

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ
FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

KONFERENCE
INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY

konané dne 13. prosince 2022

SBORNÍK

BRNO 2022

Konference Interní grantové agentury VETUNI 2022

Fakulta veterinárního lékařství

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ

z výsledků řešení projektů IGA VETUNI 2022 financovaných z prostředků účelové podpory
na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2022

Editovali:

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

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

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

Za věcnou a jazykovou správnost odpovídají autoři

Vydání první

Veterinární univerzita Brno 2022

ISBN 978-80-7305-880-7

Vážené kolegyně a kolegové, studentky a studenti,

Veterinární univerzita Brno prostřednictvím Interní grantové agentury univerzity poskytuje účelovou podporu na projekty výzkumu prováděné studenty při uskutečňování akreditovaných doktorských nebo magisterských studijních programů, který je bezprostředně spojen s jejich vzděláváním. V roce 2022 bylo na úrovni univerzity řešeno celkem 29 studentských projektů a jejich výsledky byly prezentovány na závěrečné konferenci Interní grantové agentury Veterinární univerzity Brno konané dne 13. prosince 2022.

Sborník obsahuje příspěvky zpracované řešiteli projektů pro účely prezentace na konferenci a obhajoby svých projektů, a představuje tedy výsledky výzkumu studentů VETUNI financovaného z prostředků účelové podpory na specifický vysokoškolský výzkum MŠMT na rok 2022.

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

prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D.
předsedkyně komise IGA VETUNI

OBSAH

Příspěvky FVL

Epizootologie lagovirů u zajíce polního (<i>Lepus europaeus</i>) v ČR.....	2
Experimentální čelenžní model pro hodnocení infekcí vyvolaných <i>Flavobacterium psychrophilum</i>	6
Prospektivní studie zánětů zevního zvukovodu psů s atopickou dermatitidou: vyhodnocení otoskopických, cytologických a kultivačních vyšetření.....	11
Výskyt zoonotických bakterií <i>Capnocytophaga</i> spp. v dutině ústní psů a jejich citlivost k antiseptickým složkám mukoadhezivních gelů.....	15
Možnosti inhibice koronaviřů antivirotickými látkami.....	19
Metoda qPCR pro laboratorní diagnostiku, sledování výskytu a kontrolu terapie makrorabdózy.....	23
Klasifikace a prevalence melanocytárních tumorů u koní v České republice.....	28
Imunofenotypizace lymfocytů u psů s lymfocytózou a lymfopenií.....	33
Vliv dlouze působící nesteroidní protizánětlivé látky mavacoxib na vybrané parametry ledvin a jater u psů s osteoartritidou.....	37
Sledování změn koncentrace cholesterolu v séru u psů s portosystémovým zkratem.....	41
Ultrasonografické vyšetření paranálních váčků u psů a koček.....	44
Vliv premedikace na změny tělesné teploty v průběhu celkové anestezie u psů.....	48
Vliv interní fixace fraktur na mechanické vlastnosti dlouhých kostí u koček.....	52
Vliv parenterální aplikace vitamínů na biochemické, hematologické, imunologické a antioxidační parametry telat holštýnského plemene.....	56
Použití intranazální aplikace azaperonu pro sedaci prasat v rámci zlepšení podmínek welfare.....	61

Příspěvky FVHE

Genetická struktura luňáků hnědých, luňáků červených a rozsah jejich hybridizace.....	66
Migrující draví ptáci - skrytá hrozba šíření antibiotické rezistence.....	71
Komparativní genomika a dynamika multirezistentních patogenních kmenů <i>Escherichia coli</i> u racků bělohavých a v jejich prostředí.....	75
Plazmidy v šíření rezistence k antibiotikám poslednej voľby: využitie sekvenovania novej generácie v koncepte One Health.....	79
Vliv způsobu zacházení před porážkou na stres u drůbeže.....	83
Základní klinické a biochemické parametry moči chrtů.....	87
Výskyt, detekce a druhová identifikace <i>Salmonella</i> spp. u jatečných prasat.....	91
Typizace gramnegativních bakterií rezistentních k antibiotikům a metagenomická analýza v populaci nutrie říční a vodním prostředí.....	95
Studium vlivu aktuálních mikropolutantů na embryonální a embryo-larvální stádia ryb.....	99
Vliv biofermentovaného krmiva na kvalitu hmyzího tuku.....	103
Aplikace nanoemulze z oleje z kávové sedliny v karagenanových biodegradabilních obalech.....	108
Netopýři jako rezervoár zoonotických agens: koronaviry a jejich výskyt v Evropě.....	112
Vliv ošetření vody CaviPlasmou na životnost kožovce rybího (<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>).....	116
Vliv přidavku autochtonních probiotik (<i>Lactobacillus</i> spp.) v krmivu na zdravotní stav pstruha duhového (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) po experimentální challenge <i>Aeromonas salmonicida</i>	120

Příspěvky
Fakulty veterinárního lékařství

Epizootologie lagovirů u zajíce polního (*Lepus europaeus*) v ČR

David Najt¹, Petr Lány¹, Rastislav Jurčík², Juraj Salaj³, Peter Supuka³

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno ¹; Odbor malých hospodárskych zvierat, Výskumný ústav živočíšnej výroby Nitra, Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum SK ²; VETSERVIS, S.R.O. SK ³

Úvod

Ve druhé polovině 70. let minulého století byl zaznamenán výrazný pokles stavu zaječí zvěře po celé Evropě. Nezanedbatelným faktorem ovlivňujícím populaci zajíců je zdravotní kondice, popřípadě různá infekční onemocnění. Jednou z příčin může být promoření zaječí populace kaliciviry.

Hemoragické onemocnění králíků (angl. *rabbit haemorrhagic disease* – RHD) a syndrom zajíce polního (angl. *European brown hare syndrom* – EBHS) jsou způsobeny dvěma velice příbuznými, ale fylogeneticky odlišnými viry patřícími do rodu *Lagovirus*, čeleď *Caliciviridae*. Infekce způsobené RHDV a EBHSV byly omezeny na specifické hostitele – přirozeně i experimentálně (Lenghaus *et al.*, 1994; Lavazza *et al.*, 1996; Bergin *et al.*, 2009).

Ve Švédsku byla v 80. letech 20. století zaznamenána hemoragická nákaza u zajíce polního (*L. europaeus*). Jedná se o kontagiózní onemocnění s vysokou morbiditou i letalitou. Onemocnění bylo charakterizováno poškozením jater neznámého původu. Až v roce 1989 byly nalezeny při vyšetření elektronovým mikroskopem viry podobné RHDV (Abrantes, *et al.* 2008).

První zmínka o hemoragickém onemocnění králíků pochází z roku 1984 z provincie Jiangsu v Číně. Jedná se o vysoce kontagiózní onemocnění, doprovázené výraznou hepatitidou s fatálním průběhem. Viry způsobující toto onemocnění jsou geneticky variabilní. V roce 2010 ve Francii začali náhle hynout za příznaků RHD i očkovaní jedinci ve výkrmu. Le-Gall-Reculé *et al.*, (2011) zde prokázali novou antigenní variantu RHDV, která se lišila od předchozích především tím, že nevyvolávala zkříženou imunitu s dříve známými variantami RHDV a proto byla označena jako RHDV2. Tato nová antigenní varianta se poměrně rychle rozšířila po celé Evropě – Finsko, Švédsko, Polsko (Le-Gall-Reculé *et al.*, 2011).

Ve Španělsku a později v Itálii byl zjištěn mezidruhový přenos RHDV2 a to u uhynulých zajíců polních (*L. europaeus*) (Velarde *et al.*, 2016).

Materiál a metodika

Vzorky zaječích sér ze SR z let 2016 – 2019, vzorky zaječích sér z ČR z roku 2017 a 2022,

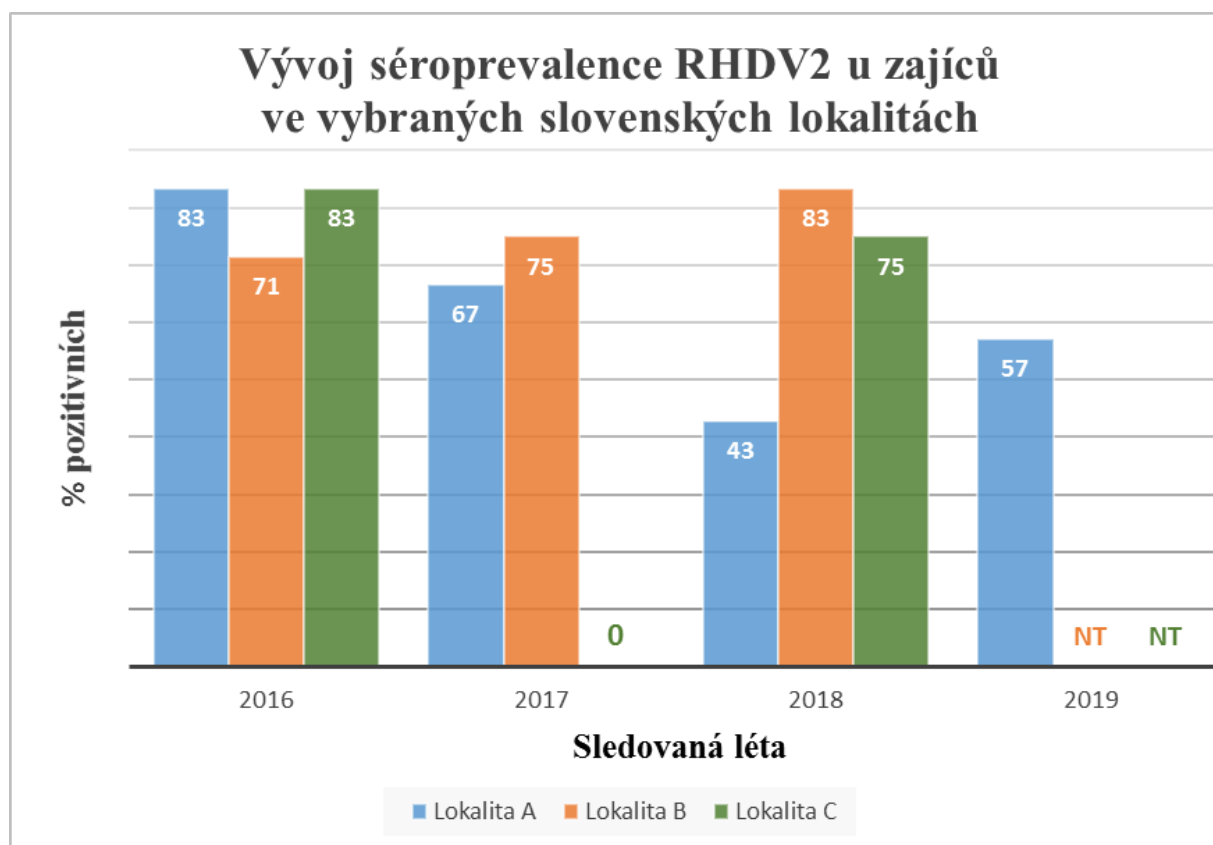
ELISA kit na průkaz protilátek EBHSV (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy), ELISA kit na průkaz protilátek RHDV2 (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy).

Výsledky

Celkově bylo testováno 230 zaječích sér z 23 lokalit České republiky a Slovenské republiky metodou ELISA na průkaz protilátek EBHSV a RHDV2.

Protilátky EBHSV byly detekovány u 223 jedinců (98,686 %, n=230). U 175 zajíců byly zjištěny protilátky proti RHDV2 (76,087 %, n=230). Pro porovnání podobný projekt proběhl i v Polsku, byly užity stejné ELISA kity a séroprevalence EBHS byla zjištěna 87,6 % (n=113), avšak u RHDV2 byla přítomnost protilátek nulová (Fitzner *et al.*, 2022). V tabulce č. 1 jsou přehledně shrnuty jednotlivé výsledky v průběhu let v České republice a Slovenské republice.

Porovnání výskytu protilátek proti RHDV2 u testovaných zajíců ve třech slovenských lokalitách v rozmezí let 2016 – 2019 je znázorněno v Grafu č. 1.



Graf č. 1: Vývoj séroprevalence RHDV2 u zajíců

Vysvětlivky: NT – netestováno

Tabulka č. 1: Výsledky testů ELISA

Testované protiřátky	Lokalita	2016			2017			2018			2019			2022		
		Počet		% pozitivních	Počet		% pozitivních	Počet		% pozitivních	Počet		% pozitivních	Počet		% pozitivních
		Celkem	Pozitivních		Celkem	Pozitivních		Celkem	Pozitivních		Celkem	Pozitivních		Celkem	Pozitivních	
EBHSV	SR	63	62	98	57	54	95	35	32	91	57	57	100	NT	NT	NT
	ČR	NT	NT	NT	5	5	100	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13	13	100
RHDV2	SR	63	50	79	57	39	68	35	26	74	57	50	88	NT	NT	NT
	ČR	NT	NT	NT	5	1	20	NT	NT	NT	NT	NT	NT	13	9	69

Vysvětlivky: NT – netestováno

Závěr

Ve vyšetřovaných vzorcích sér zajíců ze slovenských lokalit se prevalence protiřátek proti EBHSV pohybovala v rozmezí 91 – 100 %, z českých lokalit byla stoprocentní. prevalence protiřátek proti RHDV2 se ve slovenských lokalitách pohybovala v rozmezí 68 – 88 %, v českých lokalitách se prevalence pohybovala mezi 20 – 69 %.

Použitá literatura:

- Abrantes J, Esteves PJ, van der Loo W. Evidence for recombination in the major capsid gene VP60 of the rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV). *Arch Virol.* 2008;153(2):329-35. doi: 10.1007/s00705-007-1084-0. Epub 2008 Jan 14. PMID: 18193156.
- Bergin, I. L., Wise A. G., Bolin S. R., Mullaney T. P., Kiupel M., and Maes R. K., 2009: Novel calicivirus identified in rabbits, Michigan, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1955–1962.
- Fitzner A, Niedbalski W, Kęsy A, Rataj B, Flis M. European Brown Hare Syndrome in Poland: Current Epidemiological Situation. *Viruses.* 2022 Oct 31;14(11):2423. doi: 10.3390/v14112423. PMID: 36366520; PMCID: PMC9698305.

Lavazza, A., Scicluna M. T., and Capucci L., 1996: Susceptibility of hares and rabbits to the European brown hare syndrome virus (EBHSV) and rabbit haemorrhagic disease virus (RHDV) under experimental conditions. *J. Vet. Med.* B43, 401–410.

Le Gall-Reculé G, Zwingelstein F, Boucher S, Le Normand B, Plassiart G, Portejoie Y, Decors A, Bertagnoli S, Guérin JL, Marchandeu S. Detection of a new variant of rabbit haemorrhagic disease virus in France. *Vet Rec.* 2011 Feb 5;168(5):137-8. doi: 10.1136/vr.d697. PMID: 21493491.

Lenghaus, C., Westbury H., Collins B., Ratnamoban N., and Morrissy C., 1994: Overview of the RHD Project in Australia. In: Williams R., and Munro R. (eds), *Rabbit Haemorrhagic Disease: Issues in Assessment for Biological Control*. pp. 104–129. Bureau of Resource Sciences, Australian Government Printing Service, Canberra.

Velarde R, Cavadini P, Neimanis A, Cabezón O, Chiari M, Gaffuri A, Lavín S, Grilli G, Gavier-Widén D, Lavazza A, Capucci L. Spillover Events of Infection of Brown Hares (*Lepus europaeus*) with Rabbit Haemorrhagic Disease Type 2 Virus (RHDV2) Caused Sporadic Cases of an European Brown Hare Syndrome-Like Disease in Italy and Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2017 Dec;64(6):1750-1761. doi: 10.1111/tbed.12562. Epub 2016 Sep 11. PMID: 27615998; PMCID: PMC5697611.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 113/2022/FVL a podpořena Agentúrou na podporu výskumu a vývoja APVV-15-0474

Experimentální čelenžní model pro hodnocení infekcí vyvolaných *Flavobacterium psychrophilum*

Věra Vaibarová¹, Alois Čížek¹

*Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita
Brno¹*

Úvod

Flavobacterium psychrophilum je celosvětově rozšířeným původcem onemocnění lososovitých ryb, které se manifestuje dvěma různými formami: cytofagóza lososovitých ryb a anemický syndrom plůdku pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (1). Mortalita v chovech může dosahovat podle různých zdrojů až 90 % a jedná se tak o ekonomicky velmi významné onemocnění (2). K ověřování účinnosti postupů terapie, prevence a profylaxe, stejně tak jako k hodnocení virulence jsou potřebné vhodné experimentální čelenžní modely (3). Cílem této práce bylo zavést a ověřit experimentální čelenžní model na pstruhu duhovém, který se jeví jako potřebný pro výběr linií odolnějších k infekci *F. psychrophilum* a k ověření alternativních metod profylaxe a léčby, které by mohly nahrazovat dosud používanou antibiotickou terapii.

Materiál a metodika

Ryby

Celkem byly v rámci projektu provedeny tři experimentální infekce. Před dovozem byl vzorek 4 ryb kultivačně vyšetřen na přítomnost patogenních bakterií, zejména přítomnost *F. psychrophilum*. Pro první pokus byly dovezeny 5-gramové ryby z komerčního chovu. Pro druhý a třetí pokus byly dovezeny 50-gramové ryby z odchovného zařízení Mendelovy univerzity v Brně. V případě prvního a třetího pokusu probíhala po převozu do prostor uživatelského zařízení Ústavu ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel VETUNI 7-denní aklimatizační fáze za účelem navyknutí ryb na podmínky prostředí. V druhém pokusu byla infekce provedena bezprostředně po dovozu ryb. Ryby byly krmeny komerčním krmivem Efico Enviro 921, denní krmná dávka byla vypočítána na 1,7 % hmotnosti obsádky a podávána ve dvou dílčích dávkách.

Bakteriální kmeny

Dva různé izoláty *F. psychrophilum* z vlastní sbírky byly vybrány pro experimentální infekci. První izolát označený 2500s je zástupcem nejčastějšího sekvenčního typu v Evropě, ST2 (4, 5, 6), sérotyp Th. Druhý izolát 98247s je zástupce nově popsaného sekvenčního typu ST386 (7), sérotyp Fd. Oba kmeny byly uchovávány při -80°C v protektivním zamrazovacím mediu s glycerolem. Před infekcí

byly rozmrazeny a nakultivovány na TYES agar s obsahem 5 % fetálního bovinního séra a kultivovány při 17 °C 72 hodin. Kultura byla 1× subkultivována a poté byla 1 kolonie přenesena do 5 ml TYES bujonu a kultivována při 17 °C, 72 hodin. Kultura byla promíchána, stočena při 5000 rpm, 8 minut, promyta ve sterilním PBS, resuspendována v 5 ml PBS a denzita byla upravena na 8,5 °McFarland. Kultivačně byla stanovena koncentrace $1,10 \times 10^9$ CFU/ml (2500s) a $1,02 \times 10^9$ CFU/ml (98247s). Poté byla kultura upravena na koncentraci 10^8 až 10^3 pro první pokus, 10^9 pro druhý pokus a 10^9 až 10^7 pro třetí pokus.

Experimentální infekce

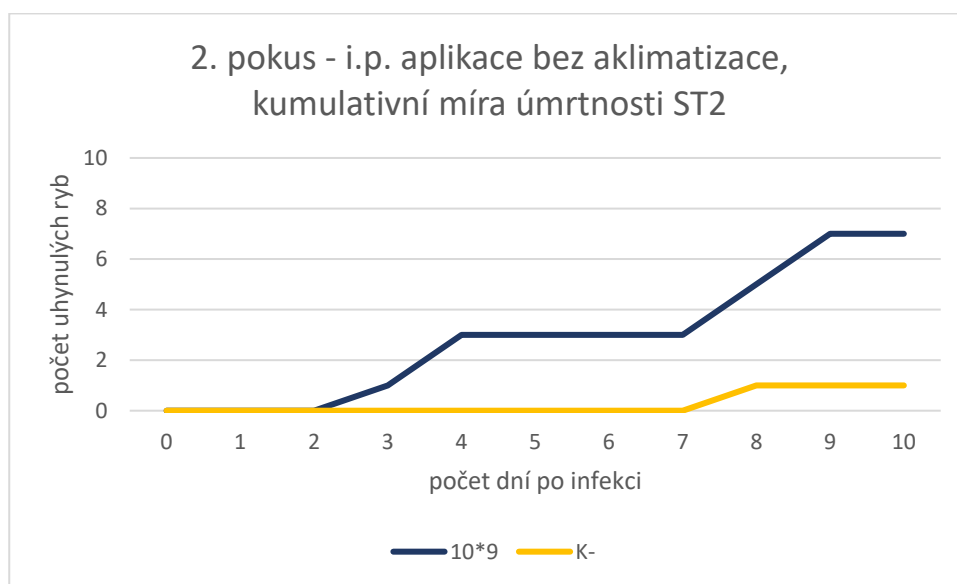
Před infekcí byla provedena anestezie ryb v hřebíčkovém oleji o koncentraci 33 mg/l (8). V prvním pokusu bylo každé ředění bakterie (10^8 - 10^3 CFU/ml) v množství 50 µl aplikováno intraperitoneálně vždy 7 rybám. Stejně velké kontrolní skupině bylo aplikováno 50 µl sterilního PBS. V druhém pokusu bylo 10 rybám aplikováno 500 µl suspenze 10^9 CFU/ml a stejně velké kontrolní skupině byl aplikován sterilní PBS. V třetím pokusu bylo vždy 7 rybám aplikováno intraperitoneálně každé ředění (10^9 - 10^7 CFU/ml) v množství 500 µl a stejně velké kontrolní skupině bylo aplikováno sterilní PBS. Poté byl po dobu 21 dnů sledován rozvoj klinických příznaků, popřípadě úmrtnost. Uhybnulé ryby byly pitvány a byla prováděna bakteriologická kultivace na TYES agar ze sleziny, žaber, popřípadě dalších patologicky změněných orgánů. Během pokusu byly pravidelně měřeny parametry vody jako teplota, pH, obsah rozpuštěného kyslíku ve vodě, koncentrace dusitanů, dusičnanů, amoniaku a chloridů. Akvária byla obden kompletně čištěna, ve zbývajících dny bylo obměňováno 80 % vody. Zbylé ryby byly na konci pokusu utraceny předávkováním hřebíčkového oleje.

Čelenžní koupel vzhledem k nepřesvědčivým výsledkům v předpokuse nebyla prováděna.

Výsledky

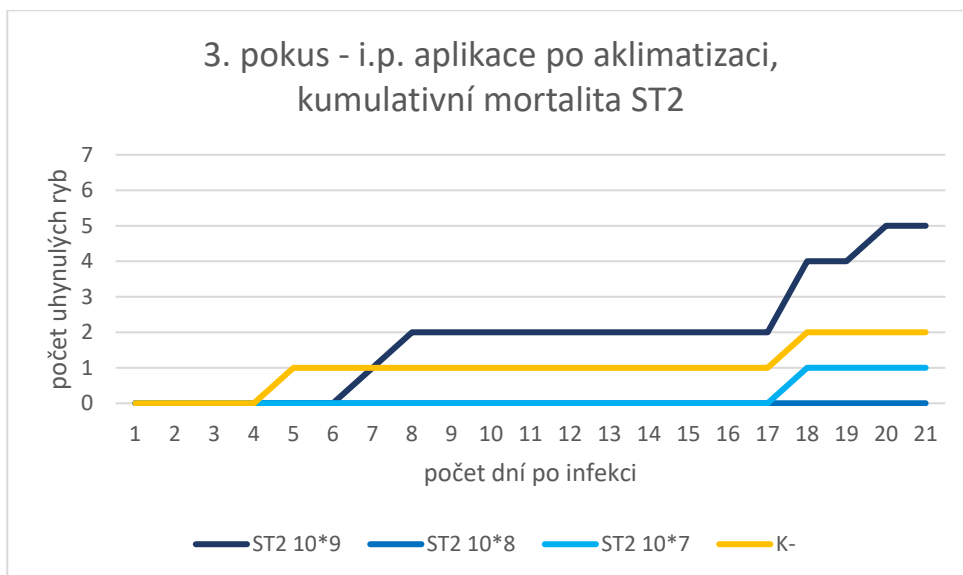
V prvním pokusu (5-gramové ryby) během aklimatizační fáze uhynula 1 ryba, slezina a žábra byly kultivačně negativní na přítomnost bakteriální infekce. Během 21 dnů sledování byl úhyn pouze minoritní (18. den – ST2 10^6 ; 20. den – ST2 10^4 , ST2 10^5 , ST386 10^8) a bez kultivačního průkazu *F. psychrophilum*. Kontrolním i infikovaným rybám byla okamžitě po utracení na konci pokusu odebrána krev pro stanovení přítomnosti protilátek ELISA metodou. Dodatečně bylo totiž zjištěno, že v chovu původu byla dříve zjištěna infekce *F. psychrophilum*, lze se proto domnívat, že ryby použité pro pokus se s bakterií v minulosti setkaly a došlo tak k jejich přirozené imunizaci, proto nebylo docíleno očekávané reakce na experimentální infekci. Analýza nám rovněž poskytne data o elevaci protilátek po experimentální infekci dvěma testovanými bakteriálními kmeny. Výsledky této analýzy zatím nejsou k dispozici.

V druhém pokusu (50-gramové ryby z odchovného zařízení MENDELU, bez aklimatizace) byla provedena infekce pouze izolátem ST2 za účelem ověřit funkčnost infekce na 50-gramových jedincích. V infikované skupině byla od prvního dne zřetelná inapetence v porovnání s kontrolní skupinou. Ryby v infikované skupině začaly hynout 3. den po infekci a úmrtnost se zvyšovala až do 9. dne, kdy mortalita dosáhla 70 %. Kumulativní mortalita je zobrazena v grafu 1. Kultivačně bylo u uhynulých ryb zjištěno ve slezině masivně *F. psychrophilum*. V kontrolní skupině uhynula jedna ryba, jednalo se pravděpodobně o důsledek traumatu během manipulace; kultivační vyšetření bylo negativní na bakteriální infekci. Pokus byl ukončen po 10 dnech z důvodu vysoké dosažené kumulativní mortality v infikované skupině, čímž byla funkčnost infekce ověřena.

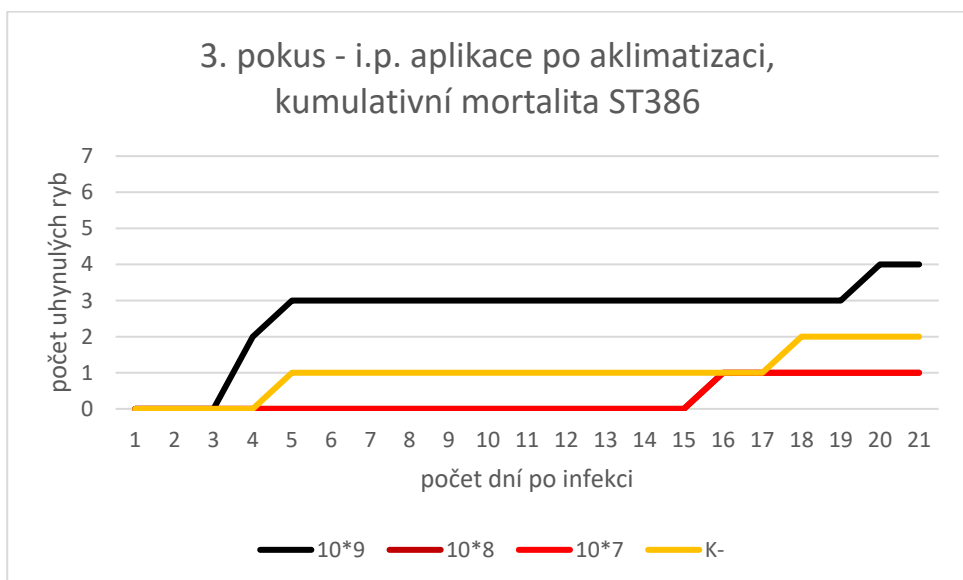


Graf 1: Kumulativní míra úmrtnosti při druhém pokusu experimentální i.p. infekce sekvenčním typem ST2 (modrá) a aplikace sterilního PBS jako negativní kontroly (žlutá).

V třetím pokusu (50-gramové ryby z odchovného zařízení MENDELU, po aklimatizaci) byly pro infekci použity ryby ze stejné kohorty, jako v případě druhého pokusu, ale po 7-denní aklimatizaci. Úhyny během fáze sledování byly nepravidelné a pro výpočet LD50 nepoužitelné. Kultivační vyšetření 2 uhynulých neinfikovaných ryb bylo negativní. Výsledky jsou znázorněny v grafu 2 a 3.



Graf 2: Kumulativní míra úmrtnosti při třetím pokusu experimentální i.p. aplikace, infekce třemi různými ředěními ST2 a aplikace PBS jako negativní kontrola.



Graf 3: Kumulativní míra úmrtnosti při třetím pokusu experimentální i.p. aplikace, infekce třemi různými ředěními ST386 a aplikace sterilního PBS jako negativní kontrola. Mortalita skupin ST386 10^8 a ST386 10^7 byly totožné a křivky se překrývají.

Během experimentů byly úspěšně nastaveny podmínky chovu tak, aby sledované parametry vody byly udržovány v přijatelných mezích. pH vody se bez ohledu na frekvenci čištění pohybovalo při horní hranici vhodné pro chov lososovitých ryb (8,7), je to dáno únikem CO_2 během provzdušňování vody a jediným řešením je okyselování vody, které by však vzhledem k frekvenci čištění vody bylo velmi problematické.

Řešitelka během listopadu 2022 absolvovala stáž v rámci IMA projektu na DTU AQUA, Dánsko, za účelem účasti na experimentálních infekcích pstruhů, které na pracovišti probíhají. Na základě

zkušeností a poznatků získaných během stáže se ukázalo, že ve vlastních experimentech byla patrně nevhodně zvolena velikost infikovaných ryb; pro úspěšné a reprodukovatelné infekce *F. psychrophilum*, na rozdíl od jiných bakteriálních původců, se na DTU Aqua osvědčily pouze ryby velikosti 1-3 gramy. Stejně tak je zapotřebí snížit teplotu vody, která se v rámci vlastních experimentů pohybovala kolem 16 °C.

Závěr

Pro úspěšné zavedení infekčního modelu bude zapotřebí dalších pokusů s využitím znalostí a poznatků získaných během dosavadních experimentálních infekcí a také během stáže na DTU Aqua.

Seznam literatury:

- 1) DUCHAUD, Eric, et al. Complete genome sequence of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. *Nature biotechnology*, 2007, 25.7: 763-769.
- 2) WOO, Patrick TK; CIPRIANO, Rocco C. (ed.). *Fish viruses and bacteria: pathobiology and protection*. CABI, 2017.
- 3) MADSEN, Lone; DALSGAARD, Inger. Reproducible methods for experimental infection with *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of aquatic organisms*, 1999, 36.3: 169-176. *organisms*, 1999, 36.3: 169-176.
- 4) NILSEN, Hanne, et al. Multilocus sequence typing identifies epidemic clones of *Flavobacterium psychrophilum* in Nordic countries. *Applied and environmental microbiology*, 2014, 80.9: 2728-2736
- 5) STREPPARAVA, Nicole, et al. Molecular epidemiology of *Flavobacterium psychrophilum* from Swiss fish farms. *Diseases of aquatic organisms*, 2013, 105.3: 203-210.
- 6) SIEKOULA-NGUEDIA, Charléne, et al. Genetic diversity of *Flavobacterium psychrophilum* isolated from rainbow trout in France: predominance of a clonal complex. *Veterinary microbiology*, 2012, 161.1-2: 169-178.
- 7) NOVÁKOVÁ, Věra, et al. Diversity of the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum* in the Czech Republic. (in preparation)
- 8) KOLÁŘOVÁ, Jitka, et al. Anestetika pro ryby. *Metodika VÚRH JU*, 2007, 77: 20.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 107/2022/FVL

Prospektivní studie zánětů zevního zvukovodu psů s atopickou dermatitidou: vyhodnocení otoskopických, cytologických a kultivačních vyšetření

Kateřina Chvátalová, Dagmar Kotlíková

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

Úvod

Otitis externa (OE) je častý zánětlivý stav zevního zvukovodu, který postihuje 10 až 20 % psů. Primární příčiny OE zahrnují alergické a endokrinní poruchy, cizí tělesa a ektoparazity. Nejčastější primární příčinou OE uváděnou v mnoha studiích jsou alergie, přičemž až 75 % diagnóz OE bývá provázeno atopickou dermatitidou. Většina případů OE je spojena s proliferací bakterií a/nebo kvasinek, z nichž zejména *S. pseudintermedius* a *Malassezia pachydermatis*, jsou uváděny jako časté sekundární příčiny OE. Mezi další patří *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp., *Streptococcus* spp. aj.. Nedávné metagenomické studie rovněž zjistily, že ve zdravém zvukovodu mohou být přítomny různé druhy bakterií včetně stafylokoků a koryneformních bakterií. Na základě těchto zjištění se předpokládá, že pestrý mikrobiom zvukovodu je pro zdravé psy optimální a lokální použití antimikrobiálních látek má potenciál vyvážený mikrobiom narušit. Proto je důležité identifikovat léčebné strategie, které se vyhýbají zbytečnému použití antimikrobik. Ovšem u rekurentních chronických případů OE bývá opakovaná antibiotická terapie nevyhnutelná a jejím možným negativním důsledkem se stává selekce rezistentních kmenů bakterií a kvasinek. Například izoláty *S. pseudintermedius* byly u 10 až 48 % případů OE rezistentní vůči meticilinu (MRSP), přičemž jedna studie ukázala, že všechny izoláty MRSP byly současně rezistentní vůči dvěma nebo více třídám antimikrobik (Lynch and Helbig, 2021; Zur et al., 2016). Rovněž existují důkazy o rezistenci *M. pachydermatis* vůči azolovým antimykotikům (Kano et al., 2019). Narůstající antimikrobiální rezistence (AMR) se v současnosti stává globální hrozbou pro lidi a zvířata. Přenos rezistentních bakterií mezi zvířata a lidmi je velmi sledovaným rizikem pro veřejné zdraví (WHO, 2015), proto jsou ve veterinární medicíně stále častěji prosazovány postupy uvážlivého nakládání s antimikrobiky a podporovány snahy ověřovat alternativní přístupy terapie, které by vedly k omezování spotřeby antimikrobik. Tyto snahy jsou uplatňovány i při léčbě OE (Jin et al., 2021; Sadeghi et al. 2021; Seo et al., 2021; Vercelli et al., 2021).

Tento projekt si kladl za cíl provést pilotní studii hodnocení otoskopických, cytologických a kultivačních nálezů z případů OE psů s atopickou dermatitidou a kontrolní skupiny zdravých psů. V navazující studii pak u vybraného souboru izolátů *S. pseudintermedius* a *M. pachydermatis* ověřit

formou experimentů in vitro účinnost vybraných antimikrobik a přípravků na bázi koloidního stříbra, studené atmosférické mikrovlnné plazmy a případně dalších alternativ k antimikrobikům.

Materiál a metodika

Klinické, otoskopické a cytologické vyšetření. Od majitelů psů, jež přichází do všeobecné ambulance KCHPK s typickými příznaky otitis externa, byly odebrány anamnéza a pečlivá anamnéza. Následovalo otoskopické vyšetření pro posouzení stavu zvukovodu a bubínku. Nálezy byly standardizovány a pečlivě zaznamenávány. Následně byly provedeny stěry z obou zvukovodů vatovým tamponem a přeneseny na podložní sklíčko. Po zaschnutí byl preparát obarven metodou DifQuick® a cytologicky hodnocen. Hodnocena byla zejména přítomnost, morfologie a počty bakterií a kvasinek. Z cytologie byly pořizovány záznamy. Zvukovody jsme dále vytřeli odběrovými tampony a ty byly vloženy do zkumavky s transportním médiem dle Amiese.

Mikrobiologické vyšetření. V diagnostické laboratoři Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie byly vzorky výtěrů zevního zvukovodu kultivovány na Columbia agar (Oxoid, VB) s 5 % ovčí citrátové krve a na Sabouraudův agar s chloramfenikolem (Oxoid, VB) a následně inkubovány 1-5 dnů při teplotě 37 °C. Během inkubace byly posuzovány růstové vlastnosti primokultur bakterií a kvasinek a prováděny subkultivace za účelem získání čistých kultur. Ty byly identifikovány na základě zhodnocení růstových vlastností, mikroskopie a vyšetřením hmotnostní spektrometrií MALDI TOF (Bruker, Německo). Identifikované bakteriální kultury byly vyšetřeny na citlivost vůči vybraným antimikrobikům diskovou difusní metodou. Kultury byly následně uchovány v kryoprotektivním médiu při -75 °C pro další vyšetření. Získané izoláty bakterií byly vyšetřeny diskovou difusní metodou (CLSI, 2018) a byla stanovena jejich citlivost vůči vybraným antimikrobikům.

Výsledky

Celkem bylo do studie zařazeno 55 psů různých plemen, stáří a pohlaví. U každého zvířete evidujeme anamnestické údaje o rozvoji klinických příznaků, případně bez klinických příznaků. Vyšetřeno bylo celkem 110 vzorků, tedy otoskopie ušního kanálu, cytologické vyšetření a kultivace se stanovením citlivosti vůči 12 vybraným antibiotikům.

Z uvedených 55 psů bylo 29 samic a 26 samců. Častější incidence onemocnění byla zaznamenána u fen, a to v poměru 20:14. Průměrný věk pacienta s otitis je 6,5 let.

Nejčastějším cytologickým nálezem (32 %) byla přítomnost velkých kokovitých bakterií, následoval jej výskyt kvasinek (30 %), malých kokovitých bakterií (26 %). Jako další byly detekovány epitelie, neutrofilie / lyzované neutrofilie či erytrocyty. Patologický nález nebyl zaznamenán u 49 (45 %) případů.

Všech 110 vzorků bylo odesláno ke kultivačnímu vyšetření na Columbia agar (Oxoid, VB) s 5 % ovčí citrátové krve a na Sabouraudův agar s chloramfenikolem (Oxoid, VB) a následně inkubovány 1-5 dnů při teplotě 37 °C. Bakteriologické kultury byly vykultivovány a typizovány z 65 (59 %) vzorků, kvasinkové pak z 26 (23 %) vzorků. Nejčastěji detekovanými patogeny byly sestupně následující: *Staphylococcus pseudintermedius* (30), *Malassezia pachydermatis* (14), *Streptococcus canis* (6), *Corynebacterium auriscanis* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (4), *Staphylococcus schleiferi* (6), *Wesella confusa* (3), *E. coli* hemolytická (2), *Enterococcus* spp. (2), *Streptococcus helichoeri* (2), *Staphylococcus intermedius* (2), *E. coli* spp. (1), *Pasteurella multocida* (1), *Proteus mirabilis* (1), *Staphylococcus chromogenes* (1), *Streptococcus dysgalactiae* (1), *Streptococcus* spp. (1). U všech izolovaných kmenů bakterií byla stanovena citlivost vůči vybraným 12 druhům antibiotik. Jednalo se o amoxicilin klavulanát (AMOX), cefalexin (CF), clindamycin (CL), colistin (COL), doxycyklin (DOX), enrofloxacin (ENR), florfenikol (FF), gentamicin (GEN), marbofloxacin (MAR), neomycin (NEO), rifaximin (RF), sulfametaxazol trimetoprim (STX).

Staphylococcus pseudintermedius, ze 30 vzorků bylo 30 citlivých na RF, AMOX, CF, GEN, NEO, DOX a FF, 26 citlivých a 4 rezistentní na STX, 29 citlivých a 1 rezistentní na MAR, 29 citlivých a 1 rezistentní na ENR, 20 citlivých a 10 rezistentních na CL, 26 citlivých a 4 rezistentní na COL. *Streptococcus canis*, z 7 vzorků bylo 7 citlivých na RF, AMOX, CF, FF, DOX, CL, COL, 6 citlivých a 1 rezistentní na GEN, 5 citlivých a 2 rezistentní na STX, MAR, ENR. *Corynebacterium auriscanis*, ze 7 vzorků bylo všech 7 citlivých na RF, GEN, FF, STX, NEO, DOX, 4 citlivé a 3 rezistentní na AMOX, CF, 5 citlivých a 2 rezistentní na MAR, CL, 3 citlivé a 4 rezistentní na MAR, 6 citlivých a 1 rezistentní na COL), *Pseudomonas aeruginosa*, bylo z celkem 5 vzorků 5 citlivých na COL, a všech 5 rezistentních na AMOX, CF, FF a DOX, 3 citlivé a 2 rezistentní na GEN, 2 citlivé a 3 rezistentní na STX, NEO, 3 citlivé a 2 rezistentní na ENR, 1 citlivý a 4 rezistentní na MAR a CL. *Staphylococcus schleiferi*, z 6 vzorků byly všechny vzorky citlivé na všechna testovaná antimikrobiotika. *Wesella confusa*, z celkem 3 vzorků byly všechny 3 citlivé na téměř všechna antimikrobika, s výjimkou CF a STX, kde byla rezistence u všech 3 vzorků. *E. coli* hemolytická byla ve všech případech citlivá na téměř všechna uvedená antimikrobika, až na GEN, kdy 1 kmen byl citlivý a 1 rezistentní. *Enterococcus* spp. byl v obou vzorcích citlivý na 11 antimikrobik, oba vzorky rezistentní na STX. *Streptococcus helichoeri*, oba vzorky byly citlivé na 11 z uváděných typů antimikrobik, 1 citlivý a 1 rezistentní na NEO. Kolonie *Staphylococcus intermedius* vykazovaly citlivost na veškerá testovaná antimikrobika. *E. coli* spp. byla citlivá na všechna testovaná antimikrobika, až na DOX. *Pasteurella multocida* je citlivá na všechna uváděná antimikrobika, vyjma COL, CL. *Proteus mirabilis* vykazuje rezistenci na DOX, CL a COL. U *Staphylococcus chromogenes* byla prokázána citlivost na všech 12

testovaných antimikrobiotik. Kolonie *Streptococcus dysgalactiae* byla rezistentní na NEO. *Streptococcus* spp. vykazoval citlivost vůči všem 12 antimikrobikům.

Závěr

Bylo potvrzeno, že v souvislosti s OE byly nejčastěji izolovány *Staphylococcus pseudintermedius* a *Pseudomonas aeruginosa* a *Malassezia pachydermatis*. Výsledky stanovení citlivosti potvrdily, že *P. aeruginosa* je multirezistentní a oproti tomu nebyl zjištěn předpokládaný výskyt multirezistence u izolátů *S. pseudintermedius*. Testování citlivosti izolátů *Malassezia pachydermatis* vůči antimykotikům kvantitativní metodou dosud nebylo zatím dokončeno. Provedením studie byla získána data a izoláty bakterií a mikroskopických hub k dalšímu výzkumu alternativních přístupů k řešení terapie *otitis externa*, který probíhá ve spolupráci s VUT Brno, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie.

Seznam literatury:

- Jin HJ, Hwang CY, Kang JH, Baek SJ, Hyun JE. In vitro antimicrobial activity of cold atmospheric microwave plasma against bacteria causing canine skin and ear infections. *Vet Dermatol.* 2021, 32(5):462-e126.
- Kano R, Yokoi S, Kariya N, Oshimo K, Kamata H. Multi-azole-resistant strain of *Malassezia pachydermatis* isolated from a canine *Malassezia dermatitis*. *Med Mycol.*; 57(3):346-350.
- Lynch, S.A. and Helbig, K.J. The Complex Diseases of *Staphylococcus pseudintermedius* in Canines: Where to Next? *Vet. Sci.* 2021, 8, 11.
- Sadeghi S, Kamrani A, Kuc U, Polissar N, Selukar S, Sadeghi S. Use of a modified Burow's solution to treat canine otitis externa: A randomised comparative clinical study. *Vet Rec.* 2021;e503.
- Seo, M., Oh, T., & Bae, S. (2021). Antibiofilm activity of silver nanoparticles against biofilm forming *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs with otitis externa. *Vet Med Sci*, 7, 1551–1557.
- Vercelli, C., Pasquetti, M., Giovannetti, G., Visionsi, S., Re, G., Giorgi, M., Gambino, G., & Peano, A. In vitro and in vivo evaluation of a new phytotherapeutic blend to treat acute externa otitis in dogs. *JVPT*, (2021), 00, 1–9.
- World Health Organization (WHO), Global action plan on antimicrobial resistance, (2015)
- Zur, G.; Gurevich, B.; Elad, D. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. *Vet. Dermatol.* 2016, 27, 468-e125.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 106/2022/FVL

Výskyt zoonotických bakterií *Capnocytophaga* spp. v dutině ústní psů a jejich citlivost k antiseptickým složkám mukoadhezivních gelů

Alena Pompová¹, Alois Čížek², Nina Čavojová³

1 - Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, 2 - Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, 3 - Magisterský studijní program – 5. ročník, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a univerzita Brno

Úvod

Capnocytophaga canimorsus je komenzální bakterie dutiny ústní psů a koček. U této bakterie je známo, že infekce kousných ran může u člověka způsobit život ohrožující stavy (Gaastra and Lipman, 2010) a představuje tak zoonotickou infekci. Mezi rizikovými faktory těchto stavů byly identifikovány imunosuprese u pacientů po transplantaci nebo s anatomicou/funkční asplenií (Shahani and Khardori, 2014). Několik přehledových článků však upozorňuje také na infekce u imunokompetentních pacientů (Mader et al., 2020). Experimenty *in vitro* prokázaly odolnost těchto bakterií vůči fagocytóze a imunitní modulaci s nízkou prozánětlivou sekrecí makrofágů. Celkově imunologické rizikové faktory během infekce jsou zatím nedostatečně objasněny. Infekce se může vyvinout v klinický obraz podobný sepsi, který vede k těžké diseminaci intravaskulární koagulace, multiorgánové selhání s fatálním koncem. Výskyt infekcí u lidí je celkově podhodnocen díky náročnosti kultivace a identifikace těchto bakterií. V ČR byly doposud popsány a publikovány dva případy těchto infekcí (Hloch et al. 2014; Prasil et al., 2020). Zajímavé je, že také *C. canis* a *C. cynodegmi* byly popsány jako druhy způsobující život ohrožující infekce, i když s nízkou incidencí ve srovnání s *C. canimorsus* (Taki et al., 2018). S ohledem na vzrůstající počty publikovaných případů infekcí v souvislosti s poraněním psem nebo kočkou (29 publikací za období 2017-2021, WoS) je třeba, aby veterinární lékaři věnovali více pozornosti osvětě mezi majiteli zvířat a měli k dispozici vhodná preventivní opatření, která by bránila vzniku infekcí zejména u imunokompromitovaných chovatelů psů a koček. Předmětem tohoto projektu bylo zjistit zastoupení *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* v mikroflóře dutiny ústní psů a ověřit možnosti jejich dekolonizace. To je také jeden z diskutovaných cílů globálního konsorcia The global *Capnocytophaga* Consortium, které zahájilo činnost v září 2021.

