

Závěrečné zprávy projektů ITA
realizovaných v roce 2020
prostřednictvím
Interní tvůrčí agentury VFU Brno



VFU Brno 2020

Vážení kolegové,

v roce 2020 úspěšně pokračovala činnost Interní tvůrčí agentury VFU Brno (ITA VFU Brno), jako jednoho z pilířů strategie rozvojového plánu tvůrčí činnosti na univerzitě. Aktivity ITA VFU Brno a jejím prostřednictvím financovaných projektů pokračovaly přes překážky, které pro výzkumné aktivity, vědeckou spolupráci a kontakty představovala epidemie koronavirové infekce. Z tohoto důvodu mnohé grantové agentury, včetně ITA VFU Brno poskytovaly řešitelům projektů úlevu v administraci projektů, například uvolňováním dříve závazných termínů nebo změnami ve skladbě rozpočtů projektů.

Agentura ITA je financována z prostředků MŠMT určených pro Dlouhodobý koncepční rozvoj výzkumné organizace (DKRVO). Během druhého roku své existence financovala ITA celkem 11 projektů z obou fakult VFU Brno a CEITEC VFU Brno a umožnila tak vědeckým pracovníkům univerzity získat experimentální data a ověřovat vědecké hypotézy, které mohou být v budoucnosti rozpracovány do podoby projektů národních nebo mezinárodních grantových agentur.

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

Závěrečné hodnocení každého ročníku na konferenci ITA VFU je pak mechanismem kontroly správné realizace jednotlivých projektů ale také popularizace činnosti agentury v rámci univerzity. ITA VFU Brno 2020 osvědčuje rozvoj vědecké a tvůrčí činnosti na univerzitě a je příkladem účelně investovaných finančních prostředků jako odpovědi univerzity na požadavek MŠMT o strategickém rozdělování prostředků určených na DKRVO.

Závěrem chci poděkovat všem členům Komise ITA VFU Brno, sekretariátu VVZ a všem, kteří se zapojili do činnosti komise a úspěšné organizace letošní konference ITA VFU Brno 2020.

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

prorektor pro vědu, výzkum a zahraniční vztahy
předseda Komise ITA VFU Brno

Brno, prosinec 2020

Komise Interní tvůrčí agentury VFU Brno

ITA VFU Brno

prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.

předseda komise

prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

místopředseda

Členové:

FVL doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D.

doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

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

doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA

CEITEC prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.

prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

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

Seznam projektů

ITA VFU Brno pro rok 2020

Číslo projektu	Název projektu	Řešitel
CEITEC/Hořín/ITA2020	Genetická diverzita hlavního histokompatibilitního komplexu (MHC) a v genech pro receptory NK buněk (NKR) u modelových populací koní	prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.
FVL/Celer/ITA 2020	Molekulární diagnostika původců vybraných infekcí hospodářských a domácích zvířat	prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.
FVL/Tichý/ITA2020	Morfologicko-fyziologické korelace ve vztahu k funkci a klinickým aspektům samičího pohlavního ústrojí savců	prof. MVDr. František Tichý, CSc.
FVL/Illek/ ITA 2020	Zdravotní poruchy v intenzivních chovech skotu a prasat a jejich vliv na kvalitu kolostra, produkci a reprodukci. Zlepšení parametrů motility spermií v inseminačních dávkách připravených z epididymálních spermií hřebce	doc. MVDr. Josef Illek, DrSc. Dipl. ECBHM
FVL/Crha/ITA2020	Onemocnění zvířat zájmových chovů z pohledu moderních metod diagnostiky a terapie	doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.
FVHE/Literák/ITA2020	Choroby volně žijících zvířat: aktuálně od úrovně genů patogenních mikroorganismů k hostitelům a interakcím s člověkem	prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.
FVHE/Pikula/ITA2020	Stresory ovlivňující zdraví divokých zvířat, zvěře a ryb	prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM
FVHE/Večerek/ITA2020	Dopady narušené pohody u vybraných druhů zvířat na jejich zdraví	prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA
FVHE/Tremlová/ITA2020	Hodnocení zdravotní nezávadnosti a funkčních vlastností jedlých obalů potravin	doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.
FVHE/Dobšíková/ITA2020	Veterinární aspekty zdravotního stavu drůbeže vlivem působení faktorů stresové zátěže a změny ve výživě	doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.
FVHE/Vorlová /ITA2020	Vliv potravinářských technologií a kulinárních úprav na kvalitu a bezpečnost potravin včetně pokrmů	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020)

1. Identifikační číslo projektu: *Ceitec/Hořín/ITA/2020*

2. Název projektu: *Genetická diverzita hlavního histokompatibilního komplexu (MHC) a v genech pro receptory NK buněk (NKR) u modelových populací koní*

3. Řešitel projektu:

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: *Ceitec VFU*

E-mail: *horinp@vfu.cz*

Telefon: *541562292/605870237*

4. Řešitelský kolektiv:

P. Hořín (0.3): *Ústav genetiky FVL, řešitel*

Martin Plášil (0.8), Ján Futas (0.8), Marie Klumplerová (0.6): *Ceitec VFU RG Animal Immunogenomics*

Karla Stejskalová (0.4), Leona Vychodilová (0.2): *Ústav genetiky FVL*

Jana Bubeníková: *PhD studentka (prezenční forma) Ústavu genetiky FVL (2. ročník)*

Kristýna Bízková-Javorská: *PhD studentka (prezenční forma) Ústavu parazitologie FVL (1. ročník)*

Tým je součástí centra excelentního výzkumu Ceitec VFU. Forma zapojení do řešení projektu byla dána předchozím zaměřením a zkušeností každého člena týmu. Provádění laboratorních analýz (JF - geny NKR; MP, MK, KS, LV - geny MHC třídy I, II, III). Bioinformatická a statistická analýza dat (JF, JB, KS). Dr. Plášil je certifikovaným pracovníkem oprávněným obsluhovat NGS sekvenátor. Z uvedeného je patrna komplementarita expertízy členů kolektivu, který také byl s tímto cílem vytvořen při budování Ceitec VFU.

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

Součástí týmu je i studentka DSP ústavu parazitologie Kristýna Bízková-Javorská, která provedla diagnostiku infekce piroplasmami *Theileria equi* a *Babesia caballi* molekulárními metodami (PCR, sekvenování), a podílí se na následné analýze získaných dat.

Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Projekt byl řešen v rámci výzkumného programu výzkumné skupiny Animal Immunogenomics centra excelentního výzkumu Ceitec VFU.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Obecný cíl: analyzovat diverzitu v genech imunitní odpovědi MHC a NKR u modelových populací koní vystavených tlaku infekčních patogenů v evolučním kontextu. Konkrétně: stanovit parametry populační genetické diverzity ve vybraných genech MHC a NKR; na základě analýzy kombinací genotypů MHC/NKR testovat hypotézu o koevoluci genomových oblastí MHC a NKR; zjistit asociace kombinovaných genotypů s modelovými infekcemi piroplasmami a WNV.

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

Modelové populace. Protože se podařilo získat pro účely projektu navíc mimořádný model afrických koní, byly studovány populace Rumunských koní z delty Dunaje (n=30), Camargueských koní (n=33) z delty Rhône a afrických koní z Pobřeží slonoviny (n=25). **Určení genotypů v exprimovaných genech MHC a NKR.** Byly amplifikovány části nebo celé geny NKR, genů MHC třídy I, II a III, genů MHC kódujících jiné než antigen-prezentující molekuly a non-MHC genů pro antigen-prezentující molekuly (seznam viz Výsledky projektu). Bioinformatickou analýzou byly identifikovány funkčně významné sekvence umožňující také určení haplotypových kombinací; genomické sekvence byly následně získány pomocí platformy Miseq (Illumina) nebo MinION (Oxford Nanopore). U každého koně byl v každém z analyzovaných genů určen genotyp ve všech identifikovaných SNP a získaných haplotypech. **Parametry populační diverzity v MHC a NKR genech.** Pro každou populaci byly v každém genu vypočteny základní parametry SNP a haplotypové diverzity. Populační struktura tří populací bude odhadnuta a jejich srovnání bude provedeno po dokončení genotypizace. **Interakce MHC a NKR genů.** Pomocí kvalitativních (χ^2) testů byl analyzován výskyt specifických kombinací genotypů a haplotypů Ly49 a KIR genů s dosud genotypovanými geny. **Asociace s infekcemi.** Ve vzorcích Rumunských koní bylo provedeno PCR vyšetření na přítomnost *Theileria equi* a *Babesia caballi* s následným diagnostickým sekvenováním a byly sumarizovány výsledky předchozího sérologického vyšetření na přítomnost anti-WNV protilátek pro genotypovaný soubor Camargueských koní. Asociace s piroplasmózou u Rumunských koní a infekcí WNV u Camargueských koní budou určeny po ukončení genotypizace.

Poznámka. Vzhledem k mimořádné epidemiologické situaci došlo ke zpoždění dodávek chemie a plastů pro molekulární analýzy, takže v důsledku odkladu v sekvenování se jedna část bioinformatických analýz teprve dokončuje.

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

Určení genotypů v exprimovaných genech MHC a NKR a jejich populační diverzita. V souladu s plánem řešení byly sekvenovány všechny geny nebo jejich části. Zcela nebo zčásti byly genotypovány a haplotypovány geny *KIR3DL*, *LY49A* a *LY49B* (NKR), *DRA*, *DQA* (MHC II), *C2*, *MICB* (MHC III), a *CD1C*, *CD1D* (non-MHC). Geny MHC třídy I byly amplifikovány a sekvenovány jako long-reads (LR) pomocí platformy MinION vyžadující specifickou bioinformatickou analýzu, která se provádí. Genotypizace a haplotypizace dalších genů MHC III (*TNFA*) a non-MHC (*MRI*) probíhá. Dosavadní výsledky ukazují rozdíly mezi populacemi v rozsahu genetické diverzity v rámci jednoho genu. Zároveň neplatí, že u všech populací vykazují nejvyšší variabilitu vždy tytéž geny. **Interakce MHC a NKR genů.** Dosud získané výsledky ukazují v některých případech průkazné rozdíly mezi pozorovanými a očekávanými četnostmi haplotypových kombinací určitých genů NKR s ostatními geny. Definitivní interpretace dat bude možná po kompletaci bioinformatických analýz, zejména ve vztahu ke genům MHC I. **Asociace s infekcemi.** Ze 48 Rumunských koní byla pomocí PCR prokázána a sekvenováním potvrzena přítomnost *Theileria equi* u 14 koní, u dvou *Babesia caballi*. Asociace s touto a WNV infekcí budou určeny po ukončeném genotypování. V případě, že budou k dispozici data o infekcích afrických koní, bude tato analýza provedena i u nich.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Projekt umožnil vypracovat metodiky genotypizace významných genů imunitní odpovědi s využitím NGS pomocí krátkých i dlouhých čtení, využít jich k získání prioritních informací o genetické diverzitě tří modelových populací a umožnil otestovat hypotézu o koevoluci dvou komplexních oblastí imunogenomu koní a asociace kombinovaných genotypů s infekcemi s cílem podpořit hypotézu o jejich funkčním významu ve vztahu k infekcím.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou publikovány v mezinárodních vědeckých časopisech. Předpokládají se separátní publikace výsledků analýzy koevoluce a asociačních analýz.

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

Population diversity of MHC and NKR genes and their interactions in model horse populations
Frontiers in Immunology.

Associations of MHC/NKR compound genotypes with infections in model horse populations.
Pathogens.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 139 696,00	1 139 696,00
Služby	100 000,00	100 000,00
Cestovné	90 000,00	0,00
Další provozní náklady	1 063 348,00	1 153 348,00
Doplňkové náklady	358 956,00	358 956,00
Celkem	2 752 000,00	2 752 000,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

Osobní náklady: Byly použity jak formou nadtarifního ohodnocení, tak formou mimořádných odměn k ocenění a motivaci vybraných osob. Částka zahrnuje stipendia pro dvě studentky DSP (40 000 Kč pro každou, celkem 80 000 Kč).

Služby: Sangerovo sekvenování (30 852 Kč), syntéza primerů (25 077 Kč). Oprava termocyklieru (3 630 Kč). Oprava purifikátoru vody (31 610 Kč). Nanopore pro sekvenování 8 831 Kč Celkem 100 000 Kč.

Cestovné: 0 Kč. V důsledku mimořádných opatření v podmínkách pandemie nebyly konány odborné akce a nebylo možné cestovat. Přesun do položky Další provozní náklady v plné výši je v souladu s Pravidly ITA VFU pro rok 2020.

Další provozní náklady: Reagencie pro Illumina MiSeq sekvenování (178 900 Kč), 2 běhy MinION sekvenování (254 628 Kč). Reagencie – PCR, fluorimetrie, atd. (523 350 Kč.). Spotřební materiál – plasty, drobný majetek (196 470 Kč). Celkem 1 153 348 Kč.

Doplňkové náklady: Čerpány podle plánu ve výši definované a plánované v souladu s Pravidly ITA VFU pro rok 2020.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

Příložen.

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

14.1.2021

Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

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

14.1.2021 Prof. MVDr. RNDr. Petr Hořín, CSc.

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

Datum, jméno a podpis

vedoucího celoškolského pracoviště:

14.1.2021 Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc., ředitel Ceitec VFU

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

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

Datum, jméno, podpis

14.1.2021 Prof. MVDr. Jiří Smola, CSc., ředitel Ceitec VFU

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVL/Celer/ITA 2020

1) **2. Název projektu:** Molekulární diagnostika původců vybraných infekcí hospodářských a domácích zvířat

3. Řešitel projektu:

2) Titul, jméno a příjmení: **prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D.**
Fakulta/celoškolské pracoviště: **Ústav infekčních chorob a mikrobiologie**
E-mail: celerv@vfu.cz
Telefon: +420 541562281

4. Řešitelský kolektiv:

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

Prof. MVDr. Vladimír Celer, Ph.D., úvazek na FVL 1,0, 12 publikací za posledních 5 let, h index 10.

Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc., úvazek 1,0; 104 publikací celkem, h index 26, 32 publikací za posledních 5 let

Prof. MVDr. František Tremel, CSc., úvazek 0,6; 63 publikací, h index 14, 1 publikace za posledních 5 let.

Prof. MVDr. David Modrý, Ph.D., úvazek FVL 0,8, 220 publikací, 70 za posledních 5 let, H index 30

Doc. MVDr. Petr Lány, Ph.D., úvazek 1,0; 22 publikací, h index 7, 4 publikace za posledních 5 let.

MVDr. Martina Masaříková, Ph.D., úvazek 1,0; 14 publikací celkem, h index 8, 8 publikací za posledních 5 let

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

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

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

MVDr. Jana Juránková Ph.D., úvazek 0,95, 16 publikací celkem, h index 7, 9 publikací za posledních 5 let

MVDr. Barbora Fecková, úvazek na FVL 1,0, 1 publikace, h index 1, 1 publikace za posledních 5 let

MVDr. Tesa Keyra, Ph.D., úvazek 1,0; Q horečka SHV, BTV, - 1 publikací, h index 1, 0 publikací za posledních 5 let.

DSP studenti

MVDr. Dagmar Břinek Kolářová

Mgr. Zuzana Úlehlová

Mgr. David Najt

MVDr. Ondřej Daněk

Mgr. Paulina Lesiczka

MVDr. Aneta Papoušková

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

Projekt byl řešen výhradně na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Navrhovaný projekt zapadá do rámce výzkumu VFU Brno stanoveného prioritami soutěže na projekty podporované prostřednictvím ITA VFU Brno pro rok 2020, tj. problematika původců infekčních onemocnění a nálezů zvířat. Zároveň projekt zapadá rámcově do výzkumné činnosti řešitelského týmu složeného z pracovníků Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie a Ústavu patologické morfologie a parazitologie.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Dílčí cíle projektu byly vytyčeny následovně:

- Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli*
- Genetická diverzita parvovirových infekcí psů a koček
- Leptospirózy

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

V rámci dílčího cíle „Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli*“ byly shromážděny vzorky z 266 telat původem z 24 českých farem. Vzorky byly nejdříve kultivovány na MacConkey agar s přídatkem cefotaximu (2 mg/l). Následně byly získané kmeny (n=128) testovány na:

- Identifikace fenotypu rezistence
 - Citlivost ke 13 ATB diskovým difúzním testem (CLSI 2017)
 - Identifikace ESBL a AmpC fenotypu (double disc synergy test, rezistence k cefamycinům)
- Identifikace STEC
 - Test produkce shiga toxinů na půdách s pranými ovčími erytrocyty
- Identifikace genotypu rezistence
 - Plazmidově kódované geny rezistence k beta-laktamovým ATB (*bla*)
 - Plazmidově kódované geny rezistence k chinolonům (PMQR geny)

Následně proběhlo NG sekvenování těchto kmenů na platformě MiSeq (Illumina) a byla provedena analýza dat (databáze ResFinder, VirulenceFinder, PlasmidFinder, Enterobase, CARD)

V rámci dílčího cíle „Genetická diverzita parvovirových infekcí psů a koček“ bylo získáno a vyšetřeno 18 vzorků trusu psů a koček se suspektní parvovirovou infekcí. Z každého vzorku byla následně extrahována virová DNA a metodou PCR potvrzena přítomnost parvoviru masožravců. Virový genom byl poté amplifikován v podobě několika překrývajících se fragmentů, které byly osekvenovány. Získané sekvence pak byly softwarově analyzovány.

V rámci dílčího cíle „Leptospirózy“ byla vyšetřována krevní séra koní pocházející z klinických pacientů ošetřených na Klinice chorob koní FVL VFU Brno. Celkem bylo vyšetřeno 405 vzorků. K sérologickému vyšetření byla zvolena reakce mikroaglutinace – lýza (RMAL). Do základního schématu byly zařazeny následující sérovary a kmeny leptospir: 1. Grippotyphosa – P125; 2. Icterohaemorrhagiae – Fryšava; 3. Sejroe – M 84; 4. Canicola – C7; 5. Pomona – Šimon; 6. Bratislava – Jež Bratislava; 7. Sorex Jalna – Sorex Jalna; 8. Tarassovi – Mitis Johnson; 9. Autumnalis – Akiyami

A. Sestava zvolených sérovarů odpovídá přibližně výskytu a rozšíření sérovarů leptospir v Evropě. Sérologické vyšetření bylo prováděno v základním ředění 1:100 a séra reagující s některým sérovarem leptospir v základním ředění byla následně ředěna geometrickou řadou a vyšetřována až do konečného titru.

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

V rámci dílčího cíle „Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli*“

- Diskovým difúzním testem byla u všech 128 izolátů základního souboru prokázána rezistence od dvou ke 12 ze 13 testovaných ATB
- Multirezistence identifikována u 90 % *E. coli* (115/128)
 - Nejčastěji rezistence k 7 a 6 ATB současně
- Produkce ESBL a AmpC stanovena u 98 % *E. coli* (125/128)
 - Společná produkce ESBL i AmpC u 30 %
 - Produkce ESBL u 62 %
 - Produkce AmpC u 6 %
- Produkce shiga toxinů prokázána u 6 % *E. coli* (8/128)

V rámci dílčího cíle „Genetická diverzita parvovirových infekcí psů a koček“ byla sekvenování potvrzena identita psích a kočičích kmenů viru a provedena jejich fylogenetická analýza. Celkem bylo sekvenováno 18 vzorků parvoviru masožravců. Nejčastěji byla prokázána genetická varianta CPV2a.

V rámci dílčího cíle „Leptospirózy“ byly prokazovány reakce s leptospirami 9 kmenů použitých v aglutinační reakci. Nejčastější reakce byly prokazovány proti leptospirám sérovaru Grippotyphosa – 146x (29,82 %), dále pak proti leptospirám sérovaru Bratislava – 106x (21,63 %) a proti leptospirám sérologické skupiny Sejroe – 105x (21,43 %). Za zmínku stojí též reakce s leptospirami sérovaru L. Icterohaemorrhagiae a to v 43 případech (8,77 %). Tyto reakce lze považovat za samostatné infekce. Reakce s ostatními sérovary leptospir se vyskytovaly ojediněle a spíše, než jako samostatné infekce je můžeme považovat za koaglutinace s jinými sérovary leptospir, protože reakce byly zjišťovány při současně vyšších titrech výše uvedených kmenů leptospir.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Hlavním přínosem projektu bylo získání detailní informace o výskytu multirezistentních *E. coli* kmenů a to mimo jiné kmenů produkujících širokospektrální betalaktamázy a kmenů produkujících shiga toxin. Dále byl prokázán výskyt parvoviru masožravců, genetické varianty CPV2a a dále informace o výskytu leptospir v populaci koní. Je zajímavé, že v celém souboru nebylo ani v jednom případě klinického vyšetření vysloveno podezření na leptospirózu, i když následná séropozitivita byla poměrně vysoká (45,91 %). Výskyt protilátek proti leptospirám byl zjišťován napříč celým spektrem zjišťovaných diagnóz v různém procentuálním zastoupení a to od 0,00 % až do 70,58 %.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou/jsou připravovány k publikaci ve vědeckých časopisech s impakt faktorem. Výsledky budou také součástí disertační práce spoluřešitelů.