Materiály a metodika

Mikrobiologické vyšetření:

(i) *Studie výskytu Capnocytophaga* spp.

Tamponové stěry sliznice dásní a povrchu zubů byly odebrány do transportního média dle Amiese. Kultivace byla provedena na Heart Infusion agaru (Oxoid, VB) s 10 % sterilní koňské krve a 25 mg gentamicinu na litr média. Inkubace probíhala v atmosféře 10 % CO₂ při 37 °C po dobu 2 až 5 dnů. Suspektní kolonie byly identifikovány hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF s nástavbou Biotyper (Bruker, Německo) s aktuální databází profilů bakteriálních kultur rozšířenou o spektra kmenů *C. canimorsus* DSM19204, *C. cynodegmi* DSM19736 a *C. canis* DSM101831. Získané kultury byly uchovány v kryoprotektivním médiu při – 80 °C pro další typizaci.

(ii) *Stanovení citlivosti ke koloidnímu roztoku nanočástic stříbra a sloučeninám s antiseptickým účinkem (chlorhexidin apod.)*

Ke stanovení citlivosti byly využity metodiky mikrodilučního stanovení MIC a MBC (VET01, CLSI, 2020; Zdražilová et al., 2015). Výchozí roztok nano stříbra (5000 p.p.m.) a dalších testovaných substancí byl recipročně ředěn v Mueller-Hintonově bujónu (Oxoid, VB) v mikrotitračních destičkách a zaočkován multiinokulátorem na denzitu 1×10^5 KTJ příslušného bakteriálního kmene včetně kontrolních kmenů *E. coli* ATCC[®]25922 a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC[®]27853 (VET01, CLSI). Hodnoty MIC byly odečteny jako nejnižší koncentrace potlačující množení testované kultury.

Hodnoty MBC byly odečteny po subkultivacích z jamek s inhibicí růstu, jako nejnižší koncentrace testovaných látek, které devitalizovaly všechny buňky inokula.

(iii) *Ověření dekolonizace a rekolonizace sliznice DÚ*

Na základě výsledků MIC byly k aplikaci vybrány dva komerční mukoadhezivní gely, jeden s účinnou látkou ve formě aktivního stříbra a druhý s chlorhexidinem. Ty byly aplikovány u těch psů, kteří byli v předběžném testování pozitivní na *C. canimorsus*. Kontrolní odběry (stěry dásní a zubů) byly prováděny před aplikací gelu a následně 4., 7. a 10. den aplikace. Týden po ukončení aplikace byl odebrán poslední kontrolní stěr. Všechny odběry byly podrobeny kultivačnímu průkazu příslušných agens a současně byla izolována DNA k jejich průkazu ve vzorcích metodou PCR.

Výsledky

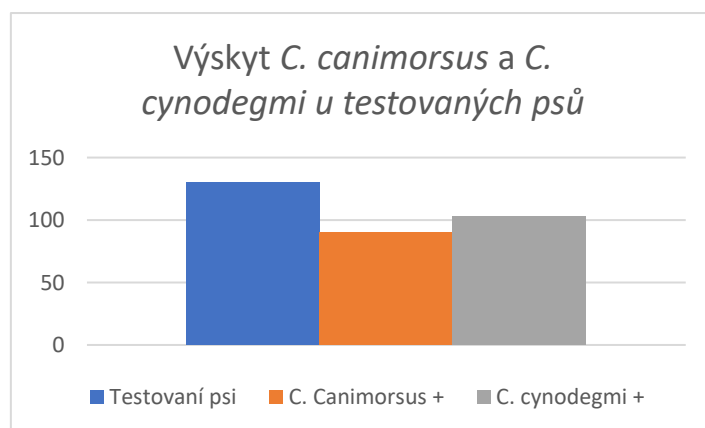
Celkem bylo na přítomnost *C. canimorsus* otestováno 130 psů obou pohlaví, různého věku a patřícím k různým plemenům. Z tohoto souboru bylo *C. canimorsus* pozitivních 90 psů (69 %), na *C. cynodegmi* 103 psů (79 %).

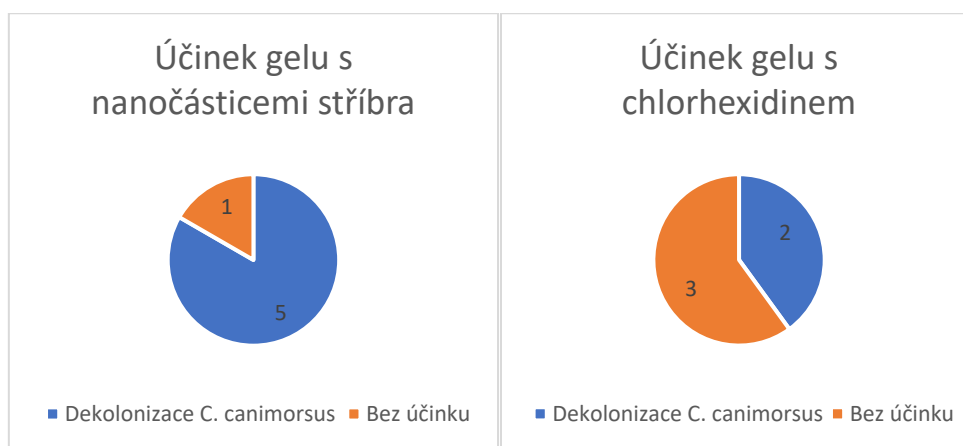
Majitelé pozitivních psů, kteří při úvodním testování projeví zájem o účast v dalším testování, byli požádáni o dodání kontrolního vzorku. Po potvrzení positivity do dalšího testování vstoupilo 11 psů, kteří byli rozděleni do 2 skupin. Jedné skupině byl aplikován mukoadhezivní gel s obsahem aktivního stříbra, druhé s obsahem chlorhexidinu. U obou látek byl v testech *in vitro* potvrzen inhibiční účinek vůči *C. canimorsus*. U aktivního stříbra odpovídala MIC (minimální inhibiční koncentrace) *in vitro* 0,000015% roztoku, u chlorhexidinu 0,00062% roztoku. Vybrané komerčně vyráběné mukoadhezivní gely obsahovaly 0,02 % nanočástic stříbra a 19,8 % chlorhexidinu. Majitelé psů následně dle instrukcí aplikovali gel a odebírali vzorky pro stanovení přítomnosti *C. canimorsus*.

Ve skupině psů, u kterých byl aplikován mukoadhezivní gel s aktivním stříbrem, došlo při opakované aplikaci gelu u 5 psů k eliminaci *C. canimorsus*. U 1 psa z této skupiny se efekt účinné látky neprojevil a jeho vzorky byly po celou dobu aplikace gelu *C. canimorsus* pozitivní.

Ve skupině s aplikací mukoadhezivního gelu s obsahem chlorhexidinu se inhibiční efekt účinné látky projevil u 2 psů – u jednoho došlo k eliminaci *C. canimorsus* již do doby druhého kontrolního odběru (4. den aplikace gelu), u druhého se projevil do odběru čtvrtého (10. den aplikace gelu). U zbylých 3 psů se inhibiční efekt chlorhexidinu neprojevil a jejich vzorky byly po celou dobu aplikace gelu *C. canimorsus* pozitivní.

V případě *C. cynodegmi* se *in vivo* inhibiční účinek obou účinných látek ukazuje spíše jako zanedbatelný.





Nanočástice stříbra										
Pes	Odběr před aplikací		4. den		7. den		10. den		17. den	
	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
3	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
4	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
6	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Chlorhexidin										
Pes	Odběr před aplikací		4. den		7. den		10. den		17. den	
	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR	Kultivace	PCR
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
5	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Závěr

Nanočástice stříbra se v dekolonizaci *C. canimorsus* z dutin ústní psů jeví slibněji než chlorhexidin. Ve studii by se mělo nadále pokračovat s větším počtem psů a v delším časovém horizontu. Vhodné by bylo také využít RT PCR pro kvantifikaci kolonizace dutin ústních. V případě bakterie *C. cynodegmi* se *in vivo* inhibiční účinek obou účinných látek ukazuje spíše jako zanedbatelný.

Seznam literatury

- Hloch O, Mokra D, Masopust J, Hasa J, Charvat J. Antibiotic treatment following a dog bite in an immunocompromized patient in order to prevent *Capnocytophaga canimorsus* infection: a case report. *BMC Res Notes*. 2014;7:432. doi:[10.1186/1756-0500-7-432](https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-432)
- Prasil P, Ryskova L, Plisek S, Bostik P. A rare case of purulent meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic – case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*. 2020;20(1):100. doi:[10.1186/s12879-020-4760-2](https://doi.org/10.1186/s12879-020-4760-2)
- Gaastra W, Lipman LJA. *Capnocytophaga canimorsus*. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):339-346. doi:[10.1016/j.vetmic.2009.01.040](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.01.040)
- Shahani L, Khardori N. Overwhelming *Capnocytophaga canimorsus* infection in a patient with asplenia. *BMJ Case Rep*. 2014;2014:bcr2013202768. doi:[10.1136/bcr-2013-202768](https://doi.org/10.1136/bcr-2013-202768)

Mader N, Lührs F, Langenbeck M, Herget-Rosenthal S. *Capnocytophaga canimorsus* - a potent pathogen in immunocompetent humans - systematic review and retrospective observational study of case reports. *Infect Dis (Lond)*. 2020;52(2):65-74. doi:[10.1080/23744235.2019.1687933](https://doi.org/10.1080/23744235.2019.1687933)

Taki M, Shimojima Y, Nogami A, et al. Sepsis Caused by Newly Identified *Capnocytophaga canis* Following Cat Bites: *C. canis* Is the Third Candidate along with *C. canimorsus* and *C. cynodegmi* Causing Zoonotic Infection. *Intern Med*. 2018;57(2):273-277. doi:[10.2169/internalmedicine.9196-17](https://doi.org/10.2169/internalmedicine.9196-17)

VET01S Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals, 5th Edition. Published online October 30, 2020.

Zadrzilova I, Pospisilova S, Masarikova M, et al. Salicylanilide carbamates: Promising antibacterial agents with high in vitro activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2015;77:197-207.

doi:10.1016/j.ejps.2015.06.009

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 104/2022/FVL

MOŽNOSTI INHIBICE KORONAVIRŮ ANTIVIROTICKÝMI LÁTKAMI

POSSIBILITIES OF CORONAVIRUS INHIBITION BY ANTIVIRAL AGENTS

¹Klára Klíčová; ¹Jan Chloupek; ²Lucie Janíček Hrubá
¹ Ústav farmakologie a farmacie Veterinární univerzita Brno
²Ústav infekčních chorob a mikrobiologie Veterinární univerzita Brno

Úvod

Do čeledi *coronaviridae* náleží RNA viry vyvolávající respirační a střevní onemocnění savců a ptáků. Tato práce se zaměřuje na kmen CCoV, neboli psí koronavirus. Na základě vědeckých studií bylo prokázáno, že je (*canine corona*) rozšířen zejména v chovatelských stanicích nebo útulcích. Základní charakteristikou tohoto viru je především nízká mortalita, avšak vysoká morbidita infikovaných jedinců (Esposito et al.,2020). Dle studie Decaro et al.,2008 dospělý pes vyznačující se silným imunitním systémem, může být infikován virem, avšak nemusí mít žádné klinické příznaky a stává se tak přímým popřípadě nepřímým vektorem viru zejména pro jedince se slabou imunitou. Virus se může do organismu dostat přes dutinu nosní, kdy napadá respirační systém a kde následně může způsobit akutní poškození plic, nebo se dostává do těla přes dutinu ústní, kdy napadá trávicí systém a způsobuje masivní záněty (Maumud MS et al.,2021).

Světová organizace pro zdraví zvířat (WOAH) označila Covid-19 jako „emerging disease“, tedy se jedná o novou infekci způsobenou změnou již existujícího patogenu. Současná světová epidemiologická situace zvyšuje snahu o nalezení účinné antivirové terapie, která by zlepšila šance infikovaných jedinců překonat klinicky vzrůstající koronavirovou infekci. Snaha o nalezení reálně fungujícího antivirotika stále intenzivně probíhá na úrovni klinických studií.

Například látky ze skupiny kanabioindů, se dle vědecké studie Decaro et al.,2008 vyznačují účinky podporující imunitní systém organismu zasaženého onemocněním Covid-19. Konkrétně se jedná o sekundární metabolity produkované rostlinou *Canabis sativa* – CBD - canabidiol a CBG - canabigerol, které potlačují vstup viru do buňky down-regulací buněčných receptorů. CBD mimo jiné zmírňuje nekontrolovatelnou produkci cytokininů, které způsobují akutní poškození plic a má též inhibiční potenciál pro postcovidové fibrózy (Costela-Ruiz, et al.2020; Lowe et al. 2017).

Cílem této práce je stanovení inhibiční aktivity vybraných látek, které tlumí replikaci psího koronaviru in vitro.

Materiál a metodika

Antivirotická aktivita testovaných látek byla provedena na modelu psího koronaviru (sbírkový kmen - ATCC; VR-2068; canine coronavirus modified), kultivovaného na buněčné kultuře CRFK (Crandel-ress feline cells – kočičí ledvinové buňky).

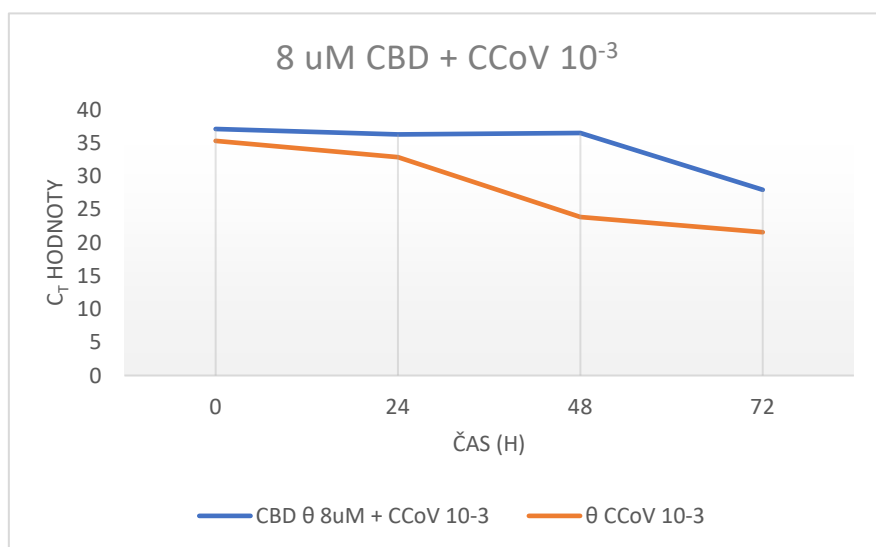
V plánovaných experimentech byl testován vliv rostlinných cytokininů, jejich derivátů a kanabinoidů. Testované substance byly testovány v několika předem stanovených ředění. U každého

ředění testované látky byla nejprve stanovena úroveň cytotoxicity pro použitou buněčnou linii. Stanovená netoxická koncentrace testované substance byla následně aplikována na buněčný monolayer. Po hodinové inkubaci v termostatu při 37 °C a za přítomnosti 5 % CO₂, byly buňky infikovány virem. Po 48 – 72 hodinách inkubace byl pozorován cytopatický efekt viru, který byl porovnán s pozitivní a negativní kontrolou. Inhibice viru byla následně kvantifikována prostřednictvím RT-qPCR a stanovení hodnoty TCID₅₀.

Výsledky

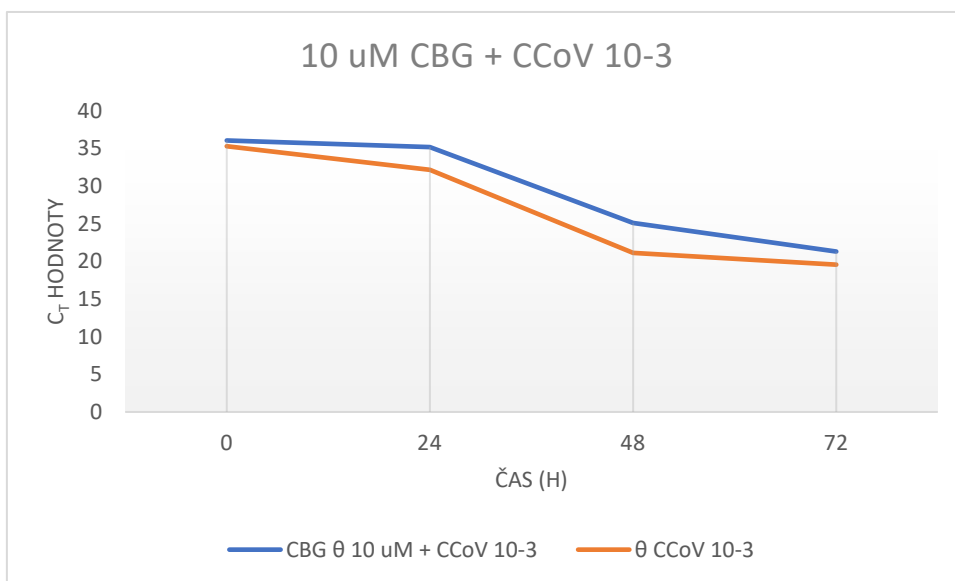
V experimentech byly testovány následující substance: CBD; CBG a interně označené fytohormony HM a KT, které byly získány od spolupracujícího pracoviště. Kanabinoidy se vyznačovali poměrně vysokou cytotoxicitou a na základě jejího stanovení byla nalezena bezpečná koncentrace: CBD 8 uM a CBG 10 uM. CBD prokazatelně zpomaloval množení viru ve srovnání s kontrolou, zejména po 48 hod. inkubaci. Po dalších 24 hodinách byl tento rozdíl vyrovnán. V případě testované substance HM, byla stanovena bezpečná koncentrace 200 uM a v rámci testování inhibice replikace viru prokazatelně inhibuje replikaci

Graf č.1: Porovnání C_t hodnot **kanabidiolu** (CBD) s pozitivní kontrolou



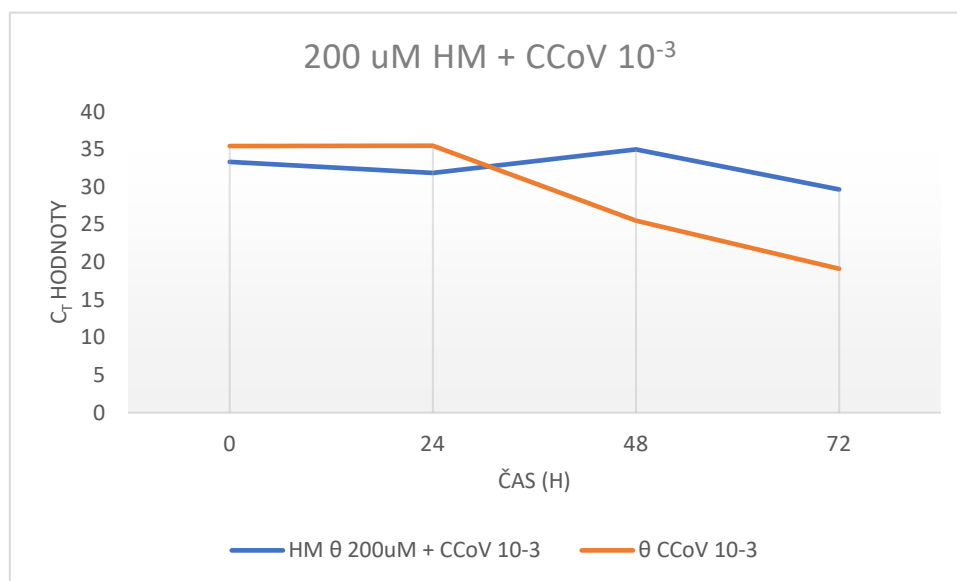
Po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti kanabidiolu došlo k poklesu titru viru 10³ x ve srovnání s kontrolou, avšak do třetího dne byl titr viru s kontrolou srovnatelný.

Graf č.2: Porovnání C_t hodnot **kanabigerolu** (CBG) s pozitivní kontrolou



Po 24 hodinové kultivaci v přítomnosti kanabigerolu došlo k mírnému poklesu titru viru ve srovnání s kontrolou, avšak do třetího dne byl titr viru s kontrolou srovnatelný.

Graf č.3: Porovnání C_t hodnot **HM** s pozitivní kontrolou



Během 72-hodinové kultivace v přítomnosti HM došlo k poklesu titru viru $1,2 \cdot 10^3$ x ve srovnání s kontrolou.

Závěr

Na základě dosavadních výsledků, lze konstatovat, že zkoušené látky ze skupiny kanabinoidů (CBG; CBD) vykazují slabý antivirotický účinek. Rostlinné cytokininy se jeví mnohem zajímavější, konkrétně substance interně označená HM o koncentraci 200 μ M.

Seznam literatury

1. Costela-Ruiz, V. J., Illescas-Montes, R., Puerta-Puerta, J. M., Ruiz, C., & Melguizo-Rodríguez, L. (2020). SARS-CoV-2 infection: The role of cytokines in COVID-19 disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 54, 62–75. doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.06.001
2. Decaro N, Buonavoglia C. An update on canine coronaviruses: viral evolution and pathobiology. *Vet Microbiol.* 2008 Dec 10;132(3-4):221-34. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.06.007. Epub 2008 Jun 12. PMID: 18635322; PMCID: PMC7117484.
3. Drechsler, Yvonne, Elton J. R. Vasconcelos, Lisa M. Griggs a Pedro P. P. V. Diniz. CRFK and Primary Macrophages Transcriptomes in Response to Feline Coronavirus Infection Differ Significantly. *Frontiers in Genetics* [online]. 2020, 11 [cit. 2022-06-20]. ISSN 1664-8021. Dostupné z: doi:10.3389/fgene.2020.584744
4. Esposito G, Pesce M, Seguella L a kol. Potenciál kanabidiolu v pandemii COVID-19. *Br J Pharmacol* . 2020;177(21):4967-4970. doi:10.1111/bph.15157
5. Lowe, H. I., Toyang, N. J., McLaughlin, W. 2017: Potential of Cannabidiol for the Treatment of Viral Hepatitis. *Pharmacognosy research*. 9(1), 116–118. doi.org/10.4103/0974-8490.199780
6. Mahmud MS, Hossain MS, Ahmed ATMF, Islam MZ, Sarker ME, Islam MR. Antimicrobial and Antiviral (SARS-CoV-2) Potential of Cannabinoids and *Cannabis sativa*: A Comprehensive Review. *Molecules*. 2021;26(23):7216. Published 2021 Nov 28. doi:10.3390/molecules26237216

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 109/2022/FVL

Metoda qPCR pro laboratorní diagnostiku, sledování výskytu a kontrolu terapie makrorabdózy.

Lenka Vrbasová¹, Dobromila Molinková², Štěpán Zídek³, Daniel Obdržálek⁴, Petr Linhart⁵, Zdeněk Knotek¹

¹ *Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců*, ² *Ústav infekčních chorob a mikrobiologie*, ³ *Student MSP, Fakulta veterinárního lékařství*, ⁴ *Student MSP*, ⁵ *Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzity Brno, ČR*

Úvod

Makrorabdóza je celosvětově rozšířené onemocnění gastrointestinálního traktu ptáků kvasinkového původu (Tomaszewski et al. 2003). Bylo popsáno u ptáků v zájmových i produkčních chovech a rovněž u mnoha volně žijících druhů (Phalen 2014). Incidence onemocnění se zvyšuje (Marlier et al. 2006). Patří mezi nejčastější příčiny úhynu v chovech andulek a drobných pěvců (Marlier et al. 2006). Původce onemocnění *Macrorhabdus ornithogaster* (MO) kolonizuje proventrikulus a ventrikulus ptáků. Změny, které zde působí, vedou především k maldigesci, malabsorbci, postupnému chřadnutí a úhynu ptáků. Nebyl popsán v jiných orgánech, u savců ani volně v přírodě (Hanafusa et al. 2013). K infekci dochází orofekálně a krměním mláďat. Nepravidelné vylučování původce trusem znesnadňuje intravitální diagnostiku. Za diagnostický standard je považováno postmortální vyšetření žaludku (Phalen 2014). Kultivace je náročná a pro běžnou diagnostiku se nevyužívá (Hanafusa et al. 2007). Metoda kvantitativní PCR (qPCR) trusu v porovnání s běžně v ambulancích využívaným mikroskopickým vyšetřením trusu umožňuje intravitálně zachytit jedince, kteří by unikli diagnostice (Sullivan et al. 2017, Vrbasová et al. 2020). Díky vysoké senzitivitě umožňuje sledovat odezvu na léčbu. To se jeví jako významný aspekt z důvodu častého výskytu rezistentních kmenů (Phalen 2014).

Materiál a metodika

Pro verifikaci metody qPCR trusu pro intravitální diagnostiku *Macrorhabdus ornithogaster* pozitivních jedinců bylo vyšetřeno celkem 100 kadaverů. Kadavery pocházely z 11 chovů (6 MO pozitivních, 5 o neznámé epizootologické situaci). Sledovaná skupina byla složena z 8 ptačích druhů (řád *Psittaciformes* 83, řád *Passeriformes* 17 jedinců). Zastoupení pohlaví v souboru bylo 46 samců 54 samic. U všech kadaverů bylo provedeno cytologické vyšetření trusu, cytologické vyšetření otisku žaludku a qPCR vyšetření trusu. Po odečtení qPCR trusu byla u všech negativních vzorků (46 vzorků) provedena qPCR stěru žaludku. Pro ověření použité metody bylo také 20 kadaverů pozitivních (stanoveno metodou qPCR trusu) podrobena párovému qPCR vyšetření stěru žaludku.

Pitva, odběr vzorků a cytologické vyšetření byly provedeny na pitevně a v ambulanci Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců Veterinární univerzity Brno. U každého jedince byl zhotoven nátěr

trusu a otiskový preparát sliznice žaludku. Vzorky byly fixovány plamenem, obarveny (Diff-Quick) a vyšetřeny optickým mikroskopem s imerzí (zvětšeno 1000x). Od každého kadaveru byl rovněž odebrán vzorek trusu a proveden stěr žaludku pro qPCR (vzorky skladovány při teplotě -18 °C). Izolace a purifikace DNA pro qPCR a qPCR stanovení proběhlo v laboratořích Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie Veterinární univerzity Brno. Pro extrakci DNA z trusu bylo použito 180 mg vzorku. K izolaci a purifikaci DNA byl použit kit NucleoSpin DNA (Machery-Nagel, Německo) podle návodu výrobce. Pro extrakci DNA ze stěrů žaludeční sliznice byl použit kit NucleoSpin DNA blood (Machery-Nagel, Německo). Stěr žaludku byl vložen do zkumavky s 500 µl fosfátového pufru (PBS), vortex 5 sekund, dále bylo postupováno podle návodu výrobce. Do každé sady byla vložena negativní kontrola pro průběžnou kontrolu kontaminace. Extrahovaná DNA byla uchována při -18 °C. Složení reakční směsi na jeden vzorek: 10 µl Luna® Universal qPCR Master Mix (New England BioLabs, USA), 6 µl PCR H₂O, 400 nM forward primer (Sekvence 5'-3'GGGATCGGGTGGAGTTTAAATAG), 400 nM reverse primer TTTCAGCCTTGCGACCATAC (produkt: pozice 1016-1110, 94 bp), 2 µl templátové DNA. Reakce probíhala v termocykleru LightCycler 480 Real Time PCR Instrument (Roche, Švýcarsko) dle programu: úvodní denaturace 95 °C 3 minuty, 40 cyklů, denaturace 95 °C 5 sekund, annealing a extenze 60 °C 30 sekund ukončeno chlazením 40 °C 30 minut). Pro každé vyšetření byla použita negativní a pozitivní kontrola. U všech vzorků byla odečtena amplifikační křivka a ověřen bod denaturace pomocí křivky tání porovnáním s pozitivní kontrolou.

Využitelnost staršího (suchého) trusu pro screening přítomnosti *MO* v zájmových chovech drobného ptactva byla ověřena porovnáním výsledků qPCR u 25 pozitivních párových vzorků čerstvého a suchého trusu (skladované po dobu 2 let při pokojové teplotě).

Monitoring rozšíření *MO* v zájmových chovech v České republice, byl proveden retrospektivně. Vzorky trusu odebrané na Celonárodní výstavě kanárů, kříženců a evropského ptactva K1 Brno 2018 byly vyšetřeny metodou qPCR. Z 391 bodovacích klecí byl náhodně odebrán trus od 102 (26 %) jedinců. Soubor zahrnoval 32 z celkového počtu 39 chovů (85 % chovů) ze 17 okresů a 7 krajů ČR. Metody qPCR trusu a mikroskopického vyšetření nátěru trusu bylo použito ke kontrole léčby v chovu kanárů s klinicky probíhající makrorabdózou. V první fázi byly podávány: 1. Acidomid 10 ml/l, 2. benzoan sodný v průběhu týdenní adaptace v dávce 1 g/l, dále v dávce 2,5 g/l vody, 3. terbinafin 250 mg/250 ml pitné vody. Bez ohledu na zvolený režim ptáci dostávali probiotika, vitamíny a imunoglukany. Po 8 týdnech byla provedena kontrola trusu. S ohledem na neuspokojivý výsledek bylo přistoupeno k druhé fázi, ve které byl všem jedincům podáván ve vodě rozpustný amfotericin B (Fungizone suspenze 100 mg/ml v dávce 1 ml/l vody). Kontrola trusu proběhla po 6 týdnech.

Abychom ověřili přenos původce z rodičů na potomstvo, bylo u 16 qPCR trusu pozitivních chovných párů vždy od jednoho z mláďat v době odstavu odebrán a vyšetřen trus.

Normální rozložení proměnných v souboru dat bylo testováno pomocí testu Shapiro-Wilk. Nenormálně rozložené proměnné byly analyzovány pomocí Wilcoxonova párového testu. Četnosti výskytu pozitivních záchytů *MO* byly analyzovány pomocí chí-kvadrát testu metodou kontingenčních tabulek. Všechny analýzy byly provedeny s pomocí statistických softwarů Unistat verze 6.0.07 a Statsoft Statistica v.12.

Výsledky

Pro verifikaci metody qPCR trusu pro intravitální diagnostiku *MO* pozitivních jedinců bylo vyšetřeno 100 kadaverů. Ze 100 vzorků trusu byla cytologickým vyšetřením potvrzena přítomnost *MO* u 34 vzorků, metodou qPCR u 54 vzorků. Metodou qPCR trusu byla pravděpodobnost záchytu původce statisticky významně vyšší než cytologickým vyšetřením nátěru ($p < 0,01$). Cytologickým vyšetřením otisku sliznice žaludku (diagnostický standard) bylo diagnostikováno 50 pozitivních vzorků. U všech 46 kadaverů s negativním vyšetřením trusu (metodou qPCR) bylo následně provedeno vyšetření qPCR stěru žaludků. Všechny vzorky negativní metodou qPCR trusu byly negativní také metodou qPCR stěru žaludku (100 %). Vyšetření qPCR stěru žaludku bylo provedeno rovněž u 20 kadaverů s pozitivním záchytem *MO* v trusu metodou qPCR. Všechny 20 vyšetřených vzorků bylo pozitivní také při vyšetření qPCR stěru žaludku. Z výsledků studie vyplývá, že qPCR trusu bylo schopno v 100% diagnostikovat pozitivní jedince v námi vyšetřovaném souboru. Jevilo se býti spolehlivější metodou než mikroskopie otisku žaludku, kterou bylo zachyceno 92,59 % (50/54) pozitivních jedinců ($p = 0,6711$) (Tab.č.1a,b).

Tab. 1a. Výsledky diagnostiky *Macrorhabdus ornithogaster* stanoveny různými metodami.

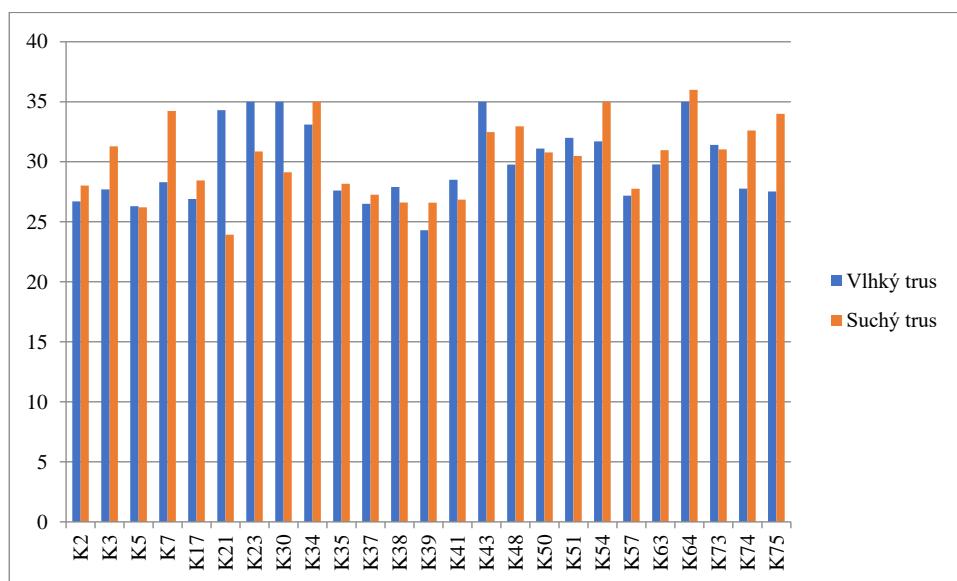
		Mikroskopické vyšetření trusu		qPCR vyšetření trusu		Mikroskopické vyšetření žaludků	
Kategorie	n	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní
Všechny kadavery	100	34	66	54	46	50	50
Samců	46	13 (28,26 %)	33 (71,74 %)	21 (45,65 %)	25 (54,35 %)	18 (39,13 %)	28 (60,87 %)
Samic	54	21 (38,89 %)	33 (61,11 %)	33 (61,11 %)	21 (38,89 %)	32 (59,26 %)	22 (40,74 %)
<i>Psittaciformes</i>	83	24 (28,92 %)	59 (71,08 %)	40 (48,19 %)	43 (51,81 %)	36 (43,37 %)	47 (56,63 %)
<i>Passeriformes</i>	17	10 (58,82 %)	7 (41,18 %)	14 (82,35 %)	3 (17,65 %)	14 (82,35 %)	3 (17,65 %)

Tab. 1b. Ověření spolehlivosti qPCR vyšetření trusu pro diagnostiku *Macrorhabdus ornithogaster* pozitivních jedinců porovnáním s qPCR vyšetřením stěru žaludku.

qPCR vyšetření trusu		Mikroskopické vyšetření trusu		qPCR vyšetření stěru žaludku		Mikroskopické vyšetření žaludků	
Kategorie	n	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní	Pozitivní	Negativní
Všechny negativní vz.	46	0	46 (100 %)	0	46 (100 %)	0	46 (100 %)
Výběr pozitivních vz.	20	11 (55 %)	9 (45 %)	20 (100 %)	0	16 (80 %)	4 (20 %)

U vybraných 25 qPCR pozitivních vzorků vlhkého (čerstvého) trusu, u kterých byly metodou qPCR vyšetřeny také párové vzorky suchého (staršího) trusu, neovlivnil statisticky významně způsob zpracování a uchování trusu výsledek vyšetření ($p = 0,2783$) (Tab. č.2).

Tab. 2. Stanovení *Macrorhabdus ornithogaster* metodou qPCR v párových vzorcích vlhkého (čerstvého) a suchého (staršího) trusu stanovením hodnoty Ct (kvantifikace v cyklech, umožňuje citlivě zachytit rozdíl v množství patogenu ve vzorcích, čím dříve začne křivka narůstat, tím více patogenní DNA bylo v původním materiálu).



Screening rozšíření kvasinky *MO* v zájmových chovech v České republice (retrospektivní stanovení z roku 2018), prokázal *MO* metodou qPCR trusu u 25,5 % (26/102) vyšetřených jedinců. Promořenost vyšetřených chovů byla 53,1 % (17/32). *MO* byl prokázán ve 13 z celkového počtu 17 vyšetřených okresů a v 6 z vyšetřených 7 krajů.

Metodou qPCR trusu a cytologickým vyšetřením nátěru trusu byly vyhodnoceny nálezy před a po léčbě při použití 4 terapeutických protokolů (Tab.č.3).

Tab. 3. Posouzení výsledku léčby metodou qPCR a mikroskopického vyšetření trusu při použití čtyř terapeutických protokolů.

Použitý přípravek	Vyšetřovací metoda	Před léčbou		Po léčbě	
		pozitivní (ks)	pozitivní (%)	pozitivní (ks)	pozitivní (%)
Acidomid n = 6	Mikroskopie trusu	4	66,67	6	100,00
	qPCR trusu	6	100,00	6	100,00
Benzoan sodný n = 13	Mikroskopie trusu	7	53,85	10	76,92
	qPCR trusu	13	100,00	11	84,62
Terbinafin n = 8	Mikroskopie trusu	3	37,50	6	75,00
	qPCR trusu	8	100,00	6/6	100,00
Amfotericin B n = 32	Mikroskopie trusu	14	43,75	5	15,63
	qPCR trusu	32	100,00	5	15,63

Vyšetřením souboru 16 mlád'at pozitivních párů (od každého páru bylo v době odstavu vyšetřeno jedno mládě) byl metodou qPCR trusu původce potvrzen u 81,25 % (13/16), mikroskopicky v trusu u 43,75 % (7/16) mlád'at ($p = 0,0679$).

Literatura

- HANNAFUSA, Y., BRADLEY, A., TOMASZEWSKI, E., LIBAL, M.C., PHALEN, D.N. Growth and metabolic characterization of *Macrorhabdus ornithogaster*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2007, 19, 256-265.
- HANNAFUSA, Y., COSTA, E., PHALEN, D.N. Infection trials in mice suggest that *Macrorhabdus ornithogaster* is not capable of growth in mammals. *Medical Mycology*. 2013, 51, 669-672.
- MARLIER, D., LEROY, C., STURBOIS, M., DELLEUR, V., POULIPOULIS, A., VINDEVOGEL, H. Increasing incidence of megabacteriosis in canaries (*Serinus canarius domesticus*). *The Veterinary Journal*. 2006, 172, 549-552.
- PHALEN, D.N. Update on the Diagnosis and Management of *Macrorhabdus Ornithogaster* (Formerly *Megabacteria*) in Avian Patients. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*. 2014, 17, 203-210.
- SULLIVAN, P.J., RAMSAY, E.C., GREENACRE, CH.B., CUSHING, A.C., ZHU, X., JONES, M.P. Comparison of Two Methods for Determining Prevalence of *Macrorhabdus ornithogaster* in a Flock of Captive Budgerigars (*Melopsittacus undulatus*). *Journal of Avian Medicine and Surgery*. 2017, 31, 128-131.
- TOMASZEWSKI, E.K., LOGAN, S.K., SNOWDEN, K.F., KURTZMAN, C. P., PHALEN, D.N. Phylogenetic analysis identifies the 'megabacterium' of birds as a novel anamorphic ascomycetous yeast, *Macrorhabdus ornithogaster* gen. nov., sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, 53(4), 1201-1205.
- VRBASOVÁ, L., MOLINKOVÁ, D., OBDRŽÁLEK, D., GROŠOVÁ, T., KNOTEK, Z. Využití metody real-time PCR při diagnostice a kontrole účinnosti léčby makrorabdózy. *Veterinární klinika*. 2020, 17, 216-221.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 103/2022/FVL

Klasifikace a prevalence melanocytárních tumorů u koní v České republice

Anna Malá¹, Miša Škorič¹, Andrea Kopecká²

¹Ústav patologické morfologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno, ²Klinika chorob koní, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Equinní melanocytární tumory jsou často řešeným problémem u běloušů vyššího věku, ale mohou se vyskytnout u koně jakéhokoliv věku a barvy. Dle jedné často citované studie údajně až u 80 % běloušů, kteří dosáhnou vysokého věku, dojde k vývoji jednoho nebo více melanocytárních tumorů (McFadyean, 1933). V knize *Equine Dermatology* je udáváno, že equinní melanocytární tumory představují 5,4-13,9 % ze všech kožních nádorových onemocnění u koní (Scott, a další, 2011). Přesná data o výskytu tohoto nádorového onemocnění u koní v České republice chybí a prevalence uváděná v různých literárních zdrojích je vypočtena z údajů úzce specifikovaných částí světové populace koní.

V epidemiologické studii prováděné na populaci 264 Camargských koní byla u tohoto plemene zjištěna prevalence výskytu melanocytárních tumorů 31,4 %, ve věkové kategorii nad 15 let byla prevalence 67 % (Fleury, a další, 2000). V další studii zaměřené na 296 koní plemene Lipicán byla zjištěna prevalence výskytu melanocytárních tumorů 50 %. Plemeno Lipicán je výsledkem 400 let příbuzenské plemenitby, narozdíl od plemene Camargský kůň sledovaného v předchozí studii, jehož populace je více heterogenní. Zjištěný dědičný faktor byl 0,36, což poukazuje na pravděpodobnou existenci dědičné predispozice (Seltenhammer, a další, 2003).

Histopatologická klasifikace equinních melanocytárních tumorů se v současné době stále provádí převážně podle klasifikačního schéma navrženého Dr. Valentine, v této studii byly vyšetřovány melanocytární tumory u 53 koní. Výsledky studie popisují 4 různé formy equinních melanocytárních tumorů: (1) melanocytární névus; (2) dermální melanom; (3) dermální melanomatóza a (4) anaplastický maligní melanom. Tyto formy se rozlišují na základě odlišných klinických a histologických charakteristik a odlišného biologického chování. Dermální melanomy a melanomatóza se od sebe histologicky téměř neliší, k rozlišení těchto dvou forem dochází na základě klinických odlišností. Ve studii se objevily 2 případy, které však nebylo možné dle této klasifikace zařadit a zůstaly tak neklasifikované (Valentine, 1995). Řada recentních publikací ale poukazuje na fakt, že toto klasifikační schéma nedostatečně reflektuje progresivní povahu a biologické chování těchto tumorů u koní (Moore, a další, 2013). Přesná histopatologická klasifikace melanocytárních tumorů u koní je zásadní kvůli posouzení vztahu histologických charakteristik těchto neoplazií, účinnosti zvolené terapie a stanovení prognózy onemocnění.

Materiál a metodika

Pro účely histopatologické klasifikace equinních melanocytárních tumorů byly do výzkumu zařazeny bioptické a nekroptické vzorky koní klinicky diagnostikované jako melanocytární tumory. Odběr bioptických vzorků byl prováděn na základě žádosti majitelů koní na Klinice chorob koní Veterinární univerzity Brno nebo v místě ustájení koní terénními veterinárními lékaři. Odebrané bioptáty byly následně dodány na Ústav patologické morfologie a parazitologie Veterinární univerzity Brno, buď osobně nebo poštou. V případě utracení nebo úhynu koně s melanocytárními tumory na Klinice chorob koní Veterinární univerzity Brno byla pitva provedena na Ústavu patologické morfologie a parazitologie, kadávery byly následně neškodně odstraněny v asanačním ústavu. Koně nikdy nebyli utráceni kvůli výzkumu, ale pouze z důvodu nenávratně narušeného zdravotního stavu (většinou z důvodu jiného onemocnění). Následná pitva byla prováděna za účelem odběru nekroptátů melanocytárních tumorů a zjištění případných metastáz. Odebrané bioptáty a nekroptáty byly fixovány v 10% formalínu a zpracovány parafínovou technikou pro následné histopatologické vyšetření. K základnímu histopatologickému vyšetření bioptátů a nekroptátů bylo využito barvení hematoxylinem a eozinem a bělení vysoce pigmentovaných lézí peroxidem vodíku. Dále bylo u vyšetřovaných vzorků provedeno imunohistochemické barvení s využitím vybraných protilátek (PNL-2, S100 protein, Ki-67, vimentin, RACK1) za účelem potvrzení diagnózy u novotvarů, u kterých nebylo možné za základě přehledného barvení stanovit přesnou diagnózu (např. špatně pigmentované léze) a dále za účelem snahy o zjištění, zda je některá z vybraných protilátek vhodná pro posouzení benignity a malignity vyšetřovaných neoplazií.

Pro účely výpočtu prevalence výskytu melanocytárních tumorů u koní v České republice byla využita data případů vyšetřených na Ústavu patologické morfologie a parazitologie Veterinární univerzity Brno. Byla provedena selekce případů, do výpočtu byly zahrnuty pouze nekropsie a biopsie koní od roku 2020. Data použitá pro výpočet prevalence zahrnovala nacionále koní (jméno, pohlaví, věk, plemeno, barva), geografickou lokalitu ustájení koně a přítomnost či nepřítomnost melanocytárních tumorů. V případě přítomnosti melanocytárních tumorů dále doba růstu, počet, velikost a lokalizace těchto neoplazií a případné fotografie lézí. U získaných výsledků je prováděno statistické vyhodnocení a zpracování za využití základních statistických analýz.

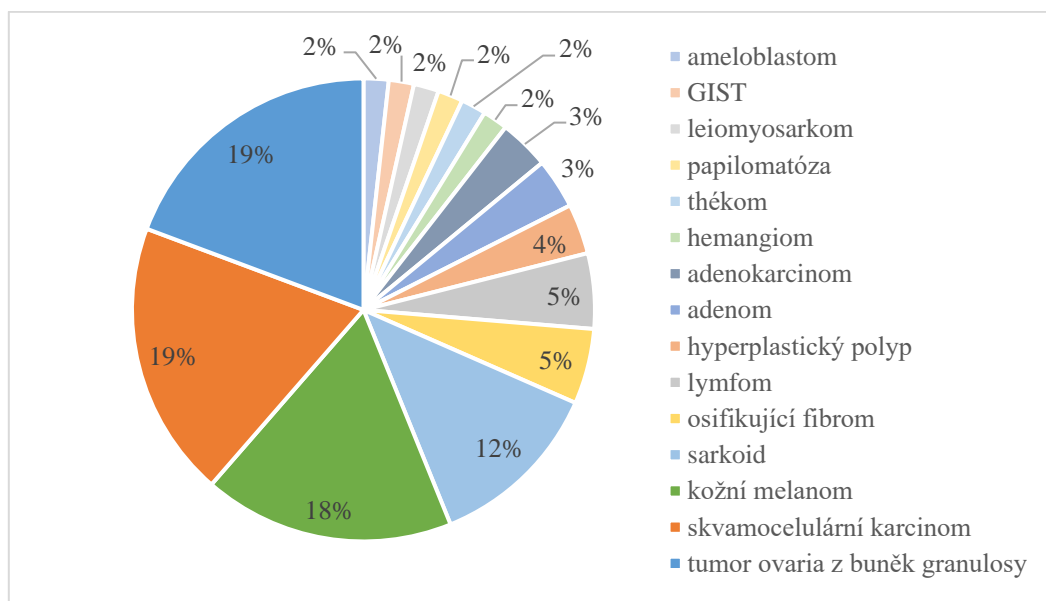
Výsledky

Při základním histopatologickém vyšetření byly sledovány následující znaky: (1) Lokalizace, velikost, tvar, ohraničení a buněčnost léze a typ růstu; (2) popis vzhledu neoplazie a stroma; (3) morfologické znaky neoplastických buněk; (4) počet mitóz a (5) další nálezy (vaskulární invaze, nekrózy, krváceniny, případné další léze). Přehled případů s diagnózami viz Tab. 1 níže. První

slopec diagnóz je určený podle výše zmíněných znaků v kombinaci s klinickým nálezem (lokalizace tumorů, celkový zdravotní stav). Dále byly neoplazie klasifikovány dle Valentine (1995), diagnóza byla stanovena na základě převažujících znaků typických pro jednotlivé typy. U většiny neoplazií se ale vyskytovaly ve variabilním množství znaky pro víc než jeden typ. Z tohoto pohledu by dle našeho názoru bylo vhodné uvažovat o úpravě/rozšíření stávající klasifikace.

V rámci pitevních vyšetření bylo v několika případech odhaleno, že přítomnost nálezu drobných lézí v perineu, nevylučuje přítomnost rozsáhlých vnitřních ložisek novotvarů. Příkladem je pacient č. 15, u kterého byl nález při vnějším ohledání makroskopicky nevýrazný (oproti některým jiným pacientům, např. pacient č. 21 s rozsáhlými splývajícími masami v perineu a na ventrální straně ocasu) – pozorována tuhá, mírně prominující nodulární léze před levým ušním boltcem, >5 mírně prominujících drobných (do 4 mm v průměru) nodulárních lézí na ventrální straně ocasu a palpačně hrbolatý konec ocasu. V průběhu pitevního vyšetření byl u tohoto pacienta ale v pánevní oblasti detekován rozsáhlý melanom velikosti 15x21 cm, který způsoboval klinicky kulhání a výraznou svalovou atrofii pravé pánevní končetiny. Dále byly zjištěny mnohočetné masy v oblasti parotideaální žlázy, v podkoží posledních 10 cm ocasu a četné vnitřní metastázy v mízních uzlinách, pojivové tkáni kolem ledvin a v průběhu mezižeberních cév.

Data o případech equinních nádorových a nenádorových onemocněních vyšetřených od roku 2020 do října 2022 na Ústavu patologické morfologie a parazitologie VETUNI byla zpracována do excelové tabulky a graficky znázorněna pomocí grafů. Equinní melanocytární tumory představují 10 % všech vyšetřovaných lézí a 18 % všech nádorových lézí vyšetřených na Ústavu patologické morfologie a parazitologie VETUNI v době od roku 2020 do října 2022.



Graf 1: Přehled diagnóz nádorových onemocnění koní u případů vyšetřovaných na Ústavu patologické morfologie a parazitologie v době od roku 2020 do října 2022.

Číslo	Plemeno	Pohlaví	Barva	Věk	Lokalizace	Diagnóza	Diagnóza dle Valentine (1995)
1	AI/1	valach	bělouš	17	fascie <i>m. cutaneus</i> , parenchymatózní orgány, serózy v DB, MU, masa kaudálně za pravou ledvinou, glutéální svalovina LPK, levý maseťer, 3. víčko, spojivka levého oka, mozkové pleny, kosti spodiny lebční	Diseminovaný maligní melanom	neklasifikováno
2	ST	klisna	bělouš	14	neznámá	Kožní melanom	MN
3	ČT	klisna	bělouš	2	oční víčko	Kožní melanom nízkého stupně malignity	MN
4	arab	klisna	bělouš	25	perineum, parotideální oblast	Kožní melanom středního stupně malignity	DMT
5	teplokrevník	klisna	bělouš	17	ventrální strana ocasu	Kožní melanom, benigní	DM
6	chládnokrevník	valach	bělouš	4	rameno, bedra, bok, šourek, lopatka, hlezno, stehno	Kožní melanom středního stupně malignity	MN
7	neznámé	klisna	bělouš	16	horní víčko, vulva, perianální oblast	Kožní melanom nízkého stupně malignity	DMT
8	WPBR	klisna	bělouš	1,5	kofen ocasu	Kožní melanom středního stupně malignity	MN
9	ST	valach	bělouš	21	ventrální strana ocasu, perianální oblast, svalovina na boku	Metastatický maligní melanom	DMT
10	arab	klisna	bělouš	27	perianální oblast, ventrální strana ocasu, pojivová tkáň kolem MM	Kožní melanom středního stupně malignity	DMT
11	PRE	klisna	bělouš	20	perianální oblast, mléčná žláza	Metastatický maligní melanom	DMT
12	AI/1	klisna	bělouš	10	báze ocasu	Kožní melanom středního stupně malignity	MN
13	ČT	klisna	bělouš	12	perianální oblast	Kožní melanom středního stupně malignity	MN
14	ČT	valach	bělouš	10	antebrachium pravé hrudní končetiny	Kožní melanom středního stupně malignity	MN
15	fríský kůň	valach	vraník	14	zadní mezinoží pod anusem	Anaplastický maligní melanom	AMM
16	AI/1	valach	bělouš	13	ocas, perianální oblast, parotideální oblast, serózy (velký melanom v pánev), MU	Metastatický maligní melanom	DMT
17	AI/1	valach	bělouš	13	ventrální strana ocasu	Kožní melanom nízkého stupně malignity	DMT
18	Shagya	klisna	bělouš	8	krk, končetiny, plece	Kožní melanom nízkého stupně malignity	MN
19	lipicán křížencec	klisna	bělouš	16	perianální oblast, ocas, „speck“ u báze ušních boltců	Kožní melanom nízkého stupně malignity	neklasifikováno
20	Welsh Cob	klisna	perlino	9	ventrální strana ocasu	Kožní melanom, benigní	MN
21	starokladarubský bělouš	klisna	bělouš	17	ventrální strana ocasu, oblast vulvy	Kožní melanom nízkého stupně malignity	DMT
22	andaluzský kůň	valach	bělouš	13	ventrální strana ocasu, perianální oblast	Kožní melanom středního stupně malignity	DMT

Tab. 1: Přehled pacientů. MN = melanocytární névus; DM/DMT = dermální melanom/melanomatóza; AMM = anaplastický maligní melanom; DB= dutina břišní; LPK = levá pánevní končetina; MM = močový měchýř; MU = mizní uzliny.

Seznam literatury

- Fleury, Catherine, a další. 2000. Survey, The Study of Cutaneous Melanomas in Camargue-Type Gray-Skinned Horses (2): Epidemiological Survey. *Pigment Cell Research*. 2000, Sv. 13, 1, stránky 45-51.
- McFadyean, John. 1933. Equine melanomatosis. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*. 1933, Sv. 46, stránky 186-204.
- Moore, J. S., a další. 2013. Melanoma in horses: Current perspectives. *Equine Veterinary Education*. 2013, Sv. 25, 3, stránky 144-151.
- Scott, Danny W. a Miller Jr., William H. 2011. *Equine Dermatology*. 2. Maryland Heights : Saunders/Elsevier, 2011. stránky 7-10, 504-508. 9781437709209.
- Seltenhammer, M. H., a další. 2003. Equine melanoma in a population of 296 grey Lipizzaner horses. *Equine Veterinary Journal*. 2003, Sv. 35, 2, stránky 153-157.
- Valentine, B. A. 1995. Equine melanocytic tumors: a retrospective study of 53 horses (1988 to 1991). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 1995, Sv. 9, 5, stránky 291-297.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 110/2022/FVL

Imunofenotypizace lymfocytů u psů s lymfocytózou a lymfopenií

Pavla Hamouzová, Libuše Poldová, Zuzana Vlasatá

Ústav fyziologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Imunofenotypizace lymfocytů je využívána v humánní medicíně, ale v praxi malých zvířat zatím výraznějšího rozšíření nedosáhla. Analýza subpopulací lymfocytů však má potenciál stát se významným parametrem pro hodnocení imunitní kompetence jedince a stanovení prognózy onemocnění (1). Proto je třeba získat dostatečné znalosti o subpopulacích lymfocytů u psů s co nejširší škálou různých onemocnění. Imunofenotyp lymfocytů u nejčastěji se vyskytujících lymfopenií a lymfocytóz však zatím nebyl studován, což je limitující z hlediska možného širšího využití průtokové cytometrie u psů.

Pro orientační klasifikaci lymfopenií a lymfocytóz je možné využít koncentraci C-reaktivního proteinu (CRP). Sekrece CRP játry je stimulována prozánětlivými cytokiny, jeho koncentrace v plazmě se proto výrazně zvyšuje zejména při akutních infekcích (2). Koncentraci CRP neovlivňuje plemenná příslušnost ani léčba kortikoidy (2). Plazmatická koncentrace CRP je proto slibným kritériem pro klasifikaci lymfopenií a lymfocytóz různých příčin.

Materiál a metodika

Vzorky

K analýze byla využita zbytková čerstvá krev stabilizovaná EDTA z rutinních hematologických vyšetření prováděných Klinickou laboratoří pro malá zvířata FVL VETUNI za účelem diagnostiky. Jednalo se o využití odpadního materiálu zbylého z běžných analýz, na psech tedy nebyly prováděny žádné experimenty. Analyzovány byly vzorky, u nichž byl hematologickým analyzátozem Sysmex XT-2000iV Hematology Analyzer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) zjištěn a) počet lymfocytů vyšší než $5,0 \times 10^9/l$ (lymfocytóza), b) počet lymfocytů nižší než $1,2 \times 10^9/l$ (lymfopenie). Celkem bylo analyzováno 47 vzorků lymfopenií (poměr fen ku psům byl 1,2:1) a 19 vzorků lymfocytóz (poměr fen ku psům byl 1,4:1). V obou skupinách byly vzorky dále rozděleny na základě zvýšené ($>10 \text{ mg/l}$) či bazální ($\leq 10 \text{ mg/l}$) plazmatické koncentrace C-reaktivního proteinu stanovené analyzátozem Information and Communication Technology Module (Architect c4000; Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois, USA) s využitím kitu Turbidimetric Canine CRP (Tridelta Development Ltd, Ireland).

Průtoková cytometrie

Vzorky byly inkubovány s primárními protilátkami: CD3e (clone CA17.2A12, FITC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), CD4 (clone YKIX302.9, RPE-Cy7, Bio-Rad, Hercules, USA), CD5 (clone YKIX322.3, APC, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), CD8 (clone YCATE55.9, FITC, Bio-Rad, Hercules, USA), CD21 (clone CA2.1D6, PE, Fisher Scientific, Waltham, USA), CD45 (clone YKIX716.13, eFluor™ 450, eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a CD79a (clone HM57, ALEXA FLUOR® 700, Bio-Rad, Hercules, USA). Každý vzorek byl analyzován ve třech zkumavkách: (1) CD45, CD3e, CD4, CD5, (2) CD45, CD21, CD79a, (3) CD45, CD5 a CD8. Pro detekci intracelulárního antigenu CD79a byla provedena fixace a následná permeabilizace pomocí Leucopermu (Bio-Rad, Hercules, USA). Do každé zkumavky 1 a 3 byl po inkubaci a promytí PBS přidán lyzační roztok (VersaLyse Lysing Solution, Beckman Coulter, USA) k odstranění erytrocytů. Vzorky byly promyty PBS, odstředěny (RCF 400 g, 5 minut) a analyzovány průtokovým cytometrem CytoFLEX B5-R3-V2 (Beckman Coulter, Indianapolis, USA) pomocí softwaru CytExpert (Beckman Coulter, Indianapolis, USA).

Statistika

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny v programu MedCalc statistical software. Byly porovnány výsledky jednotlivých skupin (lymfopenie se zvýšeným CRP, lymfopenie s bazálním CRP, lymfocytózy se zvýšeným CRP, lymfocytózy s bazálním CRP) a výsledky u různých plemen, pohlaví a věkových kategorií. Na základě výsledku Shapiro-Wilkova testu byla analýza provedena pomocí Mann-Whitneyho testu. Hladina významnosti byla stanovena jako $P \leq 0,05$.

Výsledky

Bylo zjištěno, že lymfopenie se častěji vyskytují společně se zvýšeným CRP (72,7 %) než u stavů, kdy se hodnota CRP nezvyšuje (27,3 %). 79,5 % lymfopenií se objevilo u psů starších 7 let. Vliv pohlaví či plemene zaznamenán nebyl. Procento subpopulací lymfocytů (% T lymfocytů, % B lymfocytů, % T_h lymfocytů a % T_c lymfocytů) a hlavní lymfocytární poměry (T : B a T_h : T_c) se nelišily mezi skupinou s bazálním a zvýšeným CRP ($P > 0,05$). V žádném z analyzovaných parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi psy s bazální a zvýšenou hladinou CRP v plasmě ($P > 0,05$).

Celkem 54,5 % lymfocytóz bylo doprovázeno zvýšeným CRP, u 45,5 % lymfocytóz byla koncentrace CRP normální. 81,8 % lymfocytóz se vyskytlo u psů ve věku do 1 roku. Vliv pohlaví či plemene

zaznamenán nebyl. Procento subpopulací lymfocytů (% T lymfocytů, % B lymfocytů, % T_h lymfocytů a % T_c lymfocytů) a hlavní lymfocytární poměry (T : B a T_h : T_c) se nelišily mezi skupinou s bazálním a zvýšeným CRP (P>0,05). V žádném z analyzovaných parametrů nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl mezi psy s bazální a zvýšenou koncentrací CRP v plasmě (P>0,05).

U lymfopenií byl zjištěn vysoce významně nižší poměr T_h : T_c než u lymfocytóz (P<0,01). Při běžných lymfopeniích tedy dochází k nejvýraznějšímu poklesu v zastoupení T_h lymfocytů.

	Lymfopenie		Lymfocytózy	
	CRP > 10 mg/l	CRP ≤ 10 mg/l	CRP > 10 mg/l	CRP ≤ 10 mg/l
Četnost [%]	72,7	27,3	54,5	45,5
Věk [roky]	9,0 ± 3,80		1,8 ± 1,03	
Medián věku [roky]	9,5		0,75	
Počet lymfocytů [$\times 10^9/l$]	0,85 ± 0,05	0,95 ± 0,08	6,19 ± 0,70	6,57 ± 0,40
T : B	2,9 ± 0,82	3,1 ± 0,62	2,9 ± 1,03	4,8 ± 3,05
T _h : T _c	1,5 ± 0,24	1,4 ± 0,19	2,4 ± 0,45	2,0 ± 0,33

Tabulka 1 Výsledky imunofenotypizace lymfocytů u lymfopenií a lymfocytóz (průměr ± střední chyba průměru, SEM)

Závěr

Lymfopenie se vyskytují převážně u psů od 7 let věku a jsou často doprovázeny zvýšenou plasmatickou koncentrací CRP. Vliv rostoucího věku na klesající počet lymfocytů je znám (3), dosavadní studie však neuváděly přesnou hranici 7 let věku. Dle našich poznatků se lymfopenie u jedinců mladších 7 let vyskytovaly vzácně (s výjimkou štěňat trpících parvovirózou). Nízký poměr T_h : T_c zjištěný u lymfopenií může mít souvislost se stárnutím psů, jelikož byl zaznamenán u zdravých stárnoucích psů jako negativní prognostický ukazatel vývoje zdravotního stavu (4). Mezi zastoupením lymfocytárních subpopulací či hlavními lymfocytárními poměry a plasmatickou koncentrací CRP u lymfopenií ani u lymfocytóz není statisticky významná souvislost. U lymfopenií byl prokázán vysoce významný pokles v zastoupení T_h lymfocytů. Tato studie přináší nové poznatky o charakteru a výskytu běžných lymfopenií a lymfocytóz u psů.

Seznam literatury:

- 1) YOKOTA, S., YUKI, M., FUJIKAKE, K., MASUDA, K., HIRANO, T., NAITO, E., KAINUMA, D., TAIRA, H., NARITA, M.: Clinical use of lymphocyte subset analysis: as a prognostic marker for dogs with pyometra. Available at: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-948363/v1>, 2021. Accessed June 20, 2022.12.
- 2) MCCLURE, V., VAN SCHOOR, M., THOMPSON, P. N., KJELGAARD-HANSEN, M., GODDARD, A.: Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 2013, 243, 361-366.
- 3) FUJIWARA, M., YONEZAWA, T., ARAI, T., YAMAMOTO, I., OHTSUKA, H.: Alterations with age in peripheral blood lymphocyte subpopulations and cytokine synthesis in beagles. *Veterinary Medicine (Auckland)*. 2012. 3, 79-84.
- 4) WATABE, A., HANAZONO, K., KOMATSU, T., FU, D. R., ENDO, Y., KADOSAWA, T.: 2012. Peripheral lymphocyte subsets as a prognostic indicator of mortality and morbidity in healthy dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2012. 74, 937-943.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 102/2022/FVL

Vliv dlouze působící nesteroidní protizánětlivé látky mavacoxib na vybrané parametry ledvin a jater u psů s osteoartritidou

Michal Radó, Iva Trojanová, Ľubica Hanúsková

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

Úvod

Osteoartritida (OA) je nejběžnější formou artritidy u psů, která postihuje přibližně čtvrtinu populace. Jde o chronické kloubní onemocnění charakterizované ztrátou kloubní chrupavky, ztluštěním kloubního pouzdra a vznikem periartikulární degenerativní osteoprodukce (osteofytóza) a v konečném důsledku vede k trvalým následkům z důvodu bolestivosti a dysfunkci končetiny. Většina OA u psů se vyskytuje sekundárně k primárnímu ortopedickému onemocnění, jako je například poškození kraniálního zkříženého vazů, menisků, dysplazie kyčelního kloubu, dysplazie lokte, OCD, luxace česky nebo intraartikulárních zlomenin. U malé podskupiny psů se OA vyskytuje bez zjevných primárních příčin a může souviset s genetikou a věkem. Mezi další faktory přispívající k OA patří zvýšená tělesná hmotnost, obezita, pohlaví, zátěž pacienta a strava. Vzhledem k nemožnosti kurativní léčby onemocnění je v rámci zlepšení kvality života těchto pacientů přistoupeno k tlumení bolestivosti spojené s degenerativními OA změnami. Medikamentózní management osteoartritidy spočívá často v dlouhodobém podávání nesteroidních antiflogistik. Mavacoxib je jediné depotní nesteroidní antiflogistikum, které lze po úvodním intervalu dvou týdnů aplikovat pouze jednou měsíčně (Cox SR, 2010). Představuje tak pro pacienty i jejich majitele komfortní způsob aplikace a udržení stabilní dávky účinné látky při jejím dlouhodobém užívání. Nesteroidní protizánětlivé látky však mohou mít mimo žádoucích účinků také řadu účinků nežádoucích, mezi které patří negativní působení na zažívací trakt, ledviny, játra nebo srážlivost krve (Zambraski EJ, 1995). Incidence výše uvedených nežádoucích reakcí je v literatuře často zmiňována u krátce působících nesteroidních protizánětlivých látek, informace o situaci u dlouze působícím mavacoxibu však v literatuře upřesněná není nebo je posuzovaná pouze z toxikologického hlediska nebo z pohledu účinnosti terapie. Konzervativní přístup může zpomalit progresi onemocnění a mnoho psů může po diagnóze žít pohodlně několik let. OA je však progresivní onemocnění a bude se časem i nadále zhoršovat.

Cílem práce bylo zjistit možné nežádoucí účinky dlouhodobě působící nesteroidní protizánětlivé látky mavacoxibu na funkce ledvin a jater s ohledem na posouzení vhodnosti podávání mavacoxibu u pacientů s nefropatiemi nebo hepatopatiemi.

Materiál a metodika

Odebírané vzorky

Celkem bylo do studie zařazeno 20 dospělých pacientů VETUNI KCHPK Brno o hmotnosti 15 - 60 kg bez jiných současných komorbidit. U všech pacientů byla odebrána krev a moč v den 0 před nasazením mavacoxibu (Trocoxil, Pfizer Italia s.r.l). Krev byla odebírána z v. *jugularis* do heparinizované zkumavky, moč byla odebírána spontánní mikcí majitelem.

Metodika

Po zahájení léčby mavacoxibem došlo u pacientů k výraznému snížení klinických projevů osteoartritidy. Všechna vyšetření byla prováděna v rámci klinického vyšetření pacientů, proto nemusel být zpracován projekt pokusů. U všech pacientů byla dávka mavacoxibu dle pokynů výrobce stanovena na 2 mg/kg. Pacientům byla podaná úvodní dávka v den 0, dávka byla zopakovaná za 14 dní, v souladu s příbalovou informací. Následující dávka byla podaná vždy po 30 dnech. Odběr vzorků byl opakován v 2., 4., 6. a 10. týdnu od nasazení medikace. Vzorky byly vyhodnocované v centrální laboratoři pro malá zvířata VETUNI Brno.

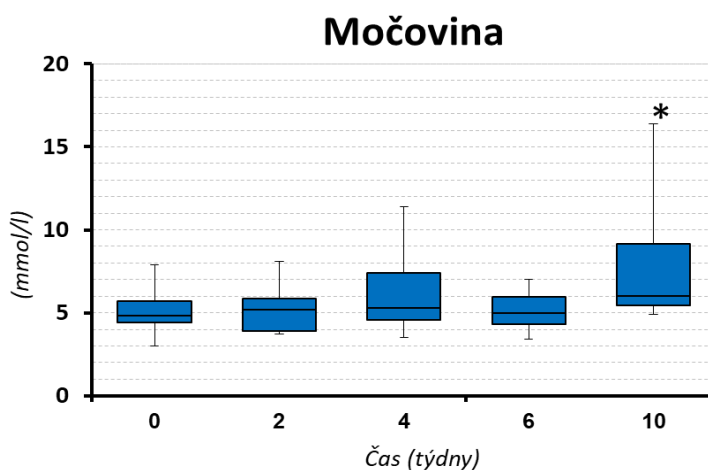
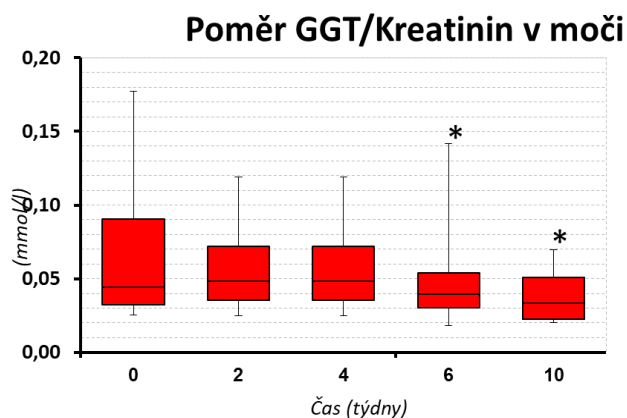
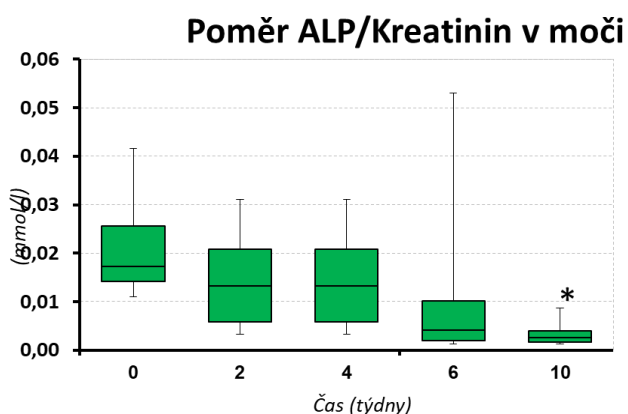
Sledované parametry

Jako sledované parametry biochemického vyšetření krve byly zvoleny rutinně sledované markery ledvin a jater. Hodnocené jaterní parametry byly: celková bílkovina, albumin, bilirubin, alaninaminotransferáza (ALT), aspartátaminotransferáza (AST), gamaglutamyltransferáza (GGT) a alkalická fosfatáza (ALP). Sledovanými parametry ledvin byly urea a kreatinin. U vzorků moči jsme stanovovali hustotu, osmolalitu, kreatinin, bílkovinu, sodík, GGT, ALP. Dále jsme u vzorků moči ze změřených parametrů hodnotili vypočtené poměry: bílkovina/kreatinin, GGT/kreatinin, ALP/kreatinin.

Výsledky

Do studie bylo zahrnuto celkem 20 psů s OA léčených konzervativně mavacoxibem. U 13 pacientů (65 %) se jednalo o OA kyčelních kloubů, u 5 pacientů (25 %) o OA v souvislosti s kolenním kloubem a u 2 pacientů (10 %) o OA loketního kloubu. Z plemen byli zastoupeni labradorský retriever (n=6), zlatý retriever (n=1), německý ovčák (n=4), cane corso (n=1), kavkazský pastevecký pes (n=1), pitbulteriér (n=1), bordeaux doga (n=1) a kříženec (n=4). Průměrná hmotnost pacienta byla 43,6 kg (SD \pm 12,0), průměrný věk 8,7 roků (SD \pm 1,7). Sledované parametry byly u všech pacientů v referenčním rozmezí, pouze u 2 pacientů byla zjištěna elevace jaterních parametrů související s konkurenčním onemocněním. K statisticky významným změnám došlo v třech sledovaných

parametrech: ALP/Kreatinin, GGT/Kreatinin v moči a močoviny v krvi. Hodnoty parametrů ve sledovaných obdobích udávají následující grafy.



Závěr

V námi testované skupině pacientů nedošlo k statisticky významným změnám v sledovaném biochemickém panelu v krvi s výjimkou močoviny, ale došlo k statisticky významnému snížení aktivity ALP a GGT v moči. Důvodem statisticky významného snížení může být nesourodost v časovém odběru moči během dne a možná korelace s příjmem tekutin před vyšetřením. Statisticky významné zvýšení koncentrace močoviny v krvi může naznačovat klinicky nesignifikantní vliv mavacoxibu na ledviny. Pro lepší validitu výsledků si téma vyžaduje rozsáhlejší dlouhodobou studii na větší skupině pacientů.

Seznam literatury:

1. COX, S. R., et al. The pharmacokinetics of mavacoxib, a long-acting COX-2 inhibitor, in young adult laboratory dogs. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2010, 33.5: 461-470.
2. Zambraski EJ (1995) The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. *Seminars in Nephrology* 15, 205–213.
3. ZAMBRASKI, Edward J. The effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on renal function: experimental studies in animals. In: *Seminars in nephrology*. 1995. p. 205-213.
4. LEES, P., et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, toxicology and therapeutics of mavacoxib in the dog: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 2015, 38.1: 1-14.
5. Walton MB, Cowderoy EC, Wustefeld-Janssens B, Lascelles BD, Innes JF: Mavacoxib and meloxicam for canine osteoarthritis: a randomised clinical comparator trial. *Vet Rec*, 2014, 175: 280

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 115/2022/FVL

Sledování změn koncentrace cholesterolu v séru u psů s portosystémovým zkratem

Jana Lorenzová, Veronika Fojtíková, Tereza Lorenzová

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

Úvod

Portosystémové vaskulární anomálie zahrnují aberantní cévy, které umožňují portální krvi, která odvádí krev z orgánů (žaludek, střeva, slinivka břišní a slezina), procházet přímo do systémového oběhu, aniž by nejprve procházela částí nebo celou jaterní tkání^{1,2}. Krev s sebou nese metabolity z trávicího traktu - toxiny, hormony, živiny, které jsou v játrech za normálních okolností zpracovávány, ale také hepatotropní látky^{3,4}. Tyto mechanismy jsou u pacientů s portosystémovým zkratem (PSS) narušeny.

Cholesterol je typ lipidu odvozeného z triacylglyceridů, který se nachází především v tkáních živočišného původu. Je důležitou složkou buněčných membrán a je klíčovým prekurzorem mnoha molekul, např. steroidních hormonů, vitamínu D a žlučových kyselin⁵. Častěji než cholesterol se u psů a koček používá k hodnocení funkce jater stanovení hladiny sérových žlučových kyselin a amoniaku v krvi⁶, nicméně i cholesterol odráží syntetickou funkci jater. U pacientů s těžkou jaterní insuficiencí, která může být způsobena i získaným nebo vrozeným portosystémovým zkratem, může v důsledku poruchy jaterní syntézy dojít ke snížení koncentrace cholesterolu v séru⁶.

Cílem této studie bylo prokázat, že dojde ke změně koncentrace cholesterolu v krvi u pacientů s PSS po chirurgickém řešení, kdy se předpokládá, že po operaci dochází k obnově průtoku krve játry, a tím k obnovení syntetické funkce jater.

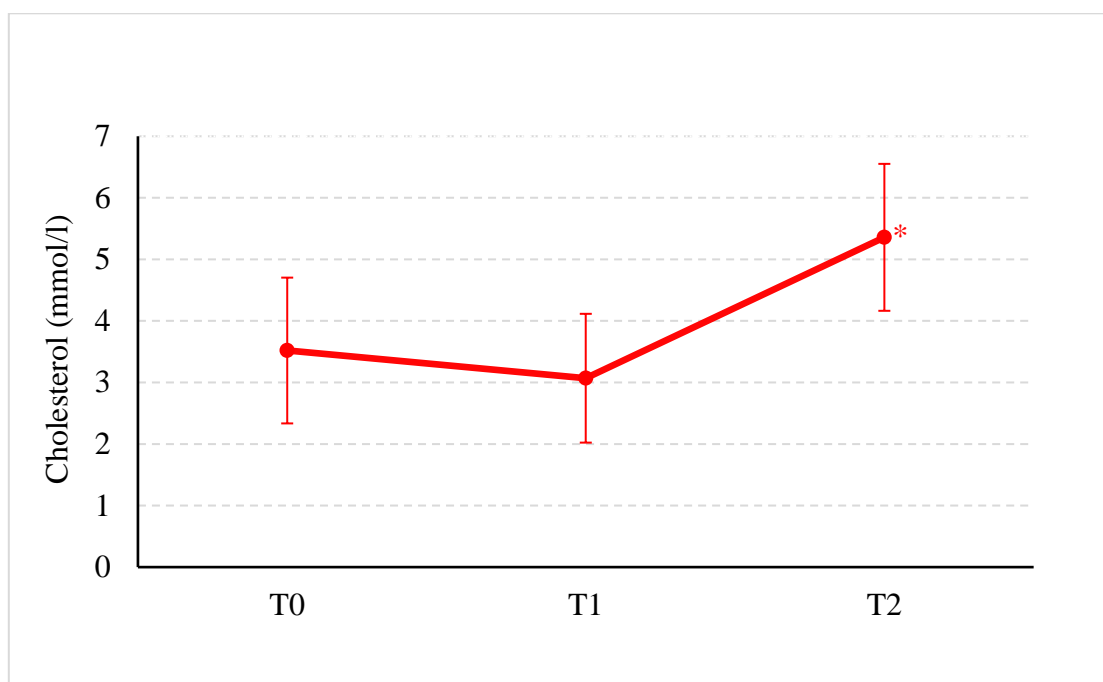
Materiál a metodika

Do této práce byli zahrnuti pacienti Kliniky chorob psů a koček, kterým byl diagnostikován portosystémový zkrat (PSS). Všechna vyšetření byla prováděna v rámci standartního předoperačního a pooperačního vyšetření pacientů s PSS. V rámci diagnostiky bylo prováděno klinické vyšetření, biochemické a hematologické vyšetření krve, a také sonografické vyšetření dutiny břišní. Případně pro upřesnění typu portosystémového zkratu bylo použito vyšetření počítačovou tomografií. Následně po potvrzení diagnózy bylo provedeno chirurgické ošetření za pomoci ameroidního konstriktoru. U těchto pacientů byla sledována koncentrace cholesterolu v krvi. Odběry krve probíhaly v časech: před operací (T0), 2 dny po operaci (T1) a následně 8 týdnů po operaci (T3). Studie svým rozsahem nepřekročila běžně prováděné výkony, proto nebyl vyžadován projekt pokusu. Ke zhodnocení dat byla provedena analýza rozptylu (ANOVA) a Dunnettův test ($p < 0,05$)

Výsledky

Do této práce bylo zahrnuto celkem 9 pacientů s portosystémovým zkratem, kteří byli chirurgicky ošetřeni ameroidním konstriktorem na našem pracovišti. Z těchto 9 pacientů bylo 6 fen a 3 psi. Nejvíce zastoupené plemeno ve sledovaném souboru byl yorkshirský teriér ($n = 7$), čivava a border kolie. Průměrný věk těchto pacientů byl $4,1 \pm 2,13$ let a jejich průměrná váha byla $3,85 \pm 3,40$ kg. Koncentrace cholesterolu v krvi byla v čase T0 stanovena u všech 9 pacientů, v čase T1 a T2 u 8 pacientů. Graf č. 1 znázorňuje nárůst koncentrace cholesterolu v krvi v čase před operací, dva dny a 8 týdnů po operaci. Byl prokázán statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) mezi odběrem před operací a následně 8 týdnů po operaci ameroidním konstriktorem. Mezi odběrem před operací a následně 2 dny po operaci nebyl nalezen statisticky významný rozdíl.

Graf č.1: **Kolísání koncentrace cholesterolu ve sledovaných časech** (T0 = hodnota před operací; T1 = hodnota 2 dny po operaci; T2 = hodnota 8 týdnů po operaci; body označují průměr; úsečky směrodatnou odchylku; * označuje statisticky významný nárůst oproti T0)



Závěr

V této studii bylo prokázáno, že dochází ke statisticky významnému nárůstu koncentrace cholesterolu v krvi 8 týdnů po operaci ameroidním konstriktorem u pacientů s onemocněním PSS. Stanovování koncentrace cholesterolu by se tak mohlo stát součástí běžného předoperačního a pooperačního vyšetření krve u pacientů s PSS, jelikož stanovení koncentrace cholesterolu v krvi je metodicky přístupnější než stanovení koncentrace amoniaku.

Přehled literatury:

1. BOWLT K, FRIEND E, MURPHY K., *Portosystemic shunts in cats and dogs: signs and diagnosis* [online]. Vet Times. 2010 Nov., Dostupné z: <https://www.vettimes.co.uk/app/uploads/wp-post-to-pdf-enhanced-cache/1/portosystemic-shunts-in-cats-and-dogs-signs-and-diagnosis.pdf>
2. BERENT A.C., TOBIAS K.M., Portosystemic vascular anomalies. *The Veterinary clinics of North America, Small animal practice*, 2009 May;39(3):513-541.
3. HUNT G.B., LUFF J.A., DANIEL L, VAN DEN BERGH R., Evaluation of hepatic steatosis in dogs with congenital portosystemic shunts using Oil Red O staining. *Veterinary pathology*. 2013 Nov;50(6):1109-1115.
4. EL-SEBAEY A.M., ABRAMOV P.N., ABDELHAMID F.M. Clinical Characteristics, Serum Biochemical Changes, and Expression Profile of Serum Cfa-miRNAs in Dogs Confirmed to Have Congenital Portosystemic Shunts Accompanied by Liver Pathologies. *Veterinary sciences*. 2020 Mar 25;7(2):35
5. VADEN S.L., KNOLL J.S, SMITH F.W.K, TILLEY L.P., *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Laboratory Tests and Diagnostic Procedures: Canine & Feline*, Iowa: State -University Press, 2009, ISBN 081381748X
6. LAWRENCE Y.A., STEINER J.M., Laboratory Evaluation of the Liver. *The Veterinary clinics of North America., Small animal practice*, 2017 May;47(3):539-553.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 108/2022/FVL

Ultrasonografické vyšetření paranálních váčků u psů a koček

Ivana Pírková, Karolína Vágnerová, Patrik Predný

Klinika malých zvířat, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Paranální váčky (*sinus paranasalis*) jsou párové kožní vchlípeniny přítomné u většiny masožravců [1]. Jejich funkce spočívá v sociální a teritoriální identifikaci nebo mohou být využity v rámci obrany [1, 2]. Některými autory jsou řazeny i mezi přídatné orgány trávicí soustavy psa [3]. Obtíže spojené s onemocněním paranálních váčků jsou jedním z běžných důvodů návštěvy veterinárního lékaře [4, 5]. Častěji se s nimi setkáváme u psů než koček [6, 7]. Diagnostika onemocnění váčků se obvykle zakládá na prezentaci pacienta a jeho klinickém vyšetření zahrnujícím i rektální vyšetření. Klinické příznaky a variabilní obsah váčků nejsou diagnosticky specifické [2], a proto jsou zapotřebí nové, diagnosticky přínosnější metody [8]. V poslední době se jako slibný diagnostický nástroj jeví ultrasonografické vyšetření [8]. Hlavním cílem naší práce byl popis běžných nálezů při ultrasonografickém vyšetření paranálních váčků u psů a koček.

Materiál a metodika

Do studie byli prospektivně zařazeni psi a kočky prezentovaní na Oddělení zobrazovacích metod Kliniky malých zvířat Veterinární univerzity Brno. Pacienti byli vybráni náhodně, bez anamnézy a klinických známek onemocnění paranálních váčků. Vyšetření váčků bylo prováděno v rámci jiných vyšetření. U psů se jednalo o pacienty podstupující ultrasonografické vyšetření dutiny břišní, bez nutnosti sedace. U koček byla vzhledem k jejich povaze upřednostňována sedace a jednalo se o kočky podstupující rentgenologické vyšetření kyčlí a plánované kastrace. Sedace a anestezie pacientů probíhala dle standardních protokolů. U všech pacientů byly k dispozici informace o plemeni, pohlaví, věku a hmotnosti. Všechna vyšetření byla provedena jedním veterinárním lékařem z Oddělení zobrazovacích metod (řešitelem práce) na ultrasonografickém přístroji Samsung RS85 (Samsung Medison CO., LTD., Korea). Získaná data byla uložena do *Picture Archiving and Communication System* a následně vyhodnocena.

Příprava a vyšetření pacienta

U psů bylo vyšetření prováděno na stojícím zvířeti, u koček v pozici na zádech s využitím polohovacích pomůcek (kolébka). K vyšetření byla použita mikrokonvexní (4-9 MHz) a lineární

sonda (4-18 MHz). Perineální oblast byla vyšetřena v transverzální a sagitální rovině se zaměřením na paranální váčky. Ve studii byla použita data naměřená v transverzální rovině (tvar, velikost a obsah váčku).

U každého pacienta jsme subjektivně hodnotili vzhled obou váčků, a to pojmem homogenní (= váčky byly stejně veliké a měly stejný nebo obdobný obsah) nebo heteroechogenní (= váčky byly rozdílného obsahu nebo velikosti).

Tvar a velikost váčku

U každého váčku jsme hodnotili zvláště jeho délku a šířku. Psi byli dle hmotnosti rozděleni do dvou podskupin: psi do 15 kg, psi nad 15 kg. Tvar váčku byl definován jako kulovitý nebo oválný na základě poměru stran. Kulovitý tvar váčku byl definován jako poměr jedné a druhé strany roven jedné.

Obsah váčku

U každého pacienta jsme subjektivně hodnotili obsah obou váčků, a to pojmem anechogenní (= černý), hypoechogenní (= mírně celulární) nebo echogenní (= celulární). V případě kombinace jednotlivých obsahů jsme použili termín heteroechogenní. Celulární obsah byl definován jako hyperechogenní reflexe nebo zformovaný sediment bez akustického stínu, volný plyn jako reverberační artefakt a přítomnost konkrementu jako hyperechogenní léze s akustickým stínem.

Výsledky

Vstupní kritéria do této části studie splnilo 138 psů a 131 koček. Normální nález byl popsán u 101 psů (73,2 %) a 122 koček (93,1 %), abnormální nález u 37 psů (26,8 %) a 9 koček (6,9 %).

Homogenní vzhled váčků byl popsán u 129 psů (93,5 %) a 125 koček (95,4 %). Velikost váčků je uvedena v tabulce 1 a vykazuje závislost na hmotnosti pacienta. Tvar váčku byl u obou druhů shodný. Nejčastějším abnormálním nálezem byla u obou druhů rozdílná velikost váčků a jejich obsah. U psa se ojediněle jednalo o přítomnost plynu (2/37) nebo mineralizace v lumen váčku (1/37). U obou druhů dominoval hypoechogenní obsah s celulárním obsahem reprezentovaným hyperechogenními reflexemi nebo zformovaným sedimentem.

Tabulka 1: Velikost váčků u psa a kočky

Sledované velikosti váčků		Základní statistické charakteristiky (cm)					
		Počet	Chybějící údaje	Průměr	Minimum	Maximum	Směr. odchylka
Psi do 15 kg	délka sin.	84	1	1,27	0,70	2,00	0,28
	šířka sin.	84	1	0,78	0,40	1,50	0,22
	délka dx.	84	1	1,26	0,70	2,00	0,29
	šířka dx.	84	1	0,80	0,40	1,50	0,24
Psi nad 15 kg	délka sin.	53	0	1,64	0,90	2,50	0,36
	šířka sin.	53	0	1,03	0,40	1,70	0,29
	délka dx.	53	0	1,60	0,80	2,50	0,40
	šířka dx.	53	0	0,99	0,40	1,80	0,30
Kočky	délka sin.	131	0	0,77	0,50	1,40	0,17
	šířka sin.	131	0	0,48	0,30	0,90	0,12
	délka dx.	131	0	0,76	0,50	1,20	0,15
	šířka dx.	131	0	0,48	0,30	0,80	0,11

Závěr

Ultrasonografické vyšetření paranálních váčků u psa a kočky je ve veterinární praxi běžně dostupné, neinvazivní a neklade zvýšené nároky na zkušenosti vyšetřujícího. Náhodný záchyt abnormálních nálezů i u asymptomatických jedinců tak podporuje fakt, že by se mohlo jednat o slibný nástroj v diagnostice a včasné detekci onemocnění paranálních váčků. Z výše popsaných výsledků je patrné, že nejčastějším nálezem u koček a psů jsou váčky homogenního vzhledu, stejného tvaru a hypoechogenního obsahu dominantně s celulárním obsahem. Náhodným nálezem u psů byla přítomnost plynu a mineralizace v lumen váčku.