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

1. The prevalence of leptospira specific antibodies in horse with regards to clinical status of the animals (Veterinární medicína nebo Acta veterinaria) - rozpracováno
2. Genetic diversity of protoparvovirus of carnivores. Veterinary Record.

3. Papouskova, A., Cizek, A. Complex approach to a complex problem: the use of whole-genome sequencing in monitoring avian-pathogenic *Escherichia coli* – a review. Acta Veterinaria Brno 89, 2020, 89: 273-282 (2020)

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 417 944,00	1 417 944,00
Služby	120 752,00	122 515,98
Cestovné	70 000,00	3 988,00
Další provozní náklady	1 000 000,00	1 064 248,02
Doplňkové náklady	391 304,00	391 304,00
Celkem	3 000 000,00	3 000 000,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Osobní náklady:

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

Služby:

Služby plánované v částce 120 752,- Kč byly mírně překročeny a bylo celkem čerpáno 122 515, 98 Kč. Toto překročení bylo v rámci tolerance povolené pravidly grantové agentury. Položka služby byla čerpána především na hrazení nákladů na sekvenování.

Cestovné:

Částka určená na cestovné nebyla čerpána v důsledku cestovních restrikcí v roce 2020. Vyčerpána byla pouze částka 3 988,- Kč na domácí cestovné, zbývající částka byla převedena do položky „Další provozní náklady“.

Další provozní náklady:

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

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady ve výši 391 304,- Kč byly čerpány přesně podle návrhu projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

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

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

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

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:
prof. MVDr. František Tremel, CSc,

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu: Ing. Vladimír Kohoutek

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

Datum, jméno, podpis

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

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020

(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVL/Tichý/ITA2020

2. Název projektu: Morfologicko-fyziologické korelace ve vztahu k funkci a klinickým aspektům samičího pohlavního ústrojí savců

3. Řešitel projektu:

- 1)** Titul, jméno a příjmení: Prof. MVDr. František Tichý, CSc.
Fakulta/celoškolské pracoviště: Sekce morfologie a fyziologie
E-mail: tichyf@vfu.cz
Telefon: 541562200

4. Řešitelský kolektiv:

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

Řešitelem projektu byl sekční rada Sekce morfologie a fyziologie, prof. MVDr. František Tichý, CSc. (profesor, 100 %). Projekt byl koncipován tak, že integroval a zastřešoval několik směrů výzkumu v této sekci. Společným jmenovatelem dílčích cílů byla problematika morfologie a fyziologie pohlavního ústrojí samic.

Projektový kolektiv byl proto rozdělen na tři menší týmy, jejichž kooperaci zajišťoval řešitel projektu. V čele každý tým byl senior konzultant/expert a jednotlivé týmy začleňovaly také mladé vědecké pracovníky a studenty. Kooperace týmů byla realizována zejména na úrovni sdílení metod a přístrojového vybavení.

Tým projektové části A:

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

MVDr. Petr Čížek, PhD. (100%) – odborný asistent, pracovník skupiny se zkušenostmi v oblasti histologie pohlavního systému, byl zodpovědný za analýzu histologických výsledků (viz publikace WOS, nejaktuálnější k tématu: *Reprod Dom Anim.*, 2020, 00, 1-7)

MVDr. Martin Pyszko, PhD. (100%) - odborný asistent, pracovník skupiny zodpovědný za získání a makroskopickou analýzu resekátů pohlavních orgánů.

MVDr. Kristýna Glocová, Ph.D. (Ph.D , od 1.10.2020 100%) - začínající odborný asistent s bohatou metodickou zkušeností z DSP, participace na provádění metod a analýze výsledků

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

Tým projektové části B:

Prof. RNDr. Eva Matalová, Ph.D. (100 %) – konzultant/expert se zkušenostmi v oblasti in situ detekce receptorů, vč. receptorů pro pohlavní hormony (viz WOS publikace v nadprůměrně hodnocených časopisech, nejaktuálnější k tématu: *Annals of Anatomy* 2020, doi: 10.1016/j.aanat.2019.151427)

MVDr. Šárka Stehlíková, Ph.D. (100 %) – odborný asistent, po návratu z MD/RD postupně navazuje na předchozí výzkum týkající se receptorů pro LH a FSH, hlavní pracovník skupiny, který byl zodpovědný za získání a analýzu výsledků

MVDr. Ivana Veselá, Ph.D. (100 %) – odborný asistent, po návratu z MD/RD postupně navazuje na předchozí výzkum zahrnující imunolokalizace (WOS – Ivana Chlastáková, DSP pod vedením prof. Matalové), na kterých participovala také v rámci řešení projektu

MVDr. Pavla Hamouzová, Ph.D. (od 1. 3. 2020 100 %) – začínající odborný asistent s bohatou metodickou zkušeností z DSP, participace na provádění metod a analýze výsledků

MVDr. Alice Ramešová – student DSP, 3. ročník, spolupráce na in situ lokalizaci receptorů (ISH zkušenost z dosavadní výzkumné práce, školitel: prof. Matalová)

Tým projektové části C:

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

MVDr. Jana Doležalová, Ph.D. (100 %) – odborný asistent, po návratu z MD/RD navázala na svoji předchozí výzkumnou činnost (viz publikace WOS, nejaktuálnější k tématu: General and Comparative Endocrinology 2019; 282: 113210)

MVDr. Petra Bíliková, Ph.D. (100 %) - začínající odborný asistent (Ph.D. 12/2018), participace na provádění metod a analýze výsledků

MVDr. Sabina Štouračová – student DSP, 2. ročník, spolupráce na přípravě vzorků a analýzách

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

Do projektu byly zapojeny dva ústavy v rámci Sekce morfologie a fyziologie – Ústav anatomie, histologie a embryologie a Ústav fyziologie. Projekt vycházel z integrace metodických přístupů, koncepce do dvou tematicky synergických celků s možností paralelního řešení pro dosažení vyšší efektivity při relativně krátkém časovém období řešení.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

A) Tato projektová část byla zaměřena na studium buněčné populace endometria krávy a prasnice, zejména na průkaz exprese estrogenových a progesteronových receptorů a na imunohistochemickou analýzu stromální populace buněk endometria ve vztahu k navazujícímu výzkumu regeneračních, ev. onkologických procesů.

Regenerační schopnosti endometria vyžadují přítomnost progenitorových buněk. Do této buněčné populace jsou řazeny SSEA-1 pozitivní epiteliální buňky a CD146 a PDGFR- β pozitivní mesenchymální buňky. Jejich imunofenotypizace, lokalizace a původ byly rovněž tématem studia v rámci projektu ITA.

B) Tato část projektu byla zaměřena na detekci a lokalizaci receptorů pro LH, FSH, estrogen, progesteron a leptin v tkáni pohlavního systému (vaječníky, děloha, pochva) samic morčat. Pohlavní hormony, resp. jejich receptory ve vztahu k ovariálním cystám byly výzkumným tématem jednoho z předchozích IGA VFU projektů, který ITA návrh dále rozšířil.

C) Problematika pohlavních hormonů u zvířat zkoumaných pomocí neinvazivních metod je jedním z VV témat na Ústavu fyziologie a projekt navazuje na předchozí výzkum zaměřený na neinvazivní monitoring steroidních hormonů ve feces u gibbonů, šimpanzů a goril.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt byl koncipován jako tři tematicky propojené výzkumné části, které lze řešit samostatně/paralelně, a to s těmito cíli:

- A) Zhodnotit expresi estrogenových a progesteronových receptorů a provést imunohistochemickou analýzu stromální populace buněk endometria krávy a prasnice
- B) Výzkum buněk a molekul s potenciálním vztahem k výskytu ovariálních cyst u morčat
- C) Stanovení koncentrace metabolitů progesteronu a estrogenu u samic primátů a šelem žijících v lidské péči s ohledem na cílené modulace chovu

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

A) Exprese estrogenových a progesteronových receptorů a imunohistochemická analýza stromální populace buněk endometria krávy a prasnice

Resekáty hysterektomie s oboustrannou adnexektomií (5 kravských a 5 prasečích) byly získány v jatečném provozu. Buněčné populace ve tkáni endometria byly studovány za použití imunohistochemických barvicích metod, zjišťována byla exprese estrogenových a progesteronových receptorů, CD117, CD105, OCT-4, SOX-2, SSEA-1, CD146 a PDGFR- β . Pro histologickou analýzu byly použity vzorky tkáně z děložních rohů. Použitá fixativa: 10% formol, bouin, methacarn, antigenfix, greenfix. Materiál byl histologicky / histopatologicky vyhodnocen. Imunohistochemické barvení bylo provedeno na automatizovaném imunostaineru Benchmark (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA). Jako detekční systém byla použita souprava Ventana ultraView Universal DAB detection Kit firmy ROCHE. Ve světelném mikroskopu při zvětšení 400x byla zjišťována tkáňová distribuce a procento marker pozitivních buněk na ploše o minimální rozloze 1 mm² (5 HPF).

B) Výzkum buněčných a molekulárních faktorů ve vztahu k tvorbě ovariálních cyst u morčat

Vzorky (ovaria) byly získány ve spolupráci s veterinárními klinikami a dále zpracovány pro histologické a molekulární analýzy srovnávající cystické a kontrolní vzorky. Byly zhotoveny histologické řezy, kde byly po imunohistochemickém značení detekovány receptory pohlavních hormonů a po barvení acidifikovanou toluidinovou modří detekovány mastocyty. Jejich počet byl vyjádřen na milimetr čtvereční. Zastoupení Kurloffových buněk bylo hodnoceno v rámci diferenciálního rozpočtu leukocytů. Pro sekvenanční analýzy byla tkáň odebírána do RNA Lateru a po izolaci RNA postoupena servisu Lexogen (Complete Transcriptome Sequencing).

C) Stanovení koncentrace metabolitů progesteronu a estrogenu u samic primátů a šelem

Vzorky (féces) byly získány ve spolupráci se zoologickými zahradami. Po transportu na VFU byly vzorky dále zpracovány a připraveny pro stanovení koncentrace vyloučených metabolitů estrogenu a progesteronu pomocí komerčního kitu DetectX® Estradiol ELISA Kit a DetectX® Progesterone ELISA Kit. Výsledky byly vyjádřeny jako imunoreaktivní steroidní metabolity v ng/g suché féces a korelovány se sledováním nástupu a délky ovariálního cyklu, a to i s ohledem na synchronizaci říje mezi jednotlivými samicemi a rozdílnost mezi monogamními a polygamními druhy.

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

A) Imunohistochemická exprese hormonálních receptorů a vybraných markerů kmenových buněk ve tkáni endometria u krávy a prasnic.

Výsledky IHC barvení s hormonálními receptory (estrogenovými i progesteronovými) a markerem kmenových buněk SOX2 prokázali heterogenní topicky vázanou expresi. Ve žláznových buňkách bazální poloviny endometria bylo ve srovnání s lumenální polovinou endometria zjištěno

signifikantně nižší množství hormonálních receptorů a overexprese SOX2. Zjištěný imunofenotyp je typický pro epitelové kmenové/progenitorové buňky a poukazuje na přítomnost této buněčné populace v bazálních částech endometria podobně lidskému endometriu. Na přítomnost epitelových kmenových buněk v endometriu poukazuje také barvení s protilátkou SSEA1 (CD15). Ve stromálních buňkách byla zjištěna pozitivita SOX2, SSEA1 a CD117, která poukazuje na přítomnost endometriálních mesenchymálních kmenových buněk (eMSCs). Buňky „vedlejší“ populace (side population) byly prokázány v myopericytech cévní stěny barvením s protilátkou proti CD146. Exprese dalších markerů kmenových buněk (OCT3/4 a CD105) nebyla v endometriu pozorována. Při mezidruhovém srovnání byly největší rozdíly v expresi SOX2 ve žlázových epiteliích (vyšší u krav).

B) Výzkum buněčných a molekulárních faktorů ve vztahu k tvorbě ovariálních cyst u morčat

Na buněčné úrovni byl výzkum zaměřen na mastocyty, a to jejich výskyt v různých fázích ovariálního cyklu a ve vztahu k různým typům cyst. V počtu mastocytů ve folikulární a luteální fázi nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Vysoce významně nižší počet mastocytů byl stanoven u vzorků s cystami *rete ovarii* oproti normálním vaječnům (P=0.0008). Vysoce významně nižší počet mastocytů byl zjištěn také u vzorků s velkými cystami *rete ovarii* (>1cm) oproti normálním vaječnům (P=0.0004). Molekulární analýza na úrovni RNASeq poukázala zejména na významné zvýšení exprese genů pro Adra1B (Alpha-1-adrenergic receptor) a Sptnb2 (Spectrin Beta, Non-Erythrocytic 2). Zastoupení Kurloffových buněk, které se vyskytují zejména u samic v souvislosti s hladinou estrogenů, v diferenciálním rozpočtu leukocytů bylo signifikantně zvýšeno ve folikulární fázi oproti fázi luteální (P=0,0349). Přítomnost cyst *rete ovarii* na jejich procentuální zastoupení neměla signifikantní vliv.

C) Stanovení koncentrace metabolitů progesteronu a estrogeneru u samic primátů a šelem

V průběhu řešení projektu bylo získáno a hodnoceno 877 vzorků (Hylobatidae 200, Hyaenidae 211 a Musteloidae 466). U samic gibbonů byly koncentrace metabolitů progesteronu i estrogeneru o 45% vyšší než u samců. U samic se podařilo zachytit 6 ovariálních cyklů (délka 24±3 dny), z nichž minimálně u 4 byl průběh paralelní. Hodnoty metabolitů progesteronu a estrogeneru u hyen čabrakových se v tzv. základní linii/hodnotě jen minimálně odlišovali samice od samců. Pouze dominantní samice měla hodnoty progesteronu o 20 % vyšší. U pand červených bude vzorkování dokončeno v únoru 2021 a výsledky postupně přidávány ke komplexní analýze nasbíraných dat, která aktuálně probíhá.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Podpora vědy a výzkumu v rámci sekce. Tematická a personální kontinuita vědecko-výzkumné činnosti, podpora spolupráce jednotlivých ústavů. Získání původních vědeckých výsledků a jejich publikace v časopise s IF. Začlenění doktorandů a mladých vědeckých pracovníků do výzkumných týmů. Rozvoj metodického zázemí obou pracovišť a soft-skills zúčastněných pracovníků.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou zahrnuty do finálních projektových publikací v časopise s IF (minimálně jedna za každý ústav).

Metodické zázemí a výsledky budou využity také v navazující vědecko-výzkumné činnosti pracovišť.

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

Plán IF publikací:

Proponovány jsou zatím následující publikace:

- 1) Lenz et al.: Expression of the SOX2 stem cell marker and hormonal receptors in bovine and porcine endometrium indicates luminal differentiation of epithelial stem cells. *Reprod Domest Anim.*
- 2) Konečná et al.: Expression of selected stem cell markers in bovine and porcine endometrium - interspecies comparative immunohistochemical study. *Reprod Domest Anim.*

- 3) Výsledky budou použity rovněž v připravované monografii (Endometrioza - morfologické, klinické a patofyziologické aspekty; Lenz první autor)
- 4) Výsledky budou zpracovány také do 1 disertační (Konečná) a 1 habilitační (Lenz) práce
- 5) Doležalová J et al.: Synchronization of estrus cycle in monogamous primates.
Časopis: International Journal of Primatology (Q1, Zoology)

Řešitel se zavazuje zaslat kopie článku a potvrzení o přijetí/zveřejnění ITA VFU Brno do 31. 5. 2022, tedy do 18 měsíců od ukončení projektu.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 134 456,00	1 134 456,00
Služby	250 000,00	260 869,00
Cestovné	124 240,00	0,00
Další provozní náklady	1 100 000,00	1 213 371,00
Doplňkové náklady	391 304,00	391 304,00
Celkem	3 000 000,00	3 000 000,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Osobní náklady:

Výše osobních nákladů a stipendií včetně nákladů na sociální a zdravotní pojištění – čerpání dle přiděleného limitu (viz Tab. výše)

Služby:

Odběr vzorků (ovariální cisty), RNA sekvenování. Pro specializované zpracování vzorků, které byly selektovány na základě primárního IHC screeningu bylo využito služeb externího pracoviště, které disponuje systémem Benchmark (Ventana Medical System, Inc., Tucson, AZ, USA).

Cestovné:

Vzhledem k restrikcím covid-19 nebylo cestovné čerpáno a finanční prostředky byly využity k rozšíření cílů projektu, např. o molekulární analýzy (RNASeq).

Další provozní náklady:

Materiálové náklady odpovídaly projektovým cílům a metodickým krokům. Jednalo se zejména o histologické analýzy (specifická barvení, protilátky, vizualizační kity atd.), molekulární analýzy (příprava vzorků na sekvenování), stanovení metabolitů (Elisa kity), spotřební materiál jako skla, plastik, ochranné pomůcky.

Doplňkové náklady:

Režie ITA VFU

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

Výpis z IFIS je přílohou této zprávy

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

14.1.2021, František Tichý

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

14.1.2021, František Tichý

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

14.1.2021, František Tichý

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVL /ILLEK / ITA 2020

2. Název projektu:

Zdravotní poruchy v intenzivních chovech skotu a prasat a jejich vliv na kvalitu kolostra, produkci a reprodukci. Zlepšení parametrů motility spermií v inseminačních dávkách připravených z epididymálních spermií hřebce.

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc.,Dipl. ECBHM
Fakulta/celoškolské pracoviště: FVL
E-mail: illekj@vfu.cz
Telefon: +420 54156 2438

4. Řešitelský kolektiv:

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

Projekt A

Doc. MVDr. Svatopluk Čech, Ph.D., akademický pracovník KCHPP, úvazek 1,0
MVDr. Vojtěch Kos, DSP KCHPP,
MVDr. Beata Marková, DSP KCHPP,

Projekt B

Doc. MVDr. Josef Illek, DrSc., akademický pracovník KLVZ, úvazek 1,0
MVDr. Josef Prášek, Ph.D. akademický pracovník KCHPP, úvazek 0,5
MVDr. Ivana Šimková, akademický pracovník KCHPP, úvazek 1,0
MVDr. Romana Kadek, DSP, akademický pracovník KLVZ úvazek 0,5

Projekt C

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

Projekt D

Doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D., akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0

MVDr. Krisová Šárka, Ph.D., akademický pracovník KCHK, úvazek 1,0

MVDr. Miroslava Mráčková, DSP KCHK

MVDr. Nina Zisopoulou, DSP KCHK

MVDr. Katarina Tothová, DSP KCHK

MVDr. Petra Andrlová, DSP KCHK

5. V případě společných projektů pro více součástí VFU Brno popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: Sekce chorob velkých zvířat FVL VFU Brno

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Předmět řešení je specifíkem sekce velkých zvířat

Cíle projektu:

A) Metabolický profil dojených krav v poporodním období ve vztahu k výkonnosti krav v laktaci

B) Monitorování poruch metabolismu krav v tranzitním období a jejich vliv na kvalitu kolostra, výskyt produkčních chorob včetně mastitid u dojnic v rané fázi laktace. Ověřit možnosti snížení spotřeby antimikrobik při léčbě mastitid využitím kombinace klinického vyšetření, kultivace na farmě včetně semi kvantitativního vyhodnocení získaných kultur se zaměřením na koaguláza negativní stafylokoky (KNS), *Staphylococcus aureus* a environmentální streptokoky (*S. uberis*). Porovnat efektivitu selektivní léčby při parenterálním, intramamárním a kombinovaném podání antimikrobik.

C) Monitoring anemie selat v důsledku deficiencie železa u negativních selat z SPF chovu a jejich porovnání se selaty z konvenčního chovu; použití různých forem železa k dosažení optimálních hodnot a potlačení negativního efektu anemie

D) Zlepšení parametrů motility spermií v inseminačních dávkách připravených z epididymálních spermií hřebce

A) Popis a metodika řešení projektu

Sledování bylo provedeno na mléčné farmě se stavem 720 dojených krav plemene Holstein o průměrné dojivosti 10500 kg mléka v rámci standardního monitoringu stáda. U 97 krav byla stanovena koncentrace vápníku (Ca) a neesterifikovaných mastných kyselin (NEFA) do 24 hodin po porodu.

Následně byly hodnoceny tyto parametry:

Počet vyřazených krav do 100 dnů p.p.

Počet březích krav do 100 dnů p.p.

Počet krav léčených v rozdojové skupině (zadržené lůžko, indigesce, dislokace slezu)

Počet krav s léčenou klinickou endometritidou do 100 dnů p.p.

Počet krav s léčenou klinickou mastitidou do 100 dnů p.p.

Nádoj za 100 dnů p.p.