Seznam literatury:

- [1] PAPPALARDO, Ersilia, Piera Anna MARTINO a Chiara NOLI. Macroscopic, cytological and bacteriological evaluation of anal sac content in normal dogs and in dogs with selected dermatological diseases. *Veterinary Dermatology* [online]. 2002, **13**(6), 315–322. ISSN 0959-4493. Dostupné z: doi:10.1046/j.1365-3164.2002.00310.x
- [2] VAN DUIJKEREN, E. Disease conditions of canine anal sacs. *The Journal of Small Animal Practice* [online]. 1995, **36**(1), 12–16. ISSN 0022-4510. Dostupné z: doi:10.1111/j.1748-

5827.1995.tb02756.x

- [3] EVANS, Howard E. a Alexander de DE LAHUNTA. Chapter 7 - The Digestive Apparatus and Abdomen. In: *Millers anatomy of the dog. St Louis: Elsevier Saunders*. 2013, s. 281–337.
- [4] THOMPSON, M. S. Diseases of the anal sacs. In: John D. BONAGURA, ed. *Kirk's current veterinary therapy. XIII, Small animal practice*. 13[ed.] / edited by John D. Bonagura. Philadelphia ; London: W.B. Saunders, 2000, s. 591–593. ISBN 978-0-7216-5523-9.
- [5] O'NEILL, Dan G., Anke HENDRICKS, Jennifer A. PHILLIPS, Dave C. BRODBELT, David B. CHURCH a Anette LOEFFLER. Non-neoplastic anal sac disorders in UK dogs: Epidemiology and management aspects of a research-neglected syndrome. *The Veterinary Record* [online]. 2021, **189**(2), e203. ISSN 2042-7670. Dostupné z: doi:10.1002/vetr.203
- [6] HARVEY, C. E. Incidence distribution of anal sac disease in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* [online]. 1974 [vid. 2022-01-14]. ISSN 0587-2871. Dostupné z: https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Incidence+distribution+of+anal+sac+disease+in+the+dog&author=Harvey%2C+C.E.&publication_year=1974
- [7] HILL, P. B., A. LO, C. a. N. EDEN, S. HUNTLEY, V. MOREY, S. RAMSEY, C. RICHARDSON, D. J. SMITH, C. SUTTON, M. D. TAYLOR, E. THORPE, R. TIDMARSH a V. WILLIAMS. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *The Veterinary Record* [online]. 2006, **158**(16), 533–539. ISSN 0042-4900. Dostupné z: doi:10.1136/vr.158.16.533
- [8] JUNG, Yechan, Eunseok JEONG, Sangjun PARK, Jimo JEONG, Ul Soo CHOI, Min-Su KIM, Namsu KIM a Kichang LEE. Diagnostic imaging features of normal anal sacs in dogs and cats. *Journal of Veterinary Science* [online]. 2016, **17**(3), 331–335 [vid. 2022-01-14]. ISSN 1229-845X. Dostupné z: doi:10.4142/jvs.2016.17.3.331

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 116/2022/FVL

Vliv premedikace na změny tělesné teploty v průběhu celkové anestezie u psů

Petr Raušer, Tereza Galková, Lukáš Novák, Alena Pompová, Michal Radó

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

Úvod

Mezi časté komplikace celkové anestezie patří hypotermie (1). Jejím důsledkem bývá prodloužené probouzení psů z anestezie a další komplikace (2). Tělesná teplota se u zdravého psa pohybuje mezi 37,8 – 39,2 °C (3). K poklesu teploty dochází při nadměrných tepelných ztrátách – primární hypotermie, při patologických procesech nebo vlivem aplikovaných látek včetně anestetik – sekundární hypotermie (4).

Medetomidin je alfa-2 adrenergní agonista s výrazným účinkem na kardiovaskulární systém (5). Tlumí termoregulační centrum, medetomidinem navozená periferní vasokonstrikce však tepelné ztráty omezuje. Acepromazin je neuroleptikum (6) působící pokles tělesné teploty útlumem termoregulačních mechanismů a zvýšenými tepelnými ztrátami navozenou vasodilatací. Fentanyl je opioidní analgetikum podávané při bolestivých výkonech. Termoregulaci ovlivňuje minimálně (7). Cílem této studie bylo posoudit rozvoj sekundární hypotermie – zjistit, jak rychle se mění tělesná teplota po podání medetomidinu s fentanylem, acepromazinu s fentanylem nebo fentanylu samotného pro premedikaci celkové anestezie. Předpokládali jsme, že při použití medetomidinu bude pokles tělesné teploty pomalejší ve srovnání s acepromazinem, po kterém by měla hypotermie nastupovat rychleji. Tato studie navazuje a rozvíjí předchozí projekty IGA VETUNI 106/2020/FVL a IGA VETUNI 109/2021/FVL zaměřené na sledování vlivu anestezie na tělesnou teplotu.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 60 zdravých psů – klinických pacientů o hmotnosti 5 – 30 kg podstupujících stomatologické ošetření v celkové anestezii. Studie svým rozsahem odpovídala běžně prováděným výkonům, proto nebyl vyžadován projekt pokusu. Všichni psi byli před anestézií klinicky vyšetřeni, byl jim zaveden intravenózní katétr a změřena tepová a dechová frekvence, krevní tlak a rektální. Byla změřena také okolní teplota.

Projekt proběhl formou randomizované "dvojitě slepé" studie. Psi byli rozděleni do 3 skupin – MED-FEN, ACE-FEN a FEN. Psi skupiny MED-FEN (n = 20) byli premedikováni medetomidinem (Domitor 1 mg/ml, Orion Pharma) v dávce 0,005 mg/kg podaným intravenózně společně v jedné stříkačce s fentanylem (Fentanyl Torrex 50 µg/ml, Torrex Chiesi) v dávce 0,01 mg/kg. Psi skupiny ACE-FEN (n = 20) byli premedikováni acepromazinem (Sedan 10 mg/ml, Bioveta a.s.) v dávce 0,01 mg/kg podaným intravenózně společně v jedné stříkačce s fentanylem v dávce 0,01 mg/kg. Psi skupiny FEN (n = 20) byli premedikováni fentanylem v dávce 0,01 mg/kg podaným intravenózně.

Úvod do anestezie byl proveden propofolem (Propofure 10 mg/ml, Axience) v dávce 1 – 2 mg/kg intravenózně. Dávka propofolu byla zaznamenána. Anestezie byla vedena směsí kyslíku a vzduchu s isofluranem (Vetflurane, Virbac). Psi byli po celou dobu anestezie pro udržení normokapie uměle ventilováni a byl jim kontinuálně aplikován fentanyl v dávce 0,01 mg/kg/h. Všechna zvířata byla umístěna ve hřbetní poloze a byla přikryta vzduchem vyhřívanou pokrývkou temperovanou horkým vzduchem na 37,8 °C. Ihned po napojení na inhalační přístroj (T0) a následně v desetiminutových intervalech po dobu 60 minut (T10 – T60) jim byly měřeny a zaznamenávány hodnoty jícnové a rektální teploty, srdeční frekvence a středního arteriálního krevního tlaku, byla zaznamenávána také okolní teplota.

Jícnová teplota (T-ESO) byla měřena čidlem zavedeným orálně do jícnu k srdeční bázi. Rektální teplota (T-REK) byla měřena čidlem zavedeným rektálně. Okolní teplota (T-OKO) byla měřena čidlem digitálního teploměru (SWS 1500 B, Sencor) umístěným ve vzdálenosti 50 cm od těla zvířete. Srdeční frekvence (SF) byla snímána třísvodovým EKG s elektrodami umístěnými na obou hrudních a levé pánevní končetině. Střední arteriální krevní tlak (TKstř) byl měřen oscilometricky manžetou přiložená na pravý metatarzus. Všechny sledované parametry byly zaznamenávány monitorem životních funkcí (Cardel 9500 HD, Midmark).

Statistické zhodnocení bylo provedeno programy GraphPad InStat 3.06 (GraphPad Software Inc.), KyPlot 2.0 beta 15 (Koichi Yoshioka) a MS Excel (Microsoft). Pro posouzení normality dat byl použit Shapiro-Wilkův test. Pro srovnání hodnot naměřených uvnitř každé skupiny v čase T10 – T60 oproti času T0 byl použit Dunnettův nebo Steelův test. Pro srovnání hodnot naměřených ve stejném čase mezi jednotlivými skupinami byl použit Tukey-Kramerův nebo Steel-Dwassův test ($p < 0,05$).

Výsledky

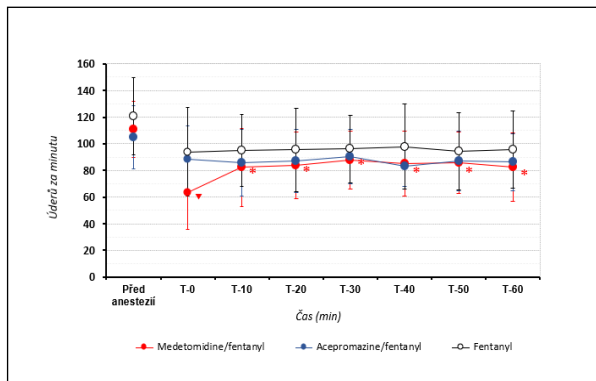
U psů skupiny MED-FEN byla oproti psům skupiny ACE-FEN a FEN použita pro úvod do anestezie signifikantně nižší dávka propofolu.

U psů skupiny MED-FEN došlo v časech T10 – T60 oproti času T0 k signifikantnímu vzestupu srdeční frekvence. U psů skupiny MED-FEN byla oproti psům skupin ACE-FEN a FEN zaznamenána v čase T0 signifikantně nižší srdeční frekvence (Obrázek 1).

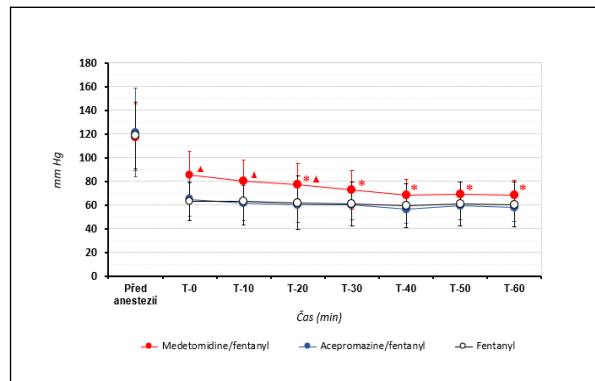
U psů skupiny MED-FEN došlo v časech T20–T60 oproti času T0 k signifikantnímu poklesu středního arteriálního tlaku. U psů skupiny MED-FEN byl oproti psům skupin ACE-FEN a FEN zaznamenán v časech T0, T10 a T20 signifikantně vyšší střední arteriální krevní tlak. (Obrázek 2).

Rektální teplota se oproti času T0 signifikantně snížila u psů skupin MED-FEN a ACE-FEN v čase T50 – T60, u psů skupiny FEN se oproti času T0 signifikantně snížila v časech T40 – T60 (Obrázek 2).

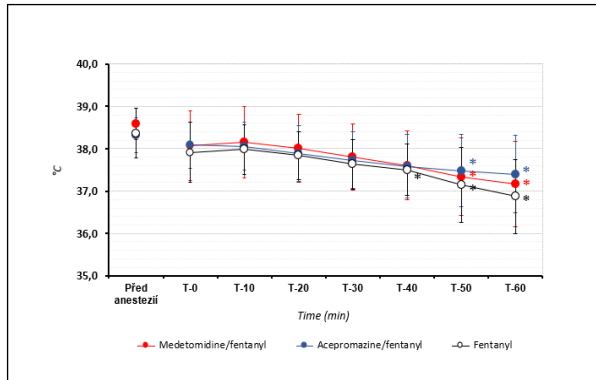
Jícnová teplota se oproti času T0 signifikantně snížila u psů skupin MED-FEN a FEN v časech T30 – T60, u psů skupiny ACE-FEN se oproti času T0 signifikantně snížila v časech T40 – T60. Jícnová teplota byla signifikantně vyšší u psů skupiny MED-FEN oproti psům skupiny ACE-FEN v časech T0 – T20 (Obrázek 4).



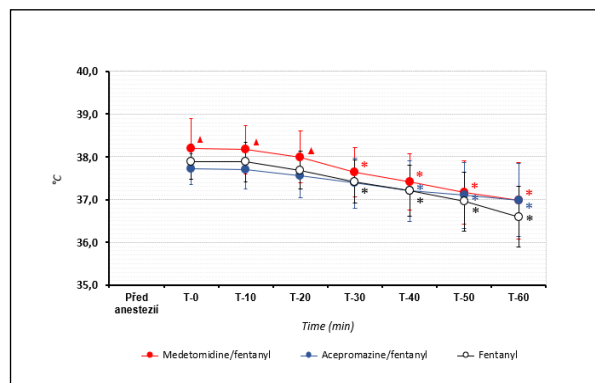
Obrázek 1: Hodnoty **srdeční frekvence** u psů premedikovaných medetomidinem a fentanylem, acepromazinem a fentanylem nebo fentanylem (body znázorňují průměr, úsečky směrodatné odchylky; * signifikantně nižší hodnoty oproti času T0, ▼ signifikantně nižší hodnoty oproti ostatním skupinám)



Obrázek 2: Hodnoty **středního arteriálního tlaku** u psů premedikovaných medetomidinem a fentanylem, acepromazinem a fentanylem nebo fentanylem (body znázorňují průměr, úsečky směrodatné odchylky; * signifikantně nižší hodnoty oproti času T0, ▲ signifikantně vyšší hodnoty oproti ostatním skupinám)



Obrázek 3: Hodnoty **rektální teploty** u psů premedikovaných medetomidinem a fentanylem, acepromazinem a fentanylem nebo fentanylem (body znázorňují průměr, úsečky směrodatné odchylky; * signifikantně nižší hodnoty oproti času T0)



Obrázek 4: Hodnoty **jícnové teploty** u psů premedikovaných medetomidinem a fentanylem, acepromazinem a fentanylem nebo fentanylem (body znázorňují průměr, úsečky směrodatné odchylky; * signifikantně nižší hodnoty oproti času T0, ▲ signifikantně vyšší hodnoty u psů premedikovaných medetomidinem a fentanylem oproti psům premedikovaným acepromazinem a fentanylem)

Závěr

Při použití premedikace medetomidinu s fentanylem, acepromazinu s fentanylem nebo fentanylu, úvodu do anestezie propofolem a vedení isofluranem s umělou plicní ventilací docházelo u psů od 50. minuty ke srovnatelnému poklesu rektální teploty a od 40. minuty i k poklesu teploty jícnové. U psů premedikovaných medetomidinem s fentanylem byla jícnová teplota 20 minut po úvodu do anestezie signifikantně vyšší oproti psům premedikovaným acepromazinem s fentanylem což odpovídá kardiovaskulárním účinkům použitých látek.

Seznam literatury:

- (1) Redondo JJ, Suesta P, Serra I, Soler C, Soler G, Gil L, Gomez-Villamandos RJ 2012: Retrospective study of the prevalence of postanesthetic hypothermia in dogs. *Veterinary Record*, 171, 374–374.
- (2) Brandt S, Oguz R, Hüttner H, Waglechner G, Chiari A, Greif R, Kurz A, Kimberger O 2010: Resistive-polymer versus forced-air warming: Comparable efficacy in orthopedic patients. *Anaesthesia and Analgesia*, 110, 834–838.
- (3) Armstrong SR, Roberts BK, Aronsohn M 2005: Perioperative hypothermia. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 15, 32–37.
- (4) Stepaniuk K, Brock N 2008: Hypothermia and thermoregulation during anesthesia for the dental and oral surgery patient. *Journal of Veterinary Dentistry*, 25, 279–283.
- (5) Vainionpää M, Salla K, Restitutti F, Raekallio M, Junnila J, Snellman M, Vainio O 2013: Thermographic imaging of superficial temperature in dogs sedated with medetomidine and butorphanol with and without MK-467 (L-659'066). *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 40, 142–148.
- (6) Wamaitha MN, Mogoia EM, Mande JD (2019): Evaluation of anesthesia produced by Ketofol in acepromazine- or medetomidine-sedated dogs. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research* 6, 215–221.
- (7) Covey-Crump GL, Murison PJ (2008): Fentanyl or midazolam for co-induction of anaesthesia with propofol in dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia* 35, 463–472.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI Brno 101/2022/FVL

VLIV INTERNÍ FIXACE FRAKTUR NA MECHANICKÉ VLASTNOSTI DLOUHÝCH KOSTÍ U KOČEK

Robert Srnec¹, Laura Staňková², Michal Radó², Valentina Vilišová³, Alois Nečas¹

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

*Doktorský studijní program (postgraduální student), Klinika chorob psů a koček, Fakulta
veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno²*

*Magisterský studijní program (student), Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a
farmaceutická univerzita Brno³*

Úvod

Fraktury dlouhých kostí jsou velmi časté v humánní i ve veterinární medicíně. Pro nejlepší možnou fixaci fragmentů je ve veterinární medicíně převážně používán systém interní metody fixace. V těchto případech je velmi často v různých funkcích využíván jako základní ortopedický prvek kortikální šroub. Obdobně je v případě extraskelletálních fixátorů využit závitový transfixační hřeb. Obě tyto komponenty, jež slouží k vytvoření vlastního spojení fixačního prvku s kostním podkladem, využívají k upevnění do kosti předvrtaného otvoru. V tomto místě pak dochází k oslabení kostního podkladu s predispozicí k mechanickému selhání konstrukce. Obdobně po zhojení zlomeniny a následném odstranění použitých implantátů, vzniká v kostním sloupci bikortikální kruhový defekt o velikosti průměru použitého šroubu, který představuje iatrogenní oslabení kosti. Tato místa se stávají predilekčním místem pro vznik refraktur a vážných komplikací v procesu léčby zlomenin. Vyvrtaný otvor reprezentuje úbytek kortikální kosti a velikost takto vzniklého defektu přímo ovlivňuje mechanickou odolnost kosti. Tyto skutečnosti jsou popsány a v minulosti publikovány v řadě studií prováděných v humánní medicíně i ve veterinární medicíně. V této oblasti jsou práce se zaměřením bazálního výzkumu jako podklad pro výstup humánní medicíny (práce prováděné u ovcí, prasat) (Edgerton et al. 1990; Ho et al. 2010) anebo práce směřující ke klinickému využití ve veterinární medicíně (práce prováděné zejména u psů, koní). V posledním období se velmi aktuálně do popředí dostává klinická ortopedie u malých savců a koček, a tyto studie jsou přesměrovány na tyto cílové druhy. Mechanická odolnost a stavba kostního sloupce je z pohledu jednotlivých druhů velmi specifická. U koček a králíků je kompaktní kost tenká, velmi tvrdá a křehká. Tyto podmínky pak vedou ke specifickým požadavkům na léčbu těchto zlomenin a v posledních letech je tomuto odvětví věnována stále větší pozornost. Na modelu králíka (Massie et al. 2019) bylo pozorováno, že vzhledem ke stavbě kosti a křehké kompaktně daného druhu se riziko iatrogenního poškození úměrně zvyšovalo s použitím větších velikostí fixačních systémů. Obdobné práce provedené na stehenní kosti u koček

však vykazovaly odlišné výsledky (Gibson et al. 2008; Hoon et al, 2021). V této studii jsme se věnovali cíleně modelu různých dlouhých rourovitých kostí u koček se zaměřením na následnou klinickou aplikaci výsledků. V takovéto šíři a souvislosti nebyla v kontextu dostupných zdrojů zatím podobná studie publikována.

Materiál a metodika

Studie mechanických vlastností kostí byla provedena jako *ex vivo* experiment na modelech dlouhých rourovitých kostí (kost pažní, kost vřetenní, kost stehenní, kost bércová) získaných z kadaverů koček. Ze zvířat uhynulých nebo utracených z důvodu jejich zdravotního stavu v rámci léčby pacientů kliniky Chorob psů a koček VETUNI byla odebrána dlouhá rourovitá kost v celé délce. Celkem byly odebrány dlouhé rourovité kosti z 15 kadaverů.

Takto získaný biologický materiál byl v gáze vlhčené NaCl uložen v zamraženém stavu při 20 °C až do doby provedení vlastních testů a měření. Po rozmražení vzorků při pokojové teplotě byla imitována léčba zlomenin interní metodou fixace vytvořením iatrogenního defektu diafýzy v různém průměru. Byl vytvořen defekt kostním vrtákem v celé šířce kostního sloupce a do vyvrtaného otvoru vytvořen závit s velikostí běžně užívaných systémů fixace používaných pro léčbu zlomenin u koček (1,1mm vrták/1,5mm závit; 1,5mm vrták/2,0mm závit a 2,0mm vrták/2,7mm závit). Pro každý vytvořený defekt byla zaznamenána jeho relativní velikost v procentech ve vztahu k zevnímu průměru kosti v místě defektu, byly změřeny základní morfometrické údaje tvaru kosti a zjištěna její váha. U každé kosti byl proveden nativní sken počítačovou tomografií a pořízena fotodokumentace. V každé testované skupině velikostního systému defektu kosti bylo 5 vzorků od každé rourovité kosti (femur n1=5, tibie n2=5, humerus n3=5, radius n4=5). Získaný model kosti byl testován na mechanickém lisu pro ohybové zkoušky FPZ 100/1 s plynule regulovatelným posunem příčnicku v režimu čtyřbodového ohybu, a to až do stavu selhání kostní architektury. Lis byl osazen certifikovanou a kalibrovanou tlakovou zatěžovací hlavou se snímačem síly o rozsahu 0-10 kN s rozlišením snímání 0,001 kN. S ohledem na literaturu (Hoon et al, 2021) byla zvolena konstantní rychlost zatěžování s přírůstkem deformace o velikosti 3,0 mm/min. V průběhu zatěžování byla kromě působící síly F (N) měřena i hodnota svislého posunutí příčnicku mechanického lisu (mm). Svislé posunutí bylo snímáno pomocí indukčního snímačem dráhy ALHBORN FWA025TR s maximálním měřicím rozsahem 25 mm a s rozlišením snímání 0,001 mm a opakovanou přesností 0,002 mm. Získaná data byla statisticky vyhodnocena základní deskriptivní statistikou.

Výsledky

V rámci projektu byly testovány čtyři různé dlouhé rourovité kosti – femur, tibie, humerus a radius. Celkem bylo ve čtyřbodovém ohybu na mechanickém lisu otestováno 60 dlouhých rourovitých kostí. Vytvořeném kostním defektu v rozsahu *cis* i *trans* kortexu došlo v průměru o následující oslabení diafýzy v místě iatrogenního defektu - pro otvor se závitem 1,5 mm (Femur 13,5 %; Tibie 16,0 %; Humerus 14,1 %; Radius 25,0 %); pro otvor se závitem 2,0 mm (Femur 18,5 %; Tibie 21,9 %; Humerus 19,4 %; Radius 34,4 %); pro otvor se závitem 2,7 mm (Femur 26,9 %; Tibie 32,2 %; Humerus 28,9 %; Radius 50,0 %).

Sledované hodnoty maximálního zatížení kosti čtyřbodovým ohybem před momentem selhání (N) byly v systému použitého závitu 1,5 mm v průměru nejvyšší, a to u kosti stehenní 977 N, kosti bércevé 1387 N, kosti pažní 929 N a kosti vřetenní 395 N. U kostních defektů se závitem 2,0 mm došlo k poklesu maximálního průměrného zatížení u kosti stehenní o 3 %; kosti bércevé 14,1 %; kosti pažní 5,7 %; kosti vřetenní 28,2 % a u kostních defektů se závitem 2,7 mm došlo k poklesu maximálního průměrného zatížení u kosti stehenní o 4,7 %; kosti bércevé 29,9 %; kosti pažní 14,4 %; kosti vřetenní 51,7 %.

Při sledování hodnoty průměrného maximálního zatížení kosti čtyřbodovým ohybem před momentem selhání (N) byly v rámci jednoho použitého systému (závit 1,5 mm; závit 2,0 mm a závit 2,7 mm) u různých kostí dosaženy nejvyšší hodnoty u kosti bércevé (závit 1,5 mm – 1387 N; závit 2,0 mm – 1191 N a závit 2,7 mm – 972 N), následně u kosti stehenní (závit 1,5 mm – 977 N; závit 2,0 mm – 948 N a závit 2,7 mm – 932 N), kosti pažní (závit 1,5 mm – 929 N; závit 2,0 mm – 876 N a závit 2,7 mm – 795 N) a nejméně odolnou k maximálnímu sledovanému zatížení je kost vřetenní (závit 1,5 mm – 395 N; závit 2,0 mm – 283 N a závit 2,7 mm – 191 N). Procentuálně je pak u jednotlivých kostí oproti maximu dosaženého u kosti bércevé pokles následující: u kosti stehenní o (závit 1,5 mm – 29,5 %; závit 2,0 mm – 20,4 % a závit 2,7 mm – 4,2 %); u kosti pažní o (závit 1,5 mm – 33,0 %; závit 2,0 mm – 26,4 % a závit 2,7 mm – 18,2 %) a u kosti vřetenní o (závit 1,5 mm – 71,5 %; závit 2,0 mm – 76,2 % a závit 2,7 mm – 80,4 %).

Seznam literatury:

1. EDGERTON, BC; AN, K; MORREY, BF: Torsional strength reduction due to cortical defects in bone. *Journal of orthopaedic research*, 1990, 8.6: 851-855
2. HO, KWK; GILBODY, J; JAMESON, T; MILES, AW: The effect of 4 mm bicortical drill hole defect on bone strength in a pig femur model. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 2010, 130.6: 797-802
3. MASSIE, AM; KAPATKIN AS; GARCIA, TC; GUZMAN, DSM; CHOU, P; STOVER, SM: Effects of hole diameter on torsional mechanical properties of the rabbit femur. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 2019, 32.01: 051-058

4. HOON, QCJ; WANG, T; HALL, E; WALSH, WR; JOHNSON, KA: Influence of Screw-Hole Defect Size on the Biomechanical Properties of Feline Femora in Ex Vivo Model, *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 2021 (on line, v tisku)
5. GIBSON, TWG; MOENS NMM; RUNCIMAN, RJ; HOLMBERG, DL; MONTEITH, GM: The biomechanical properties of the feline femur. *Veterinary and Comparative Orthopaedics and Traumatology*, 2008; 21(04): 312-317

Závěr

Oslabení diafýzy kosti se logicky zvyšuje s velikostí defektu, ale taktéž odlišně u různých kostí v závislosti na jejich tvaru a průměru. Při stejné velikosti defektu se pak jednotlivé dlouhé rourovité kosti chovají odlišně. Z výsledků tak vyplývá, že nelze jen mechanicky vybrat vhodný velikostní systém interní metody fixace dle velikosti pacienta, ale také s ohledem na charakteristiky dané dlouhé rourovité kosti. Pozitivní přínos projektu je dán získáním cenných poznatků v oblasti řešení zlomenin dlouhých rourovitých kostí u koček s vysokým potenciálem využití v klinické medicíně.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI Brno 114/2022/FVL

Vliv parenterální aplikace vitamínů na biochemické, hematologické, imunologické a antioxidační parametry telat holštýnského plemene

Romana Kadek, Michaela Simonová, Jakub Bartoň, Natálie Kuchtová

Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární univerzita Brno¹

Úvod

Protože vitamíny rozpustné v tucích u přežvýkavců přecházejí placentou k plodu jen v zanedbatelném množství, je nesmírně důležitý jejich příjem kolostrem a později prostřednictvím kvalitní mléčné náhražky. Výskyt vysoké mortality telat ve stádech se ukázal být častější ve stádech s nízkou koncentrací alfa-tokoferolu a β -karotenu v krvi telat^{1,2}. Dnes je známo, že vitamíny rozpustné v tucích hrají velmi důležitou roli v imunitním systému a také jako antioxidanty pro udržení stability biologických membrán³. Cílem naší práce bylo zjistit vliv parenterální aplikace β -karotenu v kombinaci s vitamínem E a vitamínu E v kombinaci se selenem na vybrané parametry telat holštýnského plemene.

Materiál a metodika

Vybraná zvířata a aplikace

Do experimentu bylo vybráno 30 klinicky zdravých telat, které byly rozděleny do 3 skupin po 10 zvířatech. První skupinou byla skupina kontrolní (K) - bez aplikace vitamínů, v první pokusné skupině (A) byl aplikován vitamínový přípravek Vita E Selen (toco alfa acetat – 25 mg, natrii selenis 2.2 mg – odpovídá 1 mg selenium; 5ml/tele). Ve druhé pokusné skupině (B) byl aplikován vitamínový přípravek Dalmavital (Betacarotenum 15,00 mg, dl-alfa tocoferol 20 mg; 1ml/tele). První odběr krve u telat proběhl ve věku 7-10 dnů života z *vena jugularis* ke stanovení biochemických, hematologických, imunologických a antioxidačních parametrů. Telatům pokusné skupiny A a B byly zároveň aplikovány uvedené vitamínové přípravky ve věku 7 - 10 dní a poté znovu ve věku 30 dní. Další odběr krve byl proveden ve věku 30 dní a poslední odběr ve věku 60 dní.

Odběr a příprava vzorků

Vzorky krve telat byly odebrány do zkumavek Hemos (HEMOS H-02, GAMA Group, České Budějovice, Česká republika) ke stanovení parametrů z krevního séra a plazmy. Vzorky krve pro hematologické vyšetření a oxidační vzplanutí leukocytů (chemiluminiscence) byly odebrány do odběrových zkumavek obsahujících kyselinu ethylendiamintetraoctovou (EDTA).

Po odběru vzorků se sérum nechalo srazit při pokojové teplotě a následně se sérum separovalo po centrifugaci při 3 000 g 10 minut. Vzorky séra byly zamrazeny při teplotě -70 °C až do analýzy.

Laboratorní analýza

Stanovení biochemických parametrů

Stanovení biochemických parametrů (protein, albumin) se uskutečnilo na automatickém biochemickém analyzátoru Konelab 20XT (Thermo Fisher Scientific, Vantaa, Finsko) s komerčními soupravami BioVendor, Brno, Česká republika.

Stanovení hematologických parametrů

Krev odebíraná na EDTA byla analyzována veterinárním hematologickým analyzátozem BC-2800. Vzorky pro hematologické vyšetření (celkový počet leukocytů, erytrocytů, hemoglobin, hematocrit) byly analyzovány ihned po odběru krve.

Stanovení antioxidačních parametrů a malondialdehydu (MDA)

Stanovení celkové antioxidační kapacity (TAS) se uskutečnilo pomocí spektrofotometrické metody na automatickém biochemickém analyzátoru Konelab 20XT. Koncentrace vitamínů A, E, β -karotenu a MDA byly stanoveny pomocí vysokoúčinné kapalinové Chromatografie (HPLC). Aktivita GPx byla měřena použitím UV metody založená na metodě Paglia a Valentine (1967).

Stanovení selénu

Koncentrace selenu byla analyzována pomocí atomové absorpční spektrometrie (hydrid generation) – HG AAS.

Stanovení imunologických parametrů

Oxidační vzplanutí fagocytů v plné krvi na EDTA bylo měřeno metodou chemiluminiscence na mikroplotnovém luminometru LM-01 (Immunotech, Česká republika). Jako aktivátory byly použity PMA (Phorbol 12-myristát 13-acetát) a CaI (vápníkový – ionofor A23187).

Statistická analýza

Získané výsledky byly testovány na homogenitu rozptylů (Hartley-Cochran-Bartlettův test) a normalitu distribuce (Shapiro-Wilkův test). Data byla analyzována statisticky pomocí jednosměrné analýzy rozptylu (ANOVA) následoval Fisherův post hoc test LSD. Všechny výsledky byly vyjádřeny jako střední hodnota (\bar{x}) \pm standardní odchylka (SD). Hodnota $P \leq 0,05$ byla považována za významnou

Výsledky

Výsledky biochemických parametrů a selénu:

Parametry		7-10 dní po narození			30 dní po narození			60 dní po narození		
		K	A	B	K	A	B	K	A	B
Protein g/l	X	62.6	59.4	59.6	58.0 ^α	62.1 ^{α,β}	57.5 ^β	62.3	60.7	66.2
	SD	7.57	4.35	5.26	3.96	3.98	4.33	6.96	6.84	5.19
Albumin g/l	X	31.0 ^{α,α}	33.1 ^α	33.4 ^α	32.4 ^α	34.7 ^{α,α}	33.0 ^α	35.4 ^α	32.3 ^{α,β}	30.8 ^β
	SD	1.59	1.97	1.82	2.05	1.11	2.15	2.84	1.22	2.03
Selén μg/l	X	198.2 ^{a,b}	145.6 ^a	138.3 ^b	173.5 ^a	195.2 ^{a,α}	163.1 ^α	169.4 ^α	141.8 ^α	156.6
	SD	42.89	21.7	18.96	18.35	22.09	24.79	14.82	21.43	13.95

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v rámci daného odběru jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α, β – $P < 0,05$; A – $P < 0,01$; a, b – $P < 0,001$; K – kontrolní skupina; A – 1. pokusná skupina (vitamin E a selén); B – 2. pokusná skupina (β-karoten a vitamin E)

Koncentrace proteinu, albuminu a selenu byla významně vyšší ($P < 0,05$; $P < 0,01$) v první pokusné skupině ve srovnání s kontrolní a druhou pokusnou skupinou v rámci odběru - 30 dní po narození. V rámci třetího odběru byla naopak statisticky významně vyšší koncentrace albuminu ($P < 0,001$) a selenu ($P < 0,01$) u kontrolní skupiny v porovnání s první pokusnou skupinou.

Výsledky hematologických parametrů:

V kontrolní skupině telat byl pozorován významně vyšší počet ($P < 0,05$) celkového počtu leukocytů ($10,5 \cdot 10^9/l$) ve srovnání s 1. pokusnou skupinou ($8,2 \cdot 10^9/l$) 30 dní po narození. Po aplikaci vitamínů nebyly pozorovány žádné statisticky významné rozdíly v hematologických parametrech mezi skupinami telat.

Výsledky antioxidačních parametrů (TAS a vitamínů) a MDA:

Parametry		7-10 dní po narození			30 dní po narození			60 dní po narození		
		K	A	B	K	A	B	K	A	B
Vit A μmol/l	X	0.45	0.36	0.30	0.36 ^{a,b}	0.95 ^a	0.88 ^b	1.02 ^{a,b}	0.43 ^b	0.36 ^a
	SD	0.11	0.07	0.08	0.09	0.15	0.22	0.27	0.14	0.13
Vit E μmol/l	X	4.39 ^{α,a}	7.53 ^α	9.66 ^a	8.86 ^{a,b}	3.86 ^a	5.18 ^b	2.31 ^{α,α}	3.79 ^α	4.10 ^α
	SD	2.23	2.33	2.60	1.95	1.91	1.70	0.76	1.45	1.28
β- karoten μmol/l	X	1.12 ^a	1.67 ^b	3.27 ^{a,b}	0.92 ^{α,β}	1.83 ^α	1.92 ^α	1.58	1.22	0.73
	SD	0.15	0.74	0.72	0.56	0.58	1.10	0.99	0.61	0.41
TAS mmol/l	X	0.49 ^{a,b}	0.83 ^a	0.79 ^b	0.91 ^α	1.03 ^{α,β}	0.91 ^β	0.95 ^{α,β}	0.87 ^α	0.81 ^β
	SD	0.15	0.07	0.07	0.11	0.12	0.09	0.09	0.16	0.08
GPx μkat/l	X	841.8	810.7	774.8	823.4 ^α	855.6 ^β	743.5 ^{α,β}	861.2	793.9	778.9
	SD	137.43	96.06	122.9	88.8	93.39	67.2	99.6	119.7	89.2
MDA μmol/l	X	1.217 ^a	1.243 ^b	0.770 ^{a,b}	1.172 ^α	1.207	0.940 ^α	0.770 ^{a,b}	1.103 ^a	1.101 ^b
	SD	0.095	0.136	0.205	0.140	0.360	0.183	0.106	0.186	0.081

x – střední hodnota; SD – směrodatná odchylka; signifikantní rozdíly mezi skupinami v rámci daného odběru jsou zaznamenány pomocí stejného značení: α, β – $P < 0,05$; A – $P < 0,01$; a, b – $P < 0,001$; K – kontrolní skupina; A – 1. pokusná skupina (vitamin E a selén); B – 2. pokusná skupina (β-karoten a vitamin E), Vit A – vitamin A; Vit E- vitamin E; TAS – celková antioxidační kapacita; GPx- glutathion peroxidáza; MDA - malondialdehyd

Vitamin A byl statisticky významně vyšší v obou pokusných skupinách ve srovnání s kontrolní skupinou ($P < 0,001$). V rámci druhého odběru byl významně vyšší ($P < 0,001$) v kontrolní skupině

v porovnání s oběma pokusnými skupinami. Ačkoliv byl vitamín E v rámci 1. odběru (ještě před samotnou aplikací vitamínového přípravku) významně vyšší ve druhé pokusné skupině ($P < 0.001$; $P < 0.01$) ve srovnání s kontrolní a 1 pokusnou skupinou, ve druhém odběru tomu bylo opačně. Kontrolní skupina vykazovala statisticky významně vyšší vitamín E ($P < 0.001$) v porovnání s oběma pokusnými skupinami. V rámci třetího odběru (60 dní věku telat) byl vitamín E zase statisticky významný u druhé pokusné skupiny ($P < 0.01$) ve srovnání s kontrolní skupinou. I β -karoten byl významně vyšší u 2. pokusné skupiny ještě v rámci 1. odběru před samotnou aplikací vitamínů ($P < 0.001$) statisticky významně vyšší ($P < 0.05$) byl i v rámci 2 odběru ve srovnání s první pokusnou skupinou. V rámci 3 odběru již nebyly pozorovány statisticky významné rozdíly v koncentraci beta- karotenu mezi skupinami. Koncentrace TAS byla významně vyšší v 1. pokusné skupině ve srovnání s kontrolní a 2. pokusnou skupinou ($P < 0.05$) v rámci odběru 30 dní po narození. Opačný trend byl pozorován v rámci druhého odběru kdy nejvyšší koncentrace TAS byla pozorována v kontrolní skupině ($P < 0.05$) Aktivita Gpx byla statisticky významně vyšší ($P < 0.05$) v rámci druhého odběru v 1 pokusné skupině v porovnání s kontrolní a 2 pokusnou skupinou. Koncentrace MDA byla statisticky významně vyšší v případě kontrolní skupiny v porovnání s druhou pokusnou skupinou ($P < 0.05$) v rámci odběru 30 dní po narození. V rámci vyšetření – oxidačního vzplanutí leukocytů byl celkově pozorován numericky vyšší peak chemiluminiscence (CL) při použití aktivátoru CaI a to i pro přepočtu na granulocyty.

Závěr

Parenterální aplikace vitamínů ovlivnila koncentrace vitamínu A, β - karotenu, TAS po první aplikaci (30 dní po narození).

Seznam literatury:

1. Torsein M, Lingberg A, Sandgren ChH, Waller KP, Törnquist M, Svensson C 2011: Risk factors for calf mortality in large Swedish dairy herds, *Prev Vet Med* 99 (2-4):136-147, DOI: 10.1016/j.prevetmed.2010.12.001
2. Torsein M, Lindberg A, Svensson C, Jensen SK, Berg Ch, Waller KP 2018: α -tocopherol and β -carotene concentrations in feed, colostrum, cow and calf serum in Swedish dairy

herds with high or low calf mortality. Acta Vet Scand 60 (1): 7, DOI: 10.1186/s13028-018-0361-0

3. Bordignon R, Volpato A, Glambowsky P, Souza CF, Baldissera MD, Secco R, Pereira WAB, Leal MLR, Vedovatto M, Da Silva AS 2019: Nutraceutical effect of vitamins and minerals on performance and immune and antioxidant systems in dairy calves during the nutritional transition period in summer. J Therm Biol 84: 451:459

Tato práce byla financovaná grantem 105/2022/FVL

Použití intranazální aplikace azaperonu pro sedaci prasat v rámci zlepšení podmínek welfare

Martin Svoboda, Jan Vašek, Adam Zacharda, Zuzana Hájková

Veterinární univerzita Brno, Klinika chorob přežvýkavců a prasat

Úvod

Prasata se setkávají v podmínkách intenzivního chovu se stresovými podmínkami, které vyžadují použití sedativ. V našich předchozích projektech IGA 2019 a 2021 jsme se zabývali perorální aplikací nejčastěji používaného sedativa u prasat azaperonu. V běžné praxi je sedace prasat standardně prováděna i.m. injekcí azaperonu v dávce 2 mg/kg tělesné hmotnosti. Jinou zajímavou alternativní možností představuje intranazální aplikace azaperonu u selat.

Výhodou je jednoduchost přípravy aplikace, bezbolestnost a účinnost. Díky tomu se intranazální podání léků uplatňuje stále více v humánní medicíně zejména u dětí (Vraníková et Gajdziok 2015). Podobný přínos této formy aplikace lze předpokládat i pro zlepšení welfare selat. Intranazální aplikace umožňuje dosáhnout rychlejší a vyšší úrovně absorpce léčiva z důvodu vysoké permeability, velkého prokrvení, nízké enzymatické aktivity prostředí a tím, že se vstřebané látky vyhýbají tzv. metabolismu prvního průchodu v játrech, kdy dochází ke snížení koncentrace léčiva ještě dříve, než vstoupí do systémového oběhu (Xu et al. 2020). Olfaktorní oblast nosní dutiny navíc svojí blízkostí k mozku umožňuje vstřebání léčiva přímo do mozku a mozkomíšního moku prostřednictvím čichových neuronů. Tím obchází hematoencefalickou bariéru (Graff et Pollack, 2005). Intranazální sedace u prasat byla zatím popsána pouze v případě midazolamu. Studie autorů Lacoste et al. (2000) prokázala, že intranazálně podaný midazolam v dávce 0,2 mg/kg, je účinný při vyvolání sedace a anxiolýzy u selat. V dostupné literatuře nejsou doposud k dispozici žádné údaje týkající se použití intranazální aplikace azaperonu za účelem sedace prasat. Existuje pouze jedna práce, kde byl azaperon použit jako součást anestetické směsi pro intranazální aplikaci za účelem anestézie sajících selat při kastraci (Axiak et al. 2007). V této studii nebyla samostatně hodnocena absorpce azaperonu, nicméně autoři zjistili po intranazálním podání výskyt menších vedlejších účinků, které jsou jinak přisuzovány i.m. aplikaci azaperonu (zvýšený respirační rytmus, pokles tělesné teploty). Podle těchto autorů by to možná mohlo být vysvětleno menší absorpcí azaperonu po intranazální aplikaci. Nicméně objektivní údaje o využití azaperonu po intranazální aplikaci chybí. Rovněž tak neexistují žádné srovnávací údaje týkající se farmakokinetiky, optimálního dávkování a klinické účinnosti azaperonu po intranazální aplikaci u prasat.

Materiál a metodika

Pokus probíhal v chovu prasat na ŠZP Nový Jičín. Celkem bylo použito 32 selat prasete domácího po odstavu, tj. ve věku cca 28 dnů, pouze prasničky. Selata byla před zahájením pokusu označena barevnou ušní známkou do pravého ušního boltce a proběhlo náhodné rozdělení (randomizace) pokusných zvířat do 4 skupin po 8 kusech.

Skupině A byl aplikován azaperon (Stresnil) i.m. v dávce 2 mg/kg ž.h. (standardní postup v praxi). Skupině B byl aplikován azaperon (Stresnil) intranazálně v dávce 2 mg/kg ž.h. Skupině C byl aplikován azaperon (Stresnil) intranazálně v dávce 4 mg/kg ž.h. Skupině D (kontrolní) byl aplikován intranazálně 1ml fyziologického roztoku. Pro intranazální aplikaci byl použit intranazální aplikátor léků LMA MAD NASAL (Bexamed s.r.o.). Krev byla selatům odebírána před aplikací azaperonu (0) a dále v intervalech 30, 90 a 240 minut po aplikaci. Vzorek krve byl odebrán z vena cava cranialis. V krevním séru byla stanovena metodou ELISA koncentrace azaperonu.

Klinická účinnost rozdílných forem aplikace azaperonu pro dosažení sedace u selat byla hodnocena u všech experimentálních skupin na základě reakce na hlasitou stimulaci tupým úderem kovu do kovového hrazení. Tento ukazatel byl hodnocen každých 15 minut během první hodiny po aplikaci, pak v intervalech 30 minut v následujících stupních.: 0 - reakce vysokého stupně (poskok, útěk), 1 - reakce středního stupně (žádné poskoky, ale reakce – úkrok stranou, pohyb hlavy, svalové chvění, zvednutí uší), 2 - žádná reakce. Dále byly posuzovány fyziologické funkce prasat (0, 30, 90, 180 a 240 minut po aplikaci), které zahrnovaly pohyb (stupně 0-1-2), stupeň salivace (0-1-2) a tělesnou teplotu. Selata byla krmena standardními granulovanými směsmi.

Výsledky

V případě intramuskulárně aplikovaného azaperonu (skupina A) v dávce 2 mg/kg došlo k nástupu sedace u všech selat ve skupině již za 15 minut po aplikaci (reakce vysokého stupně nezjištěna u žádných selat) a navozená sedace trvala do 45. minuty od zahájení experimentu. V 60. minutě vykazovalo již 25 % selat reakci vysokého stupně. U skupin s intranazální aplikací (skupiny B a C) byla zjištěna klesající tendence intenzity odezvy na podmět se zvyšující se dávkou aplikovaného azaperonu. V případě intranazálně aplikovaného azaperonu v dávce 2 mg/kg došlo k nástupu sedace v celé skupině selat za 60 minut po aplikaci. V 90. minutě vykazovalo již 25 % selat reakci vysokého stupně. U intranazálně aplikovaného azaperonu v dávce 4 mg/kg došlo k nástupu sedace u všech selat ve skupině za 60 minut po aplikaci a trvala v celé skupině do 120. minuty od zahájení experimentu. V 150. minutě vykazovalo již 25 % selat reakci vysokého stupně. Dále bylo provedeno stanovení azaperonu v krevním séru. Maximální koncentrace azaperonu v krevním séru

byly dosaženy ve všech skupinách 30 minut po aplikaci. Od 30. – 240. minuty došlo ve všech skupinách selat k signifikantnímu poklesu koncentrace azaperonu v krevním séru. Dále byly hodnoceny intenzita salivace a intenzita pohybu. Parametr intenzity salivace nebyl nikterak významný. Slinění se neobjevilo u žádného selate v průběhu celého experimentu. V případě intramuskulárně aplikovaného azaperonu (skupina A) v dávce 2 mg/kg byla zjištěna ataxická nebo méně aktivní selata od 30. do 180. minuty. Ležící selata byla zjištěna pouze v devadesáté minutě. Od 180. minuty nebyla pozorována žádná ležící selata. U intranazálně aplikovaného azaperonu v dávce 2 mg/kg byla zjištěna ataxická nebo méně aktivní selata také od 30. do 180. minuty. Ležící selata byla zjištěna také pouze v devadesáté minutě. Od 180. minuty nebyla pozorována žádná ležící selata. Ve skupině intranazálně aplikovaného azaperonu v dávce 4 mg/kg byla zjištěna ataxická nebo méně aktivní selata také od 30. do 180. minuty. Ležící selata byla zjištěna od 30. do 180. minuty. Od 240. minuty nebyla pozorována žádná ležící selata.

Během pokusu jsme též prováděli měření tělesné teploty. Tělesné teploty se u všech skupin pohybovaly ve fyziologickém rozmezí.

Závěr

Naše výsledky ukazují, že intranazálně podaný azaperon se vstřebává a způsobuje sedaci u selat. Z našich výsledků je patrné, že zvýšením dávky intranazálně podaného azaperonu je doba trvání sedace delší. Lze uzavřít, že k vyvolání adekvátní úrovně sedace srovnatelné se standardním způsobem aplikace tj. 2 mg/kg ž.hm. i.m. je zapotřebí intranazální podání azaperonu v dávce 4 mg/kg těl. hm.

Seznam literatury

AXIAK SM; JÄGGIN N; WENGER S; DOHERR MG; SCHWATZMANN U: Anaesthesia for castration of piglets: Comparison between intranasal and intramuscular application of ketamine, climazolam and azaperone. Schweizer Archiv für Tierheilkunde 2007, 149, 395-402.

GRAFF; CL, POLLACK; GM: Nasal drug administration: potential for targeted central nervous system delivery. J. Pharm. Sci. 2005, 94, 1187–1195.

LACOSTE L; BOUQUET S; INGRAND P; CARITEZ JC; CARRETIER M; DEBAENE B: Intranasal midazolam in piglets: pharmacodynamics (0.2 vs 0.4 mg/kg) and pharmacokinetics (0.4 mg/kg) with bioavailability determination. Laboratory Animals. 2000, 34, 29-35.

VRANÍKOVÁ B; GAJDZIOK J: Biologická dostupnost léčiva a možnosti jejího ovlivňování. Čes. Slov. Farm.2015, 64, 7–13.

XU J; TAO J; WANG J: Design and Application in Delivery System of Intranasal Antidepressants. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 2020, 8: 1-13.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 111/2022/FVL

Příspěvky

Fakulty veterinární hygieny a ekologie

Genetická struktura luňáků hnědých, luňáků červených a rozsah jejich hybridizace

Branka Bilbija, Vitalii Starenko, Marek Dostál, Ivan Literák

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

Úvod

Luňák hnědý (*Milvus migrans*) a luňák červený (*Milvus milvus*) jsou v Česku vzácní dravci zpravidla dobře rozlišitelní na základě morfologických znaků, chování a migrační ekologie. Jedinci v evropské populaci luňáka červeného jsou morfologicky uniformní na rozdíl od luňáka hnědého, u něhož se v Evropě setkáváme se zástupci poddruhů *Milvus migrans migrans* a *Milvus migrans lineatus*, jakož i jejich hybridů. Navíc se v Evropě můžeme setkat i s mezidruhovými hybridy luňáků hnědých a luňáků červených (1). Genetická struktura populací luňáků byla v Evropě (i ve světě) studována dosud jen velmi limitně stejně jako rozsah hybridizací mezi poddruhy luňáků hnědých a mezi luňákem hnědým a luňákem červeným (2).

Mikrosatelitové markery jsou často používány ve studiích populační struktury kvůli jejich vysoké rychlosti mutací (3). Získání zcela nové sady mikrosatelitových markerů je nákladné a časově náročné, proto je obvyklé, že se používají již známé markery vyvinuté pro příbuzné druhy. Genetická struktura populace luňáků červených v Německu byla nedávno charakterizována právě analýzou DNA pomocí mikrosatelitů (4).

Hlavním cílem práce bylo zavedení metodiky pro hodnocení specifických mikrosatelitových markerů u luňáků rodu *Milvus* a charakterizace jejich genetické struktury v Evropě a širěji v celé palearktické oblasti.

Materiál a metodika

Vzorky pro genetickou analýzu byly jsou odebrány v letech 2014 až 2021. Na 15 vzorcích z naší kolekce izolátů DNA z luňáků bylo testováno 33 primerových párů navržených pro studie dravců příbuzných luňákům, a 4 primerových párů které jsme navrhli pro toto studium (Tabulka 1). 15 z 33 párů primerů (Tabulka 1) bylo úspěšně amplifikováno a použili jsme je pro všech 407 vzorků. Schopnost amplifikace mikrosatelitních lokusů byla otestována pomocí PCR za užití komerčního PPP Master Mixu (Top-Bio, s.r.o.). Produkty PCR byly nanášeny na 2 % agarózový gel a pomocí elektroforézy separovány.

Produkty PCR pro potvrzení přítomnosti mikrosatelitových markerů byly extrahovány komerčním kitem pro extrakci fragmentů DNA (Geneaid Biotech Ltd.) a poté odeslány k sekvenování (Macrogen Inc.) k potvrzení specificity.

Tabulka 1. Mikrosatelitové páry primerů použité ve studii

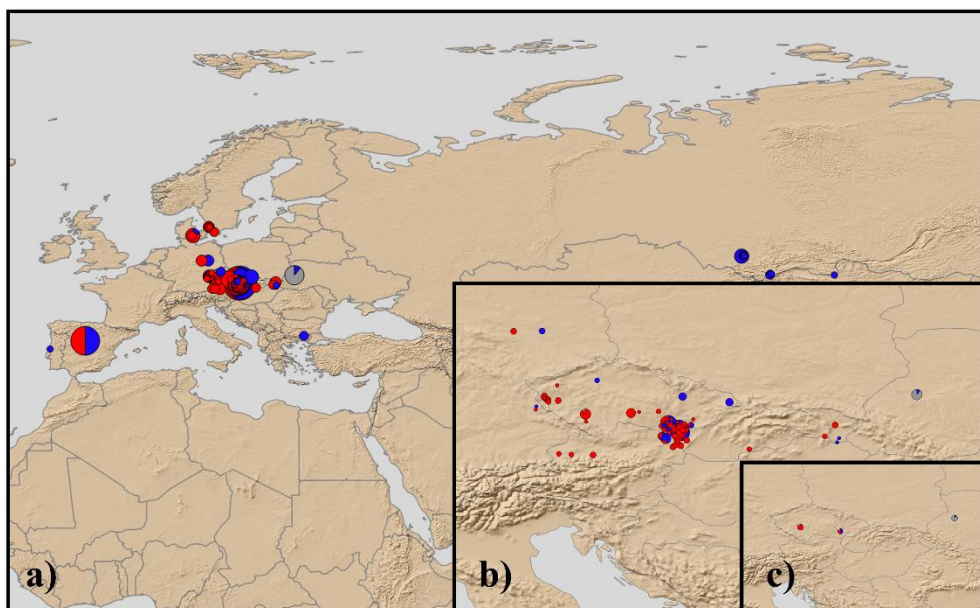
Locus	Forward primer	Reverse primer	Repeat motif	Length	Reference
1 NVH fr34	TATTTTCAGCCTGGTTTCCTAT	TTTAGTATCTCAAAGACCCTGTGT	(GT) ₉	148-152	(5)
2 NVH fr142	CCACCCCTCTGCCACTCA	CCCCTGTCAGCTAAACACATCAC	(GT) ₁₂	165-179	(5)
3 NVH fr144-2	GGGCTTTAGGTCTTCTTATTTTC	GCCTACTATTTCCGTTTACTGG	(CA) ₁₅	130-142	(5)
4 NVH fr164-1	CTGTTTCGGATGGTTCCTACAACCTT	CTCACAGGGAGGCAGGTTACTT	(GT) ₁₂	126-148	(5)
5 NVH fr190-2	CCACACAAAATCCCTCCAAC	GTTTTGCTACTGTTTCTCTGCTG	(CA) ₁₂	139-153	(5)
6 NVH fr195-2	CGTACTTTAGGCTACTGAATAA	TTAAGACAAAACGATAGACTGT	(CA) ₁₆	156-168	(5)
7 NVH fr203	CAGACCTGGCTGCAATGAGGA	GACGACCCACGGACTACAGCTTT	(GT) ₉	194-244	(5)
8 NVH fr206	ATCTAATGGGCTTTCCTGGATTT	GACATTTTCTCATAGGCAACTGA	(CA) ₁₄	150-164	(5)
9 Hal01	GAATACACCCAGAACAGCAACC	CCCAGCTGTGCTCATAACATAC	(GT) ₁₇	128-140	(6)
10 Hal02	TGGACCACAAAGTGTAACCTTCTAA	TGAATCTGCATGGTAAGCTCAG	(TG) ₁₀	178-182	(6)
11 Hal03*	GGGCATCCCTCAATCTGTTAC	ATGTTCCAGCTAGCCCTTTC	(CAAA) ₆	135-143	(6)
12 Hal05*	GCCAAAACCTGTGAGTACC	GTGGTCTGTGGGACACG	(AGG) ₁₀	109-112	(6)
13 Hal09	TGAGCTTTGTAGTAGCAGTGGTG	TGCAAAAATAGAGCCAATACCC	(AC) ₁₇	133-151	(6)
14 Hal12	CACATGTTTGTGTGCACGTC	GTGCTGCCTCTCACTGTCG	(GT) ₁₀	236-238	(6)
15 Aa04*	TGCAGCTCAAAGCAAAGG	CAACCCCAACTCTCACACCT	(GT) ₁₂	126-130	(7)
16 Aa26*	GCAAAGGTAAACTGCATCTGG	ATGCACTATTGGTAAACAGGCA	(AC) ₁₄	145-159	(7)
17 Aa50	AACATGGCAATGTGTTTCGA	ATTGACGCTGCAACAGATG	(TG) ₁₁	209-219	(7)
18 Aa57	AACATTAAGGCAGATGTGGACA	TACTGTGGACACGGACAGGA	(TG) ₁₂	113-155	(7)
19 BswA110w*	ATTTTGAGAGGTGAAGGTCACG	CAGGTCAGTGAAGGACTCTGC	(CA) ₁₈	197-233	(8)
20 BswA204w	GCAGAAGGAAATGTGTTTGGTT	TAAGAAACCAGGTGGCATTAGG	(CA) ₁₆	133-177	(8)
21 BswA317w*	CTGAAAATGTCCACACAACAAA	TGAGTAAGCACAGGAGATGGAT	(CA) ₁₇	369-391	(8)
22 BswD220w	TAACTTTTGGTCAGCCCTGAAT	TCTGTGGCACTGCAATGAAT	(GAGAA) ₁₁	265-335	(8)
23 BswA303w*	ACTGAATAAGCAGAGGGCAAAA	TGGCACTCCATAGTCAATCAG	(CA) ₁₅	226-250	(8)
24 BswB111aw*	TCATCCAATGCAGTTCTCA	CACTGGCATGAATGGACAGA	(CATC) ₇	188-208	(8)
25 BswD234w	GGAATTGCATAGGTCAAACACA	CTGTGCAACATATTATTTCCCTTG	(GAGAA) ₁₇	198-268	(8)
26 BswB220w*	GGCTTTTCTGATTGAATTAGGG	CACAACTGTTGCCTGAACTTT	(AAT) ₉	136-172	(8)
27 BswB221w	TAACTTCGACACAGGGTAGCAA	TGGGAGAGTGTGTTGTGCTCTTA	(AAT) ₄	206-224	(8)
28 BswA302w*	CGAAGTTGTGCAATCTCATTTTC	CTTGCTTTCACAATTTGCAGTC	(CA) ₁₆	201-227	(8)
29 BswA312w	GGCAGAAATCAGCAGCATAAAT	CCACTCCCTCATGAAACAGATT	(CA) ₂₁	136-168	(8)
30 Bbu14	CAAATGTCTCAACAGCTTAAGTCC	TCATTACTACTGTTAGAAATAGGCTTG	(GT) ₇	141	(9)
31 Bbu16*	AGGTTTGCATCCTCATACTTTCTC	TTTCCCTAACATTTACTGACTCCTG	(GT) ₉	176	(9)
32 Bbu22	GACGCTTGAGCAAAGAGAGG	TGCAAGAACACTTCCAAAGC	(CA) ₈	124	(9)
33 Bbu46	TGAACCCTGGAGAAAGATGC	CAATTTGGGGAGACGTGATG	(AC) ₁₂	168	(9)
34 SSR16*	ATCCTGGGCCAAGAGACC	CTGCTCCGAAGCAACAAC	(AC) ₉	154-164	naše studie
35 SSR48*	TTCTGTGGAATCTGAGACAGG	TGGTGCAACAGGGAAGG	(GAG) ₉	185-193	naše studie
36 SSR49*	GACGCGCTGTCATGTCC	GCCAAGGGCTGTGTGTTTC	(AT) ₁₁	254-284	naše studie
37 Mmi4*	TTCTCCAGCCCGATTTTTGT	CCTCCAGGTTTACATAACA		149-165	naše studie

* mikrosatelitové páry primerů které jsme v našich vzorcích úspěšně amplifikovali

Délka fragmentů byla analyzována na sekvenátoru ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) a skórování bylo prováděno pomocí softwaru PEAK SCANNER v. 1 (Applied Biosystems). Přítomnost mikrosatelitových lokusů je potvrzena sekvenováním (Macrogen Inc.) omezené sady vzorků. Soubor byl formátován do potřebných vstupních souborů pomocí CONVERT 1.31. Pro kontrolu možných překlepů, přítomnosti nulových alel a genotypových chyb byl použit program MICRO-CHECKER 2.2.3. Indexy genetické rozmanitosti jsou analyzovány v ARLEQUIN 3.5.2.2. K získání vhledu do genetické struktury populace a ke zjištění, zda geografický původ vzorků odpovídá genetickým skupinám, byl použit program STRUCTURE 2.3.4.

Výsledky

Software STRUCTURE 2.3.4. našel dva clustery ($K=2$), které odpovídají našemu souboru dat z luňáků hnědých a luňáků červených luňáků patřících do dvou různých populací (Obrázek 1). Geografická struktura ukazuje, že se luňáci hnědí hnízdí v celé Eurasii, zatímco luňáci červení jsou omezeni na evropskou oblast. Potvrzuje se také přesun hybridní zóny ze Sibiře do střední Evropy (Obrázek 1b a 1c).



Obrázek 1. Dva clustery ($K=2$) nalezeny softwarem STRUCTURE 2.3.4., luňáci hnědí jsou označeni modře a luňáci červení jsou označeni červeně, hybridní jedinci jsou označeni šedě.

Všechny analyzované lokusy byly polymorfní. Po aplikaci Bonferroniho korekce nebyla detekována žádná vazebná nerovnováha pro žádný pár lokusů. Genetická diverzita, celkový počet alel (n_A), alelická bohatost (AR) a počet soukromých alel (n_p) byly vyšší v populaci luňáků hnědých ve srovnání s populací luňáků červených (Tabulka 2).

Hodnoty očekávané a pozorované heterozygotnosti byly vyšší také pro populaci luňáka hnědého. Pokud jde o hodnoty FST, ukázaly se diference mezi dvěma clustry 0.44241, což ukazuje na značný stupeň diference mezi populacemi (Tabulka 2).

Tabulka 2. Genetická diverzita dvou clustrů STRUCTURE s vyloučením hybridních jedinců. Zkratky: n - počet jedinců, np - počet privátních alel, nA - počet alel na lokus, Ho - pozorovaná heterozygotnost, He - očekávaná heterozygotnost, AR - alelická bohatost.

Cluster	n	np	nA	Ho	He	AR
Luňák hnědý	138	45 (40.91%)	110	0.434948	0.41370	7.333
Luňák červený	255	11 (16.18%)	68	0.28839	0.31271	4.857

Závěr

Byli jsme schopni potvrdit a odlišit dvě samostatné populace analýzou souboru vzorků obsahujícího obě populace i jejich hybridy. Je potvrzeno, že genetická diverzita je větší v populaci luňáků hnědých, což odpovídá jejich větší oblasti rozšíření. Zjistili jsme také, že hybridní zóna se přesunula ze sibiřské oblasti do oblasti střední Evropy. Získané výsledky poskytly nové poznatky o populační struktuře luňáků hnědých a červených, což představuje základ pro analýzu jejich migračních vzorců.

Seznam literatury:

- 1) HENEGER, P., DOLINAY, M., MATUŠÍK, H., PFEIFFER, T., NACHTIGALL, W., BIZOS, J., ŠIMÍČKOVÁ, D. a LITERÁK, I. Conservation of the red kite *Milvus milvus* (Aves: Accipitriformes) is not affected by the establishment of a broad hybrid zone with the black kite *Milvus migrans migrans* in central Europe. *PLoS ONE*. 2016, 11(7), s. e0159202, 1-22. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159202>
- 2) ANDREYENKOVA, N., KARYAKIN, I., STARIKOV, I., SAUER-GÜRTH, H., LITERÁK, I., ANDREYENKOV, O., SHNAYDER, E., BEKMANSUROV, R., ALEXYENKO, M., WINK, M. a ZHIMULEV, I. Phylogeography and demographic history of the black kite *Milvus migrans*, a widespread raptor in Eurasia, Australia and Africa. *Journal of Avian Biology*. 2021, 52(10), s. e02822, 1–19. <https://doi.org/10.1111/jav.02822>
- 3) SCHLÖTTERER, C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA. *Chromosoma*. 2000, 109, s. 365–371. DOI 10.1007/s004120000089
- 4) BRUNE, J., KRÜGER, O., HIPPAUF, E., RÖSNER, S. a KATZENBERGER, J.. Eine nichtinvasive Methode für Populationsstudien beim Rotmilan *Milvus milvus*:

- Molekulargenetische Individualerkennung anhand von Mauserfedern. *Vogelvelt*. 2019, 13, s. 129–140.
- 5) NESJE, M. a RØED, K. Microsatellite DNA markers from the gyrfalcon (*Falco rusticolus*) and their use in other raptor species. *Molecular Ecology*. 2000, 9, s. 1438-1440. doi: 10.1046/j.1365-294x.2000.00999-4.x. PMID: 10972786.
 - 6) HAILER, F., GAUTSCHI, B. a HELANDER, B. Development and multiplex PCR amplification of novel microsatellite markers in the White-tailed Sea Eagle, *Haliaeetus albicilla* (Aves: Falconiformes, Accipitridae). *Molecular Ecology Notes*. 2005, 5 s. 938-940. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01122.x>
 - 7) MARTÍNEZ-CRUZ, B., DAVID, V., GODOY, J., NEGRO, J., O'BRIEN, S. a JOHNSON, W. Eighteen polymorphic microsatellite markers for the highly endangered Spanish Imperial Eagle (*Aquila adalberti*) and related species. *Molecular Ecology Notes*. 2002, 2, s. 323 – 326. DOI: 10.1046/j.1471-8286.2002.00231.x
 - 8) HULL, J., TUFTS, D., TOPINKA, R., MAY, B. a ERNEST, H.B. Development of 19 microsatellite loci for Swainson's hawks (*Buteo swainsoni*) and other buteos. *Molecular Ecology Notes*. 2007, 7, s. 346-349. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01604.x>
 - 9) JOHNSON, P., FOWLIE, M. a AMOS, W. Isolation of microsatellite loci from the common buzzard, *Buteo buteo* (Aves: Accipitridae). *Molecular Ecology Notes*. 2005, 5, s. 208-211. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00878.x>

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 202/2022/FVHE

Migrující draví ptáci - skrytá hrozba šíření antibiotické rezistence

Tomáš Nohejl^{1,2}, Michaela Růžičková^{1,2}, Marek Schneider¹, Ivana Jelínková¹, Kateřina Krejčí¹,
Martin Klvaňa², Jiří Kolář¹, Kateřina Kavanová¹, Hassan Tarabai^{1,2}, Marek Dostál¹, Šimon Krejčí¹,
Monika Dolejská^{1,2}

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno; ²Středoevropský technologický institut (CEITEC), Veterinární univerzita Brno

Úvod

Divoká zvířata jsou stále častějšími hostiteli bakterií nesoucích geny virulence a antibiotické rezistence. Stěhovaví ptáci mají potenciál získat a přenést rezistentní bakterie v rámci dlouhých migračních cest [1]. Předchozí studie poukázala na dravce jakožto významné nositele enterobakterií rezistentních ke klinicky významným antibiotikům [2]. Draví ptáci mají oportunistické chování při krmení, kdy využívají potravu z různých přírodních (malí hlodavci, savci a mršina) a antropogenních zdrojů (lidské odpadky ze skládek), aby splnily své dietní požadavky [3]. Zmíněné dlouhé migrační cesty a potravní návyky dělají z dravců možný rezervoár antibiotické rezistence a zároveň vhodný modelový organismus ke studiu akvizice, prevalence a přenosu rezistentních bakterií v rámci volně žijících ptáků.

Klinicky významné bakterie, a to převážně kmeny *Escherichia coli*, nesou geny pro rezistenci k antibiotikům používaným na léčbu infekcí v humánní a veterinární medicíně (cefalosporiny, chinolony, karbapenemy a kolistin). Nejen, že se tyto geny mohou šířit pomocí bakterií, ale jsou zároveň nesený mobilními genetickými elementy (MGE), které zprostředkovávají jejich horizontální přenos mezi jednotlivými bakteriemi [4]. Plazmidy jsou MGE, které se replikují nezávisle na bakteriálním chromozomu a bakterie si je mohou vzájemně předávat horizontální cestou. Vzhledem k tomu, že plazmidy mají zásadní význam pro šíření genů antibiotické rezistence, jsou nedílnou součástí epidemiologie klinicky významných kmenů bakterií. Pomocí plazmidů jsou rezistentní bakterie schopné geny antibiotické rezistence předávat do přirozeně se vyskytujících bakterií daného organismu. Takto vzniklé rezervoáry genů antibiotické rezistence se šíří pomocí jejich hostitelů včetně migrujících ptáků [5]. V rámci studie byl prozkoumán soubor 779 kloakálních výtěrů volně žijících migrujících dravých ptáků Evropy z let 2018-2021. Byla určena prevalence rezistentních bakterií včetně jejich genetického obsahu čítající geny antibiotické rezistence, virulence a zastoupení mobilních genetických elementů, plazmidů.

Materiál a metodika

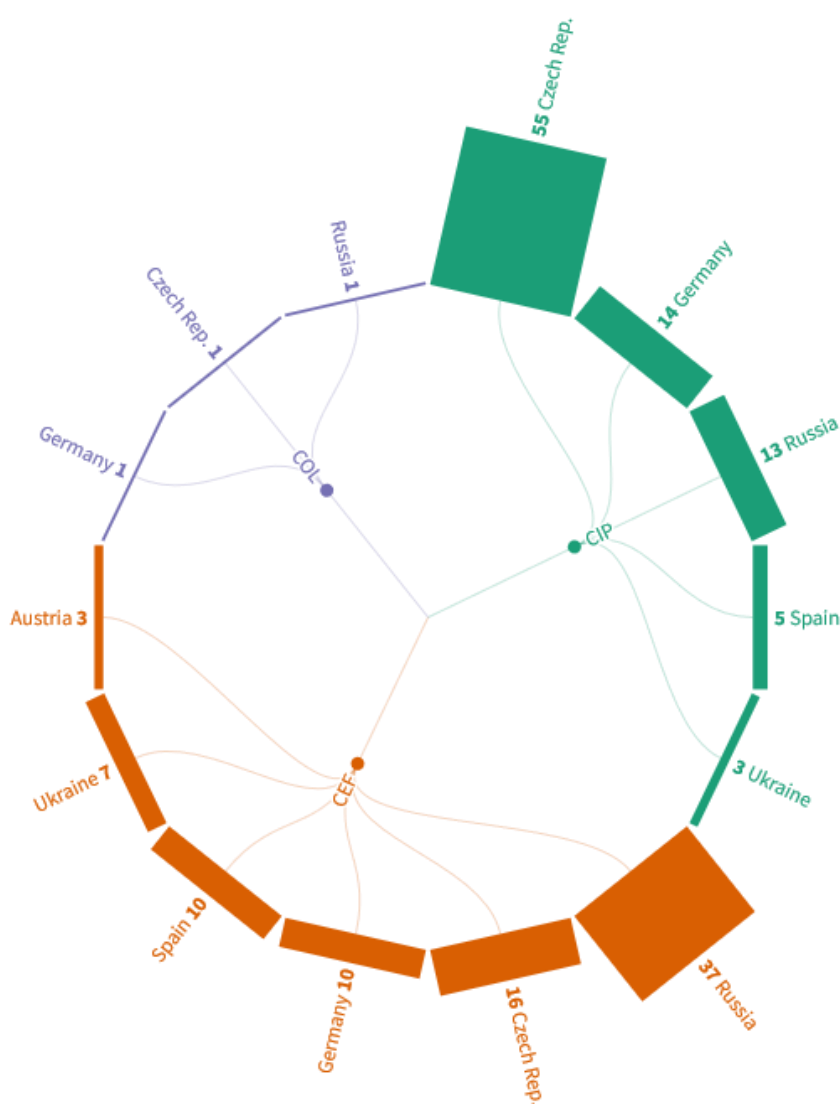
Tento projekt charakterizoval soubor kloakálních výtěrů volně žijících migrujících dravých ptáků z Belgie (n=13), České republiky (n=392), Maďarska (n=8), Německa (n=105), Rakouska (n=13), Ruska (n=185), Slovenska (n=8), Španělska (n=38) a Ukrajiny (n=17) z let 2018-2021. V letech 2018-2019 bylo sesbíráno 481 vzorků a v letech 2020-2021 celkem 298 vzorků z dravců různých druhů (luňák červený, luňák hnědý, moták pochop, orel královský, orel mořský, aj.). Izoláty z odebraných vzorků byly selektovány na 4 typech médií s obsahem jednoho z následujících antibiotik: cefotaxim (2 µg/ml), ciprofloxacin (0,05 µg/ml), meropenem (0,125 µg/ml) a kolistin (3,5 µg/ml). Selektivní kultivací bylo získáno 419 izolátů rostoucích na půdě s ciprofloxacinem, 200 izolátů rostoucích na půdě s cefotaximem, 35 na půdě s kolistinem a 205 na půdě s meropenemem. Tyto izoláty byly druhově určeny metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Pomocí PCR byly ověřeny geny zprostředkávající rezistenci k daným antibiotikům. Izoláty pozitivní pro zmíněné geny se sestávaly z 90 rostoucích na půdě s ciprofloxacinem, 83 rostoucích na půdě s cefotaximem a 3 rostoucích na půdě s kolistinem a byly následně vybrány k celogenomovému sekvenování.

U vybraných izolátů byla extrahována genomická DNA kitem NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel), která byla využita na přípravu knihoven kitem Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) a tyto knihovny byly sekvenovány na přístroji HiSeq (Illumina). Sekvenační data byla assemblována programy Trimmomatic-0.36 a SPAdes v3.13.0 a získané kontigy byly analyzovány na přítomnost genů antibiotické rezistence (ResFinder 4.1), plazmidových replikonů (PlasmidFinder 2.1) a určení sekvenčního typu izolátů (MLST 2.0) volně dostupnými nástroji (<http://www.genomicepidemiology.org>). Analýza sekvencí byla zpracována v programu Geneious 9.1.8 za využití databáze GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) ve spojení s algoritmem BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). U vybraných izolátů s rozdílným zastoupením genů rezistence v kombinaci s plazmidovými replikony byla navíc extrahována genomická DNA kitem Nanobind HMW DNA Extraction (Circulomics), který poskytuje delší fragmenty DNA, a ty byly sekvenovány na přístroji MinION (Oxford Nanopore Technologies) pomocí kitu Rapid Barcoding kit (Oxford Nanopore Technologies). Kompletní sekvence plazmidů byly následně získány pomocí programu Guppy Basecalling Software v4.2.2, BBDuk v38.68, Porechop v0.2.4, Ratatosk v0.4, Unicycler v0.4.8, Racon v1.4.20, Medaka v1.2.3, Pilon v1 při využití dat z Illumina a MinION sekvenování.

Výsledky

V rámci studie jsme vytvořili sbírku 779 vzorků kloakálních výtěrů dravých ptáků sesbíraných v letech 2018-2021 z území Evropy. Geny skupiny *qnr* (*qnrB*, *qnrC*, *qnrD* a *qnrS*), *aac(6')-Ib-cr* a *oqxA* kódující rezistenci k chinolonům byly detekovány u 90 izolátů rostoucích na médiu s ciprofloxacinem, které pocházely z dravců z let 2018-2021. Alespoň jedna rezistentní bakterie s plazmidově kódovaným genem rezistence k chinolonům byla prokázána u 11,6 % vyšetřených dravců. Geny *bla_{CMY-2}* a *bla_{CTX-M}* u izolátů rostoucích na médiích s cefotaximem byly nalezeny v 83 případech, což představuje 10,7 % (n=779) z celkově vyšetřených dravců. Gen *mcr-1* kódující rezistenci ke kolistinu byl detekován u 3 izolátů a odpovídá 0,4 % výskytu v získané sbírce. Izolované rezistentní kmeny patřily k bakteriálním rodům *Escherichia coli* (n=171) nejčastěji sekvenčního typu (ST) 10, 115 a 162 a *Klebsiella pneumoniae* (n=5) ST294, ST788 nebo ST1726. Izoláty nesoucí zmíněné geny rezistence pocházely z České republiky (40,9 %, 72/176), Ruska (29 %, 51/176),

Německa (14,2 %, 25/176) Španělska (8,5 %, 15/176), Ukrajiny (5,7 %, 10/176) a Rakouska (1,7 %, 3/176), a to z naprosté většiny luňáků hnědých a červených (Obrázek č. 1).



Obrázek č. 1: Země odběru vzorku kloakálního výtěru dravce v souvislosti s jeho izolátem rostoucím na půdě s antibiotikem CIP (ciprofloxacín, zelená), CEF (cefotaxim, oranžová) nebo COL (kolistín, fialová).

Výše zmíněná sbírka izolátů byla vybrána k celogenomovému

sekvenování. Všechny izoláty vykazovaly multirezistenční profil a mezi další detekované geny

antibiotické rezistence patřily zejména geny rezistence k beta-laktamům (např. *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{TEM} a *bla*_{OXA-2}), fluorochinolonům (plazmidově kódované geny *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* a *qnrS*), sulfonamidům (*sul1-3*), tetracyklinu (*tetA*), aminoglykosidům (*aac(3)-IId*, *aac(3)-VIa*, *aadA2*) a fosfomycinu (*fosA*). Mezi časté virulenci faktory u sekvenovaných izolátů patřily geny *entB-F*, *entS*, *fepA-D*, *fepG*, *fimA-I*, *gspC-M*, *ompA* a *ecpA-E*. V jednotlivých izolátech se pak většinou vyskytovaly plazmidové replikony skupin IncF-type, IncHI2, IncI, IncK, IncN, IncX1 a IncY. Na základě původu izolátu, roku odebrání, zastoupení genů rezistence, virulenci faktorů a plazmidových replikonů byly vybrány reprezentativní izoláty k celogenomovému sekvenování dlouhých čtení na platformě MinION. Jedním z prvních zcela uzavřených plazmidů naší sbírky byl plazmid IncI2 nesoucí gen *mcr-1* z izolátu DR164-COL, u kterého byla ověřena i jeho schopnost přenosu mezi bakteriemi pomocí konjugace. Tento plazmid byl dle celosvětové databáze NCBI detekován i ve vzorcích pocházející z lidí (klinické izoláty z Argentiny, Číny a Ruska), prasečího trusu (Čína, USA), drůbeže (Vietnam) a dalších. Získané informace poukazují na možný zoonotický potenciál jednotlivých plazmidů nesoucí geny rezistence ke klinicky důležitým antibiotikům. Dravci, jakožto divoká zvířata ovlivněna antropogenní aktivitou, pravděpodobně jsou rezervoárem genů antibiotické rezistence s možností jejího dalšího šíření do prostředí.

Závěr

V rámci studie byla charakterizována velká sbírka rezistentních izolátů získaná z populací migrujících dravých ptáků z několika území Evropy. Studie poukázala na závažné rozšíření antibiotické rezistence u volně žijících zvířat s možností jejího dalšího šíření do prostředí.

Seznam literatury:

[1] RAMEY, AM, AHLSTROM, C.A. Antibiotic Resistant Bacteria in Wildlife: Perspectives on Trends, Acquisition and Dissemination, Data Gaps, and Future Directions. *Journal of wildlife diseases*, 2020; 56: 1-15

[2] DARWICH, L, et al. High prevalence and diversity of extended-spectrum β -lactamase and emergence of OXA-48 producing Enterobacterales in wildlife in Catalonia. *PLoS One*. 2019; 14; 8

[3] TARABAI, H, et al. Plasmid-Mediated *mcr-1* Colistin Resistance in *Escherichia coli* from a Black Kite in Russia, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2019; 63; 9

[4] SOUCY SM, et al. (2015) Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*; 16(8):472-82.

[5] SKARZYNSKA, M, et al. Antimicrobial Resistance Glides in the Sky-Free-Living Birds as a Reservoir of Resistant *Escherichia coli* With Zoonotic Potential. *Front Microbiol*. 2021 Apr 9;12:656223.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 203/2022/FVHE

Komparativní genomika a dynamika multirezistentních patogenních kmenů *Escherichia coli* u racků bělohavých a v jejich prostředí

Michaela Růžičková^{1,2}, Jarmila Laušová^{1,2}, Ivo Papoušek¹, Monika Dolejská^{1,2}

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

Úvod

Neustále se zvyšující antibiotická rezistence způsobuje závažné problémy při léčbě infekčních nemocí jak lidí, tak zvířat. Rezistence enterobakterií, jako je např. *Escherichia coli*, je závažná zejména z důvodu jejich kosmopolitního výskytu a existence patogenních kmenů [1]. Rezistentní bakterie selektované z důvodu užívání antibiotik v humánní i veterinární medicíně se snadno dostávají do prostředí, kde se poté z obydlených oblastí mohou šířit do přírody a kolonizovat tak volně žijící zvířata [2,3]. Dalšímu přenosu ve volné přírodě pak napomáhá migrující ptactvo, které je schopno rezistentní bakterie roznášet i do míst prostých lidského vlivu [4].

Jedním ze v tomto směru sledovaných druhů jsou raci, kteří žijí synantropně a mají tendence žít se v místech s pozůstatky lidské činnosti, např. na skládkách. Studie ukazují, že raci poté bývají kolonizováni rezistentními kmeny bakterií vyskytujícími se u lidí [5]. To je případ i vodní nádrže Nové Mlýny, která je součástí přírodní rezervace, ale zároveň se zde vyskytuje oblast pro rekreaci. Studie se zaměřuje na racky bělohlavé (*Larus cachinnans*) hnízdící na této nádrži a řeší komparativní genomiku a dynamiku multirezistentní patogenní *Escherichia coli* kolující v jejich kolonii. Zároveň v rámci výzkumu simulujeme prostředí bez potenciálních vnějších vlivů a pozorujeme přenos plazmidů a přidružených genů rezistence mezi jednotlivými kmeny a racky. Pro lepší pochopení vlivu prostředí a možného přenosu z něj se soustředíme také na vzorky vody odebrané v místě hnízdní kolonie a několika dalších míst vodní nádrže.

Materiál a metodika

Během experimentu bylo ve dvou letech po sobě umístěno pět nelétavých mládřat racků bělohavých (*Larus cachinnans*) na 10–12 týdnů do voliéry a vzorkováno v pravidelném intervalu dvou týdnů. Dohromady bylo odebráno celkem 35 kloakálních stěrů v roce 2018 a 20 stěrů v roce 2019. Tyto stěry byly poté kultivovány na médiu s cefotaximem (2 µg/ml), a v případě růstu bylo z každé kultury odebráno pět kolonií. V roce 2019 bylo odebráno také šest vzorků vody z různých míst nádrže, které byly selektovány na médiu s cefotaximem (2 µg/ml), a z každé kultury bylo poté odebíráno 20 kolonií. Vybrané kolonie byly pasážováním přečištěny a poté u nich bylo provedeno druhové určení

za pomoci MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie. Dále jsme pracovali jen s izoláty identifikovanými jako *E. coli*.

U získaných izolátů byl proveden PCR screening genů *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CMY-2} a *bla*_{TEM} kódujících rezistenci vůči beta-laktamovým antibiotikům. Pro fenotypové zhodnocení byl použit komerční test MASTDISCS® Combi, který detekuje produkci beta-laktamázy, a jsme díky němu schopni odlišit producenty širokospektrých beta-laktamázy (ESBL, *Extended-Spectrum Beta-Lactamases*) a AmpC beta-laktamázy.

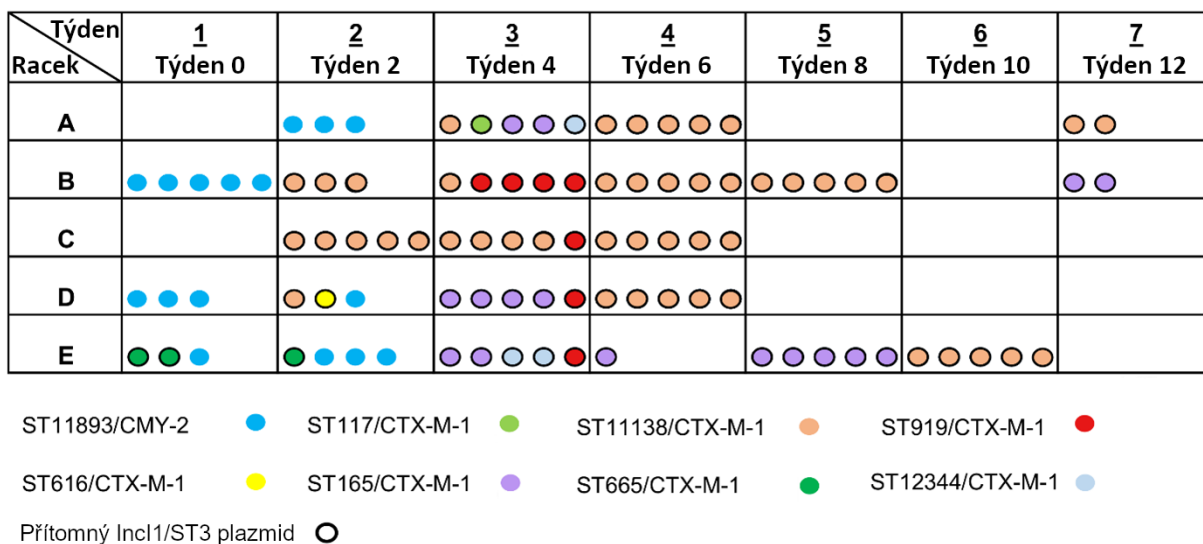
Pro zjištění bližší příbuznosti jednotlivých izolátů bylo provedeno restriční štěpení genomové DNA enzymem XbaI následované separací fragmentů pulzní gelovou elektroforézou, a na jejím základě a na základě výsledků předchozího testování byly vybrány izoláty na další analýzu za pomoci celogenomového sekvenování krátkých čtení (WGS, *Whole Genome Sequencing*). Celogenomová DNA byla extrahována pomocí kytu NucleoSpin® Tissue. Knihovny byly připraveny kitem Nextera XT a sekvenace proběhla na platformě HiSeq (Illumina). Ze získaných dat byly programem Trimmomatic odfiltrovány adaptorové sekvence a čtení se špatnou kvalitou. Získaná čtení byla poté poskládána za pomoci algoritmu SPAdes. S využitím MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) byl určen sekvenční typ (ST) jednotlivých bakteriálních kmenů. Plazmidové replikony byly detekovány nástrojem PlasmidFinder, geny pro rezistenci k antibiotikům poté nástrojem ResFinder, a geny virulence nástrojem VirulenceFinder. Vzhledem k výsledkům byly analýzy doplněny ještě sekvenováním dlouhých čtení na platformě MinION (Oxford Nanopore Technologies), díky čemuž jsme byli schopni určit lokalizaci významných genů na chromozomu nebo na plazmidu. Vybrané izoláty byly prozkoumány více do hloubky, a byla u nich určena frekvence konjugace plazmidu, produkce kolicinu a stanovení fitness.

Výsledky

Testovaný soubor izolátů byl získán selekcí vzorků z kloakálních stěrů odebraných z nelétavých mládřat racků hnízdících v kolonii u vodní nádrže Nové Mlýny na médiu s přídavkem cefotaximu (2 µg/ml). Z 35 kloakálních stěrů v roce 2018 bylo vyselektováno 23 (66 %) rostoucích kultur a z 20 stěrů v roce 2019 celkem 12 (60 %) kultur. Odebráním pěti kolonií z každé kultury jsme nakonec získali sbírku 94 izolátů *E. coli* z roku 2018 a 60 izolátů *E. coli* z roku 2019. Z šesti vzorků vody získaných v roce 2019 jsme nakonec odebráním 20 kolonií z každé misky získali dohromady 59 izolátů rostoucích na půdě s cefotaximem, z toho 42 bylo identifikováno jako *E. coli*.

Na datech můžeme sledovat výrazné změny v přítomnosti různých sekvenčních typů v čase a jejich přenos mezi jedinci. V roce 2018 byli během prvního vzorkování tři racci kolonizováni *E. coli* ST11893 nesoucí gen *bla*_{CMY-2}. Tento gen přerušoval úsek spojený s produkcí kolicinu umístěný na

konjugativním plazmidu F34:A:-B:-. Pouze jeden z racků nesl *E. coli* produkující gen *bla*_{CTX-M-1}, a to na IncI1/ST3 plazmidu zodpovědném za produkci kolicinu, zde ale k přerušení sekvence nedocházelo. V dalších odběrech původní kmen *E. coli* nesoucí F-plazmid zmizel a plazmid IncI1/ST3 se začal šířit do dalších sekvenčních typů s postupným převládáním ST11138, což by mohlo být způsobeno právě schopností produkovat kolicin. Dva měsíce po začátku experimentu začal výskyt izolátů rezistentních k cefotaximu klesat, což můžeme pozorovat na Obr. 1.



Obr. 1. Výskyt jednotlivých sekvenčních typů a genů, které nesou, v závislosti na čase

V roce 2019 byla dynamika mezi jednotlivými kmeny a racky méně výrazná, a u jednoho jedince za celou dobu nedošlo k žádné kolonizaci rezistentními kmeny *E. coli*. V celém experimentu převládal ST2325 s genem *bla*_{TEM-52}, který je zodpovědný za produkci širokospektrých beta-laktamáz. Tento ST se z jednoho jedince rozšířil i do ostatních, jen ke konci experimentu se objevily také sekvenční typy 162 a 349, oba s genem *bla*_{CMY-2} kódujícím produkci AmpC beta-laktamázy.

Co se týká odběrů vody z roku 2019, v celém souboru převládal ST12346 nesoucí gen *bla*_{CTX-M}, v malé míře jsme ale mohli také pozorovat ST2325 s geny *bla*_{CTX-M} a *bla*_{TEM}, který byl v tomto roce přítomný i v izolátech získaných z racků. U dalších sekvenčních typů výrazně převažoval výskyt genu *bla*_{CTX-M} kódujícího produkci ESBL nad genem *bla*_{CMY-2} pro produkci AmpC beta-laktamáz, který se zde téměř neobjevoval.

Závěr

Naše výsledky ukazují, že raci jsou ve svém gastrointestinálním traktu schopni udržovat rezistentní kmeny bakterií po dobu minimálně šesti týdnů, což může vést k dalšímu šíření rezistence. Můžeme dokázat, že po vyjmutí racků z jejich přirozeného prostředí dochází k poklesu výskytu rezistentních bakterií až do téměř úplného vymizení. Zároveň jsme pozorovali výměnu bakterií mezi jednotlivými

ptáky, která mohla vést k emergenci nových, potenciálně úspěšnějších sekvenčních typů. Při pohledu na získaná data usuzujeme, že racci mohou sloužit jako sekundární zdroj rezistence pro další jedince, jiná volně žijící zvířata a pro prostředí jako takové. Dalším důležitým faktorem úspěšného šíření určitých sekvenčních typů se zdá být asociace plazmidů nesoucích geny antibiotické rezistence s geny pro produkci kolicinu. Byli jsme také schopni demonstrovat výskyt multirezistentních linií *E. coli* v samotné vodní nádrži, což může představovat riziko jak pro volně žijící zvířata, tak pro lidské zdraví.