Průměrný počet somatických buněk v období 100 p.p.

Krávy byly podle zjištěných koncentrací Ca a NEFA rozděleny do šesti skupin:

1. Ca vyšší než 2,2 mmol/l (v normě, kontrola)
2. Ca nižší než 2,2 mmol/l (hypokalcémie, H)
3. NEFA nižší než 0,35 mmol/l (v normě, kontrola)
4. NEFA vyšší než 0,35 mmol/l (lipomobilizace, L)
5. Ca vyšší než 2,2 mmol/l a současně NEFA nižší než 0,35 mmol/l (oba ukazatele v normě, kontrola)
6. Ca nižší než 2,2 mmol/l a současně NEFA vyšší než 0,35 mmol/l (současně hypokalcémie a lipomobilizace, HL)

Dosažené výsledky projektu:

Ve sledovaném souboru vykazovalo 69,1% krav hypokalcémii, 76,3% krav lipomobilizaci a u 11,3% krav byly oba ukazatele v normě a 53 % krav vykazovalo současně hypokalcémii a lipomobilizaci. Počet vyrazených krav do 100 dnů laktace byl u krav s hypokalcémií signifikantně vyšší. Počet zabřezlých krav do 100 dnů p.p. byl u krav s hypokalcémií signifikantně nižší. U krav s hypokalcémií byl vyšší výskyt mastitid a zvýšený počet somatických buněk v mléce.

B) Popis a metodika řešení projektu

V průběhu tranzitního období byl v chovu krav plemene Holstein sledován metabolický profil u krav a to 1 až 2 týdny před porodem, v den porodu, 3. den p.p a 40. až 50 den p.p. Byl posuzován zdravotní stav krav, BCS, průběh porodu, a puerperia. Rovněž byla posouzena životnost narozených telat a jejich zdravotní stav. V období 2 až 5 dnů stáří telat byla posouzena kolostrální imunita na základě stanovení koncentrace imunoglobulinů v krevním séru. U dojnic byl sledován výskyt poruch metabolismu a produkce mléka. Dále bylo sledování zaměřeno na diagnostiku mastitid. V dalších 2 vybraných chovech bylo diagnostikováno 53 a 50 klinických forem mastitid. Pro terapii byly zvoleny a zhodnoceny 2 různé metody.

Dosažené výsledky projektu:

Vývoj kondice krav (BCS) v tranzitním období se postupně snižoval z průměrné hodnoty 3,59 na hodnotu 3,23 v 40 až 50 dnu laktace. Porody krav byly fyziologické a probíhaly spontánně. Narozená telata byla životná a nevykazovala příznaky onemocnění. Příjem kolostra byl u všech telat bezproblémový. Zadržení lůžka se nevyskytlo. U 10 krav (20%) však byla diagnostikována metritida vyžadující terapii. Průměrná denní produkce mléka ve 40. až 50 dnu laktace činila 40,4 litrů. Výskyt poruch metabolismu byl v jednotlivých obdobích rozdílný. U krav před porodem byla diagnostikována hypokalcémie u 2 krav (4%), karence zinku u 6 krav, (12,5%) mědi u 37 krav (77%), karence vit A u 19(40%) a beta karotenu u 13 krav (27%). U 4 krav (4%) byla diagnostikována lipomobilizace. V den porodu byla diagnostikována subklinická hypokalcémie u 25 krav (52%) hypofosforémie u 21 krav (44%) a zvýšil se výskyt lipomobilizace. V období 3 až 5 dnů p.p. byla diagnostikována subklinická hypokalcémie u 2 krav, (4%) hypofosforemie u 13 krav, (27%) lipomobilizace u 10 (20%) a subklinická ketóza u 12 krav (24,5%). Karence vitamínu A a beta karotenu se vyskytla u 24 krav. (50%) Na konci sledovaného období byla diagnostikována karence zinku u 12 (24,5%) a mědi u 39 krav (81%) Subklinická ketóza byla diagnostikována u 3 krav (%) lipomobilizace přetrvávala u 8 krav (16,6%). U 2 krav (4%) se vyskytla klinická forma ketózy

současně s endometritidou a mastitidou. V průběhu sledovaného období 1 kráva uhynula a 1 kráva byla vyřazena z důvodu onemocnění paznehtů a kachexie.

Klinickým vyšetřením 53 nových případů klinických mastitid na farmě A bylo 29 případů (54,7 %) se stupněm závažnosti 1, 24 případů (45,3 %) se stupněm závažnosti 2 a žádný případ se systemickými příznaky stupně 3. Následným vyšetřením 7. den po léčbě s použitím ATB nebo bez použití ATB se 39 případů (73,6 %) klinicky vyléčilo, 12 případů (22,6 %) mělo ještě změněné mléko (st. závažnosti 1) a u 2 případů (3,8 %) přetrvávaly příznaky 2. stupně. Kultivačním vyšetřením stájovými testy byl zachycen nejčastěji výskyt environmentálních streptokoků (včetně *S. uberis*) a to 43,4 %, dále koaguláza negativní stafylokoky (KNS) v 30,2 %, *E. coli* v 7,5 %, smíšená infekce 2 patogeny v 9,5 %, bez nálezu původce v 7,5 % a jiný Gram– patogen v 1,9 % případů. Léčba antibiotiky s účinnou látkou penicilin byla navržena v 47,2 % případů. Ostatních 52,8 % případů nebylo léčeno ATB. Kontrolní kultivací byla potvrzena vysoká úspěšnost léčby kombinací intramamární a intramuskulární aplikace 96 %. Dále bylo vyšetřeno 173 případů subklinických mastitid se záchytem KNS v 43,9 %, *Streptococcus spp.* v 8,1 %, bez nálezu původce v 20,8 %, *C. bovis* a *E. coli* shodně v 2 % případů. V 23,2 % případů byl zaznamenán jiný patogen. Pro léčbu ATB v laktaci bylo doporučeno 6 případů (3,5 %) a zaprahnuto bylo ATB předčasně dalších 5 případů (2,9 %).

Na Farmě B bylo z 50 vyšetřených případů klinických mastitid zachyceno kultivačně 40 % případů způsobených *S. uberis* a dalšími environmentálními streptokoky, *E. coli* byla zachycena v 28 %, KNS v 8 % a smíšená infekce 2 patogeny v 24 % případů. Léčba ATB byla aplikována v 62 % případů pouze intramuskulární aplikací ATB a v 38 % proběhla léčba bez použití ATB. Úspěšnost léčby potvrzená kontrolní kultivací s negativním výsledkem byla 93,5 %, což přináší potvrzení potenciálu další úspory spotřeby ATB změnou způsobu podání.

C) Popis a metodika řešení projektu

Byly vytvořeny dvě skupiny zvířat (skupina A a B). Skupina A byla tvořena selaty ve stáří 4-6 týdnů po narození z různých vrhů, z SPF chovů, v různém časovém horizontu. Tito jedinci představovali pacienty, o které se klinika stará v rámci výuky studentů a kteří přicházejí v různém zdravotním stavu. Skupina B byla tvořena zdravými jedinci stejné kategorizace z komerčního chovu, které se nadále nechávají v produkčním cyklu.

Oběma skupinám pokusných zvířat bylo aplikováno železo v různých formách do krční svaloviny. (i.m.)

Všechny vzorky krve byly odebrány jednak na EDTA (hematologický profil), tak na sérum (stanovení železa) z vena cava cranialis. Místo odběru bylo vždy předtím řádně vydezinfikováno a po odběru intenzivně komprimováno a opět vydezinfikováno.

Vzorky Skupiny A byly odeslány do Klinické laboratoře pro velká zvířata a zároveň porovnány s výsledky terénního stanovení od Skupiny B.

Hodnocení anemie: hodnota hemoglobinu pro anemii byla stanovena pro méně jak 90g/l (I), pro subanemii hodnota 90-110g/l (II) a optimální hodnota více jak 110g/l (III).

Dosažené výsledky projektu:

Celkem bylo vyšetřeno 140 ks selat po odstavu, směsného charakteru, ze dvou různých farem původu určených k výuce na Klinice chorob prasat, s různými zdravotními komplikacemi (Skupina A). Dále bylo vyšetřeno 155 ks selat z komerčního chovu bez alterace zdravotního stavu (Skupina B). Vzorky

krve (EDTA) a krevní sérum pro stanovení železa byly bezprostředně vyšetřeny v Klinické laboratoři pro velká zvířata. Ve skupině A vykazovalo deficit v červené krevní řadě-hodnota I 72% jedinců a to především v hodnotě hemoglobinu, ale i hematokritu a potažmo v dalších parametrech červené krevní řady, pro hodnotu II 24% a 4% pro hodnotu III. Ve skupině B vykazovalo deficit v červené krevní řadě-hodnota I 14% jedinců a to především v hodnotě hemoglobinu, pro hodnotu II 52% a 34% pro hodnotu III. Hodnoty železa v séru byly po aplikaci gleptoferronu (200mg/1ml) oproti dextraferanu (100mg/1ml) ve stejné dávce statisticky vyšší v obou skupinách nehledě na jejich zdravotní stav.

Nízké hodnoty hemoglobinu ve Skupině A s alterovaným zdravotním stavem odpovídají imunodeficienci způsobené nedostatečnou hladinou železa vlivem nesprávné aplikace či výběru nevhodného preparátu či nízké dávky.

D) Popis a metodika řešení projektu

Soubor pacientů je tvořen 9 hřebci ve věku 3 až 9 let, různých plemen (americký honácký kůň- quarter horse, fríský kůň, holštýnský teplokrevník, hafling, andaluský kůň, český teplokrevník a kříženec), kteří byli hospitalizováni na Klinice chorob koní VFU Brno za účelem kastrace. Všichni jedinci byli před provedením kastrace klinicky zdraví a měli obě varlata sestoupená v šourku. Kastrace byla provedena v celkové injekční anestezii.

Odběr spermií byl proveden pomocí retrográdního výplachu cauda epididymidis a ductus deferens ředidlem určeným pro mrazení hřebčích spermií (Gent Extender, Minitübe International) temperovaným na 38°C. Bezprostředně po výplachu bylo provedeno vyšetření získaných vzorků nejprve pod stereomikroskopem. Byla stanovena celková motilita spermií a koncentrace spermií (počítáním v Bürkerově komůrce). Poté byly vzorky naplněny do pejet o objemu 0,5ml. Po ekvilibraci (5°C, 150 minut) byly vzorky zmrazeny poloautomatickým mrazícím zařízením nejprve v parách dusíku a následně v tekutém dusíku, kde byly následně skladovány. Rozmrazení vzorků pro další vyšetření proběhlo ve vodní lázni o teplotě 38°C po dobu 30 sekund. Spermie od každého hřebce byly rozředěny ředidlem na cílovou koncentraci 30-50 x10⁶ spermií/ ml, promíchány a ponechány k inkubaci 10 minut při teplotě 38°C. Poté byl každý vzorek rozdělen na pět dílů, motilita jednoho dílu (kontrola) byla změřena a do ostatních bylo pipetou přidáno odpovídající množství zkoumané látky- pentoxifylinu (PTX) a kofeinu (KOF) tak, aby bylo vždy dosaženo dvou koncentrací a to u PTX 3.6mM, tj. 1mg/ml a 7.18 mM, tj. 2mg/ml a u KOF výsledná koncentrace 2mM, tj. 0.4mg/ml a výsledná koncentrace 5.5mM, tj. 1mg/ml. Po 30ti minutách byla změřena motilita u všech zkumavek a další měření pak proběhlo za 60; 120; 180 a 240 minut po naředění

Dosažené výsledky projektu:

Sledované parametry motility po rozmrazení byly vyhodnoceny pomocí Computer-Assisted Sperm Analysis (CASA) a to: celková motilita (CM), progresivní motilita (PM), curvilinear velocity (VCL) a straightness (STR). Výsledky byly statisticky zpracovány párovým Wilcoxonovým testem.

Obě koncentrace měly pozitivní účinek na celkovou a progresivní motilitu spermií pouze 30 a 60 minut po rozmrazení. Následně 120, 180 a 240 minut po rozmrazení došlo ke zlepšení pouze při nižší koncentraci kofeinu (KOF) v celkové motilitě spermií. Závěrem lze říci, že přidání PTX ke zmrazeným a rozmraženým koňským epididymálním spermatozoům významně zlepšuje celkovou a progresivní motilitu spermií po dobu až 4 hodin. Přidání KOF zlepšuje celkovou pohyblivost spermií, ale ne progresivní pohyblivost, protože bylo pozorováno mnoho druhů patologických pohybů. Na základě těchto výsledků může přidání PTX k inseminačním dávkám připraveným ze spermií hřebce nadvarlete zlepšit jejich kvalitu.

Výsledky studie jsou prezentovány v článku „Influence of pentoxifylline and caffeine on stallion epididymal sperm motility after thawing“, který je podaný v časopise s IF (Acta Veterinaria Brunensis) a v současné době prochází revizí.

Informace a data získaná jako součást uvedené studie budou dále zpracovávána v odborné práci studentky šestého ročníku Kitty Horváthové (Možnosti ovlivnění motility spermií v inseminační dávce hřebce po rozmrazení) a po obhájení této práce budou součástí další publikace v časopise s IF.

Přínos projektu: Výsledky získané řešením projektu jsou přínosem pro rozvoj oboru, budou využitelné v pedagogice i v terénní praxi veterinárních lékařů i chovatelů

Využití výsledků: získané výsledky budou využívány pro rozvoj vědy a odborný růst pracovníků klinik a laboratoře. Budou publikovány ve vědeckých časopisech a prezentovány na vědeckých konferencích i odborných seminářích. Budou využity i v pedagogickém procesu. Část výsledků je již v tisku („Influence of pentoxifylline and caffeine on stallion epididymal sperm motility after thawing“, který je podaný v časopise s IF (Acta Veterinaria Brno) a v současné době prochází revizí.)

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

1) „Influence of pentoxifylline and caffeine on stallion epididymal sperm motility after thawing“, kt (Acta Veterinaria Brunensis) v tisku.

Připravované publikace pro Acta Veterinaria Brno

2) Associations between subclinical hypocalcemia and postparturient diseases in dairy cows

3) Monitoring metabolic health of dairy cattle in the transition period.

4) Iron deficiency anemia in piglets.

Další výsledky budou publikovány ve sbornících z vědeckých konferencí v ČR i v zahraničí.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 312 298,00	1 312 298,00
Služby	0	0
Cestovné	20 098,00	20 098,00
Další provozní náklady	1 276 300,00	1 276 300,00
Doplňkové náklady	391 304,00	391 304,00
Celkem	3 000 000,00	3 000 000,00

Zdůvodnění nákladů:

Osobní náklady: tvořily stipendia a odměny řešitelů projektu

Služby: nebyly čerpány

Cestovné: tvořily náklady na pohonné hmoty a diety související s návštěvou farem

Další provozní náklady: tvořily výdaje za nákup chemikálií, diagnostických setů a drobného spotřebního materiálu

Doplňkové náklady: byly stanoveny dle platných předpisů

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

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

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

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

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

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

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

prof. MVDr. Jiří Smola, CSc.

Doc. MVDr. Markéta Sedlinská, Ph.D.

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

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu: Ing. Vladimír Kohoutek, tajemník FVL

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Michal Crha, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVL/Crha/ITA2020

2. Název projektu: Onemocnění zvířat zájmových chovů z pohledu moderních metod diagnostiky a terapie

3. Řešitel projektu:

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

Fakulta/celoškolské pracoviště: Fakulta veterinárního lékařství VFU Brno

E-mail: crham@vfu.cz

Telefon: +420 725 170 287

4. Řešitelský kolektiv:

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

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

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

Doc. MVDr. Miša Škorič, Ph.D. (ÚPMP, FVL, 1,0) - spoluřešitel, analýza a zpracování výsledku, podíl na publikačních výsledcích.

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

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

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

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

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

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

MVDr. Lucia Frgelecová, Ph.D. (ÚPMP, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

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

MVDr. Jan Chloupek, Ph.D. (ÚFF, FVL, 1,0) – spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, příprava publikačních výstupů.

MVDr. Kristína Řeháková, Ph.D. (KLPM, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, zajištění laboratorně diagnostické práce, příprava publikačních výstupů.

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

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

MVDr. Zora Knotková, CSc. (KCHPPDS, FVL, 1,0) - spoluřešitel, shromažďování a zpracování výsledků, laboratorně-diagnostická práce, analýza výsledků.

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

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

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

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

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

Není společným projektem více součástí VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Předmět řešení projektu je v souladu s výzvou Interní tvůrčí agentury (ITA) VFU Brno a strategií výzkumu na Fakultě veterinárního lékařství VFU Brno, kdy mezi současné a perspektivní směry výzkumu, kromě jiného, patří i využití pokročilých diagnostických a terapeutických protokolů včetně nejmodernějších chirurgických metod spojených s miniinvazivním ošetřením pacienta, stanovování vhodných protokolů anestezie a analgezie, zavádění metodologických postupů léčby vedoucí k personalizované medicíně, využití biomaterialů a nanotechnologií v léčbě onemocnění zvířat zájmových chovů a další.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt cílí na rozvoj a ověření moderních diagnostických a terapeutických postupů u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů s důrazem na nejnovější trendy a směry v oblasti veterinární medicíny, dále na problematiku prevence vybraných onemocnění a welfare ošetřovaných zvířat.

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

Projekt byl zaměřen na rozvoj a ověření moderních diagnostických a terapeutických postupů u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů s důrazem na aktuální trendy v oblasti veterinární medicíny z pohledu diagnostiky, terapie, prevence vybraných onemocnění a welfare ošetřovaných zvířat. Do řešení projektu byli zapojeni pracovníci dvou klinických pracovišť FVL včetně studentů DSP, tj. Kliniky chorob psů a koček a Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců. Řešení projektu probíhalo ve spolupráci s pracovníky Klinické laboratoře pro malá zvířata, Histopatologické laboratoře Ústavu patologické morfologie a parazitologie a pracovníky Ústavu farmakologie a farmacie. Zhodnoceny byly výsledky využití pokročilých diagnostických a terapeutických přístupů včetně nejmodernějších chirurgických metod spojených s miniinvazivním ošetřením pacienta. Stanoveny a posouzeny byly nové protokoly anestezie a analgezie včetně metodologických postupů vedoucí k personalizované medicíně. Dále byla hodnocena kvalita poskytované veterinární péče ve vztahu k minimalizaci stresu a zajištění welfare ošetřovaných zvířat.

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

Dosažené výsledky projektu budou prezentovány ve formě vědeckých i odborných publikací (viz přehled níže), a to nejpozději do 18 měsíců od ukončení řešení projektu. S ohledem na platná protiepidemická opatření v souvislosti se zamezením šíření onemocnění Covid-19 bohužel nebylo možné prezentovat dílčí výsledky projektu na původně plánovaných zahraničních cestách.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Přínosem projektu bylo zhodnocení nových diagnostických, anesteziologických a léčebných postupů, které mohou být následně využívány v klinické praxi ke zkvalitnění veterinární léčebné a preventivní činnosti u vybraných onemocnění zvířat zájmových chovů.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Získané výsledky budou prezentovány širší odborné i chovatelské veřejnosti formou publikace v recenzovaném vědeckém anebo odborném časopise a budou uplatněny také v databázi RIV. Nové poznatky budou taktéž prezentovány studentům při výuce, tak jako budou jednotlivé dílčí výsledky a praktická doporučení využívány pro zkvalitnění veterinární léčebné, diagnostické a preventivní činnosti.