Seznam literatury:

[1] JANG, J., H.-G. HUR, M.J. SADOWSKY, M.N. BYAPPANAHALLI, T. YAN a S. ISHII. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications-a review. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017, 123(3), 570-581 [cit. 2022-11-16]. ISSN 13645072. Dostupné z: doi:10.1111/jam.13468

[2] DOLEJSKA, Monika a Ivan LITERAK. Wildlife Is Overlooked in the Epidemiology of Medically Important Antibiotic-Resistant Bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2019, 63(8), e01167-19 [cit. 2022-11-16]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.01167-19

[3] PLAZA-RODRÍGUEZ, Carolina, Katja ALT, Mirjam GROBBEL, et al. Wildlife as Sentinels of Antimicrobial Resistance in Germany?. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2021, 7 [cit. 2022-11-16]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2020.627821

[4] ALM, Elizabeth W., Quri R. DANIELS-WITT, Deric R. LEARMAN, Hodon RYU, Dustin W. JORDAN, Thomas M. GEHRING a Jorge SANTO DOMINGO. Potential for gulls to transport bacteria from human waste sites to beaches. *Science of The Total Environment* [online]. 2018, 615, 123-130 [cit. 2022-11-16]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2017.09.232

[5] AHLSTROM, Christina A., Mariëlle L. VAN TOOR, Hanna WOKSEPP, et al. Evidence for continental-scale dispersal of antimicrobial resistant bacteria by landfill-foraging gulls. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, 764 [cit. 2022-11-16]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2020.144551

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 204/2022/FVHE

Plazmidy v šírení rezistencie k antibiotikám poslednej voľby: využitie sekvenovania novej generácie v koncepte One Health

Katarína Stred'anská^{1,2}, Tomáš Nohejl^{1,2}, Iva Sukkar², Jana Palkovičová^{1,2}, Monika Dolejská^{1,2}

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

Úvod

Liečba infekcií spôsobených multirezistentnými baktériami je nesmierne náročná a nákladná a ohrozuje životy pacientov a spoločenských či hospodárskych zvierat. O prepojení týchto odvetví pojednáva koncept „One Health“ [1], ktorý bude podkladom pre naše hypotézy.

Je kriticky dôležité, aby sa zachovala účinnosť rezervných antibiotík poslednej voľby. Medzi tieto antibiotiká patrí i skupina širokospektrálne účinných látok zvaných karbapenémy a kolistín. Obe skupiny sú ohrozené, nakoľko sa zvyšuje výskyt rezistentných baktérií. To je spôsobené najmä horizontálnym šírením génov rezistencie prostredníctvom mobilných genetických elementov, hlavne plazmidov [2]. Odolnosť baktérií ku kolistínu je často zabezpečená chromozomálnymi mutáciami, avšak boli objavené i gény *mcr*, ktorých výskyt je úzko spojený s plazmidmi [3].

Plazmidy spolu s ďalšími mobilnými genetickými elementami hrajú významnú úlohu v horizontálnom šírení a udržiavaní génov rezistencie. Medzibunkový prenos plazmidov je závislý na procese konjugácie, ktorý je ovplyvnený prekonaním exklúzných systémov bunky [4]. Dôkladný popis štruktúry a sekvencie plazmidov a jej porozumenie je preto nevyhnutné pre hľadanie spôsobov ako šíreniu antibiotickej rezistencie predísť.

Aktuálne najpokročilejšou metódou pre identifikáciu sekvencií DNA je sekvenovanie. Kombinácia sekvenovania s krátkymi a dlhými čítaniami teda poskytuje nielen prehľad génov a sekvencií prítomných v genóme sledovaného izolátu, ale tiež obraz o ich začlenení [5].

Materiál a metodika

V rámci projektu boli skúmané izoláty radu *Enterobacterales*, najmä *E. coli*, zo zbierky z humánnych animálnych a environmentálnych zdrojov. Z izolátov, u ktorých bola pomocou testovacej súpravy na zistenie minimálnej inhibičnej koncentrácie (MIKRO-LA-TEST (MIC)) potvrdená rezistencia ku kolistínu alebo karbapenémom, bola extrahovaná DNA (MaCherey-Nagel NucleoSpin). U takto extrahovanej DNA bola určená koncentrácia (Qubit™ dsDNA HS and BR Assay Kits) z vyhovujúcich vzoriek boli pripravené sekvenačné knižnice a následne bolo prevedené sekvenovanie platformou HiSeq (Illumina). U obdržaných dát prebehla kontrola kvality

a odstránenie adaptorových sekvencií (Trimmomatic), nasledované ich poskladaním (assembly) algoritmom SPAdes. Výsledné sekvencie boli podrobené základnej bioinformatickej analýze – určenie bakteriálneho druhu a sekvenčného typu (MLST – *Multi Locus Sequence Typing*), identifikácia plazmidových replikónov (Plasmidfinder), ich inkompatibilných skupín (pMLST) a identifikácia génov rezistencie (Resfinder). Následne boli izoláty rozdelené do skupín podľa neseného génu rezistencie a boli zostavené fylogenetické stromy (Prokka, Roary, RAxML), na základe ktorých boli vybrané reprezentatívne vzorky z jednotlivých skupín. Z takto vybraných vzoriek bola šetrne izolovaná DNA (GenFind V3 – Beckman Coulter alebo Circulomics Nanobind), vhodná na sekvenovanie s dlhými čítaniami. To bolo prevedené na platforme MinION (Oxford Nanopore Technologies) za pomoci prípravy sekvenačných knižníc kitom Rapid Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies). Tieto sekvencie boli taktiež assemblované (Flye) a ďalej porovnávané medzi sebou či so sekvenciami z dostupných databáz (Geneious, GenBank). Bolo tiež využité mapovanie krátkych čítaní na kostry z dlhých čítaní (BRIG) pre znázornenie podobnosti sledovaných izolátov, ktoré neboli sekvenované na platforme MinION.

Výsledky

Zbierka kmeňov nesúcich gény pre produkciu karbapenemáz sa skladala z izolátov rôznych bakteriálnych druhov a sekvenčných typov klinického pôvodu získaných v ČR (324, u ktorých boli nájdené rôzne typy karbapenemáz), izolátov získaných z čajok z Austrálie (108, produkujúcich karbapenemázu IMP-4) a troch izolátov *Enterobacter asburiae* s VIM-1 z odpadných vôd z Brna.

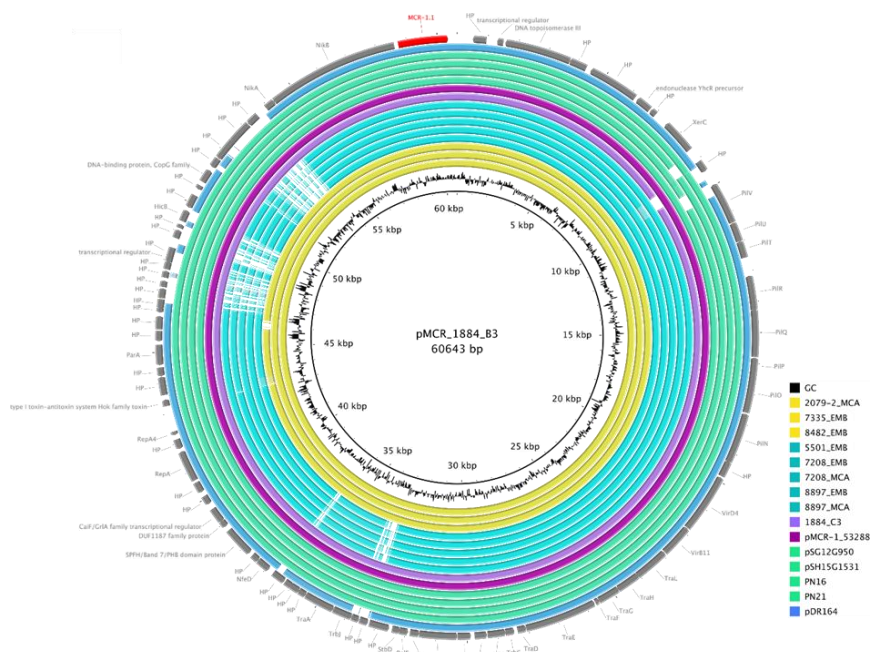
U klinických izolátov boli nájdené gény rezistencie ku karbapenémom v počte – 49 *bla_{OXA-48}*, 6 *bla_{OXA-244}*, 91 *bla_{NDM-1}*, 59 *bla_{NDM-4}*, 15 *bla_{NDM-5}*, 86 *bla_{KPC-2}*, 6 *bla_{VIM-1}* a 3 *bla_{VIM-4}*. Po vybraní reprezentatívnych vzoriek, sa vďaka sekvenovaniu s dlhými čítaniami u mnohých z týchto génov podarilo potvrdiť lokalizáciu na plazmidoch rôznych inkompatibilných skupín.

Niektoré z týchto kombinácií sú typické pre rozmanité vzorky, ako napríklad IncL plazmid nesúci gén *bla_{OXA-48}*, ktorý sa často vyskytoval v našich klinických izolátoch. V databáze GenBank sa nachádzajú rovnaké plazmidy pochádzajúce z prostredia, z okolia veterinárnej kliniky, či z klinických izolátov. To naznačuje, že sa jedná o epidemický plazmid rozšírený v rôznych zdrojoch a oblastiach. Zaujímavým príkladom začlenenia génu rezistencie v genóme je napríklad *bla_{OXA-244}*, u ktorého sme pozorovali začlenenie v profágovi LE1 naprieč rôznymi typmi vzoriek (sedem klinických, jeden animálny, štyri environmentálne). Tento profág sa v prípade *E. coli* (ST38) nachádzal prevažne na chromozóme, avšak u *Klebsiella pneumoniae* bol nájdený zväčša na plazmidoch, a to i v prípadoch nájdených v databáze GenBank. Tento gén sa šíri naprieč prostredím, čo je spojené s klonálnym šírením extraintestinálnej patogénnej línie *E. coli* ST38.

U génu *bla*_{N_{DM}-1} sme pozorovali vysokú variabilitu v začlenení, keďže sa nachádzal na chromozóme, ale najmä na rôznych typoch plazmidov (IncR, IncC, plazmidy typu IncF a hybridné plazmidy IncHI1 s plazmidom typu IncF). Variabilita začlenenia bola menšia u *bla*_{N_{DM}-4}, nachádzajúcom sa na plazmidoch skupiny IncX3, prípadne na hybridných plazmidoch IncX3 s plazmidom typu IncF. Plazmidy typu IncF niesli tiež gény *bla*_{N_{DM}-5}, kde bol tento gén ohraničený inzerčnými sekvenciami. V našej zbierke sa nevyskytli izoláty z animálnych ani environmentálnych zdrojov, ktoré by niesli jeden z týchto génov. Rovnako porovnanie s databázou GenBank naznačuje, že plazmidy nesúce tieto gény sú typické pre klinické izoláty.

Gén *bla*_{IMP-4} bol lokalizovaný na plazmidoch, a to prevažne na plazmidoch typu IncHI2. Identifikované IncHI2 z našej zbierky austrálskych čajok boli vysoko podobné s plazmidmi získanými z rôznych bakteriálnych izolátov ľudského a animálneho pôvodu.

Gény *bla*_{VIM-1} sa v našich klinických izolátoch nachádzali na plazmidoch typu IncHI1 alebo pKPC-CAV1193 - podobne ako u ďalších klinických izolátov. Naopak u kmeňov *E. asburiae* pochádzajúcich z odpadových vôd bol gén *bla*_{VIM-1} lokalizovaný u dvoch kmeňov na plazmide skupiny IncF a u jedného izolátu na netypovateľnom plazmide. Gén bol začlenený do kazety integrónu triedy 1 spolu s génmi rezistencie k aminoglykozidom a kvartérnym amónnym zlúčeninám. Zbierka 185 izolátov nesúcich gény rezistencie ku kolistínu bola reprezentovaná 111 izolátmi *E. coli* nesúcimi *mcr-1* pochádzajúcimi z importovaného a domáceho, bravčového a hovädzieho mäsa a hydiny, 73 klinickými izolátmi a jedným izolátom získaným z čajky v ČR. U klinických izolátov boli najčastejšie detegované gény *mcr-1* (48/73) a *mcr-9* (25/73). Tri izoláty niesli zároveň gén *mcr-4* a *mcr-9*. Gén *mcr-1* bol najčastejšie nesený plazmidmi IncX4 (125/160), IncI2 (16/160), IncH2 (14/160) a u 5 izolátov bol detegovaný na chromozóme. Vysoká nukleotidová identita bola pozorovaná u plazmidov IncX4 pochádzajúcich z mäsa i z humánnych klinických izolátov. U plazmidov IncI2 sa naše izoláty rozdelili do dvoch skupín. Jedna z nich vykazovala rovnaký profil ako plazmid izolovaný z Haje tmavej z Ruska a zahŕňala izoláty z kloakálnych sterov bitúnkových zvierat. Druhá skupina vykazovala rovnaký profil ako plazmid izolovaný z importovaného králičieho mäsa a zahŕňala izoláty z kloakálnych sterov bitúnkových zvierat, z humánnych klinických izolátov a zo vzoriek mäsa importovaného do ČR. Výsledok mapovania krátkych čítaní na dlhé čítanie plazmidu IncI2 z králičieho mäsa je zobrazený na obrázku 1. U plazmidov zo skupiny HI2 bola vysoká variabilita, avšak podobná plazmidová kostra. Plazmid niesol viacero génov rezistencie k ďalším skupinám antibiotík, napr. sulfónamidy, amino-glykozidy, chinolóny, atď.



Obrázok 1. Zrovnanie sekvencií plazmidov IncI2 s génom *mcr*.

plazmid pMCR_1884_B3 (GenBank č. MT929283.1) pochádzajúci z *E. coli* ST162 ako referencia – importované králičie mäso. Bledomodrá skupina a žltá skupina znázorňuje plazmidy pochádzajúce z kloakálnych sterov bitúnkových zvierat. Svetlofialová skupina predstavuje plazmidy z ľudských klinických izolátov. Tmavofialová skupina predstavuje IncI2 plazmidy pochádzajúce z izolátov z mäsa importovaného do ČR. Zelenou farbou sú znázornené podobné plazmidy z databázy GenBank (MH522410.1, MH522416.1, MG489944.1 a MG557851.1). Tmavomodrá farba predstavuje plazmid získaný z izolátu z Haje tmavej z Ruska (MK542639.1).

Záver

Naše výsledky ukazujú podobnosti v začlenení niektorých génov rezistencie ku karbapenémom a ku kolistínu naprieč rôznymi typmi vzoriek. To naznačuje možný prenos týchto génov prostredníctvom mobilných genetických elementov, najmä plazmidov, medzi rôznymi baktériami a ich cirkuláciu u človeka, zvierat a v prostredí. Smer šírenia jednotlivých génov rezistencie bude predmetom ďalšieho podrobného skúmania dát získaných v rámci tohto projektu.

Seznam literatury:

- [1] McEwen SA & Collignon PJ. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum Journal*, 2018 Mar;6(2). doi: 10.1128/microbiolspec.ARBA-0009-2017
- [2] Codjoe F.S. & Donkour, E.S. Carbapenem Resistance: A Review. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 2017, 6.(1)1: doi:10.3390/medsci6010001
- [3] Stefaniuk E.M. *et al.* Colistin Resistance in *Enterobacterales* Strains – A Current View. *Polish Journal of Microbiology*. 2019, 68(4), 417–427
- [4] Che Y. *et al.* Conjugative plasmids interact with insertion sequences to shape the horizontal transfer of antimicrobial resistance genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2021, 118:6, e2008731118
- [5] Adewale B.A. Will long-read sequencing technologies replace short-read sequencing technologies in the next 10 years? *African Journal of Laboratory Medicine*, 2020, 9(1)1340: doi:10.4102/ajlm.v9i1.1340

Tato práca byla financovaná grantem IGA VETUNI 205/2022/FVHE

Vliv způsobu zacházení před porážkou na stres u drůbeže

Kadlecová Gabriela, Válková Lenka, Voslářová Eva, Šebánková Monika, Vojtkovská Veronika,
Kotianová Lucia, Hostovský Martin, Hostovská Lucie, Blahová Jana

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

Úvod

Intenzivní zemědělská produkce vyžaduje nutnost přepravy hospodářských zvířat mezi místem odchovu a výkrmu a následně na místo porážky, kdy během nakládky, vlastního transportu a vyskladňování dochází v různé míře k stresovému zatížení zvířat (Scott and Moran, 1993). Manipulace spojená s přepravou je jedním z výrazně stresujících faktorů ovlivňujících welfare drůbeže (Terlouw et al., 2008), kdy při zacházení se zvířaty dochází ke zraněním (Gregory et al., 1992), která mají dopad také na kvalitu masa (Harkati et al., 2018). Nejčastější místa vzniku zranění jsou v oblasti končetin a křídel (Saraiva et al., 2020) a také oblast hrudníku (Gerpe et al., 2021). Mezi některé rizikové faktory patří například přenášení 2 – 3 zvířat současně, čímž se zvyšuje riziko kolize zvířat mezi sebou nebo zranění při vkládání do přepravního boxu (Gerpe et al., 2021). Gregory et al. (1992) prokázali, že přenášení drůbeže za obě končetiny v porovnání s přenášením pouze za jednu končetinu vede ke snížení četnosti zlomenin. K hodnocení welfare v souvislosti s přepravou a manipulací při přenášení lze využít data o výskytu zranění na jatkách při příjmu drůbeže a rovněž stresové zatížení sledované prostřednictvím změny hladiny kortikosteronu a dalších biochemických ukazatelů v krvi (Mormède et al., 2007) nebo změn povrchové teploty zachycených termokamerou (Edgar et al., 2013).

Materiál a metodika

Pro hodnocení stresu u drůbeže v souvislosti s přítomností poranění končetin vzniklých při manipulaci a přepravě byly při porážení nosnic na jatkách v rámci vykrcení po omrácení odebrány vzorky krve od 35 nosnic s poraněními končetin a 35 nosnic bez poranění končetin.

Pro hodnocení stresového zatížení drůbeže při vyskladňování bylo náhodně vybráno 20 brojlerových kuřat, která byla po odchyту přenášena v inverzní poloze těla (úchopem za zadní končetiny hlavou dolů) a 20 jedinců přenášených v přirozené poloze těla s hlavou nahoru (s jednou rukou pod hrudníkem v horní části stehen a druhou rukou přidržující hřbet a křídla). Každý brojler byl také snímán termokamerou ihned po odchytu a následně po přenesení na místo porážky. Využita byla termokamera testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s parametry obrazu 640x480 pixelů, senzitivitou < 0,04 °C, rozmezím teploty –30 až 100 °C a nastavenou emisivitou na hodnotu 0,97.

Povrchová teplota byla snímána z neopeřeného místa za vnějším koutkem oka ze vzdálenosti cca 0,5 metru a odečtena v softwaru IRSoft (Testo SE & Co. KGaA, Německo).

Krev byla od všech zvířat odebrána v rámci vykrvení po omráčení do heparinizovaných zkumavek. V rámci biochemické analýzy krevní plazmy byla stanovena koncentrace celkového proteinu, albuminu, kyseliny močové, glukózy, laktátu, triglyceridů, cholesterolu, vápníku, kreatinkinázy, fosforu a aktivita enzymů AST, ALT, ALP a LDH a u brojlerů navíc kreatinin, hořčík a FRAP. Biochemické parametry byly stanoveny pomocí analyzátoru Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) s použitím komerčních kitů (Biovendor, Brno, Česká republika). Hladina plasmatického kortikosteronu byla vyhodnocena metodou ELISA s využitím komerčních kitů Cayman Chemical (Ann arbor, MI, USA) u nosnic a antibodies-online (Aachen, Německo) u brojlerů s měřením absorbance na readeru při vlnové délce 450 nm.

Statistické zpracování výsledků bylo provedeno v programu UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Pro statistické srovnání hodnot mezi různými skupinami byl použit nepárový Studentův t-test. Pro srovnání hodnot povrchové teploty brojlerů před a po přenesení na místo porážky byl proveden párový t-test. Hodnota $p < 0,05$ byla stanovena jako statisticky významná.

Výsledky

Tabulka č. 1 zobrazuje výsledky hodnocených biochemických parametrů v krvi nosnic a brojlerů. V případě inverzní polohy hlavy při přenášení brojlerů byla statisticky významně zvýšená ($p < 0,05$) hladina laktátu a aktivita LDH a snižená ($p < 0,05$) aktivita ALT ve srovnání se skupinou zvířat přenášených v poloze hlavou nahoru. Způsob přenášení neměl vliv ($p > 0,05$) na další sledované biochemické parametry v plazmě ani na hladinu kortikosteronu v krvi. Nosnice po ukončení snášky, u kterých byla při prohlídce na jatkách zjištěna traumatická poranění končetin, vykazovaly ve srovnání s nosnicemi bez poranění významně vyšší ($p < 0,05$) koncentrace albuminu, celkové bílkoviny a kortikosteronu a nižší ($p < 0,05$) hladinu glukózy, triglyceridů, vápníku a aktivitu ALT. Ostatní sledované biochemické parametry nebyly ovlivněny přítomností poranění na končetinách ($p > 0,05$).

Tabulka č. 2 zobrazuje povrchovou teplotu naměřenou na neopeřeném místě za vnějším koutkem oka u brojlerů dle způsobu, jakým byli přenášení na místo porážky (inverzní poloha vs. přenášení v poloze hlavou nahoru).

Skupina brojlerů přenášených hlavou nahoru měla po odchyty i po přenesení vyšší ($p < 0,05$) povrchovou teplotu než skupina brojlerů přenášených v inverzní poloze (Tabulka č. 2). Během doby od odchyty do přenesení na místo porážky nedošlo ke změně povrchové teploty u žádné skupiny.

Tabulka č. 1. Průměrné hodnoty kortikosteronu a sledovaných biochemických parametrů při různých způsobech přenášení brojlerů a výskytu traumat u nosnic.

Biochemický parametr	způsob přenášení - brojleři		stav končetin - slepice	
	inverzní poloha hlavy	přirozená poloha hlavy	skupina s poraněním	skupina bez poranění
alkalická fosfatáza (μkat/l)	3,11 ^a	3,64 ^a	2,87 ^c	3,34 ^c
alaninaminotransferáza (μkat/l)	0,76 ^a	1,18 ^b	0,18 ^c	0,37 ^d
aspartátaminotransferáza (μkat/l)	6,46 ^a	5,79 ^a	8,15 ^c	7,09 ^c
laktátdehydrogenáza (μkat/l)	18,52 ^a	16,87 ^b	9,38 ^c	8,51 ^c
kreatinkináza (μkat/l)	168,76 ^a	187,00 ^a	169,37 ^c	154,03 ^c
celková bílkovina (g/l)	30,59 ^a	28,99 ^a	55,24 ^c	50,86 ^d
albumin (g/l)	13,54 ^a	12,80 ^a	20,05 ^c	17,53 ^d
triglyceridy (mmol/l)	0,81 ^a	0,83 ^a	4,83 ^c	8,95 ^d
glukóza (mmol/l)	14,17 ^a	14,06 ^a	13,04 ^c	13,56 ^d
laktát (mmol/l)	8,82 ^a	5,22 ^b	4,08 ^c	4,71 ^c
kyselina močová (μmol/l)	229,62 ^a	239,75 ^a	529,13 ^c	446,19 ^c
kreatinin (μmol/l)	29,41 ^a	26,12 ^a	-	-
cholesterol (mmol/l)	3,12 ^a	3,08 ^a	3,32 ^c	3,77 ^c
fosfor (mmol/l)	2,25 ^a	2,27 ^a	2,12 ^c	2,29 ^c
hořčík (mmol/l)	1,04 ^a	1,05 ^a	-	-
vápník (mmol/l)	2,83 ^a	2,73 ^a	3,94 ^c	4,58 ^d
FRAP (μmol/l)	1124,52 ^a	1114,8 ^a	-	-
kortikosteron (ng/ml)	46,63 ^a	45,24 ^a	6,38 ^c	3,68 ^d

Odlíšné indexy (^{a,b} u způsobu přenášení a ^{c,d} u výskytu poranění) v rámci řádků ukazují statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl mezi dvojicemi hodnot.

AST = aspartátaminotransferáza, ALT = alaninaminotransferáza, ALP = alkalická fosfatáza, LDH = laktátdehydrogenáza, FRAP = ferric reducing ability of plasma

Tabulka č. 2. Průměrné hodnoty povrchové teploty neopeřeného místa za okem brojlerů dle způsobu přenášení na místo porážky

	Teplota po odchytu (° C)	Teplota po přenesení (° C)
inverzní poloha těla	40,50 ^{a,x}	40,51 ^{a,x}
přirozená poloha těla	40,89 ^{a,y}	40,83 ^{a,y}

^a stejný index v rámci řádků ukazuje statisticky nevýznamný ($p > 0,05$) rozdíl mezi hodnotami, ^{x,y} odlišný index v rámci sloupců ukazuje statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl mezi hodnotami.

Závěr

Byl prokázán vliv traumatických poranění vzniklých v souvislosti s vyskladňováním z chovu a přepravou drůbeže (nosnic) na jatky na její stresové zatížení, kdy nosnice s traumatickými poraněními končetin vykazovaly vyšší hladinu kortikosteronu a změny dalších biochemických ukazatelů stresu. Vliv způsobu držení drůbeže při odchytu a přenášení drůbeže (brojlerových kuřat) na stresové zatížení naznačuje rozdíl v hodnotě laktátu, LDH a ALT a rozdíl v povrchové teplotě, avšak hodnoty plazmatického kortikosteronu se nelišily.

Seznam literatury:

- 1) EDGAR, J.L., NICOL, C.J., PUGH, C.A., PAUL, E.S. Surface temperature changes in response to handling in domestic chickens. *Physiology and Behavior*, 2013, 119:195-200.
- 2) GERPE, C., STRATMANN, A., BRUCKMAIER, R., TOSCANO, M.J. Examining the catching, carrying, and crating process during depopulation of end-of-lay hens. *Journal of Applied Poultry Research*, 2021, 30:100115.
- 3) GREGORY, N.G., WILKINS, L.J., AUSTIN, D., BELYAVIN, C.G., ALVEY, D.M., TUCKER, S.A. Effect of catching method on the prevalence of broken bones in end-of-lay hens. *Avian Pathology*, 1992, 21:717-722.
- 4) HARKATI, A., BOUGHELLOUT, H., FUENTE-GARCÍA, C., KRID, F.A.B., AGLI, A., ZIDOUNE, M., SENTANDREU, M.A. Effect of pre-slaughter handlings on broiler chicken welfare and relationship with meat quality. *Journal of Veterinary Science and Technology*, 2018, 9:4.
- 5) MORMÉDE, P., ANDANSON S., AUPERIN B., BEERDA B., GUEMENE, D., MALMKVIST, J., MANTECA, X., MANTEUFFEL, G., PRUNET, P., VAN REENEN, C.G., RICHARD, S., VEISSIER, I. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior*, 2007, 92:317-339.
- 6) SARAIVA, S., ESTEVES, A., OLIVEIRA, I., MITCHELL, M., STILWELL, G. Impact of pre-slaughter factors on welfare of broilers. *Veterinary and Animal Science*, 2020, 10:100146.
- 7) SCOTT, G.B., MORAN, P. Fear levels in laying hens carried by hand and by mechanical conveyors. *Applied Animal Behaviour Science*, 1993, 36:337-345.
- 8) TERLOUW, E.M.C., ARNOULD, C., AUPERIN, B., BERRI, C., LE BIHAN-DUVAL, E., DEISS, V., LEFEVRE, F., LENSINK, B.J., MOUNIER, L. Pre-slaughter conditions, animal stress and welfare: current status and possible future research. *Animal*, 2008, 2:1501-1517.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 206/2022/FVHE

Základní klinické a biochemické parametry moči chrtů

Simona Kovaříková, Jana Blahová, Denisa Jurůjová, Kristýna Panyková

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

Úvod

Příslušnost k určitému plemeni může mít vliv na výsledky hematologického a biochemického vyšetření krve. Koncept jednotných referenčních rozmezí pro celý živočišný druh nemusí být pro některá plemena ideální (1). Tradičně zmiňovaným plemenem s odchylkami od standardních referenčních intervalů je greyhound. U greyhoundů byly popsány změny parametrů červené krevní řady (vyšší počty erytrocytů, vyšší hodnoty hematokritu, vyšší koncentrace hemoglobinu) a nižší počty leukocytů a trombocytů (2,3). Greyhoundi mají také oproti ostatním plemenům vyšší plazmatické koncentrace kreatininu a to pravděpodobně v důsledku většího množství svalové hmoty. (4) S ohledem na odchylky zjištěné u greyhoundů byla sledována i další plemena patřící do skupiny chrtů. Greyhoundům nejpodobnější hodnoty měli whippeti, mezi ostatními plemeny chrtů byly zjištěny signifikantní rozdíly ve sledovaných hematologických a biochemických parametrech (5). Referenční rozmezí určené pro greyhoundy se tak nehodí pro použití u ostatních chrtů a každé chrtí plemeno by tak ideálně mělo mít své vlastní referenční intervaly.

Cílem této práce bylo posoudit poměr proteinu ke kreatininu v moči zástupců plemen patřících do skupiny chrtů (FCI skupina 10) a výsledky porovnat s hodnotami psů mimo tuto skupinu.

Materiál a metodika

Majitelé chrtů byli se žádostí o poskytnutí vzorku moči kontaktováni přímo, prostřednictvím chovatelských klubů nebo sociálních sítí. Ve skupině ostatních plemen byly vzorky moči získávány také v rámci preventivních prohlídek celkového zdravotního stavu.

Během doby trvání studie bylo získáno pomocí spontánní mikce celkem 219 vzorků moči od psů – zástupců plemen patřících do skupiny chrtů FCI – skupina 10). U všech vzorků byla zjištěna hustota a chemické vlastnosti pomocí semikvantitativních diagnostických proužků. Pro následné kvantitativní laboratorní vyšetření byly použity pouze vzorky bez přítomnosti krve nebo hemoglobinu (bez ohledu na makroskopický vzhled vzorku), současně byly také vyřazeny vzorky s nedostatečným objemem. Laboratorní vyšetření tak bylo provedeno u 191 vzorků, 28 vzorků tak bylo vyřazeno. Kontrolní skupinu tvořilo 90 vzorků získaných od psů jiných plemen než chrtů. Vzorky moči byly odebírány pouze od klinicky zdravých psů.

Ve skupině chrtů bylo 104 psů (z toho 26 kastrováných) a 87 fen (z toho 29 kastrováných), průměrný věk skupiny byl 3,7 roku (rozmezí 6 týdnů až 14 let). Ve skupině chrtů bylo vyšetřeno 50 vzorků od

psů plemene whippet, 31 vzorků od plemene saluki, 27 vzorků od plemene galgo, 21 vzorků od plemene greyhound, 18 vzorků od plemene italský chrtík, 15 vzorků od plemene barzoj, 9 vzorků od plemene deerhound, 7 vzorků od plemene afghánský chrt, 6 vzorků od plemene irský vlkodav, po 3 vzorcích od plemen azawakh a sloughi a jeden vzorek od maďarského chrta. V kontrolní skupině bylo 42 psů (z toho 5 kastrovaných) a 48 fen (z toho 20 kastrovaných), průměrný věk skupiny byl 4,4 roku (rozmezí 10 týdnů až 12 let).

Vzorky byly od majitelů dopravovány ve zmrazeném stavu. Po rozmrazení byly zjišťovány fyzikální a chemické vlastnosti. V rámci vyšetření moči byla zjišťována hustota pomocí ručního refraktometru (RUR-5ATC). Pokud hustota přesahovala horní hranici stupnici refraktometru, byl vzorek naředěn destilovanou vodou v poměru 1:1. Následně byl vzorek znovu posouzen, poslední dvojčíslí odečtené na stupnici refraktometru bylo vynásobeno dvěma, a tak byla získána výsledná hodnota hustoty. Pomocí diagnostického proužku (HeptaPHAN, Erba Lachema, Česká republika) byly posuzovány chemické vlastnosti vzorku (pH, bílkovina, glukóza, krev). Následně byly vzorky odstředěny (3 000 otáček po dobu 3 minut) a pro další analýzu byl použit pouze supernatant. Koncentrace proteinu a kreatininu v moči byla stanovována fotometricky s využitím biochemického analyzátoru Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific). Koncentrace bílkoviny byla zjišťována pomocí komerčního kitu Abbott s benzethonium chloridem, koncentrace kreatininu byla měřena Jaffého metodou s využitím komerčního kitu of firmy Biovendor.

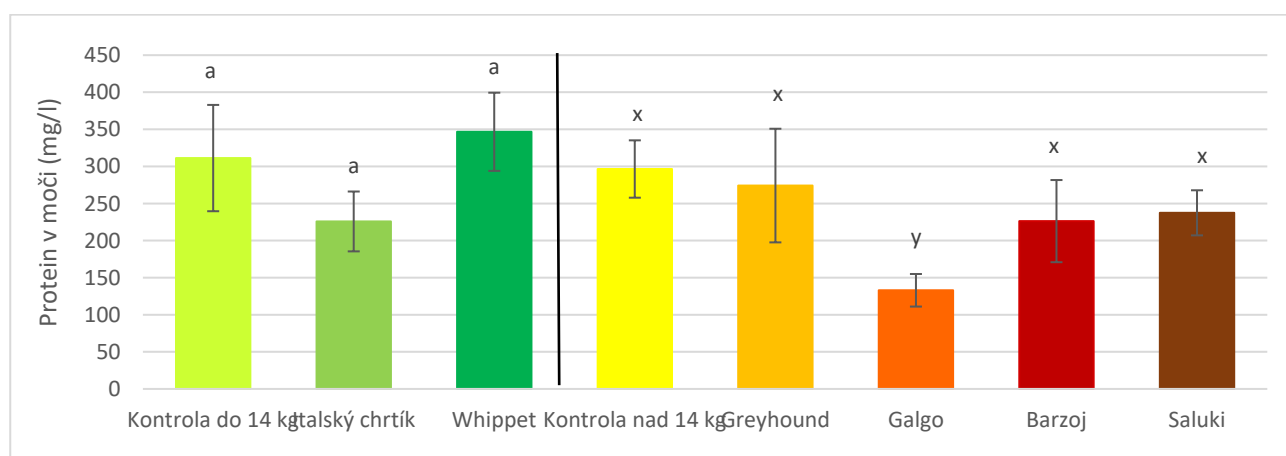
Pro statistické zhodnocení získaných dat byl využit program Unistat for Excel 6.5. Vzhledem k tomu, že data nevykazovala normální rozdělení (Shapiro-Wilkův test), byl pro další testování rozdílů mezi příslušnými skupinami použit neparametrický test – Kruskal-Wallis ANOVA. Testování bylo prováděno na hladině významnosti $p < 0,05$. Ve skupině chrtů byly vytvořeny podskupiny podle jednotlivých plemen, pro další statistické vyhodnocení byly použity pouze skupiny s více než deseti jedinci. Kontrolní skupina byla následně rozdělena na dvě části – zástupci plemen a kříženců s tělesnou hmotností do 14 kg ($n=20$) a nad 14 kg ($n=70$). S první podskupinou (psi do 14 kg) byli srovnáváni whippeti a italscí chrtíci, ostatní chrti byli srovnáváni s podskupinou psů s hmotností nad 14 kg. Pokud se koncentrace proteinu v moči nacházela pod mezí stanovitelnosti (68 mg/l), byla pro statistické zpracování použita polovina této hodnoty (tj. 34 mg/l).

Výsledky

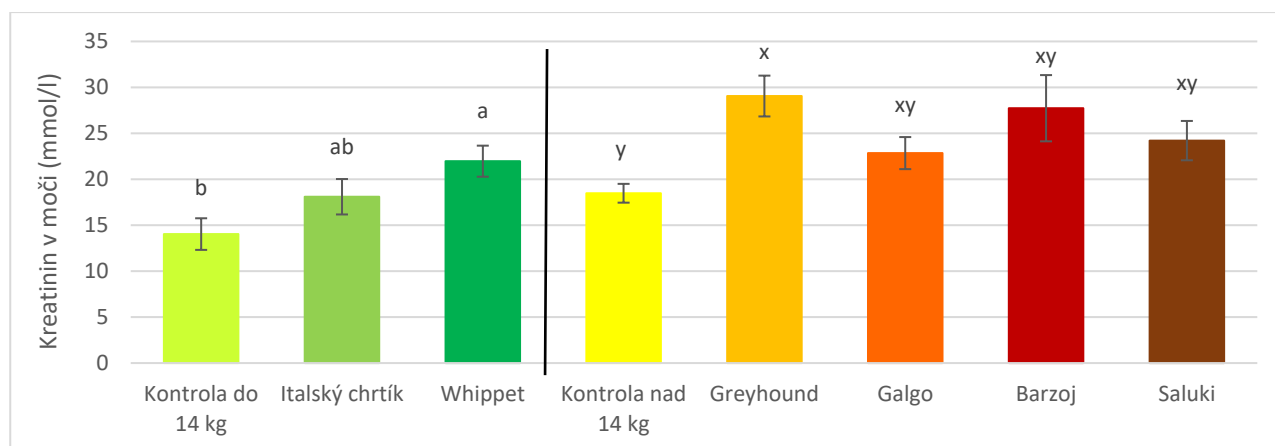
Při srovnání výsledků celé skupiny chrtů a celé kontrolní skupiny nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly v hustotě vzorků (1,042 vs. 1,042). U chrtů byla zjištěna statisticky významně vyšší koncentrace proteinu v moči (299,8 mg/l vs. 248,8 mg/l, $p = 0,045$), kreatininu v moči (23,0 mmol/l vs. 17,5 mmol/l, $p < 0,000$) a nižší hodnota UPC ve srovnání s kontrolní skupinou (UPC: 0,13 vs.

0,19, $p = 0,000$). Byla zjištěna korelace mezi oběma metodami stanovení proteinu v moči. Při srovnávání jednotlivých plemen chrtů a podskupin kontrolní skupiny nebyl zjištěn rozdíl mezi hustotami vzorků moči. U whippetů a greyhoundů byla zjištěna statisticky významně vyšší koncentrace kreatininu v moči ($p = 0,016$; $p = 0,000$). U plemene galgo byla zjištěna statisticky významně nižší koncentrace proteinu v moči ve srovnání s kontrolou ($p = 0,014$). Rozdíly v hodnotách UPC pak byly zaznamenány pouze u plemene galgo a greyhound ($p=0,000$; $p=0,010$). Výsledky jsou znázorněny v grafech 1 až 3.

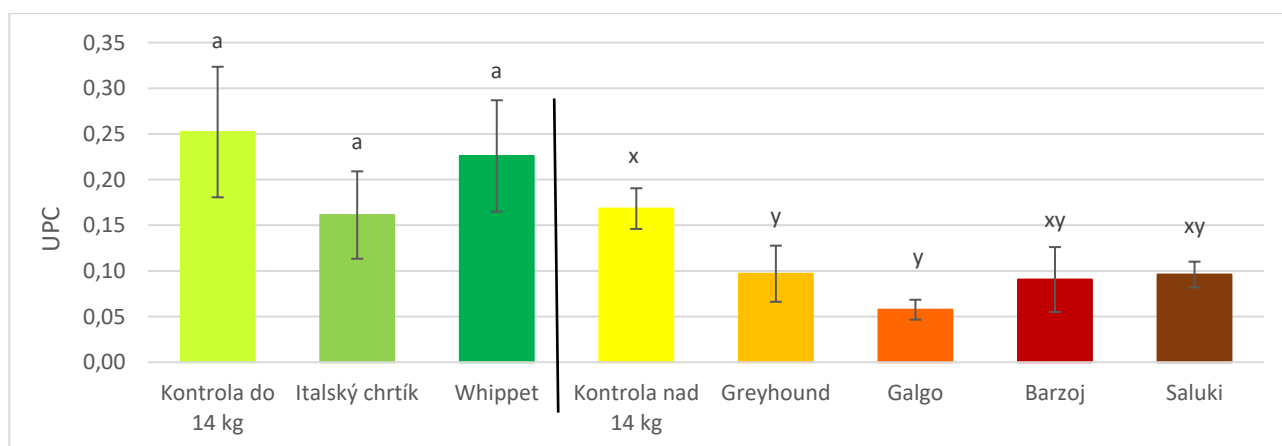
Graf 1: Koncentrace proteinu v moči (průměr \pm střední chyba průměru) u jednotlivých sledovaných podskupin. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl, samostatné porovnání bylo provedeno pro plemena do 14 kg a nad 14 kg.



Graf 2: Koncentrace kreatininu v moči (průměr \pm střední chyba průměru) u jednotlivých sledovaných podskupin. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl, samostatné porovnání bylo provedeno pro plemena do 14 kg a nad 14 kg.



Graf 3: Hodnoty UPC (průměr \pm střední chyba průměru) u jednotlivých sledovaných podskupin. Rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl, samostatné porovnání bylo provedeno pro plemena do 14 kg a nad 14 kg.



Závěr

Studie prokázala rozdíly v koncentraci kreatininu a proteinu v moči a hodnotách UPC u psů řazených do skupiny chrtů. Změny však neplatí pro celou skupinu, existují meziplenné rozdíly.

Seznam literatury

1. KOVAŘÍKOVÁ, S. Vliv plemene na hematologické a biochemické parametry psů a koček - review. *Veterinářství* 2018, **68**(7), 455-461.
2. STEISS, J.E., BREWER, W.G., WELLES, E., WRIGHT, J.C. Hematologic and serum reference intervals in retired greyhounds. *Compendium Continuing Education Veterinary Practitioners* 2000, **22**(5), 243-248.
3. CAMPORA, C., FREEMAN, K.P., LEWIS, F.I., GIBSON, G., SACCHINI, F., SANCHEZ-VAZQUEZ, M.J. Determination of haematological reference intervals in healthy adult greyhounds. *Journal of Small Animal Practice* 2011, **52**(6), 301-309.
4. FREEMAN, W.E., COUTO, C.G., GRAY, T.L. Serum creatinine concentration in retired racing greyhounds. *Veterinary Clinical Pathology* 2003, **32**(1), 40-42.
5. UHRÍKOVÁ, I., LAČŇÁKOVÁ, A., TANDLEROVÁ, K., et al. Haematological and biochemical variations among eight sighthounds breeds. *Australian Veterinary Journal* 2013, **91**(11), 452-459.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 222/2022/FVHE

Výskyt, detekce a druhová identifikace *Salmonella* spp. u jatečných prasat

Helena Veselá, Petra Furmančíková, Marta Dušková, Šárka Papírníková

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

Úvod

Bakterie rodu *Salmonella* jsou jednou z hlavních příčin alimentárních onemocnění v zemích Evropské unie. Jde o druhou nejčastěji hlášenou zoonózu v EU ve druhé dekádě 21. století (1). Česká republika patří k zemím s trvale vysokým výskytem salmonelózy v lidské populaci, incidence je násobně vyšší než je průměr v zemích EU (2).

Nejvyšší přítomnost salmonely stále vykazuje drůbeží maso, ale v posledních letech se díky kontrolním programům v členských státech EU četnost salmonel v drůbežím mase výrazně snížila. Pozornost se proto začíná upínat k prasatům, která se na šíření salmonel také významně podílí. Prasata, s výjimkou drůbeže, patřila v roce 2020 mezi nejvíce testovaná zvířata na přítomnost této bakterie. Chovy prasat jsou významným zdrojem salmonel a jatky představují jedno z klíčových míst, odkud se mohou salmonely dostávat do potravinového řetězce. Kontaminované vepřové maso a vepřové produkty jsou v mnoha zemích hlavním zdrojem lidských infekcí salmonelou. Odhaduje se, že konzumace vepřového masa je v zemích EU zhruba u 15 až 23 % případů příčinou humánní salmonelózy, i když se tyto hodnoty v různých členských státech liší (1). Hlavní příčinou kontaminace masa je infekce jatečných zvířat. Prasata dovážená na jatky bývají nosiči původců salmonely, aniž by se u nich projevovaly klinické příznaky. V průběhu porážky a jatečného opracování může dojít k přenosu salmonel, zejména z trávicího traktu, na JUT. Jatky proto představují jedno z hlavních míst, kde dochází ke kontaminaci vepřového masa salmonelami. Jatečně upravené tělo, resp. maso, pozitivní na *Salmonella* spp., představuje klíčový způsob, jak se tento patogen dostává do potravinového řetězce, čímž představuje významné riziko pro bezpečnost potravin (3). Snížení výskytu salmonel u poražených prasat vede k nižšímu počtu kontaminovaných JUT, což snižuje riziko infekce konzumentů vepřového masa (4).

U pozitivních zvířat jsou salmonely izolovány hlavně z mandlí, střeva a mezenterálních mízních uzlin (5). Bakteriologické vyšetření orgánů a obsahu střeva prasat ihned po porážení je důležitým ukazatelem při hodnocení rizika kontaminace JUT. S prasaty jsou nejčastěji spojeny sérovary *S. Typhimurium* a *S. Derby* (1) a monofazická *S. Typhimurium* (6). Dosavadní výzkumy ukazují, že více než 40 % izolátů salmonel u prasat, které byly hlášeny a podrobeny sérotypizaci v roce 2019, obsahovalo sérovar *S. Typhimurium* (7).