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

Publikace s IF:

1. Proks P, Johansen TM, Nyvltova I, Komenda D a kol. VERTEBRAL FORMULAE AND CONGENITAL VERTEBRAL ANOMALIES IN GUINA PIGS: A RETROSPECTIVE RADIOGRAPHIC STUDY. *Animals* 2020, submitted, Q1, IF=1,65
2. Cigánková E, Vitásek R, Jelínková K. AN OVARIAN HYPERSTIMULATION SYNDROME IN A BITCH CAUSED BY RECOMBINANT HUMAN CHORIONIC GONADOTROPIN TREATMENT OF LUTEAL INSUFFICIENCY. *Reproduction in Domestic Animals* 2020, submitted, Q2, IF=1,64
3. Crha M, Lorenzová L, Nečasova A a kol. LAPAROSCOPIC OVARIECTOMY IN DOGS: A COMPARISON OF THE ENSEAL™ AND THE HARMONIC ACE™ SYSTEM. *Acta Vet Brno*, Q3, IF=0,56 (v přípravě)
4. Knotek a kol. VYUŽITÍ METADONU A SUFENTANILU PRO BEZPEČNOU ANALGÉZI A ANESTEZII PLAZŮ. *Acta Vet Brno*, Q3, IF=0,56 (v přípravě)

Odborné publikace bez IF:

1. Crha M, Nečasová A, Filipejová Z, Nečas A. POUŽITÍ HARMONICKÉHO SKALPELU A BEZ UZLOVÉHO JEDNOSTRANNĚ OSTNATÉHO STEHU PŘI INTRAKORPORÁLNÍ LAPAROSKOPICKÉ GASTROPEXI U VELKÝCH PLEMEN PSŮ. *Veterinářství* 2020;70(11): 556-660.
2. Nečasová A, Lorenzová J, Staňková L, Procházka P, Nečas A. PERITONEOPERIKARDIÁLNÍ BRÁNIČNÍ KÝLA U PSA. *Veterinářství* 2020;70(11): 648-653.
- 3.
4. Bložoňová A, Paukner K, Raušerová L. POUŽITÍ GUAIFENEZINU PRO POTENCI MYORELAXACE V TERAPII OTRAVY METALDEHYDEM U PSŮ – POPIS PŘÍPADU. *Veterinářství* 2020;70(11):661-665.
5. Knotek Z, Puskásová A. STOMATOSKOPIE, ESOFAGOSKOPIE A GASTROSKOPIE U AGAM VOUSATÝCH. *Veterinární klinika* 2020, ročník 6.
6. Čermáková E, Křížová P, Zbořilová H., Knotek Z. ANALGEZIE A ANESTEZIE DROBNÝCH GEKONŮ. *Veterinární klinika* 2020, ročník 6.
7. Zbořilová H, Čermáková E, Knotek Z. DIAGNOSTICKÝ PŘÍSTUP K PLAZŮM S ONKOLOGICKÝM ONEMOCNĚNÍM. *Veterinární klinika* 2020, ročník 6
8. Křížová P, Čermáková E, Valašťanová M, Knotek Z. VIROVÁ ONEMOCNĚNÍ PLAZŮ CHOVANÝCH V ČESKÉ REPUBLICI. *Veterinární klinika* 2020, ročník 6.
9. Hundáková A. CHOROBY FRETIEK (MUSTELA PUTORIUS FURO) SÚVISIACE S IMUNITNÝM SYSTÉMOM. *Veterinární klinika* 2020, ročník 6.
10. Řeháková K., Škorová K., Černá L., Doubek J. LEUKOCYTÁRNÍ POMĚRY V PERIFERNÍ KRVI – NĚMÍ SVĚDCI U NÁDOROVÝCH PROCESŮ. *Veterinářství* 2020; 70:565-568.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 344 522,00	1 344 522,00

Služby	210 000,00	183 662,29
Cestovné	54 174,00	0,00
Další provozní náklady	1 000 000,00	1 080 511,71
Doplňkové náklady	391 304,00	391 304,00
Celkem	3 000 000,00	3 000 000,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Osobní náklady:

Celková výše osobních nákladů byla 1 344 522,00 Kč. Z této sumy tvořily mzdové prostředky (os. příplatky, příp. odměny) pro členy řešitelského týmu 1 296 522,00 Kč včetně zákonných odvodů a dále stipendia, která tvořila 48 000,00 Kč.

Služby:

Služby (max. 10% celkových nákladů projektu) z původní výše 210 000,00 byly čerpány pouze ve výši 183 662,29 Kč (zbytek byl v souladu se směrnicí ITA VFU Brno převeden do dalších provozních nákladů). Služby byly čerpány následovně: oprava a údržba přístrojů 67 538,60 Kč; pronájem tlakových lahví, servis, statistická analýza, editace a úprava textů pro publikační výstupy 116 123,69 Kč.

Cestovné:

Mobility za účelem aktivní prezentace výsledků projektu nebyly realizovány z důvodu trvajících omezení. Náklady na plánované cesty ve výši 54 174,00 Kč byly proto v souladu se směrnicí ITA VFU Brno převedeny a využity na krytí provozních nákladů projektu.

Další provozní náklady:

Provozní náklady ve výši 1 080 511,71 Kč tvořily: náklady na šicí, spotřební chirurgický materiál; náklady na zdravotní spotřební materiál; operační oblečení a ochranné pomůcky; náklady na laboratorní materiál (imunohistochemické barvení); drobný hmotný majetek; náklady na tonery a kancelářský spotřební materiál.

Doplňkové náklady:

Doplňkové náklady (režijní náklady - 15% z mezisoučtu přímých nákladů) v celkové výši 391 304,00 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVHE/Literák/ITA2020

2. Název projektu

Choroby volně žijících zvířat: aktuálně od úrovně genů patogenních mikroorganismů
k hostitelům a interakcím s člověkem

3. Řešitel projektu:

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat
FVHE

E-mail: literaki@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 630

4. Řešitelský kolektiv:

Doc. RNDr. Monika Dolejská, Ph.D. FVHE, 2150, AP

Mgr. Ivo Papoušek, Ph.D. FVHE, 2150, AP

Prof. MVDr. Pavel Široký, Ph.D., FVHE, 2150, AP

Doc. RNDr. Oldřich Sychra, Ph.D. FVHE, 2150, AP

Prof. MVDr. Petr Dvořák, CSc. FVHE, 2150, AP

Studenti DSP:

Mgr. Marek Dostál (2150)

Mgr. Simona Ovčiariková (2150)

Mgr. Tomáš Nohejl (2150)

Mgr. Jana Palkovičová (2150)

PharmDr. Petra Šišmová (2150)

Mgr. Kristína Nešporová (2150)

Mgr. Markéta Zelendová (2150)

MSc. Hassan Tarabai (2150)

Mgr. Nikola Kašpárková (2150)

MVDr. Pavlína Pittermannová (2150)

MVDr. Lenka Rozsypalová (2150)

Mgr. Lucie Ošlejšková (2150)

MVDr. Kristína Zechmeisterová (2150)

Mgr. Alena Balážová (2150)

5. V případě společných projektů pro více součástí VFU Brno popsat zapojení těchto součástí do řešení projektu: jen FVHE, 2150

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Projekt byl zaměřen na studium aktuálně významných interakcí mezi infekčními i neinfekčními patogeny a cílovými makroorganismy, kterými byla volně žijícími zvířata.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Rozšířit znalosti o patogenech virových, bakteriálních (včetně bakterií rezistentních k účinku antibiotik) mykotických a parazitárních vyskytujících se u plazů, ptáků (zejména racků a dravých ptáků) a drobných zemních savců v Česku i v zahraničí. U prasat divokých kontaminovaných ^{137}Cs nalézt tkáň, která bude vhodnou alternativou ke svalovině při rutinním vyšetření na přítomnost radionuklidů ^{137}Cs .

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

Mláďata racků bělohavých z VD Nové Mlýny a mláďata luňáků červených a luňáků hnědých z různých lokalit v Česku a zahraničí byla bakteriologicky vyšetřována k izolaci *Escherichia coli* s rezistencí k cefalosporinům vyšší generace a fluorochinolonům. U izolátů byly stanoveny sekvenční typy, geny antibiotické rezistence, plazmidy a geny virulence a byla provedena jejich fylogenetická analýza. Byla studována migrace racků a luňáků významných v přenosu rezistentních izolátů.

Drobní zemní savci z okolí skládky komunálního odpadu v Žabčicích byli vyšetřováni k průkazu *E. coli*, *Borrelia burgdorferi* s.l., *Coxiella burnetii*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia* sp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia* sp., leptospir, hantavirů a *Toxoplasma gondii* a *Encephalitozoon* spp. Byla testována vhodnost odběrů vzorků krve pijavkou lékařskou k sérologickým vyšetřením

Byla provedena morfologická analýza dipter parazitujících na ptácích v Jihoafrické republice a dalších ektoparazitů volně žijících ptáků České republiky a Slovenska.

Z hadů *Zamenis longissimus*, a ještěřů *Lacerta strigata*, *Darevskia chlorogaster* a *Pseudopus apodus* z Iránu byly získány krevní nátěry pro mikroskopii a vzorky krve pro molekulárně genetické analýzy krevních parazitů. Na podkladě morfologických znaků a analýzou DNA byla identifikována krevní protista rodů *Hepatozoon* a *Schellackia*. Kombinací pěti párů primerů bylo získáno pět úseků DNA pokrývajících prakticky celý gen pro 18S rRNA (cca 1800 bp). Takto získané sekvence byly podrobeny fylogenetické analýze. Získané sekvence byly propojeny s morfologickými daty popisovaných parazitů.

Ve tkáních prasat divokých z Šumavy byla stanovována hmotnostní aktivita ^{137}Cs a ^{40}K pomocí dvou gama spektrometrických tras.

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

Přítomnost *E. coli* s rezistencí k cefalosporinům byla prokázána ve střevním traktu u 85% vyšetřených racků. U 20 izolátů byla prokázána produkce širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) a u 41 byla zjištěna AmpC beta-laktamáza CMY-2. K ciprofloxacinu bylo rezistentních 58 izolátů a u 17

z těchto izolátů byla prokázán gen pro plazmidy kódovanou rezistencí k chinolonům (PMQR) zahrnující varianty *qnS1*, *qnrB19* a *qnrD*. V souboru 158 vzorků kloakálních výtěrů z mláďat luňáků byly izoláty *E. coli* s rezistencí k cefalosporinům prokázány u 11 % jedinců. Byla prokázána produkce ESBL následujících typů: CTX-M-1, CTX-M-15, CTX-M-32, CTX-M-65, CTX-M-14 a CTX-M-27. Bylo získáno 38 izolátů *E. coli* s geny PMQR *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*. U části vyšetřených racků i luňáků byly charakterizovány jejich migrační strategie.

V okolí skládky Žabčice bylo odchyceno celkem 124 drobných savců 4 druhů (dominantně *Microtus arvalis* a *Apodemus* spp). *T. gondii* byla detekována u 1,6 % savců. Bylo izolováno 120 kmenů *E. coli* rezistentních k antibiotikům (ciprofloxacinu, cefotaximu). *Encephalitozoon* spp. byl zjištěn u 11% hlodavců (n = 300) odchycených v minulých letech v různých lokalitách ČR. Konkrétně se jednalo o *E. cuniculi* genotyp II a *E. hellem* genotyp 1A. Pijavky byly vhodným modelem k odběru krve.

Byly vyšetřeny sběry ektoparazitů z 2094 ptáků 265 druhů v Jihoafrické republice. Bylo zpracováno 153 ptakotrudek nalezených u 137 ptáků 78 druhů. Determinováno bylo 16 druhů ptakotrudek a odhaleno 93 parazito-hostitelských vazeb, z nichž 84 bylo zaznamenáno poprvé.

Morfologicky byla identifikována krevní protista *Hepatozoon colubri* a *Hepatozoon ophisauri* v jejich typových hostitelích, byly získány sekvence jejich 18S rDNA, které byly použity v následné fylogenetické analýze.

U patnácti vzorků z prasat divokých byla aktivita ^{137}Cs ve svalovině $46,68 \text{ Bq.kg}^{-1}$ a ve stěně žaludku $23,69 \text{ Bq.kg}^{-1}$. Korelační koeficient obou těchto parametrů byl 0,988. Na stanovení aktivity ^{137}Cs u divokých prasat postačí odebrat vzorek stěny žaludku

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Byl významně zvýšen rozsah informací o významu racků a dravců v přenosu bakterií s rezistencí k cefalosporinům a ciprofloxacinu včetně informací o migrační strategii vyšetřovaných racků a luňáků. Byl zvýšen rozsah informací o výskytu *T. gondii* a kmenů rezistentních k ciprofloxacinu a cefotaxinu u drobných zemních savců v okolí skládky komunálních odpadů. Byl zvýšen rozsah znalostí o výskytu parazitických dipter u ptáků Jihoafrické republiky a krevních protist plazů Iránu. Byl zvýšen rozsah znalostí o distribuci radionuklidů ^{137}Cs ve tkáních prasat divokých.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Část výsledků byla publikována a bude snaha další výsledky projektu publikovat v prestižních vědeckých časopisech v biomedicínských oborech. Prioritní výsledky budou zahrnuty do aktualizací výukových sylabů předmětů vyučovaných na VFU Brno. Výsledky, na jejichž získání se podíleli studenti DSP, budou využity v rámci jejich bakalářských, diplomových a disertačních prací. Výsledky budou využity i k popularizaci vědeckého výzkumu realizovaného na VFU Brno.

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

Publikované výsledky (řešitel a spoluřešitelé vyznačení tučně):

OVČIARIKOVÁ, S., ŠKRÁBAL, J., MATUŠÍK, H., MAKOŇ, K., MRÁZ, J., ARKUMAREV, V., DOBREV, V., RAAB, R., LITERÁK, I. Natal dispersal in Black Kites *Milvus migrans migrans* in Europe. *Journal of Ornithology*, 2020, vol. 161, no. 4, p. 935-951. Výhradní dedikace FVHE/Literák/ITA2020

PANTER, C.T., XIROUCHAKIS, S., DANKO, Š., MATUŠÍK, H., PODZEMNÝ, P.,
OVČIARIKOVÁ, S., LITERÁK, I. Kites (*Milvus* spp.) wintering on Crete. *The European Zoological Journal*, 2020, vol. 87, no. 1, p. 591-596. Výhradní dedikace **FVHE/Literák/ITA2020**

SYCHRA, O., HALAJIAN, A., ENGELBRECHT, D., SYMES, C.T., OSCHADLEUS, H.D., DE SWARDT, D.H., PAPOUSEK, I. Louse-flies (Diptera: Hippoboscidae) of birds from South Africa: prevalence and diversity. *African Entomology*, 2020, vol. 28, no. 2, p. 249-261.
 Výhradní dedikace **FVHE/Literák/ITA2020**

Připravované publikace:

TARABAI, H., LITERAK, I., DOLEJSKÁ, M. Migratory raptors as reservoirs of novel plasmid-mediated resistance mechanisms to quinolones and beta-lactams. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

ZECHMEISTEROVÁ, K., JAVANBAKHT, H., KVIČEROVÁ, J., ŠIROKÝ, P. Against growing synonymy: Identification pitfalls of *Hepatozoon* and *Schellackia* demonstrated on North Iranian reptiles. *European Journal of Protistology*.

KVAPIL, P., BÁRTOVÁ, E., HAREJ, M., KASTELIC, M., **KAŠPÁRKOVÁ, N., BUDÍKOVÁ, M., RAČNIK, J.** Haematological and biochemical analysis of blood samples collected by medicinal leeches (*Hirudo medicinalis*) from selected zoo animals. *New Zealand Veterinary Journal*.

KVAPIL, P., RAČNIK, J., KASTELIC, M., **PITTERMANNOVA, P., SEDLAK, K., BARTOVA, E.** Detection of antibodies against tick born encephalitis virus and other flaviviruses in zoological collection in Slovenia. *Viruses*.

BENOVA, K., **DVORAK, P., MATE, D., SPALKOVA, M., DOLEZALOVA, J., KOVARIK, L.** Does the 1 Gy dose of gamma radiation impact the pork quality? *Veterinarni Medicina*.

8. Náklady na řešení projektu:

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	756 474	756 454
Služby	140 000	163 366
Cestovné	270 000	104 303
Další provozní náklady	1 060 655	1 203 006
Doplňkové náklady	334 069	334 069
Celkem	2 561 198	2 561 198

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Výše čerpání i struktura nákladů se mírně lišila ve vztahu k plánovaným a schváleným parametrům u položek cestovné, služby a ostatní provozní náklady. Vzhledem k mimořádným proticovidovým opatřením nebylo možné realizovat všechny plánované služební cesty tj. na cestovním bylo ušetřeno 159 697. Ušetřená částka byla z větší části účelně čerpána na další provozní náklady a z menší části na služby

Osobní náklady:

Osobní náklady zahrnovaly odměny řešitelům a stipendia studentů DSP, kteří se podíleli na řešení projektu.

Služby:

Zahrnovaly zejména sekvenace oligonukleotidů a sekvenace vlastních produktů amplifikace DNA. Nad rámec přidělených 140 000 Kč bylo čerpáno 23 366 Kč.

Cestovné:

Zahrnovalo zejména náklady na terénní sběry vzorků v Česku i zahraničí. Výše čerpání byla 104 303 Kč, což je o cca 165 697 Kč méně než bylo přiděleno.

Další provozní náklady:

Zahrnovaly především náklady na média a misky pro bakteriologickou kultivaci, antibiotika a antibiotické disky, zkumavky, spotřební materiál pro izolaci DNA a RNA, polymerázovou řetězovou reakci, elektroforézu, fragmentační analýzu, spotřební plastik (mikrozkumavky, pipetovací špičky), prostředky pro dezinfekci a jednorázové rukavice, laboratorní sklo, materiál na odběry vzorků, chemikálie na fixaci vzorků, náklady na telemetrická zařízení. Celkem čerpáno 1 203 006 Kč. Nad rámec přidělených 1 060 655 Kč bylo čerpáno cca 142 351 Kč.

Doplňkové náklady:

Představovaly režijní náklady ve výši 334 069,- Kč (15 % celkových nákladů).

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2019 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis
řešitele projektu:

Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2019 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.
člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků:**

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

Datum, jméno a podpis Prof. MVDr. Ivan Literák, CSc.
přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis Ing. Jiří Rotrekl
správce rozpočtu:

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

Datum, jméno, podpis Doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.
děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020
(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu:

FVHE/Pikula/ITA2020

2. Název projektu:

Stresory ovlivňující zdraví divokých zvířat, zvěře a ryb

3. Řešitel projektu:

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

Ústav ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel

Fakulta veterinární hygieny a ekologie

E-mail: pikulaj@vfu.cz

Telefon: +420 541 562 655

4. Řešitelský kolektiv:

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

Akademičtí pracovníci

Vliv nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků

Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D. FVHE, 2190, AP 1.0

Problematika patogenů asociovaných s ektoparazity netopýrů

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., dipl. ECZM FVHE, 2190, AP 1.0

doc. MVDr. Hana Bandouchová, Ph.D., dipl. ECZM FVHE, 2190, AP 1.0

RNDr. Ing. Veronika Seidlová (Kováčová), Ph.D. FVHE, 2190, AP 1.0

Ing. Jana Sedláčková, Ph.D. FVHE, 2190, AP 1.0

Bioakumulace a ekotoxicita polutantů ve vodním prostředí

prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc. FVHE, 2190, AP 1.0

doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D. FVHE, 2190, AP 1.0

Mgr. Barbora Havelková, Ph.D. FVHE, 2190, AP 0.5

MVDr. Ivana Papežiková, Ph.D. FVHE, 2190, AP 0.6+0.15(NAZV)

MVDr. Hana Minářová FVHE, 2190, AP 0.4+0.1 (NAZV)

Buněčné kultury derivované ze zvěře: *in vitro* model posouzení toxicity polutantů

Ing. František Vítula, Ph.D. FVHE, 2190, AP 1.0

Studenti DSP

Vliv nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků

MVDr. Michal Příbyl (2190)

Problematika patogenů asociovaných s ektoparazity netopýrů

MVDr. Tomáš Heger (2190)

Mgr. Monika Němcová (2190)

Buněčné kultury derivované ze zvěře: *in vitro* model posouzení toxicity polutantů

MVDr. Tomáš Heger (2190)

Mgr. Monika Němcová (2190)

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

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

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

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Projekt byl zaměřen na čtyři hlavní výzkumné cíle: 1) studium vlivu nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků, 2) analýza problematiky patogenů asociovaných s ektoparazitami netopýřů, 3) testování bioakumulace a ekotoxicity environmentálně relevantních polutantů ve vodním prostředí a 4) využití buněčných kultur derivovaných ze zvěře v rámci *in vitro* modelu pro posouzení toxicity polutantů.

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

1) Vliv nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků

Přítomnost patogenů *Batrachochytrium dendrobatidis* a *B. salamandrivorans*, případně ranavirů, byla testována pomocí qPCR při výzkumu hybridních populací kuněk *Bombina variegata* a *Bombina orientalis* v České republice, na komplexu vodních skokanů rodu *Pelophylax* v rámci spolupráce s Univerzitou Wrocław (Polsko) a u ocasatých obojživelníků z České republiky a Německa. U všech vzorkovaných jedinců byly zaznamenány informace o jejich zdravotním stavu, kondici, přítomnosti deformit, patologických kožních lézí nebo o případné mortalitě. Údaje o druhu, hybridním statusu, infekční zátěži, prevalenci patogenů v rámci skupiny/druhu na hodnocené lokalitě a výskytu a rozsahu lézí budou statisticky vyhodnoceny s pomocí multifaktoriální GLM analýzy.

2) Problematika patogenů asociovaných s ektoparazitami netopýřů

Pro tuto studii byla využita sbírka vzorků krve netopýřů a jejich ektoparazitů (15 různých druhů netopýřů, cca 1000 většinou párových vzorků, tj. krev hostitele+jeho ektoparazitů) původem z ČR, Polska, Arménie a některých regionů evropské a asijské části Ruska. Ektoparazité byli určeni do rodu a druhu. Byla izolována DNA ze vzorků krve a jednotlivých ektoparazitů (muchule čeledi *Nycteribiidae* a *Streblidae*), případně směsných vzorků drobných ektoparazitů z jednoho hostitele (rozočci čeledi *Spinturnicidae*). Následovala molekulární detekce pozitivních vzorků pomocí PCR (16S rRNA), fylogenetická analýza *Bartonella*-pozitivních vzorků (house-keeping geny *gltA* a *rpoB*, sekvenace PCR produktu), a eko-epidemiologická analýza dat (např. prevalence a diverzita bartonel specifická pro různé druhy hostitelů a ektoparazitů, geografické oblasti, samce a samice, adultní a subadultní netopýři, druhy netopýřů vytvářející velké klastry při hibernaci, případně velké letní kolonie).

3) Bioakumulace a ekotoxicita polutantů ve vodním prostředí

Design experimentů s půdními bezobratlými, perloočkami a embryolárnými stádii dávia pruhozaného byl koncipován tak, abychom mohli posoudit jednotlivé i kombinované expozice sledovaných organismů nanočásticím stříbra a paracetamolu. K testování bylo zvoleno minimálně 5 různých koncentrací, přičemž ta střední byla odvozena od environmentálně relevantních hodnot. Cesty expozice zahrnovaly testované látky v kultivačním médiu, vázané na krmivo (*Chlorella* sp.) či jako škrobové nanočástice s enkapsulovaným paracetamolem. Zjištěny byly hodnoty akutní a chronické toxicity sledovaných látek, což umožní odhad rizika pro organismy vodního ekosystému.

4) Buněčné kultury derivované ze zvěře: *in vitro* model posouzení toxicity polutantů

Pro účely tohoto projektu byly založeny primární buněčné kultury tyreocytů štítné žlázy spárkaté zvěře. Pro simulaci struktury štítné žlázy v *in vitro* experimentech byly využívány trojrozměrné kultivační systémy. Testováním reakce tyreocytů na expozici vybraným kongenerům polychlorovaných bifenylnů (např. PCB 138, který je zjišťován u zvěře) byla v experimentech ověřována viabilita buněk, měřena cytotoxicita zkoumaného polutantu, detekována produkce reaktivních forem kyslíku, sledováno vychytávání jódu buňkami a měřena produkce tyroxinu.

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

1) Vliv nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků

V rámci studia vlivu patogenů v hybridní zóně kuňky obecné a kuňky žlutobřiché byl analyzován vliv evoluční adaptace na život v různých biotopech (rybníčky bohaté na predátory a efemerní vodní biotopy) na vnímavost k predaci larvami vážek. Experimentálně bylo zjištěno, že pulci kuňky žlutobřiché stráví relativně více času plaváním ve vodním sloupci. Jejich chování tak indukuje více útoků vizuálně se řídícími predátory.

2) Problematika patogenů asociovaných s ektoparazity netopýrů

Vyšetřili jsme 890 vzorků krve 19 druhů netopýrů z 32 přírodních i antropogenních lokalit. Celková prevalence výskytu *Bartonella* spp. ve vzorcích byla 37,5%. Liší se však v závislosti na některých parametrech, zejména mezi druhy netopýrů (*Myotis myotis* 22,1%; *Nyctalus noctula* 65,5% a jednotlivými zeměmi Arménie 37,5%; Bulharsko 59,9%; Česká republika 39,3%; Polsko 22,1%; Rusko 35,4%; Ukrajina 41,7%). Ze 131 vzorků ektoparazitů jich bylo 26 pozitivních na *Bartonella* spp.

3) Bioakumulace a ekotoxicita polutantů ve vodním prostředí

Byly provedeny testy toxicity na vodních organismech dle standardních metodik. Výsledky jsou například: Hodnota EC₅₀ (efektivní koncentrace) nanočástic paracetamolu pro perloočku *Daphnia magna* po 24, respektive 48 hodinách expozice byla 21.48 (CI 24.34 - 40.70) a 3.749 (3.283 - 4.282) mg/L. V exponovaných organismech byly měřeny další parametry, například parametry oxidačního stresu.

4) Buněčné kultury derivované ze zvíře: *in vitro* model posouzení toxicity polutantů

Výsledky naší studie ukazují, že PCB 138 negativně ovlivňuje funkci štítné žlázy na subletální úrovni nezávisle na fungování hypothalamo-hypofyzární osy, primárně skrze narušení příjmu jódu buňkou a/nebo syntézy a uvolňování thyroxinu T4. Zřejmé jsou druhové a časové rozdíly vlivu PCB na funkci tyrocytů.

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Analyzována byla unikátní data interakce hostitel-patogen a volně žijící živočich-antropogenní stresor. Výsledky jsou založeny na komplexním přístupu z pohledu různých specializovaných oborů.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Lze předpokládat značný mezinárodní přesah výsledků projektu a jejich uplatnění ve vědeckých časopisech. Kromě vědeckého přínosu má řešení projektu i praktické implikace pro ochranu zdraví volně žijících zvířat, ochranářskou a veterinární ekologii.

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

1) Vliv nových patogenů s ohledem na hybridizaci obojživelníků

SMOLINSKY R., BALAZ V, NURNBERGER B. Tadpoles of hybridising fire-bellied toads (*B. bombina* and *B. variegata*) differ in their susceptibility to predation. Plos One, 2020, 15: e0231804. IF=2,74, Q2, **dedikace FVHE/Pikula/ITA2020 + GAČR 16-26714S v důsledku meziinstitucionální spolupráce**

2) Problematika patogenů asociovaných s ektoparazity netopýrů

Ectoparasites of Paelearctic bats: vectors of diverse *Bartonella* genotypes (Transboundary and Emerging Diseases) **rukopis v přípravě**

3) Bioakumulace a ekotoxicita polutantů ve vodním prostředí

HLAVKOVA D, BEKLOVA M, KOPEL P, HAVELKOVA B. Effects of silver nanoparticles and ions exposure on the soil invertebrates *Folsomia candida* and *Enchytraeus crypticus*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2020, 105 (2): 244-249. IF=1,657, Q3, **exkluzivní dedikace FVHE/Pikula/ITA2020**

4) Buněčné kultury derivované ze zvíře: *in vitro* model posouzení toxicity polutantů

ABDELSALAM EEE, BANDOUCHOVA H, HEGER T, KANOVA M, KOBELKOVA K, NĚMCOVÁ M, PIAČEK V, SEDLACKOVA J, SEIDLOVA V, VITULA F, PIKULA J.

Polychlorinated biphenyl toxicity in the thyroid gland of wild ungulates: an *in vitro* model. Acta Veterinaria Brno, 2020, 89: 151-162. IF=0,566, Q3, **exkluzivní dedikace FVHE/Pikula/ITA2020**

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	590 130	590 130
Služby	85 000	179 321
Cestovné	160 000	41 907
Další provozní náklady	835 889	859 661
Doplňkové náklady	250 652	250 652
Celkem	1 921 671	1 921 671

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Osobní náklady:

Osobní náklady byly čerpány ve výši a dle rozpisu ve schváleném projektu. Jedinou změnou bylo rozdělení stipendia původně plánovaného pro Dr. Hegera studentům Dr. Příbylovi a Mgr. Němcové. Důvodem pro tuto změnu byl přechod Dr. Hegera do kombinované formy DSP studia a s tím související jeho malé zapojení v průběhu řešení projektu.

prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D.	odměna 50 000 Kč
prof. RNDr. Miroslava Beklová, CSc.	odměna 50 000 Kč
doc. MVDr. Hana Bandouchová, Ph.D.	odměna 35 000 Kč
doc. MVDr. Miroslava Palíková, Ph.D.	odměna 40 000 Kč
Mgr. Vojtech Baláž, Ph.D.	odměna 35 000 Kč
RNDr. Ing. Veronika Seidlová, Ph.D.	odměna 40 000 Kč
Ing. Jana Sedláčková, Ph.D.	odměna 25 000 Kč
Mgr. Barbora Havelková, Ph.D.	odměna 30 000 Kč
MVDr. Ivana Papežiková, Ph.D.	odměna 30 000 Kč
Ing. František Vitula, Ph.D.	odměna 25 000 Kč
MVDr. Hana Minářová	odměna 25 000 Kč
MVDr. Michal Příbyl	stipendium 37 500 Kč
MVDr. Tomáš Heger	stipendium 0 Kč
Mgr. Monika Němcová	stipendium 37 500 Kč

Služby:

Skutečné náklady na služby byly čerpány ve výši 179 tis Kč. (publikační náklady v časopisech Open access, jazykový proofreading a sekvenování PCR produktů, multilicence programu Endnote X9). Požadavek na maximální procentuální výši v této kategorii nákladů (max. 10% přímých nákladů) byl mírně překročen, tj. činí 10,7%. Navýšení oproti plánovanému bylo v důsledku nemožnosti čerpat cestovné v souvislosti s koronavirovou pandemií.

Cestovné:

Původně plánovanou výši cestovného (160 tis. Kč) nebylo možno dodržet s ohledem na omezení možností cestování v důsledku koronavirové pandemie a rušení konferencí. Čerpáno tedy bylo jen 41 tis Kč, což splňuje požadavek na maximální procentuální výši v této kategorii nákladů.

Další provozní náklady:

Další provozní náklady byly čerpány ve výši 859 tis. Kč, tedy 51,4% přímých nákladů. Navýšení oproti plánovanému bylo v důsledku nemožnosti čerpat cestovné v souvislosti s koronavirovou pandemií.

Doplňkové náklady:

Odvedeny doplňkové náklady ve výši 15%, tj. 250 652 Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020

- 1. Identifikační číslo projektu:** FVHE/Večerek/ITA2020
- 2. Název projektu:** Dopady narušené pohody u vybraných druhů zvířat na jejich zdraví
- 3. Řešitel projektu:**

Titul, jméno a příjmení: Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

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

E-mail: vecerekv@vfu.cz

Telefon: 541562770

4. Řešitelský kolektiv:

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

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

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA – hlavní řešitel

Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D. – spoluřešitelka

Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc. – spoluřešitelka

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

Doc. MVDr. Vladimíra Pištěková, Ph.D. – spoluřešitelka

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

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

Doc. RNDr. Iveta Bedáňová, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Martina Volfová, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Simona Kovaříková, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D. – spoluřešitel

MVDr. Petra Doleželová, Ph.D. – spoluřešitelka

MVDr. Jarmila Konvalinová, Ph.D. – spoluřešitelka

PharmDr. Zuzana Šířoká, Ph.D. – spoluřešitelka

Mgr. Lucie Plhalová, Ph.D. – spoluřešitelka

Mgr. Veronika Doubková, Ph.D. – spoluřešitelka

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

MVDr. Michal Kaluža – spoluřešitel

MVDr. Gabriela Lukešová – spoluřešitelka

MVDr. Zuzana Tšponová – spoluřešitelka

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

ne

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

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

Cíle projektu:

Cílem projektu bylo hodnocení úrovně ochrany a welfare hospodářských, zájmových a volně žijících zvířat v souvislosti s jejich zatížením stresory a toxiny s důrazem na

- posouzení úrovně welfare a zdraví králíků na základě hodnocení úrovně stresu v chovu a na základě výsledků veterinární prohlídky po porážce na jatkách
- screening incidence cystinurie u vybraných plemen psů z pohledu dopadu na welfare psů
- posouzení úrovně welfare a zdraví bažantů během jejich odchovu v zajetí
- hodnocení welfare a zdraví volně žijících zvířat na základě analýzy příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchranných stanicích
- hodnocení kontaminace povrchových vod z hlediska welfare ryb
- srovnání citlivosti embryí ryb a obojživelníků při posuzování negativních účinků farmak vyskytujících se ve vodním ekosystému

Popis a metodika řešení projektu:

Úroveň zdraví a welfare králíků byla posouzena na základě postmortálních nálezů detekovaných při veterinární prohlídce zvířat na jatkách v celé České republice během období let 2010 až 2019. Byly hodnoceny patologické nálezy v závislosti na jejich lokalizaci a charakteru poškození (s odlišením akutních, chronických, traumatických a parazitárních změn). Data o výsledcích veterinárních prohlídek na jatkách byla získána ve spolupráci se Státní veterinární správou.

Úroveň stresu u králíků v komerčním chovu byla zjišťována pomocí stanovení hladin metabolitů glukokortikoidů ve výkalech. Hodnocena byla stresová odpověď v souvislosti s běžnými úkony prováděnými v chovu (manipulace, přemístění). Za tím účelem byly odebrány vzorky výkalů před a po působení stresoru. Pro stanovení hladin metabolitů glukokortikoidů ve výkalech byly využity komerční ELISA kity.

Pro hodnocení incidence cystinurie byla vybrána 2 plemena psů (irský teriér a jezevčík), u kterých se na základě informací od chovatelské a veterinární veřejnosti předpokládá zvýšený výskyt cystinurie. Pro porovnání byla také vytvořena skupina psů sestávající ze zástupců různých plemen a kříženců. Ve spolupráci s chovatelskými kluby byli osloveni majitelé s žádostí o odběr vzorku moči spontánní mikcí. Ve všech vzorcích byla stanovena koncentrace cystinu a kreatininu, následně byl vypočítán poměr hodnot, které byly srovnány s údaji dostupnými v literatuře. Koncentrace cystinu v moči byla stanovována metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií. Příprava vzorku moči pro samotné stanovení byla využita extrakce na pevné fázi. Analýzy byly prováděny v laboratoři

Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství. Počty dosud vyšetřených vzorků jsou nižší, než bylo původně plánováno v projektu, neboť odběr a transport vzorků byl negativně ovlivněn pandemií Covid-19 a doprovodnými vládními nařízeními, které se týkaly zejména volného pohybu osob. Zatím nevyšetřené vzorky jsou uloženy u chovatelů a jejich transport (za specifických podmínek) bude uskutečněn po uvolnění situace. Řešení tohoto dílčího cíle tedy ještě probíhá a bude dokončeno v příštím roce. I přes omezený počet vzorků je ale z výsledků naší studie zřejmé, že v chovu irských teriérů v České republice je cystinurie významný problém.

Manipulační a transportní stres byl hodnocen v odchovně bažantů obecných v souvislosti s odchytom, nakládkou a transportem bažantů při jejich prodeji ve věku cca 16-17 týdnů. U skupiny náhodně vybraných bažantů (8 slepic a 8 kohoutů) byly odebrány vzorky trusu po dobu 2 dnů před transportem a 3 dnů po transportu. V trusu byla následně stanovena hladina metabolitů kortikosteronu metodou ELISA a byl sledován její vývoj. Pro hodnocení vlivu věku na míru strachu a stresu bažantů při jejich odchytu a manipulaci byl u náhodně vybraných bažantů ve věku od 6 do 16 týdnů prováděn ve dvoutýdenních intervalech test tonické imobility.

Dynamika výskytu parazitů v trusu byla sledována v průběhu celého období odchovu bažantů. Vzorky trusu byly sbírány 2x týdně na vybraných místech tak, aby vzorek trusu odpovídal ploše a struktuře odchovny/bažantnice. Trus byl vyšetřen pomocí flotační metody. Jednotlivé druhy parazitů byly určeny a jejich výskyt posouzen z hlediska místa výskytu, věku bažantů a ročního období.

Údaje o handicapovaných zvířatech v záchranných stanicích byly získány ve spolupráci se záchrannými stanicemi sdruženými v Národní síti záchranných stanic ČR. Byl hodnocen vývoj počtu zvířat přijatých do záchranných stanic pro volně žijící živočichy v ČR během období let 2010 – 2019 a byly posouzeny faktory ovlivňující příjem zvířat, jejich dobu pobytu a způsob ukončení pobytu v záchranné stanici. Analyzovány byly všechny kategorie zvířat (savci, ptáci, obojživelníci, plazi) přijímaných do záchranných stanic. Posuzován byl vliv druhu, věku, pohlaví, typu poranění, ročního období a dalších faktorů na příjem, dobu pobytu v záchranné stanici a úspěšnost poskytnuté péče v záchranných stanicích z pohledu následného znovuvypuštění zvířat do přírody, případně úhynu zvířat v záchranné stanici.

Hodnocení reziduí léčiv bylo provedeno na 65 lokalitách povodí řeky Labe ve spolupráci s podnikem Povodí Labe v Hradci Králové (bodový odběr vzorků). Vzorky byly analyzovány na rezidua 13 léčiv (8 zástupců sulfonamidů a 5 zástupců nesteroidních antiflogistik). Stanovení koncentrací reziduí léčiv bylo provedeno metodou kapalínové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií LC-MS/MS. Byl hodnocen vztah mezi zjištěnými hodnotami reziduí léčiv a průtoky vody na jednotlivých sledovaných lokalitách.

Hodnocení kontaminace kovy bylo provedeno pomocí analýzy svaloviny ryb. Hlavním kontaminantem vodního ekosystému je rtuť, proto byl hodnocen vývoj hodnot obsahu celkové rtuti v indikátorových rybách (cejn velký, jelec tloušť a další druhy). S ohledem na neočekávané události v průběhu roku 2020 byla provedena drobná úprava v metodice řešení tohoto dílčího úkolu. Protože vývoj nálezové situace onemocnění COVID-19 a opatření k jeho zdolávání znemožnily provedení odběrů vzorků ryb z řeky Labe ke zjištění aktuální kontaminace toku rtutí, rozhodli jsme se více zaměřit na problematiku kontaminace českých rybníků. Za účelem analýzy byly prostřednictvím Fakulty rybářství a ochrany vod ve Vodňanech (FROV) získány vzorky svaloviny ryb z produkčních rybářských podniků. Stanovení obsahu celkové rtuti ve svalovině bylo provedeno atomovou absorpční spektrometrií na jednoúčelovém analyzátoru AMA 254.

Za účelem porovnání citlivosti embryí byla raná vývojová stádia ryb a obojživelníků vystavena krátkodobému působení vybraných antidepresiv (fluoxetin a citalopram). K testům byla použita embrya dáňá pruhovaného (*Danio rerio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Oba

tyto druhy patří mezi často využívané modelové organismy v testech, ve kterých jsou zjišťovány negativní účinky cizorodých látek vyskytujících se ve vodním prostředí. Embrya dávia pruhoaného a drápatky vodní byla krátce po oplození vystavena po dobu 96 hodin působení různých koncentrací léčiv (fluoxetinu a citalopramu), přičemž jako nejnižší použité koncentrace léčiv byly zvoleny environmentální koncentrace detekované v povrchových vodách. Dále byly také testovány vyšší dávky (násobky environmentálně relevantních koncentrací) pro zhodnocení potenciálního vztahu dávky a účinku. V průběhu testů byla u embryí sledovány mortalita, rychlost líhnutí a výskyt morfologických změn. Testování bylo provedeno s využitím modifikovaných metod OECD 236 a ASTM E1439/98. Testy toxicity byly prováděny v laboratořích Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VFU Brno).

Dosažené výsledky projektu:

Výsledkem projektu v části zaměřené na welfare a zdraví králíků bylo posouzení stresové zátěže králíků v intenzivních chovech a zjištění úrovně welfare a zdraví králíků vyjádřené četností a typem nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce na jatkách.

Výsledkem projektu v části zaměřené na welfare zájmových zvířat bylo zjištění míry výskytu cystinurie u vybraných plemen psů a doporučení vhodných chovatelských opatření s cílem ozdravení populace z hlediska výskytu cystinurie vedoucí ke zlepšení welfare psů.

Výsledkem projektu v části zaměřené na welfare volně žijících zvířat bylo posouzení míry manipulačního a transportního stresu bažantů obecných v odchovně, zjištění druhového zastoupení a dynamiky výskytu parazitů u odchovávaných bažantů a zhodnocení rizik vedoucích k neschopnosti zvířat přežít ve volné přírodě a posouzení úspěšnosti péče poskytované zvířatům v záchranných stanicích na základě procenta zvířat schopných návratu zpět do přírody.

Porovnání citlivosti raných vývojových stádií dávia pruhoaného a drápatky vodní vůči akutnímu působení vybraných farmakologicky aktivních látek ze skupiny antidepresiv vyskytujících se ve vodním prostředí, analýza a zhodnocení obsahu celkové rtuti v rybách a reziduí léčiv v povrchové vodě povede ke zvýšení informovanosti laické, odborné a vědecké veřejnosti o dané problematice a bude prevencí další kontaminace a povede ke zlepšení prevence a v souvislosti s tím i welfare ryb a vodních organismů.

Přínos projektu:

Přínosem projektu je získání poznatků o úrovni stresového zatížení králíků v intenzivních chovech, úrovni jejich zdraví a welfare promítající se do četnosti nálezů na jatkách při veterinární prohlídce porážených zvířat ve smyslu využití poznatků pro směřování dalších chovatelských a veterinárních opatření pro zlepšování zdraví a pohody brojlerových králíků.

Přínosem projektu v části zaměřené na welfare zájmových zvířat je zjištění míry výskytu cystinurie u vybraných plemen psů umožňující navrhnout chovatelská opatření s cílem ozdravení populace z hlediska výskytu cystinurie vedoucí ke zlepšení welfare psů.