Materiál a metodika

Pro účely této studie bylo na přítomnost salmonel testováno 120 prasat poražených na jatkách v České republice v období červen až říjen. U každého prasete byly ihned po porážení odebrány mandle, mezenteriální mízní uzliny a obsah slepého střeva. Získané vzorky byly přepravovány při chladírenské teplotě do 4 °C a analyzovány do dvou hodin od odběru. Ke stanovení bakterií *Salmonella* spp. byly využity klasické kultivační metody dle ČSN EN ISO 6579 (Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu *Salmonella*) (8). Vzorky obsahu střeva (25 g) byly homogenizovány ve 225 ml pufrované peptonové vody (OXOID, UK), vzorky mandlí (15 g) a mezenteriálních mízních uzlin (15 g) byly homogenizovány ve 135 ml pufrované peptonové vody (OXOID, UK). Vzorky byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Obsah střeva byl vyočkován na 3 místa na polotuhý MSRV agar (OXOID, UK) o celkovém objemu 0,1 ml a inkubován při teplotě 41,5 °C 24 hodin. Vzorky mandlí a mízních uzlin o objemu 1 ml byly přeneseny do MKTTn bujónu (OXOID, UK) a o objemu 0,1 ml do RVS bujónu (OXOID, UK). Tato selektivní živná média byla inkubována při 37 a 41,5 °C po dobu 24 hodin. Vyočkování bylo provedeno na selektivně diagnostické tuhé půdy (XLD agar, Brilliance Salmonella Agar Base; OXOID, UK), které byly inkubovány při 37 °C 24 hodin. Při hodnocení inkubovaných ploten byl sledován narůst suspektních kolonií. U získaných izolátů byla provedena sérologická (latexový test; OXOID, UK) a biochemická konfirmace (Enterotest 24; Erba Lachema, CZ). U kmenů *Salmonella* spp. byla provedena typizace metodou sklíčkové aglutinace s komerčními antiséry. Sérotypizace izolátů byla provedena podle White-Kauffmann-Le Minor schématu aglutinací na sklíčku se specifickými séry pro O a H antigen. Pomocí metody PCR byly detekovány geny (*fljB*) kódující bičkové proteiny.

Výsledky

V pokusu byly testovány vzorky ($n=360$) pocházející ze 120 prasat. Salmonela byla prokázána ve vzorcích lymfatické tkáně ($n=3$), a to konkrétně v mandlích ($n=1$) a v mezenteriálních mízních uzlinách ($n=2$). V obsahu slepého střeva nebyla *Salmonella* spp. detekována. Celkem bylo pozitivních 0,8 % testovaných vzorků. U prasat byly prokázány celkem 3 různé sérovary: *S. Derby* (mandle), *S. Typhimurium* (mízní uzliny) a monofazická *S. Typhimurium* (mízní uzliny). Pozitivní vzorky s nálezem *S. Derby* a *S. Typhimurium* pocházely z jednoho chovu prasat, ale od různých jedinců. Monofazická *S. Typhimurium* (obrázek 1) pocházela z jiného chovu prasat.

Identifikované sérovary *S. Derby* a *S. Typhimurium* jsou běžně stanovovány v populaci prasat v zemích Evropské unie, kdy prasata jsou ve většině případů asymptomatickými nosiči. V posledních

letech je na vzestupu i monofazická varianta *S. Typhimurium*, která se liší od klasické (bifazické) varianty strukturou bičíku (chybí fáze 2 flagelárního H antigenu).

Získané výsledky ukazují nízkou prevalenci salmonel v námi testovaných chovech.



Obrázek 1. *Salmonella* spp. na XLD agaru (foto Furmančíková)

Závěr

Projekt poskytl nové poznatky o výskytu salmonely v chovech v České republice. Naše studie prokázala výskyt bakterií rodu *Salmonella* v lymfatické tkáni u jatečných prasat. Infikovaná prasata se často stávají asymptomatickými přenašeči, proto lze tento patogen izolovat z mandlí, střev a související lymfatických uzlin zdánlivě zdravých zvířat. Tato infikovaná lymfatická tkáň může sloužit jako zdroj kontaminace během procesu porážky a představuje riziko zavlečení salmonel do potravinového řetězce. Legislativa Evropské unie stanovuje cíle pro snížení výskytu lidské salmonelózy, členské státy jsou povinny přijmout účinná opatření ke kontrole infekce a kontaminace salmonelou v rámci porážky prasat a výrobního řetězce vepřového masa a masných výrobků.

Seznam literatury:

- 1) EFSA and ECDC. The European Union one health 2020 zoonoses report. *EFSA Journal*. 2021, 19, 324.
- 2) ŠPAČKOVÁ, M., DANIEL, O. Salmonelózy v ČR v letech 2018-2021, deskriptivní analýza. Zprávy CEM (SZÚ, Praha). 2022, 31, 23-33.
- 3) BONARDI, S., ALPIGIANI, I., BRUINI, I., BARILLI, E., BRINDANI, F., MORGANTI, M., CAVALLINI, P., BOLZONI, L., PONGOLINI, S. Detection of *Salmonella enterica* in pigs at slaughter and comparison with human isolates in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 218, 44–50.
- 4) PESCIAROLI, M., CUCCO, L., DE LUCA, S., MASSACCI, F., MARESCA, C., MEDICI, L., PANICCIA, M., SCOCCIA, E., STAFFOLANI, M., PEZZOTTI, G., MAGISTRALI, C.F. Association between pigs with high caecal *Salmonella* loads and carcass contamination. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 242, 82–86.
- 5) SIDDI, G., PIRAS, F., SPANU, V., DEMONTIS, M., MELONI, M. P., SANNA, R., CIBIN, V., DE SANTIS, E. P. L., SCARANO, CH. Trend of *Salmonella enterica* occurrence and serotypes in Sardinian pig slaughterhouses. *International Journal of Food Safety*. 2021, 10, 9362.
- 6) PALA, C., TEDDE, T., SALZA, S., UDA, M. T., LOLLAI, S., CARBONI, V., FADDA, A., MARONGIU, E., VIRGILIO, S. Epidemiological survey on the prevalence of *Salmonella spp.* in the Sardinian pig production chain, using real-time PCR screening method. *Italian Journal of Food Safety*. 2019, 8, 110-114.
- 7) DEANE, A., MURPHY, D., LEONARD, F. C., BYRNE, W., CLEGG, T., MADIGAN, G., GRIFFIN, M., EGAN, J., PRENDERGAST, D.M. Prevalence of *Salmonella spp.* in slaughter pigs and carcasses in Irish abattoirs and their antimicrobial resistance. *Irish Veterinary Journal*. 2022, 75, 4.
- 8) ČSN EN ISO 6579. *Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella*). Praha: Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, 2020.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 209/2022/FVHE

Typizace gramnegativních bakterií rezistentních k antibiotikům a metagenomická analýza v populaci nutrie říční a vodním prostředí

Jarmila Laušová¹, Iva Sukkar², Pavlína Zakopalová¹, Nela Kučerová², Katarína Stred'anská¹,
Monika Dolejská¹

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

Úvod

Nadužívání antibiotik v humánní a veterinární medicíně vede k masivnímu rozšíření bakterií rezistentních k antibiotikům, což představuje jeden z největších problémů dnešní medicíny¹. Problém antibiotické rezistence se netýká jenom zdraví člověka a zvířat, ale ovlivňuje i životní prostředí. V této souvislosti se mluví o takzvaném konceptu Jednoho zdraví (One Health), který upozorňuje na propojenost mezi všemi ekosystémy². Vodní prostředí představuje jeden z klíčových ekosystémů pro šíření genů antibiotické rezistence z důvodu jeho neustálého znečišťování rezidui antibiotik a bakteriemi z mnoha antropogenních zdrojů³, jako jsou čistírny odpadních vod nebo zemědělské aktivity (např. využívání výkalů hospodářských zvířat k hnojení půdy). V nedokonale přečištěné odpadní vodě zůstávají jak bakterie, tak rezidua antibiotik, která následně vytváří selekční tlak vedoucí k horizontálnímu transferu genů mezi různými bakteriálními kmeny. Tato přečištěná voda se dostává do povrchových vod, kde ovlivňuje celý vodní ekosystém i živočichy v něm žijící⁴.

Jedním z živočichů hojně se vyskytujícím na břehu řek je nutrie říční (*Myocastor coypus*). Je to hlodavec původem z Jižní Ameriky, který byl do České republiky importován za účelem farmového chovu na kožešiny a maso, ale z těchto chovů byl zavlečen i do volné přírody⁵. Nutrie je býložravec a potravu si hledá hlavně v blízkosti vodních toků⁶. Podnebí ve střední Evropě není pro nutrie optimální a jejich přežití je zvláště v zimních měsících závislé na přísunu jídla. Proto se nutrie postupně přesunuly na břehy řek uvnitř měst, kde mají dostatek potravy. Ve vhodných podmínkách může dospělá nutrie rodit mláďata až třikrát ročně a v jednom vrhu mít až šest mláďat, proto se ve městech rychle množí a jelikož v našich podmínkách nemá přirozeného nepřítele je považovaná za jeden z nejhorších invazivních druhů⁵. Přesunem nutrie do obydlených oblastí přichází ve větší míře do kontaktu s potenciálními zdroji rezistentních bakterií (přečištěná voda z čistíren, pole hnojená hnojem hospodářských zvířat, přímá interakce s lidmi a jejich psy při krmení) a proto mohou být těmito bakteriemi kolonizovány⁷.

Cílem tohoto projektu bylo zmapovat výskyt rezistentních gramnegativních bakterií z rektálních výtěrů nutrií a ve vodním prostředí, ve kterém se nutrie trvale zdržují a popsat genetickou variabilitu těchto bakterií.

Materiál a metodika

Na vodních tocích v Plzni a Praze byly v průběhu roku 2021 (Plzeň) a 2022 (Praha) sbírány rektální výtěry z nutrie říční. Na tento sběr následně navazoval odběr vody z pěti lokalit v Praze. Vzhledem k eradikaci populace na tocích v Plzni v průběhu roku 2021 v této oblasti sběr vody neprobíhal. Od června 2022 byla voda v Praze odebírána ve dvouměsíčních intervalech z lokalit, kde se nutrie trvale zdržují. Vzorky nutrií byly odebírány z kadáveru získaných během programu redukce jejich populace. Pro metageneomovou analýzu bylo získáno 12 vzorků vod z různých termínů a lokalit a 86 vzorků z nutrií, ze kterých bylo připraveno 6 směsných vzorků. Z DNA izolované z těchto vzorků bylo po přípravě knihoven provedeno sekvenování a výsledná data budou zpracována s využitím širokého spektra bioinformatických přístupů.

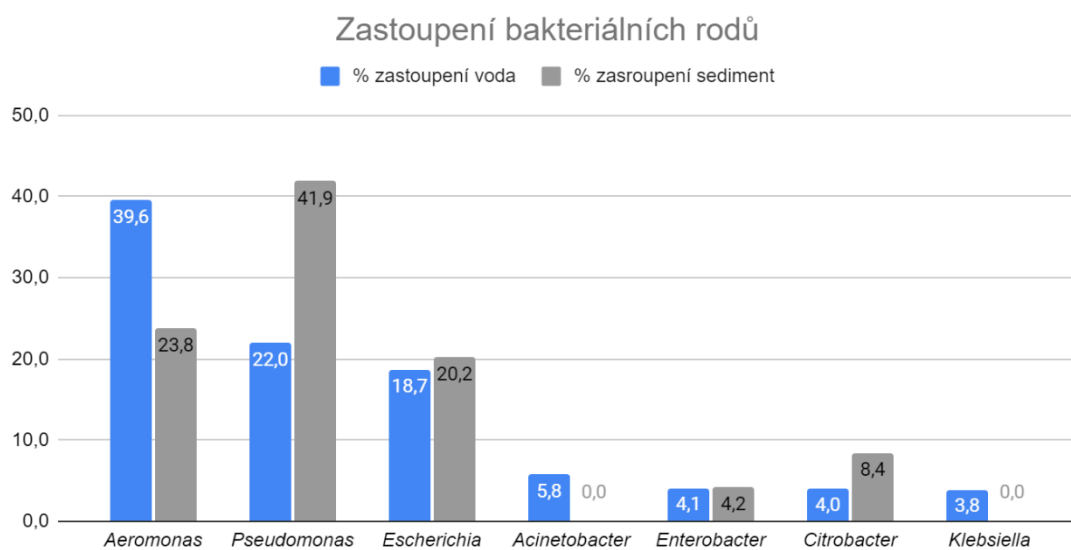
Z vod a sedimentu byly kultivovány bakterie na selektivních půdách MacConkey agar a Eosin methylene blue agar s přidavkem jednoho ze čtyř vybraných antibiotik: cefotaxim (2 mg/l), meropenem (0,125 mg/l), ciprofloxacín (0,05 mg/l) a kolistin (3,5 mg/l). Čisté kultury gramnegativních bakterií byly druhově určeny pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF (Bruker Daltonics).

Metodou PCR byly všechny získané izoláty otestovány na přítomnost genů rezistence k různým skupinám antibiotik. Izoláty selektované na půdě s cefotaximem byly testovány na přítomnost genů rezistence zahrnující *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{DHA}, *bla*_{OXA-II}, *bla*_{OXA-IV}, *bla*_{CMY-I} a *bla*_{CMY-II}. U izolátů selektovaných na půdě s ciprofloxacínem byla testována přítomnost genů *aac*(6')-*lb-cr*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE1*, *qnrS*, *qepA*, *oqxA* a *oqxB*. Izoláty, které jsme získali kultivací na půdě s meropenemem byly testovány na přítomnost genů *bla*_{OXA-48}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMI} a *bla*_{GES}. Přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-10* byla testována u izolátů selektovaných na půdě s kolistinem. Z izolátů nesoucích zájmový gen byly vybrány zástupci na celogenomové sekvenování na platformě Illumina. Ze získaných sekvenačních dat budou provedeny analýzy založené na algoritmu blast oproti datům získaným ze sekvenování metagenomu.

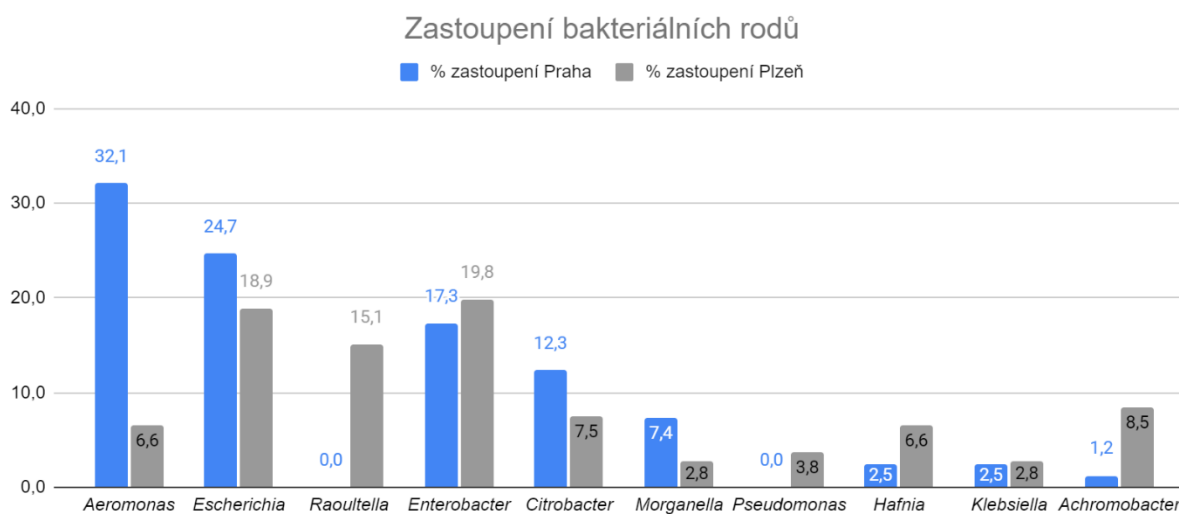
Výsledky

Z rektálních výtěrů nutrií z Plzně a Prahy bylo získáno celkem 197 bakteriálních izolátů. Zastoupení jednotlivých rodů podle lokality je uvedeno v grafu 1. Z vod a sedimentu odebíraných ve třech různých termínech a z pěti různých lokalit v Praze bylo získáno celkem 1397 gramnegativních bakteriálních izolátů. Z každé lokality a odběru bylo pro každé antibiotikum získáno 20–25 izolátů z vody a 10–15 izolátů ze sedimentu. Ze vzorků vody bylo na půdě s ciprofloxacínem identifikováno 243 izolátů, na půdě s cefotaximem 246 izolátů, na půdě s meropenemem 263 izolátů a na půdě s kolistinem 203 izolátů. Procentuální zastoupení bakteriálních rodů ve vzorcích vod je uvedeno v grafu 1.

Graf 1. Zastoupení bakteriálních rodů ve vzorcích vod a sedimentu



Graf 2. Zastoupení bakteriálních rodů v rektálních výtěrech nutrií z Prahy a Plzně



Ze sedimentu bylo na půdě s ciprofloxacinem získáno 145 izolátů, na půdě s cefotaximem 111 izolátů, na půdě s meropenemem 68 izolátů a na půdě s kolistinem 118. V grafu 2 je uvedeno procentuální zastoupení bakteriálních rodů ve vzorcích ze sedimentu.

Pomocí metody PCR bylo identifikováno celkem 91 bakterií selektovaných z vody na půdě s cefotaximem, které nesly zájmový gen. Z bakterií selektovaných na půdě s ciprofloxacinem bylo 50 izolátů, které nesly gen pro rezistenci k antibiotikům, z půdy s meropenemem bylo 25 izolátů, které nesly gen a z půdy s kolistinem 1 izolát. Zastoupení konkrétních genů je uvedeno v Tabulce 1.

Mezi bakteriemi získanými ze sedimentu bylo identifikováno 12 izolátů, které nesli gen pro rezistenci k antibiotikům (Tabulka 2).

Tabulka 1. Zastoupení genů rezistence k antibiotikům u izolátů z vod

půda s ciprofloxacinem		půda s cefotaximem		půda s meropenemem		půda s kolistinem	
<i>aac(6')-Ib-cr</i>	11	<i>bla_{CTX-M}</i>	69	<i>bla_{IMI-1}</i>	1	<i>mcr-7</i>	1
<i>qnrA</i>	3	<i>bla_{CMY-1}</i>	1	<i>bla_{KPC}</i>	3		
<i>qnrB</i>	26	<i>bla_{DHA}</i>	5	<i>bla_{NDM}</i>	3		
<i>qnrD</i>	9	<i>bla_{OXA-II}</i>	2	<i>bla_{OXA-48}</i>	18		
<i>qnrS</i>	9	<i>bla_{OXA-IV}</i>	5				
<i>qepA</i>	1	<i>bla_{SHV}</i>	12				
		<i>bla_{TEM}</i>	21				

Tabulka 2. Zastoupení genů rezistence k antibiotikům u izolátů ze sedimentu

půda s cefotaximem		půda s meropenemem		půda s kolistinem	
<i>bla_{CTX-M}</i>	3	<i>bla_{OXA-48}</i>	2	<i>mcr-3</i>	7

Závěr

Tato studie naznačuje, že nutrie říční může je hostitelem patogenních bakterií rezistentních k antimikrobiálním látkám. Tyto patogenní rezistentní bakterie jsme detekovali i ve vodním prostředí, které tyto nutrie trvale obývají. Předpokládáme, že nutrie mohou být přímými šířiteli těchto bakterií do vodního prostředí, ale pro potvrzení této hypotézy je potřeba provést další analýzy.

Seznam literatury:

- 1 TALEBI BEZMIN ABADI, A., RIZVANOV, A.A., HAERTLÉ, T. et al.; World Health Organization Report: Current Crisis of Antibiotic Resistance. *BioNanoSci.* 2019, 9, 778–788.
- 2 IRITI, M., VITALINI, S., VARONI, E. M.; Humans, animals, food and environment: One health approach against global antimicrobial resistance. *Antibiotics.* 2020, 9(6), 346.
- 3 CARVALHO, I. T., SANTOS, L.; Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environment International.* 2016, 94, 736-757.
- 4 KARKMAN, A., DO, T. T., WALSH, F., VIRTA, M. P.; Antibiotic-resistance genes in waste water. *Trends in microbiology.* 2018, 26(3), 220-228.
- 5 HOMOLKA, M.; Nutrie říční invazivní druh – neřešený problém. *Myslivost.* 2018, 3, 36.
- 6 CARTER, J., FOOTE, A.L., JOHNSON-RANDALL, A.; Modeling the effects of nutria (*Myocastor coypus*) on wetland loss. *Wetlands.* 1999, 19, 209–219.
- 7 LIM, S. R., LEE, D. H., PARK, S. Y., LEE, S., KIM, H. Y., LEE, M. S., LEE, J. R., HAN, J. E., KIM, H. K., KIM, J. H.; Wild Nutria (*Myocastor coypus*) is a potential reservoir of carbapenem-resistant and zoonotic *Aeromonas* spp. in Korea. *Microorganisms.* 2019, 7(8), 224.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 210/2022/FVHE

Studium vlivu aktuálních mikropolutantů na embryonální a embryo-larvální stádia ryb

Aneta Hollerová¹, Denisa Medková^{1,2}, Pavla Lakdawala¹, Jana Blahová¹

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

²Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Úvod

Kontaminace životního prostředí antropogenními mikropolutanty představuje v současné době celosvětově závažný problém, a to nejen z hlediska přírodních ekosystémů, ale i lidské populace. Často detekovanými cizorodými látkami ve vodním prostředí jsou léčiva a mikroplasty. Ke kontaminaci vodního prostředí dochází např. nedostatečným přečištěním odpadních vod nebo špatným nakládáním s těmito látkami.

V dnešní době jsou stále častěji předepisovány léky k léčbě kardiovaskulárních chorob a diabetu. Konkrétně se jedná o léčiva metoprolol, enalapril a metformin. Metoprolol, řazený do skupiny beta-blokátorů, ovlivňuje funkce srdce, jater a gonád ryb, kde jsou přítomny tzv. beta-receptory (1). Podobné účinky na srdce ryb může vykazovat i enalapril, který je předepisován k léčbě hypertenze, či srdečního selhání (2). Metformin je farmakem používaným k léčbě diabetu. Jeho negativní účinky na raná vývojová stádia ryb jsou popisovány jako opožděné líhnutí, či častý výskyt malformací (3). Mimo farmaka je velice hojně diskutována problematika mikroplastových částic (< 5 mm) ve vodním prostředí, negativní vliv na necílové organismy a jejich vývojová stádia (4). Mikroplasty jsou schopny ucpávat póry chorionů a menší částice (< 0,5 μm), schopné průniku chorionem, mohou ovlivňovat raná stádia ryb i na molekulární úrovni. V životním prostředí může také docházet k adhezii dalších xenobiotik na mikroplasty a kombinovanému účinku těchto látek na necílové organismy (5).

Cílem této práce je odhalit negativní účinky reziduí jmenovaných léčiv, polystyrenových mikročástic a jejich kombinaci na raná vývojová stádia modelového organismu dánia pruhovaného (*Danio rerio*) a sladkovodního zástupce kapra obecného (*Cyprinus carpio*).

Materiál a metodika

První část projektu byla zaměřena na vliv reziduí vybraných léčiv, mikroplastů a jejich kombinace s metoprololem na embryonální stadia *D. rerio* (Mendelova univerzita v Brně). Léčiva byla dále testována i na embryích *C. carpio* (Rybníkářství Pohořelice, a.s.). Hodnocení toxicity látek bylo provedeno dle metodiky OECD č. 236 (6). Koncentrace testovaných léčiv (Sigma-Aldrich, s.r.o., Česká republika) byly zvoleny – 0,1 (metoprolol, enalapril); 1 (metformin); 10; 100; 1 000 a 100 000

$\mu\text{g/L}$, pro polystyrenové mikročástice (velikost $52,5 \pm 11,5 \mu\text{m}$; EPRUI Biotech, Čína) byly zvolené koncentrace následující – 0,01; 0,1 a 1 g/L. Kombinace obou kontaminantů byly testovány v následujících koncentracích – metoprolol + mikroplast – low (0,1 $\mu\text{g/L}$ + 0,01 g/L); medium (100 $\mu\text{g/L}$ + 0,1 g/L) a high (100 000 $\mu\text{g/L}$ + 1 g/L), přičemž nejnižší koncentrace se rovnala koncentraci environmentálně relevantní. Roztoky látkem byly připraveny v souladu s normou ISO 7346 (7). Test s každodenní výměnou testovacích roztoků byl ukončen po 96 hodinách s odebráním vzorků ke zhodnocení exprese genů zodpovědných za vývoj ryb, detoxifikaci a zánětlivé procesy (např. *nfatc1*, *gata6*, *cyp3a*, *il1b*, *il6*). Každých 24 hodin byla sledována mortalita, morfologické změny a čas líhnutí.

Druhou částí testu byl embryolarvální test toxicity dle metodiky OECD č. 210 (8) na *C. carpio* semistatickou metodou. Testovanou látkou byl metoprolol. Byl aplikován do krystalizačních misek ve formě roztoků v pěti různých koncentracích (0,1; 1; 10; 100 a 1 000 $\mu\text{g/L}$). Test byl ukončen 28 dní po vylíhnutí usmrcením ryb předávkováním anestetikem MS 222. U ryb byla průběžně zaznamenávána mortalita, morfologické změny a vývojové abnormality. Dále byly také odebrány vzorky k histopatologickému vyšetření, k analýze genové exprese (*nfatc1*, *gata6*, *mef2aa*) a markerů oxidativního stresu a k hodnocení vývojových stádií larev.

Výsledky

Studie ukázala, že metoprolol, metformin a enalapril ovlivnily rychlost líhnutí u embryí *D. rerio* ve všech testovaných koncentracích. Po 72 hpf se vylíhlo 50% embryí, kdežto u kontrolní skupiny bylo vylíhnuto 86% embryí ($p < 0.05$). V čase 96 hpf však již statisticky významný rozdíl v rychlosti vývoje mezi exponovanými skupinami a kontrolou pozorován nebyl. U embryí *D. rerio* vystavených koncentraci 1 000 a 100 000 $\mu\text{g/l}$ metoprololu a metforminu byl pozorován zrychlený srdeční tep ($p < 0.05$). Enalapril způsobil statisticky významné zvýšení srdeční frekvence v nejvyšší testované koncentraci ($p < 0.01$). Enalapril vedl k významnému zvýšení mortality v nejvyšší testované koncentraci ($p < 0.01$) a metformin v koncentracích 100, 1 000 a 100 000 $\mu\text{g/l}$ ($p < 0.05$). Testované látky neměly vliv na mortalitu, rychlost líhnutí a vznik malformací u embryí *C. carpio*, přesto způsobily statisticky významné zvýšení srdeční frekvence a to ve všech testovaných koncentracích ($p < 0.05$). Embrya ryb vystavených částicím mikroplastu v nejvyšší testované koncentraci, měla značně zvýšený srdeční tep ($p < 0.05$) ve srovnání s kontrolní skupinou. Během pokusu, kdy bylo k mikročásticím přidáno léčivo metoprolol, byl pozorován zvýšený srdeční tep ve všech testovaných koncentracích ($p < 0.01$).

Výsledné hodnoty analýzy genové exprese vzorků embryonálních testů toxicity léčiva metoprolol na *D. rerio* jsou zobrazeny v Tabulce č. 1. Všechna testovaná léčiva způsobila

signifikantní změny exprese vybraných genů na hladině statistické významnosti $p < 0.05$, v některých případech i $p < 0.01$.

Tabulka č. 1: Souhrn výsledků analýzy genové exprese vzorků embryonálních testů toxicity metoprololu na *D. rerio*. Výsledné statistické rozdíly ($p < 0.05$) jsou vyznačeny rozdílnými písmeny, zvýrazněny tučně a šipkami ↑ zvýšení exprese, ↓ snížení exprese.

testovaná látka	gen	kontrola	0.1 µg/L	100 µg/L
metoprolol	<i>nfatc1</i>	0,003560 ^{ab}	0,004089 ^a	↓ 0,002833^b
	<i>mef2aa</i>	0,004332 ^a	0,004452 ^a	↓ 0,003532^b
	<i>gata6</i>	0,001647 ^a	↑ 0,003674^b	↑ 0,003532^b
	<i>cyp3a65</i>	0,006973 ^a	↑ 0,015571^b	↑ 0,026653^c
enalapril	<i>nfatc1</i>	0,003560 ^a	↓ 0,002457^b	↓ 0,002318^b
	<i>mef2aa</i>	0,004332 ^a	↓ 0,003098^b	↓ 0,002985^b
	<i>nkx2.5</i>	0,000026 ^a	0,000023 ^{ab}	↓ 0,000021^b
	<i>cyp3a65</i>	0,006973 ^a	↑ 0,016123^b	↑ 0,018294^b
testovaná látka	gen	kontrola	1 µg/L	100 µg/L
metformin	<i>fasn</i>	0,002805 ^a	↓ 0,000147^b	↓ 0,000078^b
	<i>irs2</i>	0,005703 ^a	0,005096 ^a	↓ 0,003635^b
	<i>vtg</i>	0,000169 ^a	0,000147 ^a	↓ 0,000078^b
	<i>cyp3a65</i>	0,006973 ^a	↑ 0,020222^b	↑ 0,022836^b

Závěr

Cílem studie bylo zhodnocení účinků léčiv metoprololu, enalaprilu a metforminu, polystyrenových mikročástic a jejich vzájemné kombinace na raná vývojová stádia ryb prostřednictvím modelových druhů kapr obecný a dánío pruhované. Výsledky předložené studie prokázaly, že testované látky ovlivňují rychlost líhnutí a srdečního tepu, avšak pouze ve vyšších testovaných koncentracích. Analýza exprese vybraných genů odhalila negativní ovlivnění vývoje orgánových soustav necílových organismů, a to i působením nejnižších environmentálních koncentrací testovaných léčiv.

Seznam literatury:

- 1) SANTOS, L., ARAUJO, A., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE-MATOS, C., MONTENEGRO, M.C. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 175(1–3): 45–95.
- 2) ROJO, M., CRISTOS, D., GONZALEZ, P., LOPEZ-ACA, V., DOMANICO, A., CARRIQUIRIBORDE, P. Accumulation of human pharmaceuticals and activity of

- biotransformation enzyme in fish from two areas of the lower Rio de la Plata Basin. *Chemosphere*, 2021, 226: 129012.
- 3) PHILLIPS, J., AKEMANN, C., SHIELD, J.N., WU, C., MEYER, D.N., MAKER, B.B., PITTS, D.K., BAKER, T.R. Developmental phenotypic and transcriptomic effects of exposure to nanomolar levels of metformin in zebrafish. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2021, 87: 103716.
 - 4) HODKOVICOVA, N., HOLLEROVA, A., SVOBODOVA, Z., FALDYNA, M., FAGGIO, C. Effects of plastic particles on aquatic invertebrates and fish – A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2022, 104013. (*In press*).
 - 5) DUAN, Z., DUAN, X., ZHAO, S., WANG, X., WANG, J., LIU, Y., PENG, Y., GONG, Z., WANG, L. Barrier function of zebrafish embryonic chorions against Microplastics and nanoplastics and its impact on embryo development. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 395: 122621.
 - 6) OECD 2013. Test No 236: Fish Embryo acute Toxicity (FET) Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.
 - 7) ISO 7346. 1996. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part 1: Static method.
 - 8) OECD 2013. Test No 210: Fish, Early-life Stage Toxicity Test. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing, Paris, France.

Tato práce byla financována projektem IGA VETUNI 213/2022/FVHE

Vliv biofermentovaného krmiva na kvalitu hmyzího tuku

Jana Čaloudová, Kateřina Křištofová, Michaela Zlámalová, Lucie Vrbíčková, Matej Pospiech
*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno*

Úvod

V současné době vzrůstá důležitost produkce hmyzu za účelem zajistit nutričně hodnotnou výživu lidí i zvířat. Hmyz představuje především zdroj bílkovin a tuku. O bílkovinách hmyzu byla publikována řada studií, avšak kvalitě hmyzího tuku nebyla věnována velká pozornost. Larvy potemníka brazilského (*Zophobas morio*) mají vysoký podíl tuku, obsahujícího nasycené i nenasycené mastné kyseliny, zejména kyselinu palmitovou a olejovou. Z nutričního hlediska je významná kyselina linolová, jež se řadí mezi n-6 mastné kyseliny (1). V souvislosti s produkcí hmyzu je nutné hledat i efektivní krmivo. Biofermentovaná krmiva jsou hojně využívána ke krmení hospodářských zvířat, u kterých mohou mít vliv na některé nutriční parametry tuku. Vliv zkrmování biofermentovaných krmiv na nutriční parametry hmyzu není znám.

Len setý (*Linum usitatissimum*) je bohatý na obsah n-3 mastných kyselin, zejména kyseliny α -linolenové. Přídavek lněných semínek do krmné dávky by měl pozitivně ovlivnit podíl n-3 polynenasycených mastných kyselin, zejména kyselin α -linolenové, eikosapentaenové, dokosapentaenové a kyseliny dokosahexaenové. Dále by měl zlepšit poměr n-6 : n-3 polynenasycených mastných kyselin (2). Předpokladem pro zkrmování fermentovaných pšeničných otrub bylo obohacení larev o kyselinu γ -linolenovou. Zvýšení obsahu této kyseliny popisují Semjon et al. (3) při zkrmování fermentovaných pšeničných otrub u brojlerových kuřat.

Materiál a metodika

Larvy *Zophobas morio* byly chovány ve třech duplikátních skupinách po dobu 5 týdnů. Počáteční hmotnost larev v každé skupině byla 225 g. Krmný pokus zahrnoval 3 druhy krmiv – pšeničné otruby (kontrola), fermentované pšeničné otruby (*Achinomucor*), fermentovanou směs kukuřice a lněných výlisků v poměru 3:2 (*Mortierella alpina*). Teplota místnosti se pohybovala mezi 22-23°C. Týdně byly zaznamenávány hmotnostní přírůstky a délka u 10 jedinců. Po skončení pokusu byly larvy lyofilizovány, část larev byla kulinárně upravena pražením, část ponechána bez úpravy. K simulaci efektu trávení byla část vzorků upravena enzymatickou hydrolyzou, metodika dle Zielinska et al. (4).

Analýzy zahrnovaly stanovení obsahu bioaktivních látek, proteinů (spolupráce s STU Bratislava) a tuku, včetně složení mastných kyselin (spolupráce UVFL Košice). Obsah polyfenolických látek byl

stanoven metodou Folin-Ciocalteu. Aktivita vychytávání volných radikálů byla stanovena metodou DPPH. Test ABTS a FRAP byl proveden podle Xiao et al. (5). Měření probíhalo v mikrotitračních destičkách prostřednictvím spektrofotometru Infinite M Nano (Tecan, Rakousko).

Výsledky

U všech skupin byly pozorovány přírůstky hmotnosti i délky a nedocházelo k úhynům. Nejvyšší nárůst hmotnosti byl sledován u skupiny krmené fermentovanými pšeničnými otrubami s celkovým nárůstem hmotnosti 192,5 g, u kontrolní skupiny byl nárůst 187,9 g. Nejnižší přírůstek hmotnosti byl pozorován u skupiny krmené fermentovanými lněnými výlisky a kukuřicí (140,4 g). Dále byly pozorovány parametry vztahující se k obsahu bioaktivních ukazatelů (viz Tabulka č. 1).

Tabulka č. 1: Výsledky analýz sledující obsah bioaktivních ukazatelů

		Polyfenoly (mg/ kg kys. DPPH (%))	ABTS (%)	FRAP (mg trolox ekvivalent / g)	
Vzorky enzymatické hydrolyzy	CN	3,71±0,23 ^{a,b,c}	6,53±0,88 ^a	12,23±1,00 ^{a,b}	3,47±0,34 ^b
	FBN	4,29±0,30 ^a	6,94±1,09 ^a	13,27±0,17 ^a	3,68±0,14 ^b
	FMFPN	3,93±0,26 ^{a,b}	6,29±0,48 ^a	12,78±0,62 ^a	3,54±0,23 ^b
	CC	2,45 ± 0,27 ^d	7,16±0,61 ^a	8,29±0,82 ^b	5,79±0,51 ^a
	FBC	2,77±0,11 ^{b,c,d}	6,76±0,31 ^a	8,22±0,69 ^b	5,45±0,80 ^a
	FMFPC	2,59±0,20 ^{c,d}	6,67±0,15 ^a	8,24±1,62 ^b	5,42±0,68 ^a
Enzymaticky hydrolyzované vzorky	CN	0,75±0,13 ^b	0,17±0,24 ^{a, b}	0,51±0,41 ^{a,b}	0,62±0,06 ^{a,b,c}
	FBN	1,11±0,04 ^a	0,30±0,62 ^{a, b}	2,54±1,43 ^a	0,88±0,21 ^a
	FMFPN	0,88±0,04 ^{a,b}	0,71±0,62 ^a	0,68±0,40 ^{a,b}	0,63±0,03 ^{a,b}
	CC	0,92±0,15 ^{a,b}	-0,07±0,48 ^{a, b}	0,60±0,81 ^{a,b}	0,42±0,12 ^{b,c}
	FBC	0,73±0,24 ^b	-0,11±0,45 ^{a, b}	-0,44±1,09 ^b	0,41±0,08 ^c
	FMFPC	0,82±0,07 ^b	-1,33±1,44 ^b	-0,07±0,60 ^b	0,37±0,02 ^c

CN – pšeničné otruby nativní (kontrolní skupina), FBN – fermentované pšeničné otruby nativní, FMFPN – fermentované lněné výlisky a kukuřice nativní, CC – pšeničné otruby kulinárně upravené (kontrolní skupina), FBC – fermentované pšeničné otruby kulinárně upravené, FMFPC – fermentované lněné výlisky a kukuřice kulinárně upravené

Pro stanovení antioxidační kapacity byly použity tři různé metodiky (DPPH, ABTS a FRAP). Z tabulky č. 1 vyplývá, že nejvyšší obsah polyfenolů byl zjištěn u larev bez enzymatické hydrolýzy, krmných fermentovanými pšeničnými otrubami. U vzorků larev bez enzymatické hydrolýzy byl po tepelné úpravě sledován statisticky významný pokles polyfenolů. Naopak u analýzy FRAP byly detekovány vyšší hodnoty u pražených vzorků. Zvýšené hodnoty ABTS byly detekovány ve vzorku fermentovaných pšeničných otrub bez kulinární úpravy jak u vzorků s enzymatickou hydrolýzou, tak bez ní.

Tabulka č. 2: Výsledky analýz sledujících složení mastných kyselin, obsah lipidů a dusíkatých látek v larvách *Zophobas morio* v závislosti na krmení

	Vzorky nativní			Vzorky s kulinární úpravou		
	CN	FBN	FMFPN	CC	FBC	FMFPC
Dusíkaté látky (mg/100 g)	7787,77±2 55,11	8011,64±7 3,32	7132,97±2 44,02	7852,99±4 66,97	8427,87±2 25,65	7343,44±8 6,32
Mastné kyseliny celkem (%)	31,59±1,95	30,70±2,9 5	32,39±1,43	29,59±1,75	27,77±2,08	29,62±1,9 3
Mastné kyseliny (mg/g):						
C14:0	0,86	1,21	0,88	1,26	0,98	0,93
C16:0	83,91	95,85	98,11	90,32	83,89	89,92
C16:1-7c	5,09	6,15	5,17	7,00 ^b	5,19 ^a	5,92 ^{a,b}
C16:1-9c	1,66	2,04	2,35	2,30 ^b	1,76 ^a	2,11 ^{a,b}
C17:0 - IS	2,24	2,16	2,68	2,90	3,51	2,72
C18:0	18,07	19,03	20,08	16,93	17,41	18,09
C18:1-9c	96,08	106,33	122,49	105,39	96,86	109,33
C18:1-11c	1,14	1,01	0,81	2,28	2,24	1,85
C18:2-9c,12c	64,81	71,05	60,29	66,71	65,34	59,26
C18:3-6c,9c,12c	0,72 ^b	0,30 ^a	0,74 ^b	0,60 ^b	0,39 ^a	0,40 ^a
C18:3-9c,12c,15c	2,94 ^a	2,91 ^{a,b}	9,42 ^b	2,78 ^a	2,73 ^a	6,40 ^b
C18:4- 6c,9c,12c,15c	0,05	0,05	0,06	0,03	0,03	0,03
C20:0	2,19	0,45	0,53	0,33	0,37	0,42

C20:1-11c	0,34	0,35	0,31	0,31	0,31	0,24
C20:2-11c,14c	0,18	0,19	0,20	0,24	0,14	0,17
C20:3-8c,11c,14c	0,28 ^a	0,28 ^a	0,31 ^b	0,21	0,16	0,16
C20:4- 5c,8c,11c,14c	1,58 ^a	1,58 ^a	1,72 ^b	1,23 ^b	1,17 ^{a,b}	0,80 ^a
C20:5- 5c,8c,11c,14c,17c	0,24 ^a	0,24 ^a	0,27 ^b	0,18	0,14	0,12
C22:0	0,09	0,07	0,10	0,05	0,05	0,05
C24:0	0,03	0,02	0,03	0,01	0,02	0,02
C24:1-15c	0,57	0,03	0,04	0,07	0,03	0,03

CN – pšeničné otruby nativní (kontrolní skupina), FBN – fermentované pšeničné otruby nativní, FMFPN – fermentované lněné výlisky a kukuřice nativní, CC – pšeničné otruby kulinárně upravené (kontrolní skupina), FBC – fermentované pšeničné otruby kulinárně upravené, FMFPC – fermentované lněné výlisky a kukuřice kulinárně upravené

V rámci této studie bylo potvrzeno, že skupina, které bylo podáváno krmivo s fermentovanými lněnými výlisky a kukuřicí vykazovala vyšší hodnoty kyseliny γ -linolenové, α -linolenové a eikosapentaenové než kontrola (viz Tabulka č. 2). Po kulinární úpravě se zvýšilo množství sledovaných mastných kyselin zejména u kontrolní skupiny. Navýšení množství nenasycených a polynenasycených mastných kyselin bylo pozorováno u obou skupin fermentovaných krmiv. Dále bylo potvrzeno, že vedle podávaného krmiva je důležitým faktorem ovlivňujícím profil mastných kyselin v tuku larev také způsob jejich kulinární úpravy. U larev krmených fermentovanými pšeničnými otrubami bylo detekováno větší množství dusíkatých látek, což odpovídá jejich nižšímu obsahu mastných kyselin.

Závěr

Na základě chovného pokusu potěmníka brazilského bylo potvrzeno, že biofermentovaná krmiva, zejména fermentované pšeničné otruby, mají pozitivní vliv na hmotnostní přírůstek larev. Zkrmování biofermentovaných krmiv ovlivnilo pozitivně také antioxidační vlastnosti a množství polyfenolů u sledovaného hmyzu. Důsledkem zkrmování biofermentovaných krmiv dochází ke změnám kvality produkovaného tuku larev hmyzu, zejména v oblasti zastoupení mastných kyselin. Nejvyšší navýšení nenasycených mastných kyselin (γ -linolenová, α -linolenová a eikosapentaenová) bylo pozorováno u skupiny krmené fermentovanými lněnými výlisky a kukuřicí.

Seznam literatury:

- 1) RUMBOS, C. I. a C. G. ATHANASSIOU, 2021. The Superworm, *Zophobas morio* (Coleoptera:Tenebrionidae): A ‘Sleeping Giant’ in Nutrient Sources. *Journal of Insect Science*. **21**(2), 1–11.
- 2) BARTKOVSKÝ, M., D. SOPKOVÁ, Z. ANDREJČÁKOVÁ, R. VLČKOVÁ, B. SEMJON, S. MARCINČÁK, L. BUJŇÁK, M. POSPIECH, J. NAGY, P. POPELKA a P. KYZEKOVÁ, 2022. Effect of Concentration of Flaxseed (*Linum usitatissimum*) and Duration of Administration on Fatty Acid Profile, and Oxidative Stability of Pork Meat. *Animals*. **12**(9), 1–13.
- 3) SEMJON, B., M. BARTKOVSKÝ, D. MARCINČÁKOVÁ, T. KLEMPOVÁ, L. BUJŇÁK, M. HUDÁK, I. JAĎUTTOVÁ, M. ČERTÍK a S. MARCINČÁK, 2020. Effect of Solid-State Fermented Wheat Bran Supplemented with Agrimony Extract on Growth Performance, Fatty Acid Profile, and Meat Quality of Broiler Chickens. *Animals*. **10**(6), 1–22.
- 4) ZIELIŇSKA, E., M. KARASÍ a A. JAKUBCZYK, 2017. Antioxidant activity of predigested protein obtained from a range of farmed edible insects. *International Journal of Food Science & Technology*. **52**(2), 306–312.
- 5) XIAO, F., T. XU, B. LU a R. LIU. 2020. Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers*, **1**(1), 60–69.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 215/2022/FVHE

Aplikace nanoemulze z oleje z kávové sedliny v karagenanových biodegradabilních obalech

Karolína Těšíková, Johana Zemancová, Lenka Zelenková, Bohuslava Tremlová, Dani Dordevic
*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1, 612 42*

Úvod

V posledních několika letech si spotřebitelé uvědomují dopad plastů na životní prostředí. Jedlé obaly upoutaly pozornost díky možnosti částečné náhrady biologicky nerozložitelných obalových materiálů. Jejich použití se rozšiřuje začlenění různých potravinářských přídatných látek (1). Kávová sedlina je vedlejší produkt bohatá na polysacharidy a lipidy, které vedle kyseliny linolové, palmitové a olejové obsahují řadu bioaktivních sloučenin, jako jsou například polyfenoly vyznačující se vyznačují významnou antioxidační a protizánětlivou aktivitou (2; 3). Tyto bioaktivní sloučeniny mohou být enkapsulovány pomocí nanoemulzí (4).