Přínosem projektu v části zaměřené na welfare volně žijících zvířat je zhodnocení míry manipulačního a transportního stresu bažantů obecných v odchovně, zjištění druhového zastoupení a dynamiky výskytu parazitů u odchovávaných bažantů a zhodnocení rizik vedoucích k neschopnosti zvířat přežít ve volné přírodě a posouzení počtu zvířat schopných návratu zpět do přírody.

Dalším přínosem je zhodnocení obsahu celkové rtuti v rybách a výskytu reziduí léčiv v povrchové vodě včetně rozšíření v současnosti omezených poznatků o vlivu farmakologicky významných látek ze skupiny antidepresiv na welfare vodních organismů.

Využití výsledků:

Výsledky byly dosud prezentovány na konferenci Ochrana zvířat a welfare (6 příspěvků) a Toxcon (1 příspěvek) a publikovány v odborném časopise Veterinářství (1 článek). Další byly již odeslány k publikaci nebo jsou připravovány k odeslání pro publikaci ve vědeckých časopisech s impakt faktorem. Výsledky jsou také součástí dizertační práce spoluřešitelk MVDr. Gabriely Lukešové a MVDr. Zuzany Tšponové.

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

Cíl 1: Posouzení úrovně welfare a zdraví králíků

1a Lenka Válková, Vladimír Večerek, Eva Voslářová, Veronika Zavřelová, Zbyněk Semerád: Zdravotní stav a pohoda králíků na základě nálezů zjišťovaných při porážce na jatkách. *Animals*

1b Zuzana Tšponová, Vladimíra Pištěková, Jana Blahová: Stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu jako metoda hodnocení welfare v chovu králíků. *Animal Science Journal*

Cíl 2: Screening incidence cystinurie u vybraných plemen psů z pohledu dopadu na welfare psů

2 Simona Kovaříková, Petr Maršálek, Jana Blahová, Kateřina Vrbová, Vladimír Večerek: Screening incidence cystinurie u vybraných plemen psů z pohledu dopadu na jejich welfare. *Journal of Small Animal Practice*

Cíl 3: Posouzení úrovně welfare a zdraví bažantů během jejich odchovu v zajetí

3a Martina Volfová, Zuzana Machovcová, Pavel Forejtek, Eva Voslářová, Iveta Bedáňová, Vladimír Večerek: Vliv transportního stresu na hladiny metabolitů kortikosteronu v trusu bažantů. *BMC Veterinary Research*

3b Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Iveta Bedáňová, Dora Satinská, Pavel Forejtek: Vliv věku, pohlaví a manipulace na strach u bažantů chovaných v odchovném zařízení. *Journal of Applied Animal Welfare Science*

3c Jarmila Konvalinová, Lucie Halešová, Pavel Forejtek, Martina Volfová, Iveta Bedáňová: Výskyt endoparazitů v chovu bažantů. *Veterinary Journal*

Cíl 4: Hodnocení welfare a zdraví volně žijících zvířat na základě analýzy příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchraných stanicích

4a Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Savci v záchraných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchraných stanicích v České republice. *PLOS ONE*

4b Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Ptáci v záchraných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchraných stanicích v České republice. *Biological Conservation*

4c Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Plazi v záchraných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchraných stanicích v České republice. *Journal of Applied Animal Welfare Science*

4d Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek: Obojživelníci v záchraných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchraných stanicích v České republice. *Anthrozoos*

Cíl 5: Hodnocení kontaminace povrchových vod z hlediska welfare ryb

5a Marie Skočovská, Martin Ferenčík, Martin Svoboda, Zdeňka Svobodová: Rezidua vybraných sulfonamidů, nesteroidních antiflogistik a analgetik-antipyretik v povrchových vodách v povodí řeky Labe (Česká republika). Veterinarni Medicina

5b Kristýna Maláčová, Pavla Sehonová, Tomáš Král, Přemysl Mikula, Danka Haruštiaková, Zdeňka Svobodová: Obsah celkové rtuti ve tkáních ryb z vybraných rybníků na území ČR. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

5c Kamila Novotná, Zuzana Široká, Pavel Jurajda, Danka Haruštiaková, Anna Spodniewska, Zdeňka Vymětalová, Martin Kubiček, Zdeňka Svobodová: Obsah rtuti v rybách z nádrží povodí Moravy (Česká republika). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology

Cíl 6: Srovnání citlivosti embryí ryb a obojživelníků při posuzování negativních účinků farmak vyskytujících se ve vodním ekosystému

6 Jana Blahová, Veronika Doubková, Pavla Sehonová, Denisa Medková, Lucie Plhalová, Zdeňka Svobodová: Srovnání citlivosti embryí ryb a obojživelníků při posuzování negativních účinků farmak vyskytujících se ve vodním ekosystému. Science of the Total Environment

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč) <i>schválená změna platná od 1. 10. 2020</i>	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 618 980	1 615 916,00
Služby	63 000	89 270,31
Cestovné	4 200	1 131,00
Další provozní náklady	922 516	902 378,69
Doplňkové náklady	391 304	391 304,00
Celkem	3 000 000	3 000 000,00

Zdůvodnění nákladů:

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

Náklady na řešení projektu byly čerpány v souladu s rozhodnutím o přidělení finančních prostředků a souhlasem se změnou v čerpání v projektu ze dne 27. 5. 2020 (č. j. 9122/20/79) a potvrzením požadavku na změnu ze dne 25. 9. 2020 (obojí se týkalo převodu nákladů na cestovné, které nemohly být využity v důsledku protiepidemických opatření, do dalších provozních nákladů). Další pokles čerpání v položce Cestovné byl způsoben zaúčtováním nákladů na PHM čerpaných v rámci tuzemských cest realizovaných za účelem odběru vzorků do dalších provozních nákladů. K navýšení položky Služby došlo v důsledku zaúčtování nakoupeného spotřebního materiálu k chromatografu v hodnotě 26 270,31 Kč účetně jako údržba a služba. Nedočerpání položky Osobní náklady bylo způsobeno uplatněním slevy na dani, zbylá částka byla převedena do položky Další provozní náklady.

Osobní náklady:

Položka „Osobní náklady celkem“ zahrnuje odměny a odvody akademických pracovníků (Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA, Prof. Ing. Eva Voslářová, Ph.D., Prof. MVDr. Zdeňka Svobodová, DrSc., Doc. Ing. Jana Blahová, Ph.D., Doc. MVDr. Vladimíra Pištěková, Ph.D., Doc. MVDr. Petr Chloupek, Ph.D., Doc. Mgr. Petr Maršálek, Ph.D., Doc. RNDr. Iveta Bedáňová, Ph.D., MVDr. Martina Volfová, Ph.D., MVDr. Simona Kovaříková, Ph.D., MVDr. Přemysl Mikula, Ph.D., MVDr. Petra Doleželová, Ph.D., MVDr. Jarmila Konvalinová, Ph.D., PharmDr. Zuzana Šírková, Ph.D., Mgr. Lucie Plhalová, Ph.D., Mgr. Veronika Doubková, Ph.D., Ing. Kamila Novotná Kružíková, Ph.D., MVDr. Michal Kaluža, MVDr. Gabriela Lukešová, MVDr. Zuzana Tšponová), kteří byli součástí řešitelského týmu a podíleli se na řešení tohoto projektu.

K nedočerpání původně plánované částky došlo v důsledku slevy na dani, částka 3 064 Kč byla převedena do dalších provozních nákladů.

Služby:

Položka „Služby“ zahrnuje náklady, které byly využity na překlad a jazykovou korekturu článků určených k publikaci ve vědeckém časopise s IF a publikační poplatky a na servis zařízení, která byla využívána k vlastním analýzám. K navýšení položky Služby došlo v důsledku zaúčtování nakoupeného spotřebního materiálu k chromatografu v hodnotě 26 270,31 Kč účetně jako údržba a služba. Celkově bylo tedy v položce Služby čerpáno 89 270,31 Kč.

Cestovné:

Položka „Cestovné“ zahrnuje náklady na cestovné k řešení dílčích částí projektu (výjezdy za účelem odběru vzorků) ve výši 1 131 Kč. Náklady plánované na účast na tuzemských a zahraničních konferencích a původní rozsah plánovaných výjezdů za účelem odběru vzorků nebylo možné využít v důsledku protiepidemických opatření a na základě souhlasu se změnou čerpání v projektu (ze dne 27. 5. 2020 a 25. 9. 2020) byly převedeny do položky další provozní náklady. Další pokles čerpání v položce Cestovné byl způsoben zaúčtováním nákladů na PHM čerpaných v rámci tuzemských cest realizovaných za účelem odběru vzorků do dalších provozních nákladů.

Další provozní náklady:

Položka „Další provozní náklady“ zahrnovala náklady, které byly využity pro nákup standardů a spotřebního materiálu (kolona, předkolony, vialky, stříkačky, filtry a další) pro chromatografické analýzy v rámci jednotlivých dílčích úkolů, spotřebního laboratorního materiálů nezbytného pro odběr a přípravu vzorků exkrementů, moči a dalších biologických matric v rámci jednotlivých dílčích aktivit (špičky, Eppendorf zkumavky, odběrové nádoby, SPE kolony, mikrotitrační destičky, laboratorní sklo a další), spotřebního materiálu využívaného pro základní vyšetření moči a trusu (močové proužky, komerční kit pro analýzu kreatininu, flotační roztok a další) a chemikálií a filtrů pro přípravu ISO a ultračisté vody. Další část finančních prostředků byla využita pro zakoupení organických rozpouštědel a dalších chemikálií pro přípravu a následnou analýzu biologických vzorků v rámci jednotlivých dílčích aktivit. Dále byl zakoupen suchý led a tekutý dusík pro transport vzorků, elektroda pro úpravu pH vody a roztoků, ELISA kity pro stanovení koncentrace glukokortikoidů a jejich metabolitů v biologických maticích, embrya testovaných vodních organismů pro realizaci embryonálních testů toxicity a dávkovací sada pro reader mikrotitračních destiček, který byl využíván v rámci vybraných analýz. Dále byly zakoupeny nezbytné kancelářské potřeby, které byly využity pro účely realizace předkládaného projektu.

Celkem byly v této položce čerpány náklady ve výši 902 378,69 Kč. Tato částka zahrnuje také prostředky, které byly na základě souhlasu se změnou čerpání v projektu (ze dne 27. 5. 2020 a 25. 9. 2020) převedeny z Cestovného, a prostředky z položky Osobní náklady ve výši 3 064 Kč, které byly ušetřeny v důsledku slevy na dani z vyplacených odměn. Do položky Další provozní náklady byly také zaúčtovány náklady na PHM ve výši 3 071,57 Kč čerpané v rámci tuzemských cest realizovaných za účelem odběru vzorků.

Doplňkové náklady:

Položka „Doplňkové náklady“ představuje režijní náklady (15 % z celkové sumy nákladů).

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

8. 1. 2021

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

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

8. 1. 2021

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky

nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

8. 1. 2021

Prof. MVDr. Vladimír Večerek, CSc., MBA

Datum, jméno a podpis
správce rozpočtu:

ing. Jiří Rotrekl

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko

Příloha:

Vypracované články k publikaci k naplnění jednotlivých cílů projektu

Zdravotní stav a pohoda králíků na základě nálezů zjišťovaných při porážce na jatkách

**Lenka Válková¹, Vladimír Večerek¹, Eva Voslářová¹, Veronika Zavřelová¹,
Zbyněk Semerád²**

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

Abstrakt

Cílem práce bylo zhodnocení charakteristických nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce u králíků porážených na jatkách v České republice v období let 2010-2019 dle jejich lokalizace a charakteru poškození a na jejich základě posoudit úroveň zdraví a welfare králíků v produkčních chovech. Ve sledovaném období let 2010-2019 bylo u 1 876 929 králíků porážených na jatkách v ČR zaznamenáno celkem 40 206 intravitálních patologických nálezů. Nejvíce se vyskytovaly intravitální nálezy na končetinách (0,84%), trupu (0,71%), ledvinách (0,17%) a játrech (0,05%) a také celkové změny (0,37%). U nálezů na končetinách a trupu dominovaly nálezy traumatického původu, které indikují nevhodné ustájení a zacházení s králíky v chovu a při přepravě. Nálezy na ledvinách i játrech byly nejčastěji chronického charakteru mající patrně souvislost s výživou intenzivně vykrmovaných králíků, kdy nedostatky ve výživě mají dopad na parenchymy s chronickými projevy na játrech a ledvinách. U celkových nálezů převládaly mnohočetné abscesy související pravděpodobně s infekcí poranění, ke kterému dochází v průběhu výkrmu, a vyhublost daná současnou technologií chovu vedoucí u některých jedinců k nedostatečnému příjmu potravy nebo rozvoji onemocnění.

Úvod

Veterinární prohlídka zvířat a jejich jatečných těl na jatkách je nejrozšířenějším a také nejdéle praktikovaným nástrojem veterinárního dozoru. Primárním účelem této prohlídky je identifikovat zvířata, jejichž maso a orgány nejsou vhodné pro lidskou spotřebu, a odstranit je tak z potravního řetězce. Veterinární prohlídka má však obrovský význam i z hlediska epizootologie a kontroly zdraví hospodářských zvířat. Dosud ne plně doceněným a dostatečně využívaným potenciálem veterinární prohlídky je možnost identifikovat a reflektovat aktuální problematiku welfare hospodářských zvířat (Stark et al., 2014, 2017). Skutečnost, že jimi musí projít všechna potravinová zvířata, dělá z jatek ideální místo pro sběr komplexních informací. Nabízí se tak jedinečná příležitost, jak zlepšit dohled nad zdravotními riziky z pohledu lidí i zvířat a jak efektivně monitorovat welfare hospodářských zvířat (Stark, 2017). Indikátory welfare, které lze vyčíst z tělesné kondice králíků, lze mnohem snáze a precizněji monitorovat při postmortální prohlídce jatečných těl než ještě zaživa ve farmovém chovu. Týká se to především různých zranění, podlitin, škrábanců, abscesů či dermatitid. Takové nálezy jsou zdrojem informací o podmínkách, které panovaly nejen v průběhu přepravy králíků na jatky (akutní poranění), ale i na farmě původu (chronické procesy) (Huneau-Salaun et al., 2015). Právě přítomnost čerstvých zranění vypovídá o úrovni welfare během přepravy, čekací doby na jatkách, omračování i samotné porážky Grilli et al. (2015). Zvýšená frekvence

a závažnost takových zranění je důkazem pochybení na straně přepravce či provozovatele jatek. Důkladná analýza charakteru a četnosti pato-anatomických nálezů tak může být podkladem k rozhodnutí, zda je třeba přistoupit k nápravným opatřením a v čem konkrétně budou spočívat.

Přestože protokoly z prohlídek (zejména těch postmortálních) poskytují velké množství informací, není tento potenciál zatím ve většině zemí systematicky využíván (Stark, 2017). Rovněž vědecká literatura je poměrně skoupá, pokud jde o sběr a analýzu dat týkajících se patologických nálezů u králíků porážených na jatkách. Jen několik studií se věnuje identifikaci a kvantifikaci pato-anatomických nálezů, které vedly k vyřazení jatečných těl králíků na jatkách (Rampin et al., 2008; Szkucik and Paszkiewicz, 2011; Ferreira et al., 2014; Drozd et al., 2019). Problémem bránícím validnímu srovnání jsou však rozdíly v počtech sledovaných zvířat či délce monitorovaného období. Výjimkou svým rozsahem je dlouhodobá polská studie, která uvádí, že v letech 2010-2018 bylo na polských jatkách ze všech prohlédnutých jatečných těl králíků 0,48 % prohlášeno za nevhodné k lidské spotřebě. Nejčastějším důvodem zamítnutí byla sepse a pyémie, vyhublost, onemocnění horních dýchacích cest a kokcidióza. Během sledovaného období se snížil výskyt kokcidiózy a jiných parazitárních onemocnění, naopak došlo k růstu případů sepse (Drozd et al., 2019).

Studie, které sledovaly zdraví králíků v chovech uvádějí, že u králíků se typicky vyskytují dva hlavní zdravotní problémy: respirační syndrom (převládá u dospělých jedinců) a trávící syndrom (častěji u mláďat). Onemocnění trávícího ústrojí jsou hlavní příčinou morbidity a mortality u brojlerových králíků. Původcem střevních onemocnění bývá například v chovech hojně rozšířená patogenní bakterie *Clostridium perfringens* (Romero et al., 2011). Mezi další patologické procesy, které trápí králíky v komerčních chovech, patří podkožní abscesy (Ferreira et al., 2014), gastrointestinální parazitózy (Szkucik et al., 2014), alopecie (Alhaidary et al., 2010), nefritida (původce *Toxoplasma gondii*, *Encephalitozoon cuniculi*) (Rampin et al., 2008) aj.

Cílem práce bylo zhodnocení charakteristických nálezů zjišťovaných při veterinární prohlídce u králíků porážených na jatkách v České republice v období let 2010-2019 dle jejich lokalizace a charakteru poškození a na jejich základě posoudit úroveň zdraví a welfare králíků v produkčních chovech.

Materiál a metodika

Zdravotní stav a pohoda králíků při porážce na jatkách byly sledovány u 1 876 929 králíků chovaných a porážených na jatkách v České republice v období let 2010 až 2019. Králíci pocházeli z přibližně 80 chovů, z nichž 1 chovatel je zcela dominantní. Jeho produkce přesahuje 50% celkové produkce králíků v ČR a pohybuje se okolo 130 000 králíků ročně. U dalších 19 chovatelů je produkce od 1000 do 10 000 králíků ročně, u dalších 21 chovatelů je roční produkce od 100 do 1000 králíků a přibližně 39 chovatelů jsou malochovatelé s produkcí do 100 králíků ročně. Naprostá většina králíků je tak chována ve velkochovech s klecovým systémem a krmena peletami. Na jatky jsou králíci v naprosté většině přepravováni speciálními vozy v přepravních kontejnerech.

Byla sledována celková úroveň zdravotního stavu králíků porážených na jatkách, a to na základě výpočtu poměru počtu intravitálních nálezů k počtu porážených králíků na jatkách.

K zjištění zdravotně nejvíce postižených orgánů a tkání u porážených králíků byl zjišťován poměr počtu nálezů na jednotlivých orgánech a tkáních (játra, žaludek, střeva, plíce, srdce, slezina, pohlavní orgány, CNS a nervová tkáň, kůže, hlava, tělo, končetiny, celkové změny, jiné nezařazené změny) k počtu porážených králíků na jatkách.

K zjištění charakteru změn byl sledován počet nálezů akutního charakteru, chronického charakteru, nálezy parazitární, nálezy traumatického původu, celkové a jiné. Mezi akutní nálezy byly zařazeny patologické změny, které souvisejí s krátkodobě působícími

zánětlivými procesy v organismu. Na jednotlivých orgánech se jednalo o nálezy zahrnující výrazné překrvení, přítomnost krvácenin, otok, zvětšení orgánů, přítomnost katarálního, fibrinózního haemorrhagického nebo hnisavého výpotku apod. Mezi chronické nálezy byly zařazeny patologické změny, které souvisejí s déletrvajícím zánětlivými procesy a funkčními či morfologickými změnami ve tkáních a orgánech. Na jednotlivých orgánech se jednalo především o nálezy zahrnující změny původní struktury parenchymu tkáně, při kterých dochází k prostupu vazivové tkáně, tvorbě vazivových jizev a také ke vzniku srůstů, dále také zmenšení orgánů a jejich tuhost, změna struktury povrchu sliznic a serózních povrchů ve smyslu jejich zhrubnutí, přítomnost pozánětlivých kaveren, přítomnost cyst nebo abscesů, kalcifikací apod. Traumatické nálezy poukazují na úroveň welfare porážených zvířat a vznikají bezprostředně před porážkou (akutní), nebo v dřívější době (chronické), z tohoto důvodu byly posuzovány samostatně a zahrnovaly otevřené rány v různých fázích hojení, haematomy v podkoží a svalovině, zhmožděnin, vykloubeniny, fraktury (otevřené a uzavřené zlomeniny), ve vnitřních orgánech (krváceniny a ruptury), které vznikají v důsledku nevhodné manipulace, přímým poškozením technologií, vlivem přepravy nebo soubojem zvířat. Mezi parazitární nálezy byly zařazeny změny, které poukazují na invazi, migraci a patologické procesy parazitů v organismu hostitele, zejména změny poukazující na přítomnost kokcií na játrech a střevech, přítomnost cysticerků a případně další. Mezi celkové změny byly zahrnuty nedostatečný vývin, vyhublost, ascites, vícečetné abscesy a tumory a další celkové změny. Mezi jiné nálezy byly zařazeny ostatní změny, které z pohledu charakteru nálezů nebylo možné začlenit do výše uvedených kategorií, např. nezánnětlivé změny a tumory na kůži, ikterus, patologická gravidita, pohlavní vývojové vady, a jiné celkové a nebo orgánové intravitální nálezy, které nebylo možno zahrnout do sledovaných skupin nálezů.