Materiál a metodika

Extrakce oleje

Kávová sedlina byla nasypána do tmavé nádoby a celé množství bylo extrahováno v n-hexanu. Extrakce probíhala 5 dní. Poté byla směs filtrována a rozpouštědlo bylo odpařeno. Extrahovaný tuk byl skladován v temnu při teplotě +7 °C.

Příprava nanoemulze

Nanoemulze obsahovala 25 % tuku z kávového lógru, 2,5 % slunečnicového lecithinu a 80,2 % destilované vody. Vytvořená směs byla pomocí PULSE 150 ULTRASONIC HOMOGENIZER (Benchmark Scientific, USA) homogenizována po dobu 5 min s délkou cyklu 78,0 s.

Výroba obalů

Nejprve bylo naváženo odpovídající množství nanoemulze (viz. Tabulka 1) a 0,3 g κ -karagenanu, dále bylo přidáno odpovídající množství destilované vody (viz. Tabulka 1). Následně byl roztok rozmíchán a zahřát na plotýnce do ztekucení. Následovalo míchání na magnetické míchačce po dobu 10 min (50°C, 350 rpm). Poté bylo přidáno 0,25 ml glycerolu a vzorky byly míchány dalších 5 minut. Dále následovalo přidání 1,3 ml TWEEN 80. Vzorky byly míchány 7 min (60°C, 850 rpm) a poté vylity do Petriho misek.

Tabulka 1: Složení vzorků obalů

Vzorek	Složení
C	0.3 g κ -carrageenan + 45 ml destilované vody + TWEEN 80 + glycerol
K0,1	0.3 g κ -carrageenan + 43,6 ml destilované vody + 0,1 g nanoemulze + TWEEN 80 + glycerol

K0,45	0.3 g κ-carrageenan + 43,25 ml destilované vody + 0,45 g nanoemulze + TWEEN 80 + glycerol
K0,8	0.3 g κ-carrageenan + 42,9 ml destilované vody + 0,8 g nanoemulze + TWEEN 80 + glycerol
K1	00.3 g κ-carrageenan + 42,7 ml destilované vody + 1,0 g nanoemulze + TWEEN 80 + glycerol

Antioxidační kapacita

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

$$\text{ABTS (\%)} = [(\text{AbsABTS} - \text{Absvzorku}) / \text{AbsABTS}] \times 100$$

Pro stanovení antioxidační kapacity metodou FRAP bylo do tmavých lahviček naváženo 0,1 g vzorku, a přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut a přefiltrovány. Následně bylo v tmavých lahvičkách smícháno 180 µl extraktu, 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.

Pro stanovení celkových polyfenolů bylo do tmavých lahviček naváženo 0,1 g vzorku, a přidáno 20 ml směsi ethanol:voda (1:1) a vzorky byly ultrazvukovány po dobu 30 minut a přefiltrovány. Do odměrné baňky o objemu 25 ml byl odebrán 1 ml extraktu a přidáno 5 ml roztoku Folin Ciocalteu (naředěného 1:10) a 4 ml 7,5% Na₂CO₃. Vzorky byly inkubovány ve tmě po dobu 30 minut a doplněny destilovanou vodou po rysku. 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.

Měření textury

Textura byla měřena na přístroji TA.XT plus texturometru metodou ASTM D882-02, kdy byla analyzována pevnost v tahu (MPa), lámavé napětí (%) a tuhost (MJ/m³). Pro měření byly filmy nastříhány na velikost 1x5 cm a měření bylo pro každý druh vzorku provedeno 5x.

Výsledky

Tabulka 2 zobrazuje výsledky antioxidačních kapacit měřených pomocí metod FRAP, ABTS a výsledky celkových polyfenolů. Výsledky metody FRAP ukazují, že při vyšším přidavku nanoemulze docházelo k nárůstu antioxidační kapacity oproti kontrolnímu vzorku ($p < 0,05$). Nejvyšší hodnotu antioxidační kapacity vykazoval vzorek K0,8. Avšak u metody ABTS docházelo po přidavku nanoemulze do jedlých obalových filmů k poklesu hodnot antioxidační kapacity oproti kontrolnímu vzorku. Nejnižší koncentrace nanoemulze vykazovala nejnižší výsledky antioxidačních kapacit u obou metod. U této metody nebyl pozorován statisticky významný rozdíl. Nicméně, v případě celkových polyfenolů, byl sledován několikanásobný nárůst hodnot u jedlých obalů obsahující nanoemulzi, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku K0,8. Tento výsledek odpovídá výsledkům metody FRAP. Přestože nanoemulze zvyšují stabilitu a biologickou dostupnost antioxidantů (5), v této studii nebyl pozorován výrazný vliv nanoemulze na antioxidační kapacitu jedlých obalů. Zvýšení celkových polyfenolů naznačuje, že kávová sedliny je bohatým zdrojem polyfenolických látek (3).

Tabulka 2: Výsledky antioxidační kapacity metody FRAP, ABTS a výsledky celkových polyfenolů (TPC) jedlých obalů

	FRAP ($\mu\text{mol Troloxu/g}$)	ABTS (%)	TPC (mg kyseliny gallové/ml)
C	$3,090 \pm 0,397^{a, b}$	$4,524 \pm 1,000$	$0,115 \pm 0,021^a$
K0,1	$2,790 \pm 0,091^b$	$3,935 \pm 0,194$	$3,249 \pm 0,091^{b, c}$
K0,45	$3,371 \pm 0,228^a$	$4,371 \pm 0,771$	$3,112 \pm 0,028^c$
K0,8	$3,335 \pm 0,214^a$	$4,328 \pm 0,000$	$3,853 \pm 0,132^d$
K1	$3,213 \pm 0,154^a$	$4,373 \pm 0,013$	$3,405 \pm 0,174^{e, c}$

*rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi sloupci

V Tabulce 3 jsou shrnuty výsledky pevnosti v tahu (MPa), lámavého napětí (%) a tuhosti (MJ/m^3). Po přidání nanoemulze do karagenanového obalu se hodnoty pevnosti v tahu snížily. Nejnižší hodnota síly byla pozorována u vzorku K1 s nejvyšší koncentrací nanoemulze. Z výsledků lámavého napětí lze pozorovat, že přidavek nanoemulze zvýšil jeho hodnoty oproti kontrolnímu vzorku. Avšak hodnoty lámavého napětí se se zvyšující se koncentrací nanoemulze snižovaly. Nejvyšší hodnotu lámavého napětí tedy vykazoval vzorek K0,1. U většiny vzorků obsahující nanoemulzi byla sledována vyšší tuhost. Nicméně tyto hodnoty se lišili jen velmi málo. Nejvyšší hodnota tuhosti byla zaznamenána o vzorku K0,45. Nanoemulze z oleje z kávové sedliny může působit jako změkčovadlo, které zvyšuje lámavé napětí a zároveň snižuje kohezní síly (pevnost). (6).

Tabulka 3: Výsledky pevnosti v tahu (MPa), lámavého napětí (%) a tuhosti (MJ/m^3) jedlých obalů

	Pevnost v tahu (MPa)	Lámavé napětí (%)	Tuhost (MJ/m ³)
C	0,121 ± 0,023 ^a	77,03 ± 13,264 ^a	0,014 ± 0,003
K0,1	0,053 ± 0,036 ^b	123,377 ± 67,723 ^{a,b}	0,013 ± 0,013
K0,45	0,063 ± 0,01 ^{a,b}	90,454 ± 5,899 ^{a,b}	0,018 ± 0,003
K0,8	0,071 ± 0,007 ^{a,b}	90,336 ± 2,235 ^b	0,017 ± 0,003
K1	0,049 ± 0,045 ^b	69,609 ± 26,466 ^{a,b}	0,011 ± 0,011

*rozdílná písmena v horním indexu značí statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) mezi sloupci

Závěr

Cílem této práce bylo zhodnocení vlivu nanomulze z oleje z kávové sedliny na antioxidační a texturální vlastnosti karageganových jedlých obalů. Přídavek nanoemulze výrazně neovlivnil antioxidační kapacity obalů, nicméně zvýšil obsah celkových polyfenolických látek. Jedlé obaly v přítomnosti nanoemulze vykazovaly nižší hodnoty pevnosti v tahu a naopak vyšší hodnoty lámavého napětí.

Seznam literatury:

- 1) KUMAR, Ajesh, Muzaffar HASAN, Shukadev MANGARAJ, Pravitha M, Deepak KUMAR VERMA, Prem PRAKASH SRIVASTAV. Trends in Edible Packaging Films and its Prospective Future in Food: A Review. *Applied Food Research*. 2022, **2**(1), 100118 [cit. 2022-11-21].
- 2) LEAL VIEIRA CUBAS, Anelise, Marina MEDEIROS MACHADO, Ritanara TAYANE BIANCHET, et al. Oil extraction from spent coffee grounds assisted by non-thermal plasma. *Separation and Purification Technology*. 2020, **250**, 117171 [cit. 2022-11-21].
- 3) LÓPEZ-LINARES, Juan C., María Teresa GARCÍA-CUBERO, Mónica COCA a Susana LUCAS. A biorefinery approach for the valorization of spent coffee grounds to produce antioxidant compounds and biobutanol. *Biomass and Bioenergy*. 2021, **147**, 106026 [cit. 2022-11-21].
- 4) PISOSCHI, Aurelia Magdalena, Aneta POP, Carmen CIMPEANU, Violeta TURCUȘ, Gabriel PREDOI a Florin IORDACHE. Nanoencapsulation techniques for compounds and products with antioxidant and antimicrobial activity - A critical view. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018, **157**, 1326-1345 [cit. 2022-11-21].
- 5) SHARMA, Simran, Sit-Foon CHENG, Bhaswati BHATTACHARYA a S. CHAKKARAVARTHI. *Efficacy of free and encapsulated natural antioxidants in oxidative stability of edible oil: Special emphasis on nanoemulsion-based encapsulation*. 2019, **91**, 305-318 [cit. 2022-11-21].
- 6) MAHCENE, Zineb, Aminata KHELIL, Sara HASNI, Perihan Kubra AKMAN, Fatih BOZKURT, Kamilia BIRECH, Mohamed Bilal GOUDJIL a Fatih TORNUK. Development and characterization of sodium alginate based active edible films incorporated with essential oils of some medicinal plants. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, **145**, 124-132 [cit. 2022-11-21].

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 217/2022/FVHE.

Netopýři jako rezervoár zoonotických agens: koronaviry a jejich výskyt v Evropě

Šárka Bednaříková¹, Kateřina Zukalová¹, Michaela Jankovířová¹, Veronika Seidlová^{1,2}, Monika Němcová¹, Jan Zukal^{1,2}, Vladimír Piaček¹, Jana Sedláčková¹, Heliana Dundarova³, Jiří Pikula¹
Ústav ekologie a chorob zoovířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární univerzita Brno¹

Ústav biologie obratlovců, Akademie věd České republiky²

Ústav pro výzkum biodiverzity a ekosystémů, Bulharská akademie věd³

Úvod

Koronavirus je označení čtyř rodů RNA virů, které patří do podčeledi *Orthocoronavirinae*. Alfakoronaviry a betakoronaviry se vyskytují u savců, včetně netopýřů a člověka. Gammakoronavirus a deltakoronavirus napadá zejména domácí a divoce žijící ptáky (Wong et al., 2019). Šíří se buď vzduchem, kontaminovanými předměty nebo oro-fekálním přenosem a způsobují závažnější i méně závažná onemocnění. V posledních letech byla, je, a bude věnována velká pozornost výzkumu betakoronavirů, které souvisejí s onemocněními SARS-CoV, SARS-CoV-2, MERS-CoV, jejichž přirozenými rezervoáry jsou netopýři, kteří mají relativně velký zoonotický potenciál (Letko et al., 2020). V přenosu onemocnění hraje vždy roli mezihostitel, který přenáší virus na člověka. První zdokumentovaný případ SARS pochází z listopadu 2002 z čínské provincie Kuang-tung. SARS zasáhl 28 zemí světa s 8 096 případy a 774 úmrtími. Jako přirozený rezervoár byl identifikován vrápenec čínský (*Rhinolophus sinicus*) (Lau et al., 2005) a pravděpodobnými mezihostiteli byly cibetky (*Viverridae*), které umožnily šíření viru z netopýřů na člověka. SARS-CoV2 spojený s pandemií COVID-19 je v současné době celosvětově nejdiskutovanějším tématem. Pravděpodobným zdrojem je vrápenec prostřední (*Rhinolophus affinis*) a mezihostitelem luskoun ostrovní (*Manis javanica*). Dosud bylo popsáno asi 200 druhů spojených se 160 druhy netopýřů 7 čeledí, a to nejčastěji z trusu a gastrointestinálního traktu (více než 78 %). Ostatní matrice tvořily tkáň jater, plic, sleziny a ledvin, a také vzorky slin a krve. Prevalence výskytu koronaviru se obecně pohybovala v rozmezí 3-10 % (Hernández-Aguilar et al., 2021). Netopýři jsou označováni za hostitele mnoha patogenů, přičemž často nevykazují klinické příznaky onemocnění. Toto platí i pro koronaviry, neboť jediným prokázaným případem byl nález histopatologických změn ve tkáni plic u listonosy plodožravého *Artibeus jamaicensis* (Munster et al., 2016).

Cílem naší studie bylo zhodnotit výskyt, distribuci a prevalenci koronavirů (resp. betakoronavirů) v různých maticích kadaverů evropských druhů netopýřů, případně ve vzorcích odebraných neletálně při terénních odchyttech netopýřů.

Materiál a metodika

Sběr vzorků

Celkem jsme detekci koronavirů podrobili 322 vzorků dvou různých biologických matric. Jako první jsme testovali soubor 277 vzorků plicních tkání získaných od netopýrů *Myotis myotis* a *Nyctalus noctula* z České republiky a Slovenska. Vzorky plic získané pitvou kadáverů, jenž měl Ústav ekologie a chorob zoonozivních zvířat, zvěře, ryba a včel k dispozici již z dřívějších let, byly uchovávány v RNAlateru při teplotě -80 °C. Druhým analyzovaným biologickým materiálem bylo 45 rektálních výtěrů šesti druhů netopýrů: *Rhinolophus ferrumequinum*, *Rhinolophus hipposideros*, *Rhinolophus euryale*, *Miniopterus schreibersii*, *Myotis capaccinii*, *Myotis emarginatus*. Rektální výtěry se podařilo získat během terénních odchytů netopýrů na čtyřech lokalitách (Mandrata Chavdarzi, Magura cave, Andaka, Magura Rabisha) v Bulharsku. Tento biologický materiál byl následně uskladněn při teplotě -20 °C ve zkumavkách s RNAlaterem.

Izolace RNA

Ze vzorků plic i rektálních výtěrů byla izolována RNA za použití kitu NucleoSpin® RNA XS (Macherey-Nagel, Německo) dle protokolu. Koncentraci a kvalitu získaných nukleových kyselin jsme ověřili pomocí nano-spektrofotometru. Získaná izolovaná RNA byla následně skladována při teplotě -80 °C.

PCR a real-time PCR

Vzorky byla dále podrobeny polymerázové řetězové reakci (PCR). První část analýz se zaměřovala na detekci pan-koronavirů ze vzorků plicní tkáně metodou RT-PCR, kdy je za působení reverzní transkriptázy umožněna konverze RNA na komplementární cDNA. Primery IZS-CoV (forward 5'-CDCAYGARTTYTGYTCNCARC-3' a reverse 5'-RHGGRTANGCRTCWATDGC-3') (180 bp) použité pro screening jedнокrokovou metodou, byly navrženy autory Lelli et al. (2013) jako zkrácená forma primerů RNA-dependentní RNA polymerázy (Rdrp), které umožňují širokospektrální detekci koronavirů (alfa i beta). PCR reakce byla provedena přidáním 5 µl získané RNA do 20 µl reakční směsi kitu QIAGEN OneStep RT-PCR (QIAGEN, Německo) sestávající z 5 µl OneStep RT-PCR Bufferu, 1 µl dNTP mixu, 1 µl Enzyme mixu, 13,5 µl RNase-free water a 1,25 µl každého z primerů. Samotná reakce PCR probíhala při 50 °C po dobu 30 minut, následně byla aktivována Hot-start DNA polymeráza při 95 °C po dobu 15 minut, následovalo 50 cyklů 94 °C 30 sekund, 45 °C po dobu 30 sekund a 72 °C po dobu 1 minuty a 10 minut závěrečné extenze při 72 °C. Získaný PCR produkt byl vyhodnocován gelovou elektroforézou.

Pro sadu testovaných primerů Rdrp (Poon et al., 2005), jenž cílí na konzervovanou oblast sekvencí RNA-dependentní polymerázy koronaviru a měly být původně použity ke screeningu vzorků, se

nepodařilo metodu RT-PCR optimalizovat. Tyto primery se jeví jako nekompatibilní s použitým OneStep RT-PCR kitem (QIAGEN, Německo) či zvolenou pozitivní kontrolou.

V další fázi řešení projektu byla vyizolovaná RNA ze vzorků plic a rektálních výtěrů amplifikována metodou real-time PCR za použití one-step kitu QuantiNova SYBR Green RT-PCR (QIAGEN, Německo) a thermocycleru qTOWER 3 Real-Time PCR (Analytik Jena, Německo). Tato metoda umožňuje současně reverzní transkripci a PCR v reálném čase s kontinuálním záznamem fluorescence v každém cyklu. K tomu byly využity primery nsp2 (forward 5'-ATGCATTTGCATCAGAGGCT-3' a reverse 5'-TTGTTATAGCGGCCTTCTGT-3') (140 bp), jež jsou navrženy autory Yip et al. (2020) tak, aby cílily na specifickou oblast viru SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome coronaviruses 2). Reakční směs 20 µl sestávala z 10 µl SYBR Green RT-PCR Master mixu, 0,2 µl QN SYBR Green RT-mixu, 2 µl primer mixu, 2,8 µl RNase-free water a 5 µl templátu. Podmínky reakce byly následující, 10 minut při 50 °C, 2 minuty při 95 °C, následovalo 45 cyklů 5 sekund při 95 °C a 10 sekund při 60 °C.

Celkově bylo v rámci plnění tohoto projektu uděláno přibližně 910 PCR reakcí.

Výsledky

Na přítomnost koronavirů jsme analyzovali 277 vzorků plic a 45 rektálních výtěrů netopýrů z České republiky, Slovenska a Bulharska. Při analýzách RT-PCR za pomoci primerů IZS-CoV byly detekovány 4 pozitivní vzorky z tkání plic a to 2 u *M. myotis* z České republiky (Malá Morávka, Sloupsko-šošuvské jeskyně) a 2 u *N. noctula* ze Slovenska a z lokality Zastávka u Brna z České republiky. Při analýzách RT-qPCR s použitím primerů nsp2 bylo odhaleno 5 pozitivních vzorků z tkání plic ve všech případech u *M. myotis* ze Zastávky u Brna z České republiky. Dále 2 pozitivní vzorky rektálních výtěrů u *M. schreibersii* a *R. euryale* přičemž oba pocházejí z Bacho Kiro – jeskyně nacházející se v bulharské oblasti Andaka.

Celková prevalence výskytu betakoronavirů v plicní tkáni netopýrů analyzovaná oběma metodami odpovídá 3 % u *Myotis myotis*, respektive 2,6 % u *Nyctalus noctula*. Přestože jsme získali nejmenší množství vzorků metodou rektálních výtěrů, prevalence pozitivních výskytů byla nejvyšší, odpovídala 4,4 %. Rozdíl mezi oběma použitými typy primerů však nebyl statisticky významný (test of difference between two proportions, $p = 0,8587$).

Závěr

Výzkum netopýrů jakožto pokladnice a zdroje patogenních agens, včetně koronavirů, je důležitý s ohledem na globální hrozby pro veřejného zdraví. V této studii jsme detekovali přítomnost koronavirů ve dvou různých biologických maticích z netopýrů pocházejících z České republiky, Slovenska a

Bulharska. Námi zjištěná prevalence 2,6 - 4,4 % výskytu koronavirů odpovídá výsledkům publikovaným v jiných studiích (Hernández-Aguilar et al., 2021).

Seznam literatury:

Hernández-Aguilar, I., Lorenzo, C., Santos-Moreno, A., Naranjo, E. J., & Navarrete-Gutiérrez, D. (2021). Coronaviruses in bats: A review for the americas. *Viruses*, *13*(7), 1226.

Lau, S. K., Woo, P. C., Li, K. S., Huang, Y., Tsoi, H. W., Wong, B. H. L., Wong, S. S. Y., Leung, S. Y., Chan, K. H. & Yuen, K. Y. (2005). Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(39), 14040-14045.

Lelli, D., Papetti, A., Sabelli, C., Rosti, E., Moreno, A., & Boniotti, M. B. (2013). Detection of coronaviruses in bats of various species in Italy. *Viruses*, *5*(11), 2679–2689. <https://doi.org/10.3390/v5112679>.

Letko, M., Seifert, S. N., Olival, K. J., Plowright, R. K., & Munster, V. J. (2020). Bat-borne virus diversity, spillover and emergence. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(8), 461-471.

Munster, V. J., Adney, D. R., van Doremalen, N., Brown, V. R., Miazgowiec, K. L., Milne-Price, S., Bushmaker, T., Rosenke, R., Scott, D., Hawkinson, A., de Wit, E., Schountz, T., & Bowen, R. A. (2016). Replication and shedding of MERS-CoV in Jamaican fruit bats (*Artibeus jamaicensis*). *Scientific Reports*, *6*, 21878. doi: 10.1038/srep21878.

Poon, L. L., Chu, D. K., Chan, K. H., Wong, O. K., Ellis, T. M., Leung, Y. H., Lau, S. K., Woo, P. C., Suen, K. Y., Yuen, K. Y., Guan, Y., & Peiris, J. S. (2005). Identification of a novel coronavirus in bats. *Journal of virology*, *79*(4), 2001–2009. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.4.2001-2009.2005>.

Wong, A. C. P, Li, X., Lau, S. K. P, & Woo, P. C. Y. (2019). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*, *11*(2): 174. doi: 10.3390/v11020174. PMID: 30791586; PMCID: PMC6409556.

Yip, C. C.-Y., Ho, C.-C., Chan, J. F.-W., To, K. K.-W., Chan, H. S.-Y., Wong, S. C.-Y., Leung, K.-H.; Fung, A. Y.-F., Ng, A. C.-K., Zou, Z., Tam, A.R., Chung, T. W.-H., Chan, K.-H., Hung, I.F.-N., Cheng, V. C.-C., Tsang, O. T.-Y., Tsui, S. K. W., & Yuen, K.-Y. (2020). Development of a Novel, Genome Subtraction-Derived, SARS-CoV-2-Specific COVID-19-nsp2 Real-Time RT-PCR Assay and Its Evaluation Using Clinical Specimens. *Internationla Journal Molecular. Sciences*, *21*, 2574. <https://doi.org/10.3390/ijms21072574>.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 219/2022/FVHE

Vliv ošetření vody CaviPlasmou na životnost kožovce rybího (*Ichthyophthirius multifiliis*)

Ivona Toulová¹, Zuzana Lepková¹, Lucie Veitová¹, Vendula Kalocsányiová¹, Ivana Papežíková^{1,2},
Ivana Mikulíková¹, Miroslava Palíková^{1,2}

1) Ústav ekologie a chorob zoonoz, zvířat, zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární univerzita Brno

2) Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova
univerzita v Brně

Úvod

Kožovec rybí (*Ichthyophthirius multifiliis*) je nálevník parazitující na ploutvích, kůži a žábrech sladkovodních ryb, který způsobuje onemocnění nazývané ichthyofitirioza. Zvláště v teplých obdobích roku může zapříčinit zvýšené úhyny v chovech ryb ^[1,2]. Jeho životní cyklus zahrnuje 4 vývojová stádia: trofont, tomont, tomit, theront. Trofont je stádium žijící na kůži a žábrách, kde se živí a roste. Poté opouští hostitele a jako tomont se nachází ve vodě a po nějaké době padá na dno, kde vytvoří cystu. Uvnitř cysty dochází k množení a vzniká 100–1000 malých tomitů. Tomity prolomí stěnu cysty a jako stádium zvané theront vyhledávají nové hostitele aktivním plaváním ^[2]. Díky stádiím nacházejícím se na kůži a žábrách krytých povrchovou vrstvou epitelálních buněk hostitele, je těžké ho z chovu eliminovat. Nedávno byl patentován nový přístroj (CaviPlasma) pro čištění vody, který využívá dvou fyzikálních jevů – nízkoenergetického plazmatického výboje a hydrodynamické kavitace ^[3]. CaviPlasma se jeví jako zařízení účinné při využití k čištění vody od některých polutantů a mikroorganismů jako jsou bakterie a sinice ^[4]. Cílem práce bylo zjistit, zda je ošetření vody pomocí této technologie schopno eliminovat i kožovce rybího, reps. stádia nacházející se ve vodě.

Metodika

V pokusu byla použita juvenilní stádia sumce velkého (*Silurus glanis*) a to kvůli vysoké vnímavosti vůči kožovci. Celkem 80 ks sumce velkého bylo rozděleno do 8 akvárií po 10 kusech. Před samotným pokusem probíhala aklimatizační fáze trvající týden, aby si dovezené ryby navykly na nové chovné prostředí. Před zahájením pokusu byla hladina vody snížena na 90 %, aby bylo možné během pokusu přidat 10 % ošetřené/neošetřené vody.

Do 8 pětilitrových nádob byla dána kohoutková voda a nechala se přes noc odstát. Dvě nádoby se nechaly pro negativní kontrolu a do zbylých 6 byly přidány seškraby kůže ze pstruha duhového přirozeně infikovaného kožovcem a voda z Petriho misek, na kterých byl kožovec kultivován *in vitro*. Přítomnost kožovce v seškrabech a na Petriho miskách byla ověřena mikroskopicky. Dvě nádoby se nechaly pro infikování pozitivní kontroly a zbylé čtyři byly dovezeny na ošetření CaviPlasmou. Dvě byly ošetřeny po dobu 1 min 20 s a další dvě po dobu 7 min.

Pokus se skládal ze 4 skupin ryb a byl proveden v duplikátu, tedy celkem 8 skupin. Skupinám č. 1 a č. 2 (negativní kontroly) byla do nádrží dolita pouze čistá odstátá kohoutková voda (bez kožovce). Skupinám č. 3 a č. 4 (pokusné skupiny) byla dolita voda s kožovcem ošetřená CaviPlasmou po dobu 1 min a 20 s. Skupinám č. 5 a č. 6 (pokusné skupiny) byla dolita voda s kožovcem ošetřená CaviPlasmou po dobu 7 min. Skupinám č. 7 a č. 8 (pozitivní kontroly) byla dolita neošetřená voda s kožovcem. Podíl vody činil u všech nádrží 10 % celkového objemu.

Po projevení klinických příznaků ichthyoftiriózy (bílé tečky na kůži) byly provedeny odběry. Rybám byla odebrána krev do heparinizovaných stříkaček a následně byly usmrceny úderem do hlavy. Následně byly provedeny seškraby kůže a žaber. Od každé ryby byl odebrán jeden žaberní oblouk a jedna prsní ploutev na histologické vyšetření. Druhá prsní ploutev byla odebrána na PCR. Byl odebrán i kožní sliz pro stanovení koncentrace lysozymu. Ryby byly změřeny a zváženy.

Seškraby z kůže a žaber byly prohlédnuty mikroskopicky a byly zjištěny počty kožovce. V seškrabech z kůže byly zjišťovány počty parazitů v jednotlivých zorných polích při zvětšení 40× a ze žaber byly spočítány absolutní počty parazitů v celém seškrabu. Krev byla využita na spočítání červených a bílých krvinek a na stanovení fagocytární aktivity periferních fagocytů.

Výsledky

Tabulka č. 1: Počty *I. multifiliis* ve stěrech kůže v zorném poli při zvětšení 40×

Negativní kontrola		Cavi 1min20sek		Cavi 7min		Pozitivní kontrola	
Ryba	Počet	Ryba	Počet	Ryba	Počet	Ryba	Počet
1	0	9	0	17	0	25	35–50
2	0	10	0	18	0	26	35–50
3	0	11	0	19	0	27	20–40
4	0	12	0	20	0	28	25–40
5	0	13	0	21	0	29	40–60
6	0	14	0	22	0	30	40–60
7	0	15	0	23	0	31	50–70
8	0	16	0	24	0	32	50–60

Tabulka č. 2: Počty *I. multifiliis* na žábrech v zorném poli při zvětšení 40×, v závorce jsou uvedeny absolutní počty kožovce

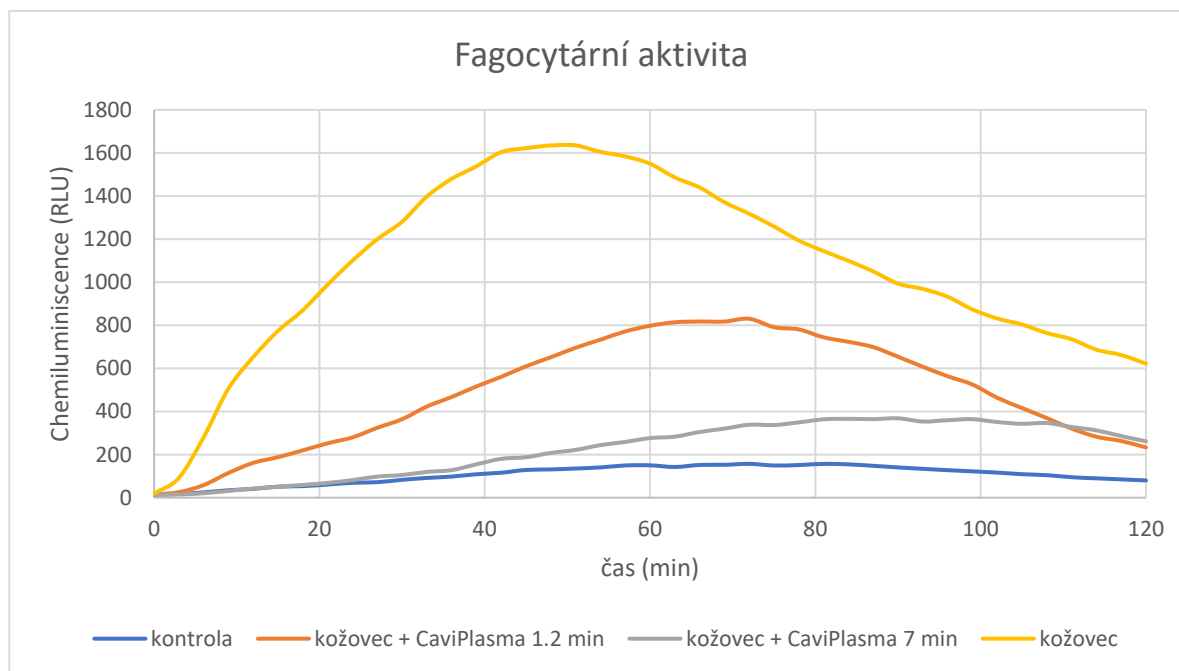
Negativní kontrola	Cavi 1min20sek	Cavi 7min	Pozitivní kontrola
--------------------	----------------	-----------	--------------------

Ryba	Počet	Ryba	Počet	Ryba	Počet	Ryba	Počet
1	0	9	0	17	0	25	9–17 (35)
2	0	10	0	18	0	26	19–23 (52)
3	0	11	0	19	0	27	9–12 (26)
4	0	12	0	20	0	28	7–14 (23)
5	0	13	0	21	0	29	13–17 (36)
6	0	14	0	22	0	30	6–12 (18)
7	0	15	0	23	0	31	10–13 (28)
8	0	16	0	24	0	32	11–14 (25)

Tabulka č. 4: Popisné charakteristiky počtů erytrocytů [$T.l^{-1}$] a leukocytů [$G.l^{-1}$], počet jedinců je 8 ($n = 8$). V tabulce č. 4 jsou uvedeny průměry, směrodatné odchylky (SD), minimální hodnoty (MIN) a maximální hodnoty (MAX) jednotlivých skupin.

Skupina		Ery	Leu
Negativní kontrola	Průměr	1,88	73,75
	SD	0,27	16,60
	MIN	1,40	56,00
	MAX	2,20	104,00
CaviPlasma 1 min 20 sec	Průměr	1,62	72,88
	SD	0,28	13,52
	MIN	1,19	47,00
	MAX	1,89	93,00
CaviPlasma 7 min	Průměr	1,81	62,75
	SD	0,24	24,43
	MIN	1,53	43,00
	MAX	2,31	120,00
Pozitivní kontrola	Průměr	1,51	41,75
	SD	0,45	14,06
	MIN	1,05	25,00
	MAX	2,41	72,00

Graf č. 1: Fagocytární aktivita jednotlivých skupin



Závěr

Na základě našich výsledků se zařízení CaviPlasma jeví jako účinné zařízení ke zničení stádií kožovce ve vodě. Ani u jedné skupiny ryb, kterým byla do nádrže přidána voda ošetřená CaviPlasmou, nedošlo k nákaze kožovcem. Přestože v tomto případě bylo ošetření účinné, jedná se o poměrně nové zařízení a je tedy za potřebí další výzkum za účelem zjištění vlivu takového ošetření vody na vodní živočichy.

Seznam literatury

1. MATTHEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. *Advances in parasitology*, 2005, 59: 159-241.
2. PALÍKOVÁ, Miroslava, et al. *Nemoci a chorobné stavy ryb*. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2019.
3. RUDOLF, P., et al. Apparatus for purifying liquids and a method for purifying liquids using this apparatus. *Czech Patent*, 2019, 308532.
4. MARŠÁLEK, Blahoslav, et al. Removal of *Microcystis aeruginosa* through the combined effect of plasma discharge and hydrodynamic cavitation. *Water*, 2019, 12.1: 8.

Tato práce byla financována grantem IGA VETUNI 220/2022/FVHE

Vliv přidavku autochtonních probiotik (*Lactobacillus spp.*) v krmivu na zdravotní stav pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) po experimentální challenge *Aeromonas salmonicida*

Zuzana Lepková, Miroslava Palíková, Ivana Mikulíková, Ivana Papežíková, Hana Band'ouchová,
Jana Blahová

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

Úvod

V současnosti jsou jedním z největších problémů akvakultury nemoci způsobené bakteriemi. Vzhledem k tomu, že užívání antibiotik má mnoho negativních účinků na ryby, životní prostředí i zdraví člověka, snažíme se hledat nové metody, jak infekce zvládat. Jednou z těchto metod je použití probiotik přidávaných do rybiho krmiva. Probiotika jsou mikroorganismy, které mají pozitivní vliv na zdraví svého hostitele. Jednou z nejvýznamnějších skupin probiotik jsou bakterie rodu *Lactobacillus*. V experimentu *in vitro* bylo prokázáno, že pomáhají zvýšit zdravotní odolnost ryb a tím potlačit infekci způsobenou bakterií *Aeromonas salmonicida*. Proto jsme se rozhodli použít stejný rod bakterií pro testování zdravotní odolnosti ryb *in vivo*.

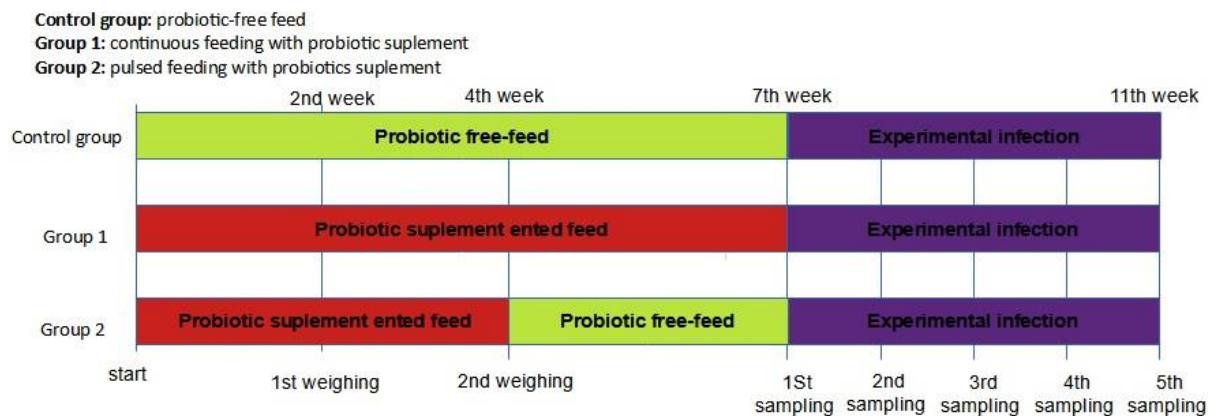
Materiál a metodika

Náš experiment se skládal ze dvou částí (krmná a experimentální), v první krmné části trávající 7 týdnů byly ryby rozděleny do 3 skupin. Každá skupina obsahovala 80ks juvenilního pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*, duplikáty 2 x 40 ks). Skupina 1 byla krmena krmivem kontinuálně s probiotickým doplňkem (*L. plantarum*) po dobu 7 týdnů, skupina 2 byla krmena v pulzním režimu krmení (4 týdny s probiotickým doplňkem, poté 3 týdny krmivem bez přidavku probiotik) a skupina 3 (kontrola) byla krmena krmivem bez přidavku probiotik po dobu 7 týdnů. První odběry byly provedeny po 7 týdnech (10 ks ryb z každé skupiny). Následovala experimentální část, kde byly ryby infikovány *A. salmonicida* pomocí imerzní koupele. Každá skupina byla rozdělena do dvou nádrží po 30ks. Experimentální část probíhala rovněž v duplikátech. Od té doby byly ryby (skupiny 1 a 2) krmeny kontinuálně krmivem s probiotiky. V průběhu celého experimentu byl sledován zdravotní stav ryb a byly pravidelně měřeny základní parametry vody. Experiment byl ukončen 4 týdny po infikování ryb. Byly odebrány vzorky krve na hematologické, biochemické a imunologické vyšetření.

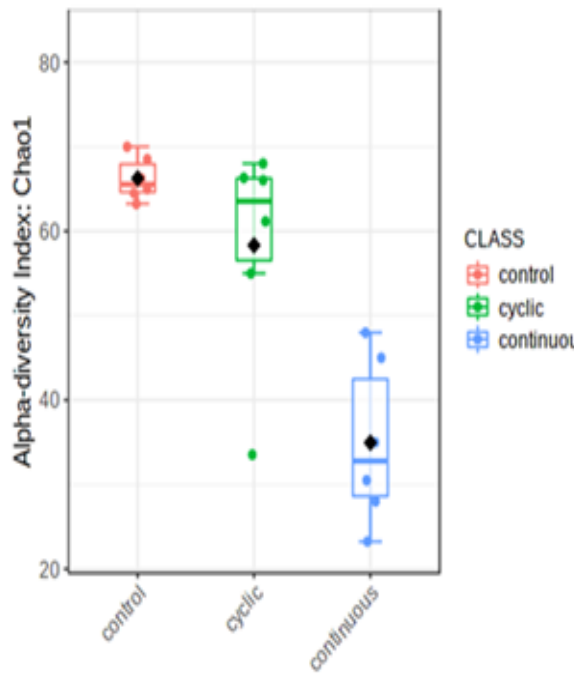
Ze střevního obsahu ryb byla izolována DNA a byla provedena metagenomická analýza složení střevního mikrobiomu.

Výsledky

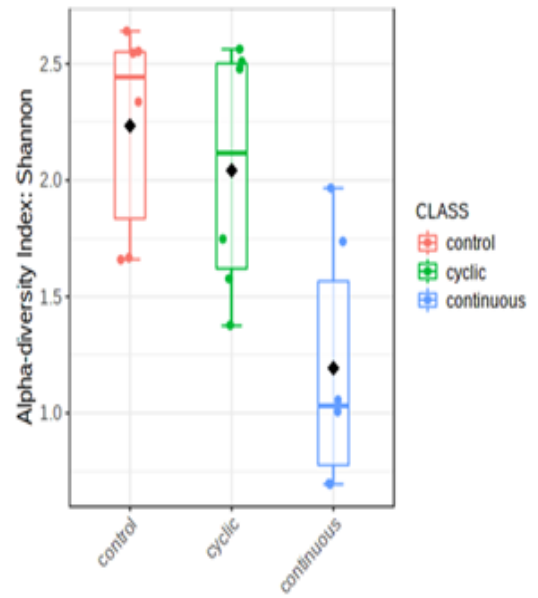
Výsledky metaxenomické analýzy po 7 týdnech krmení probioticky obohaceným krmivem- na konci krmné části (1st sampling) ukazují statisticky významnou změnu ve složení střevního mikrobiomu. Porovnání výsledků u tří testovaných skupin ryb ukazuje, že přidavek probiotik má vliv na složení střevní mikrobioty pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Byl zjištěn rozdíl v počtu bakteriálních kmenů mezi kontrolní, cyklickou a kontinuální skupinou a zároveň rozdíl ve složení bakteriálních tříd mezi těmito skupinami. Výsledky hematologických a biochemických vyšetření z odběrů v průběhu a po ukončení experimentální části (1st-5th sampling) odhalily rozdíl v 5 parametrech (Hb, Ht, Cl⁻, Mg, Ca). Výsledky hematologických vyšetření našeho testu *in vivo* však nejsou v souladu s očekáváním založeným na výsledcích *in vitro*.



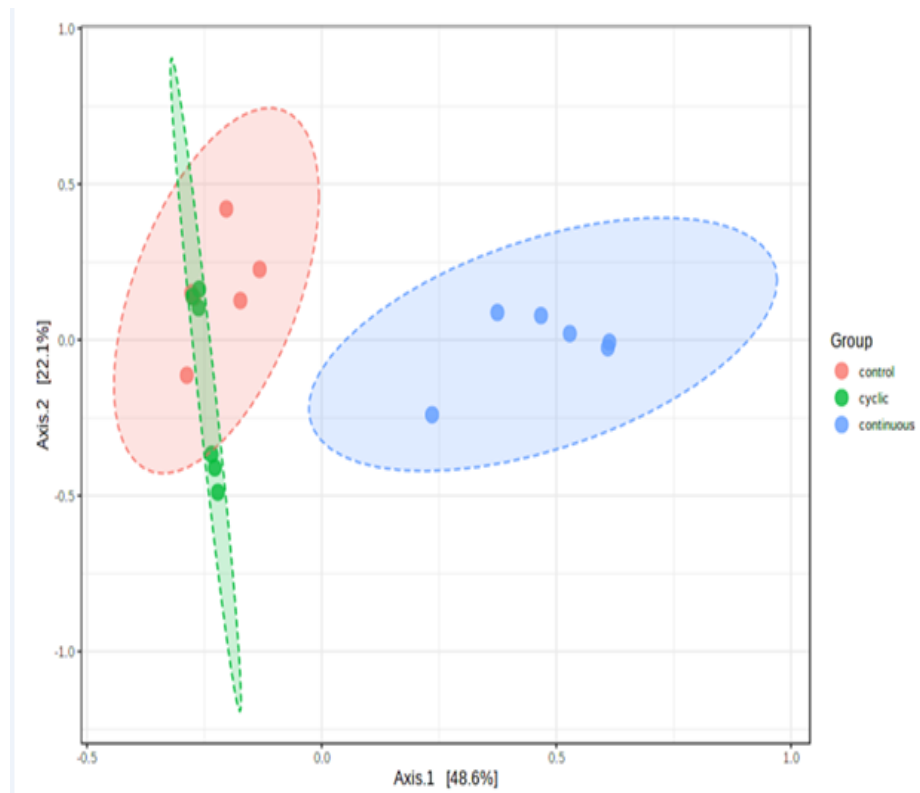
Chao 1 (ANOVA)



Shannon index (ANOVA)



B-diverzita – PcoA



Seznam literatury:

- Autin, M. Probiotics: What are they? Why are they needed in the feed? BioMar Magazine, October 2010: 8-10.
- Balcázar, J. L., Vendrell, D., DeBlas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J. L. et al. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology 2009, 17: 153-157.
- Cingelová Maruščáková, I., Schusterová, P., Popelka, P., Gancarčíková, S., Csank, T., Fečkaninová, A., Ratvaj, M., Mudroňová, D. Effect of autochthonous lactobacilli on immunologically important molecules of rainbow trout after bacterial infection studied on intestinal primoculture, Fish & Shellfish Immunology, 2021, 119: 379-383.
- Fečkaninová, A., Koščová, J., Mudroňová, D., Schusterová, P., Cingelová Maruščáková, I., Popelka, P. Characterization of two novel lactic acid bacteria isolated from the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) in Slovakia, Aquaculture 2019, 506: 294-301.
- Irianto A., Austin B. Probiotic in aquaculture. Journal of Fish Diseases, 2002, 25 : 633-642.
- Palíková, M., Marková, Z., Navrátil, S., Mareš, J., Papežíková, I. Zdravotní problematika lososovitých ryb v recirkulačních systémech dánského typu v podmínkách České republiky. Veterinářství, 2015, 65: 636-642.

Tato práce byla financovaná grantem IGA VETUNI 221/2022/FVHE

Editovali:	prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA
Název:	Konference Interní grantové agentury VETUNI
Počet stran:	123
Vydání:	První
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno Brno 2022

ISBN 978-80-7305-880-7