K posouzení charakteru nejvíce postižených orgánů a tkání byl u těchto orgánů a tkání (játra, ledviny, hlava, tělo, končetiny) zhodnocen také charakter těchto změn přímo na těchto orgánech a tkáních (akutní, chronický, parazitární, traumatický, jiný).

Z dosažených výsledků byla dovozena dlouhodobá úroveň zdravotního stavu a pohody porážených králíků na jatkách.

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat 6.5 for Excel. Pro statistické porovnání četností nálezů v rámci jednotlivých kategorií byl využit Chí kvadrát test (Zar, 1999) pro hodnocení statistické významnosti v kontingenční tabulce 2x2. Při četnostech překračujících 5, se použila Yatesová korekce, při četnostech nižších než 5 byl využit Fisherův přesný test (Zar, 1999).

Výsledky

V období let 2010 až 2019 bylo u 1 876 929 králíků porážených na jatkách v ČR zaznamenáno celkem 40 206 intravitálních patologických nálezů. Podíl počtu intravitálních nálezů k celkovému počtu porážených králíků na jatkách tedy byl 0,0214 (2,14%).

Počty intravitálních patologických nálezů dle jejich lokalizace u králíků porážených na jatkách jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Nejvíce se vyskytovaly intravitální nálezy na končetinách (0,84%), trupu (0,71%), ledvinách (0,17%) a játrech (0,05%) a také celkové změny (0,37%). Rozdíly ve výskytu intravitálních změn mezi uvedenými kategoriemi byly statisticky vysoce významné ($P < 0,01$).

Rozdělení nálezů podle charakteru a nebo původu intravitálních změn u králíků porážených na jatkách je uvedeno v tabulce č. 2. Rozdíly ve výskytu změn byly statisticky vysoce významné mezi všemi kategoriemi ($P < 0,01$). Nejvyšší počet nálezů byl traumatického původu (1,518%). Ostatní kategorie byly detekovány v méně než 1% případů.

S ohledem na skutečnost, že se nejvíce vyskytovaly nálezy na končetinách, těle a celkové změny, a dále nálezy na ledvinách a na játrech, zabývali jsme se zvláště také bližším charakterem a původem nálezů na těchto orgánech a tkáních.

Z hlediska posouzení výskytu nálezů na jednotlivých částech těla byly nejčetnější nálezy na končetinách a těle. Rozdělení nálezů na končetinách a těle dle charakteru a nebo původu změny je uvedeno v tabulce č. 3. Z výsledků vyplývá, že u nálezů na končetinách dominovaly nálezy traumatického původu, jejichž výskyt byl statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší, než nálezy chronického a nebo akutního charakteru. Obdobně u nálezů na těle byly statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší počty nálezů traumatického charakteru než nálezů akutních a chronických.

Tabulka č. 1. Výskyt intravitálních změn na orgánech a tkáních zjišťovaných u králíků po porážení na jatkách

orgány a tkáň	intravitální nálezy	
	počet	%
játra	862	0,046
žaludek	0	0,000
střeva	0	0,000
plíce	89	0,005
srdce	0	0,000
slezina	3	0,000
pohlavní orgány	0	0,000
ledviny	3135	0,167
nervová tkáň (CNS, mícha)	15	0,001
kůže	0	0,000
hlava	29	0,002
trup	13261	0,706
končetiny	15717	0,837
celkové změny	6918	0,369
jiné změny	179	0,010

Tabulka č. 2. Charakter a nebo původ intravitálních změn zjišťovaných u králíků po porážení na jatkách

charakter a nebo původ změny	intravitální nálezy	
	počet nálezů	%
akutní	277	0,015 ^d
chronické	4305	0,229 ^c
parazitární	73	0,004 ^f
traumatické	28500	1,518 ^a
celkové	6918	0,369 ^b
jiné	134	0,007 ^e

^{a-f} procenta s odlišným písmenem se liší ($P < 0,01$)

Tabulka č. 3. Charakter a nebo původ intravitálních změn zjišťovaných u králíků po poražení na jatkách na těle a končetinách

charakter a nebo původ změny	intravitální nálezy			
	tělo		končetiny	
	počet	%	počet	%
akutní	168	0,009 ^c	60	0,003 ^b
chronické	239	0,013 ^b	13	0,001 ^c
traumatické	12855	0,685 ^a	15 645	0,834 ^a

^{a-c} procenta ve stejném sloupci s odlišným písmenem se liší (P < 0,01)

Z hlediska posouzení výskytu nálezů na jednotlivých orgánech byly nejčastější nálezy na ledvinách a játrech. Rozdělení nálezů na ledvinách a játrech dle charakteru a nebo původu změny je uvedeno v tabulce č. 4. Nálezy na ledvinách i játrech byly nejčastěji chronického charakteru.

Výsledky týkající se celkových nálezů jsou uvedeny v tabulce č. 5. Mezi celkovými nálezy byly nejčastější nálezy abscesů, statisticky významně (P < 0,01) méně často byla zjištěna vyhublost. Výskyt nedostatečného vývinu a ascites byl zcela zanedbatelný. Mezi výskytem jednotlivých celkových nálezů byl zjištěn statisticky významný rozdíl (P < 0,01).

Tabulka č. 4. Charakter a nebo původ intravitálních změn zjišťovaných u králíků po poražení na jatkách na ledvinách a játrech

charakter a nebo původ změny	intravitální nálezy			
	ledviny		játra	
	počet	%	počet	%
akutní	1	0,000 ^b	1	0,000 ^c
chronické	3134	0,167 ^a	789	0,042 ^a
parazitární	0	0,000 ^b	71	0,004 ^b

^{a-c} procenta ve stejném sloupci s odlišným písmenem se liší (P < 0,01)

Tabulka č. 5. Výskyt celkových změn u králíků po poražení na jatkách

nález	počet	%
nedostatečný vývin	44	0,002 ^c
vyhublost	1 027	0,055 ^b
abscesy	5 844	0,311 ^a
ascites	4	0,000 ^d

^{a-d} procenta s odlišným písmenem se liší (P < 0,01)

Diskuze

Podíl počtu intravitálních nálezů k celkovému počtu poražených králíků na jatkách byl 0,0214. To znamená, že na každých sto králíků bylo zjištěno 2,14 nálezů dokumentujících narušení zdraví a nebo pohody na takové úrovni, že vedlo k intravitálním změnám detekovaným při prohlídce králíků na jatkách po poražení. Metodicky srovnatelné studie byly v minulosti provedeny také u dalších druhů jatečných zvířat. Jediným druhem s ještě nižším výskytem intravitálních nálezů, než byl zjištěn u králíků, byla brojlerová kuřata (podíl 0,016, Večerková et al., 2019). U všech dalších sledovaných druhů byl tento podíl vyšší, a to jak

u krůt (0,101, Večerková et al., 2019), tak u prasat (0,809, Večerek et al., 2020) a skotu (0,479, Kaluža et al., under review). Je zajímavé, že úplně opačné výsledky byly zjištěny při srovnání úhynů těchto druhů zvířat při jejich přepravě na jatky v České republice. Nejvyšší úhyny při přepravě byly zjištěny u brojlerových kuřat (0,37%, Večerek et al., 2016) a králíků (0,19%, Voslářová et al., 2018), zatímco nižší úroveň úhynů byla zjištěna u prasat (0,07%, Voslářová et al., 2017) a skotu (0,02%, Šimová et al., 2016; 2017), u kachen (0,08%, Voslářová et al., 2016) a krůt (0,15%, Machovcová et al., 2017). Výsledky naznačují, že brojlerová kuřata a králíci s narušeným zdravotním stavem mnohem častěji než jiné druhy uhynou během přepravy na jatky, resp. že cestu přežijí především zvířata v dobré kondici. Porážena jsou pak tedy převážně zvířata s dobrým zdravotním stavem, což dokumentují ve srovnání s ostatními druhy jatečných zvířat nízké počty intravitálních nálezů zjišťovaných po porážce na jatkách. Je také možné, že odlišný způsob přepravy a různá citlivost zvířat k přepravnímu stresu u různých druhů ovlivňuje podíl a kondici zvířat, která jsou po přepravě porážena. Nízký počet intravitálních nálezů u brojlerových kuřat a králíků může být dán také jejich krátkou dobou života ve srovnání s jinými druhy zvířat chovaných na maso.

Kvantifikací a identifikací patologických nálezů u králíků porážených na jatkách se věnuje jen málo studií, což je škoda nejen z vědeckého pohledu, ale především z pohledu veterinární péče o zdraví a welfare farmových králíků. Szkucik and Paszkiewicz (2011) sledovali výskyt a charakter patologických nálezů u králíků porážených na polských jatkách v letech 2000 až 2010. Patologické změny či odchylky byly zaznamenány u 4,94% jatečných těl, za nepoživatelné bylo prohlášeno 1,05% ze všech porážených kusů králíků. Nejběžnějším patologickým nálezem byla přítomnost parazitů, zejména kokciidií (65,13%), nicméně nejčastějším důvodem (34,93%) vyloučení z lidské spotřeby byla bakteriální onemocnění (sepsa a pyémie), následovaná kokcidiózou (28,96%). Nejčastěji zaznamenanou celkovou změnou byla vyhublost (2%). Na tento výzkum navázali v letech 2010 až 2018 Drozd et al. (2019), kteří detekovali patologické změny již jen u 0,48% porážených králíků. Nejčastějším důvodem nepoživatelnosti jatečného těla a vnitřních orgánů byla sepsa a pyémie, následovala vyhublost, onemocnění horních dýchacích cest, jiné nespecifikované příčiny a kokcidióza. Pozitivním trendem byl ve srovnání s předchozím obdobím pokles ve výskytu parazitárních onemocnění. Také z naší studie vyplývá, že se daří eliminovat výskyt parazitárních onemocnění ve farmových chovech králíků. Na rozdíl od polské studie však nejzávažnějším zdravotním a welfare problémem nejsou v podmínkách ČR bakteriální onemocnění vyvolávající sepsi či pyemii, nýbrž nálezy traumatického charakteru (haematomy, zhmožděny, vykloubeniny, fraktury, krváceniny, ruptury aj.). Rampin et al. (2008) uvádějí, že z vyšetřovaného počtu 59 440 jatečných těl králíků byly v rámci post mortální prohlídky na jatkách v Itálii zjištěny patologické nálezy u pouhého 1%. Ani v této studii nehrály dominantní roli nálezy traumatického charakteru, přestože se patologické léze nacházely nejčastěji na povrchu těla a také v trávícím a močovém ústrojí. K nejběžnějším nálezům patřily podkožní abscesy a dále nefritidy, pravděpodobně vyvolané parazitem *Encephalitozoon cuniculi*. Pozitivní trend, pokud jde o zdravotní stav a welfare králíků v českých farmových chovech, lze dovodit ze studie, která se v období let 1989 až 1994 a 1995 až 2000 zaměřila na klasifikaci jatečných těl různých druhů hospodářských zvířat (skot, prasata, ovce, kozy, koně, kuřata, slepice, krůty, kachny, husy, králíci) porážených na jatkách v ČR (Kozák et al., 2002). Relativní počet jatečných těl prohlášených za vhodné k lidské spotřebě se v průběhu let 1995 až 2000 zvýšil ve srovnání s obdobím 1989 až 1994 u všech sledovaných druhů a kategorií zvířat, u králíků činil tento nárůst téměř 10% (z 83,95 na 93,64%).

Králík je velmi citlivý živočich, o čemž kromě vysoké mortality při přepravě (Voslářová et al., 2018) svědčí i relativně vysoká mortalita králíků v chovech, zejména v období po odstavu (Gidenne et al. 2005, 2009; Volek, 2005). Během výkrmu uhynie až

čtvrtina mladých králíků (Licois and Marlier, 2008). Zranitelnou kategorií jsou i chovné samice, jejichž organismus je zatížen vysokými nároky v souvislosti s opakovanou reprodukcí a laktací. Dvě třetiny chovných samic, vstupujících do reprodukčního procesu, uhynou ještě před třetím porodem nebo musí být utraceny ze zdravotních důvodů či pro nedostatečnou plodnost. U králíků se typicky vyskytují dva hlavní zdravotní problémy: respirační syndrom (převládá u dospělých jedinců) a trávící syndrom (častěji u mláďat) (Licois and Marlier, 2008). Infekce dýchacích cest mívají smíšenou etiologii, k jejich rozvoji přispívá průvan a prašné prostředí. Onemocnění trávícího ústrojí jsou hlavním důvodem morbidity a mortality u brojlerových králíků (Romero et al., 2011). Jejich příčiny jsou dietetické (nedostatek vlákniny, nadbytek škrobu a bílkovin), virové (rotaviry, astroviry), bakteriální (koliformní enteritida, klostridiová enterotoxemie) a parazitární (zejména kokcidie) (Percy et al., 1993; Martinec, 2002; Jeklová et al., 2006; Romero et al., 2011). V současnosti jsou v chovech králíků velkým problémem nakažlivá onemocnění dosud neobjasněné etiologie - mukoidní enteropatie a především epizootická enteropatie, která je dokonce považována za jednu z možných příčin poklesu stavu králíků chovaných v České republice (Martinec, 2002). Běžné jsou souběžné infekce způsobené vícero původci; příčiny trávících potíží jsou často komplexní – významnou roli hraje výživa, ustájení (vysoká hustota osazení; špinavá a vlhká podestýlka; nedostatečná sanitace), zoohygienické podmínky (nevyhovující mikroklima), zhoršený zdravotní stav samic v období porodu, pozdější odstav (přes 35 dní věku), přemístění odstavených mláďat do jiného prostoru nebo výkrm různých věkových kategorií králíků v jedné stáji (Finzi et al., 2008; Le Bouquin et al., 2009).

Krátká doba života (výkrm je ukončen dříve, než se projeví dopad podmínek chovu změnou na orgánech) a vysoká mortalita v chovu i při přepravě (eliminace jedinců s narušeným zdravotním stavem) se promítá do zdraví a kondice králíků porážených na jatkách. Nicméně i přes relativně nízký počet intravitálních nálezů zjištěných u králíků při prohlídce na jatkách lze identifikovat některé kategorie nálezů, které vykazují vyšší četnost a vypovídají o specifickém narušení zdraví a welfare v chovu nebo při přepravě. Zcela nejčastější byly nálezy na trupu a končetinách, přičemž se jednalo téměř výhradně o traumatické změny. Nálezy traumatického charakteru na trupu i končetinách jsou z pohledu welfare nepříznivé výsledky. Příčinou mohou být technologie chovu vedoucí k poškozování zejména končetin, tak také způsob odchytu a umístování králíků do přepravních boxů před přepravou a způsob vyskladňování králíků z přepravních boxů na jatkách, kdy pravděpodobně dochází k poranění, zhmožděninám a také vykloubeninám a zlomeninám. Drátěné podlahy bývají často příčinou otlaků a zranění (paraketóza, pododermatitida), proto je vhodné přikrýt je alespoň rohožemi (Stanciu et al., 2015). Problémem je rovněž vysoká hustota osazení, která vede ke zvýšené agresivitě králíků (Trocino et al., 2015). Nedostatečné rozměry klecí zase omezují možnosti pohybu, přirozených aktivit a postojů, což vede k abnormálnímu vývoji skeletu králíků (deformace kostí, hypoplazie kostní tkáně) (Dresher, 1996). Jednoznačně pozitivní vliv má vybavení klecí, případně kotev, obohacujícími prvky (kousací tyče, vyvýšené plošiny, tunely, řetízky, větvičky), neboť významně přispívají k redukci stresu a jsou tak prevencí agresivního chování a behaviorálních abnormalit jako je ohryzávání klecového pletiva či stereotypie (Martino et al., 2016; Mohammed and Nasr, 2017). Králíci ustájení alternativním způsobem (nižší hustota osazení, podlaha s plastovými rošty) vykazovali nižší výskyt zranění, na druhou stranu však měli vyšší mortalitu (Rauterberg et al., 2019). Ke zraněním vzniklým v chovu se přidružují další poškození (akutního charakteru), ke kterým dochází v souvislosti s přepravou na jatky. Manipulace se zvířaty při jejich nakládce a vykládce je sama o sobě rizikovým faktorem, pokud jde o vznik zranění a mortalitu při přepravě. Toto riziko se zvyšuje, pokud je manipulace nešetrná a pokud je přepravováno v rámci jedné zásilky velké množství zvířat. Příčina tkví v lidském faktoru, neboť při manipulaci s velkým počtem zvířat klesá opatrnost personálu (Petracci et al., 2010). Vztah

personálu ke zvířatům hraje při manipulaci s jatečnými králíky klíčovou roli (Trocino and Xiccato, 2006). Hrubé zacházení vede ke vzniku traumatických lézí, jako jsou modřiny, odřeniny, pohmožděniny či zlomeniny (Verga et al., 2009). Intravitální nálezy traumatického charakteru v naší studii korespondují s vysokou úrovní mortality při přepravě na jatky publikovanou ve studii Voslařová et al. (2018).

Při prohlídce orgánů byly intravitální patologické nálezy nejčastěji zjištěny na ledvinách a játrech. Na ledvinách se jednalo téměř výhradně o nálezy chronické (99,9%) a také na játrech chronické nálezy (91,5%) výrazně převyšovaly nálezy akutní a parazitární. Obdobně Rampin et al. (2008) při prohlídce králíků na jatkách v Itálii zjistili patologické změny zejména v trávicím a močovém ústrojí. Chronické změny na ledvinách a játrech jsou způsobeny pravděpodobně nevyváženou výživou ve vztahu k potřebám u některých jedinců v rámci intenzivního výkrmu a tento nesoulad má dopady na parenchymy (játra a ledviny). Na dobrou funkci trávicí soustavy a tím i celého organismu má vliv nejen složení krmné dávky a vhodný poměr živin, ale i množství přijaté potravy, způsob zpracování krmiva, struktura a velikost jeho jednotlivých částic. Výsledky výzkumů naznačují, že snížení obsahu škrobu a bílkovin ve prospěch vlákniny má, při zachování parametrů užitečnosti, blahodárné účinky na trávicí proces i fermentaci ve slepém střevě a vede k redukci zdravotních problémů a mortality králíků (Gidenne et al., 2013; Trocino et al., 2013). Zejména pod tlakem epizootické enteropatie byla detailně zkoumána výživa králíků, která nyní hraje v prevenci zdravotních problémů dominantní úlohu (Gidenne and Garcia, 2006; Martinec, 2012). Prevencí trávicích potíží i následného narušení metabolismu a poškození orgánů je správné složení krmné dávky - vyšší zastoupení stravitelné i nestravitelné vlákniny (hrubá vláknina 14-18% (Gidenne, 2003), nižší obsah škrobu (pod 14% (Gidenne et al., 2004) a bílkovin (15-16% (Martínez-Vallespín et al., 2011), případně doplnění vhodných rostlinných aditiv (Krieg et al., 2009). Účinným opatřením je i restrikce krmiva v období po odstavu (Foubert et al., 2008; Gidenne et al., 2012).

Ve srovnání se zahraničními studiemi (Rampin et al., 2008; Szkucik and Paszkiewicz, 2011; Drozd et al., 2019) byl zjištěn překvapivě nízký výskyt parazitárních nálezů na játrech u králíků, což může svědčit o zvládnutí jaterní kokcidiózy v chovech. Zvládnutí střevní kokcidiózy ve výkrmu králíků potvrzuje také nulový výskyt nálezů na střevech. Szkucik et al. (2014) však upozorňují, že ani jatečná těla králíků, která byla při postmortální veterinární prohlídce schválena k lidské spotřebě, nemusí být prostá parazitů. Polští vědci v letech 2007 až 2011 zkoumali střeva a játra získaná z jatečných těl, která po porážce prošla veterinární prohlídkou a byla schválena k lidské spotřebě. Parazitologické testy vzorků, odebraných ze střev a jater králíků poražených v letech 2007 až 2011, odhalily přítomnost gastrointestinálních parazitů téměř v 80% případů. Nejčastěji byl ve vnitřních orgánech králíků zaznamenán výskyt kokciidií (78,83%), následovaly hlístice (16,42%), cysticerky *C. pisiformis* (4,74%) a tasemnice *Mosgovoyia pectinata* (0,72%).

Mezi sledovanými kategoriemi nálezů byly ve vyšší míře zaznamenány ještě celkové změny. Z nich naprostou většinu tvořily nálezy mnohočetných abscesů (84,5%) a vyhublost (14,9%). Frekventovaným zdravotním problémem v komerčních chovech králíků bývají podkožní abscesy (Rampin et al., 2008), které mohou být lokalizovány po celém těle, ale nejčastěji se objevují na zadních končetinách či v oblasti krku. Bývají následkem infekce poranění, ke kterému došlo v průběhu výkrmu. Nejčastěji se abscesy vytvoří po vzájemném pokousání nebo soubojích mezi společně vykrmovanými jedinci. Při mikrobiologickém rozboru bývá nejčastěji izolována *Pasteurella spp* (59,3 %) a *Staphylococcus aureus* (25,9%) (Ferreira et al., 2014). Příčin vyhublosti je velké množství, většinou souvisí s některým dalším patologickým stavem, jako jsou například záněty dýchacích cest, gastroenteritidy, nefritidy, jaterní a střevní kokcidiózy. Vyhublost může být také dána konkurenčními vztahy v přístupu ke krmivu v chovech, neumožňující některým jedincům dostatečný přísun živin a vedoucí

následně dlouhodobě k vyhublosti. V obou dřívějších polských studiích (Szkucik and Paszkiewicz, 2011; Drozd et al., 2019) patřila vyhublost mezi nejčastější důvody pro vyloučení jatečného těla z lidské spotřeby při prohlídce králíků na jatkách. Jedná se tedy o aktuální problém, který je třeba řešit na úrovni úpravy technologie a zoohygieny v chovech králíků.

Závěr

Počty intravitálních patologických nálezů zjišťovaných při prohlídce králíků na jatkách jsou nižší ve srovnání s jinými druhy zvířat chovaných na maso. To může znamenat buď dobrý stav králíků celkově nebo jen to, že se na jatky dostanou převážně králíci v dobrém stavu, protože ti v horší kondici uhynou již v chovu nebo při přepravě, jak naznačují dřívější studie dokumentující vysokou mortalitu králíků. Neodpovídající úrovni welfare v chovech a při přepravě by odpovídaly také traumatické nálezy na končetinách a trupu, které byly vůbec nejčastějšími nálezy detekovanými při prohlídce na jatkách. Nejvíce postiženými orgány z hlediska počtu intravitálních nálezů byly játra a ledviny. V obou případech převládaly chronické nálezy indikující jejich vznik v chovu a mající patrně souvislost s výživou intenzivně vykrmovaných králíků, kdy nedostatky ve výživě mají dopad na parenchymy s chronickými projevy na játrech a ledvinách. Pozitivní je nízký výskyt nálezů parazitárního původu na játrech a nulové nálezy na střevech svědčící o zvládnutí kokcidiozy králíků při jejich chovu. U celkových nálezů převládaly mnohočetné abscesy související pravděpodobně s infekcí poranění, ke kterému dochází v průběhu výkrmu, a vyhublost daná současnou technologií chovu vedoucí u některých jedinců k nedostatečnému příjmu potravy nebo rozvoji onemocnění.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Alhaidary, A., Mohamed, H.E., Beynen, A.C. 2010. Alopecia in rabbits fed semi-purified diets with marginal protein content. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 37: 267-270.
- Dresher, B. 1996. Deformations of vertebral column in breeding rabbits. In: *Proceedings of the 6th World Rabbit Congress, Toulouse, France*, pp. 417-421.
- Drozd, L., Paszkiewicz, W., Pyz-Lukasik, R. 2019. Post-slaughter changes in rabbit carcasses in Poland between 2010 and 2018. *Medycyna Weterynaryjna* 75: 613-616.
- Ferreira, A., Monteiro, J.M., Vieira-Pinto, M. 2014. The importance of subcutaneous abscess infection by *pasteurella* spp. and *staphylococcus aureus* as a cause of meat condemnation in slaughtered commercial rabbits. *World Rabbit Science* 22: 311-317.
- Finzi, A., Macchioni, P., Negretti, P. 2008. Rabbit health control by management. In: *Proceedings of the 9th World Rabbit Congress, Verona, Italy*, pp. 949-953.
- Foubert, C., Duperray, J., Boison, P., Guyonvarch, A. 2008. Effect of feed restriction with or without restriction free access to drinking water on performance of growing rabbits in healthy or epizootic rabbit enteropathy conditions. In: *Proceedings of the World Rabbit Congress, Verona, Italy*, pp. 667-671.
- Gidenne, T., Kerdiles, V., Jehl, N., Arveux, P., Eckenfelder, B., Briens, C., Stephan, S., Fortune, H., Montessuy, S., Muraz, G. 2013. Protein replacement by digestible fibre in the diet of growing rabbits: 2-Impact on performances, digestive health and nitrogen output. *Animal Feed Science and Technology* 183: 142-150.
- Gidenne, T., Fortun-Lamothe, L., Combes, S. 2012. Intake restriction for the young rabbit: new strategies to enhance its digestive health and feed efficiency. *INRA Productions Animales* 25: 323-336.

- Gidenne, T., Combes, S., Feugier, A., Jehl, N., Arveux, P., Boisot, P., Briens, C., Corrent, E., Fortune, S., Montessuy, S., Verdelhan, S. 2009. Feed restriction strategy in the growing rabbit. 2. Impact on digestive health, growth and carcass characteristics. *Animal* 3: 509-515.
- Gidenne, T., Garcia, J. 2006. Nutritional strategies improving the digestive health of the weaned rabbit. In: Maertens, L., Coudert, P. (Eds): *Recent Advances in Rabbit Sciences*, ILVO, Animal Science Unit, Melle, Belgium, pp. 229-238.
- Gidenne, T., Jehl, N., Perez, J.M. 2005. Effect of cereal sources and processing in diets for the growing rabbit. II. Effects on performances and mortality by enteropathy. *Animal Research* 54: 65-72.
- Gidenne, T., Mirabito, I., Jehl, N., Perez, J. M., Arveux, P., Bourdillon, A., Briens, A., Duperray, J., Corrent, E. 2004. Impact of replacing starch by digestible fibre at two levels of lignocelulose on digestion, growth and digestive health of the rabbit. *Animal Science* 78: 389-398.
- Gidenne, T. 2003. Fibres in rabbit feeding for digestive troubles prevention: respective role of low-digested and digestible fibre. *Livestock Production Science* 81: 105-117.
- Grilli, C., Loschi, A.R., Rea, S., Stocchi, R., Leoni, L., Conti, F. 2015. Welfare indicators during broiler slaughtering. *British Poultry Science* 56: 1-5.
- Huneau-Salaun, A., Stark, K.D.C., Mateus, A., Lupo, C., Lindberg, A., Le Bouquin-Leneveu, S. 2015. Contribution of meat inspection to the surveillance of poultry health and welfare in the European Union. *Epidemiology and Infection* 143: 2459-2472.
- Jeklová, E., Jekl, V., Hauptman, K., Knotek, Z. 2006. Enteropatie králíků II. – infekční onemocnění. *Veterinární klinika* 3: 37-42.
- Kaluža, M., Večerek, V., Voslářová, E., Semerád, Z., Passantino, A. Assessing the standard of health and welfare in individual categories of cattle from the viewpoint of intravital pathological changes. *under review*
- Kozák, A., Večerek, V., Steinhäuserová, I., Chloupek, P., Pištěková, V. 2002. Results of slaughterhouse carcass classification (capable for human consumption, capable for processing and condemned) in selected species of food animals. *Veterinarni medicina* 47: 26-31.
- Krieg, R., Vahjen, W., Awad, W., Sysel, M., Kroeger, S., Zoher, E., Hulan, H.W., Arndt, G., Zentek, J. 2009. Performance, digestive disorders and the intestinal microbiota in weaning rabbits are affected by a herbal feed additive. *World Rabbit Science* 17: 87-95.
- Le Bouquin, S., Jobert, J.L., Larour, G., Balaine, L., Eono, F., Boucher, S., Huneau, A., Michel, V. 2009. Risk factors for an acute expression of Epizootic Rabbit Enteropathy syndrome in rabbits after weaning in French kindling-to-finish farms. *Livestock Science* 105: 283-290.
- Licois, D., Marlier, D. 2008. Infectious pathologies in intensive meat rabbit production. *Inra Productions Animales* 3: 257-267.
- Machovcová, Z., Večerek, V., Voslářová, E., Malena, M., Conte, F., Bedáňová, I., Večerková, L. 2017. Pre-slaughter mortality among turkeys related to their transport. *Animal Science Journal* 88: 705-711.
- Martínez, M. 2012. ERE – epizootická enteropatie králíků. *Veterinářství* 62: 781-785.
- Martínez-Vallespín, B., Martínez-Peredes, E., Ródenas, L., Cervera, C., Pascual, J., Blas E. 2011. Combined feeding of female and young: partial replacement of starch with acid detergent or/and neutral detergent soluble fibre at two protein levels. *Livestock Science* 141: 155-165.
- Martino, M., Mattioli, S., Farkas, P., Szendro, Z., Dal Bosco, A., Ruggeri, S., Matics, Z., Castellini, C., Gerencser, Z. 2016. Carcass traits and meat quality of growing rabbits in pens with and without different multilevel platforms. *World Rabbit Science* 24: 129-138.

- Mohammed, H., Nasr, M. 2017. Growth performance, carcass traits, behaviour and welfare of New Zealand White rabbits housed in different enriched cages. *Animal Production Science* 57: 1759-1766.
- Percy, D.H., Muckle, C.A., Hampson, R.J., Prash, M.L. 1993. The enteritis complex in domestic rabbits: A field study. *Canadian Veterinary Journal* 34: 95-102.
- Petracci, M., Bianchi, M., Biguzzi, G., Cavani, C. 2010. Preslaughter risk factors associated with mortality and bruising in rabbits. *World Rabbit Science* 18: 219-228.
- Rampin, F., Piccirillo, A., Schiavon, E., Poppi, L., Grilli, G. 2008. Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Italian Journal of Animal Science* 7: 105-111.
- Rauterberg, S.L., Bill, J., Kimm, S., Kemper, N., Fels, M. 2019. Effect of a new housing system on skin lesions, performance and soiling of fattening rabbits: A German case study. *Animals* 9: 650.
- Romero, C., Nicodemus, N., Jarava, M.L., Menoyo, D., de Blas, C. 2011. Characterization of *Clostridium perfringens* presence and concentration of its alpha-toxin in the caecal contents of fattening rabbits suffering from digestive diseases. *World Rabbit Science* 19: 177-189.
- Stanciu, N., Popescu-Miclosanu, E., Tudorache, M. 2015. Study regarding rabbit welfare intensively bred. *Scientific Papers-Series D-Animal Science* 58: 334-338.
- Stark, K.D.C. 2017. Abattoir condemnation data remain underused in decision making. *Veterinary Record* 180: 514-515.
- Stark, K.D.C., Alonso, S., Dadios, N., Dupuy, C., Ellerbroek, L., Georgiev, M., Hardstaff, J., Huneau-Salaun, A., Laugier, C., Mateus, A., Nigsch, A., Afonso, A., Lindberg, A. 2014. Strengths and weaknesses of meat inspection as a contribution to animal health and welfare surveillance. *Food Control* 39: 154-162.
- Szkucik, K., Pyzlukasik, R., Paszkiewicz, W. 2011. Morbid traits and qualitative changes in rabbits slaughtered in Poland between 2000-2010. *Medycyna weterynaryjna* 68: 418-421.
- Szkucik, K., Pyz-Lukasik, R., Szczepaniak, K.O., Paszkiewicz, W. 2014. Occurrence of gastrointestinal parasites in slaughter rabbits. *Parasitology Research* 113: 59-64.
- Šimová, V., Voslářová, E., Passantino, A., Bedáňová, I., Vecerek, V. 2016. Mortality rates in different categories of cattle during transport for slaughter. *Berliner und Munchener Tierärztliche Wochenschrift* 129: 462-467.
- Šimová, V., Voslářová, E., Večerek, V., Passantino, A., Bedáňová, I. 2017. Effects of travel distance and season of the year on transport-related mortality in cattle. *Animal Science Journal* 88: 526-532.
- Trocino, A., Filiou, E., Tazzoli, M., Birolo, M., Zufellatto, A., Xiccato, G. 2015. Effects of floor type, stocking density, slaughter age and gender on productive and qualitative traits of rabbits reared in collective pens. *Animal* 9: 855-861.
- Trocino, A., Fragkiadakis, M., Majolini, D., Tazzoli, M., Radaelli, G., Xiccato, G. 2013. Soluble fibre, starch and protein level in diets for growing rabbits: Effects on digestive efficiency and productive traits. *Animal Feed Science and Technology* 180: 73-82.
- Trocino, A., Xiccato, G. 2006. Animal welfare in reared rabbits: A review with emphasis on housing systems. *World Rabbit Science* 14: 77-93.
- Večerek, V., Voslářová, E., Conte, F., Večerková, L., Bedáňová, I. 2016. Negative trends in transport-related mortality rates in broiler chickens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29: 1796-1804.
- Večerek, V., Voslářová, E., Semerád, Z. 2020. Patho-anatomic findings in finisher pigs, sows and piglets detected during the veterinary inspection of pigs slaughtered in the slaughterhouse. *Acta Veterinaria Brno* 89: *in press*.
- Večerková, L., Voslářová, E., Večerek, V. 2019. Comparison of the welfare of laying hens, broiler chickens and turkeys in terms of bird health as surveyed during inspection in slaughterhouses. *Acta Veterinaria Brno* 88: 243-248.

- Verga, M., Luzzi, F., Petracci, M., Cavani, C. 2009. Welfare aspects in rabbit rearing and transport. *Italian Journal of Animal Science* 8: 191-204.
- Volek, Z., Marounek, M., Skrivanova, V. 2005. Replacing starch by pectin and inulin in diet of early-weaned rabbits: effect on performance, health and nutrient digestibility. *Journal of Animal and Feed Sciences* 14: 327-337.
- Voslářová, E., Večerek, V., Bedáňová, I., Večerková, L. 2018. Mortality in rabbits transported for slaughter. *Animal Science Journal* 89: 931-936.
- Voslářová, E., Hytychová, T., Večerek, V., Nenadovic, K., Bedáňová, I. 2016. Transport-induced mortality in Pekin ducks transported for slaughter in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno* 85: 205-212.
- Voslářová, E., Večerek, V., Passantino, A., Chloupek, P., Bedáňová, I. 2017. Transport losses in finisher pigs: Impact of transport distance and season of the year. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 30: 119-124
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu jako metoda hodnocení welfare v chovu králíků

Zuzana Tšponová, Vladimíra Pištěková, Jana Blahová

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

Abstrakt

Králíci jsou obecně považováni za zvířata velmi citlivá k vnějším podnětům. Jakékoli narušení, jako je hlasitý hluk, indukuje rychlou kaskádu sekrece endokrinních orgánů regulovanou osou hypothalamus-hypofýza-nadledvina (HPA). Aktivita HPA osy byla použita k posouzení stresu a dobrých životních podmínek hospodářských zvířat. Stres zvyšuje hladinu cirkulujícího kortizolu v krvi, která je doprovázena sníženou imunitní odpovědí na infekce, jakož i sníženým růstem a plodností. Ačkoli se vzorky krve nejčastěji používají k analýze hladin glukokortikoidů (GC), samotný odběr krve může způsobit zvýšení hladin GC. Kromě toho hladiny GC v krvi mohou být ovlivněny cirkadiálními rytmy, sekrecí pulsu a krátkodobými stresory. Tyto účinky se považují za zmírněné při měření hodnot GC ve fekálních vzorcích, které lze odebrat bez narušení pohody zvířete, protože metabolity glukokortikoidů ve stolici odrážejí hromadění během několika hodin. Byly analyzovány vzorky od 6 králíků stejného věku a plemene, žijící v hustotě osazení 4500 cm² na jedince. Králíci byli vystaveni běžné manipulaci, která je předpokládaným stresorem. Vzorky trusu odebrané před stresovým podnětem vykazují nižší hladiny kortikosteronu, než vzorky odebrané v rozmezí 6-12 hodin po stresovém podnětu. Vzorky byly analyzovány metodou ELISA pomocí komerčního kitu.

Úvod

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

Chovní králíci jsou běžně chováni individuálně v klecích, v menších alternativních chovech bývají chováni po malých skupinách. Jatečnými králíky jsou myšleni králíci ve věku mezi 35 a 85 dny věku, což odpovídá době od odstavu do porážky. Jateční králíci jsou

chování většinou ve skupinách o různém počtu králíků, podle velikosti klece. V Itálii jsou chováni většinou v klecích po dvojicích. Tento systém se může zdát stresující z hlediska welfare, ale podle některých autorů je tento způsob výhodný ze zdravotního hlediska, kdy je možné lépe hodnotit zdravotní stav jedince a provádět terapii jedince (Verga et al., 2007).

Jateční králíci jsou běžně chováni v hustotě osazení 14-20 zvířat/m² ve skupinách 2-6 jedinců (Verga et al., 2007). Nedávná studie (Buijs et al., 2011) ukázala, že devítitýdenní králíci se navzájem vyhýbali blízkosti, i když byli chováni v hustotě osazení 5 zvířat/m², což naznačuje, že by bylo vhodnější jim zajistit více místa. Uvádí se také, že malé klece a vysoká hustota osazení omezují pohybové, sociální a odpočinkové chování králíků, jakož i jejich variabilitu chování a zvyšují strach a agresi (Verga et al., 2007; Szendro a Luzi, 2006). Lze tedy očekávat také účinky na GC, ale o tomto je zatím známo jen málo.

Vyšší bazální koncentrace kortikosteronu v plazmě byly zaznamenány u králíků chovaných ve skupinách po pěti, v porovnání králíky chovanými v menších skupinách (Ombasilar et al., 2007). Nebyl však pozorován žádný rozdíl mezi králíky chovanými jednotlivě nebo ve skupinách po osmi jedincích, když byli chováni ve stejné hustotě osazení (Whary et al., 1993), přičemž jako klíčový faktor byla určena hustota. Množství a kvalita dostupného prostoru mohou výrazně ovlivnit dobré životní podmínky chovaných králíků. Hlavní problémy se týkají omezené možnosti ukázat normální chování, jako je poskakování (Stauffacher, 1992), a dále rizika fyzického poškození (Drescher, 1992). Stereotypy a snížená úroveň aktivity králíků se projevuje podle Podbersheck et al. (1991) u králíků chovaných v kleci oproti králíků chovaných v kotcích. Zdravé vyjádření chování je možné v klecích v maximální hustotě 38–40 kg / m² (Maertens and De Groote, 1984).

U obohacení životního prostředí se předpokládá, že zmírňuje stres u domácích zvířat tím, že dělá prostředí více kontrolovatelným nebo stimulujícím a zvyšuje možnosti vyjádření druhově specifického chování (Baumans, 2005), čímž ovlivňuje úroveň GC (Meijer et al., 2007; Pohle and Cheng, 2009; Van de Weerd et al., 2009). Některé studie však uvádějí, že obohacení snižuje základní hladiny GC (Belz et al., 2003; Spooler et al., 1996), zatímco jiné neuvádějí žádný účinek na výchozí hodnoty, ale sníženou (Meijer et al., 2007) nebo zvýšenou (Beattie et al., 2000) reakci na nový stresor. Některé rozdíly mezi studiemi mohou být vysvětleny různými druhy, strategiemi obohacování a použitými experimentálními protokoly. Ale dokud není známo více o účincích chronického stresu na mechanismus GC, zůstává důležité měřit základní koncentrace a odpověď na nové stresory. Studie měřící účinek obohacení na fekální GCM (metabolity glukokortikoidů) jsou obvykle omezeny na základní hodnoty a vedly k protichůdným výsledkům.

Cílem předkládané studie byla analýza vzorků trusu testovaných králíků v souvislosti s obsahem metabolitů glukokortikoidů před účinkem stresoru a po ukončení působení stresoru (manipulace se zvířaty) a určení dosažení nejvyšší koncentrace kortikosteronu ve vzorku trusu.

Materiál a metodika

Námi zvolená metodika je založena na odběru vzorků, před účinkem stresoru a po ukončení působení stresoru. Vzorky byly odebrány individuálně propadem na táč u králíků umístěných individuálně v kleci. Sledovali jsme metabolity glukokortikoidů v trusu u 6 králíků, téhož plemene (masný hybrid), téhož stáří (75 dní) a umístěné ve stejných podmínkách. Králíci byli individuálně umístěni v obohacených klecích. Hustota osazení klece byla 4500 cm² na jedince. Obohacení v klecích bylo zajištěno přírodním materiálem vhodným k okusu. Odběr trusu probíhal 4 dny. Odběr vzorků probíhal ráno a večer ke sledování cirkadiálních rytmů, které by se mohly promítat v koncentraci metabolitů glukokortikoidů v trusu.

Druhý den po odběru ranního vzorku trusu byla navozena stresová situace běžně se vyskytující v chovu – manipulace s králíkem, kontrola zdravotního stavu a návrat do původní klece (celkem doba manipulace činila 30 minut). Po návratu králíků do původních klecí probíhala kontrola produkce trusu každých 20 minut, abychom předešli degradaci metabolitů vlivem okolního prostředí. Předpokládáme degradaci metabolitů již po 30 minutách, v závislosti na podmínkách okolního prostředí. K analýze jsme použili vzorky s předpokládaným záchytem metabolitů glukokortikoidů, a to vzorky odebrané v rozmezí 6-18 hodin po účinku stresoru.

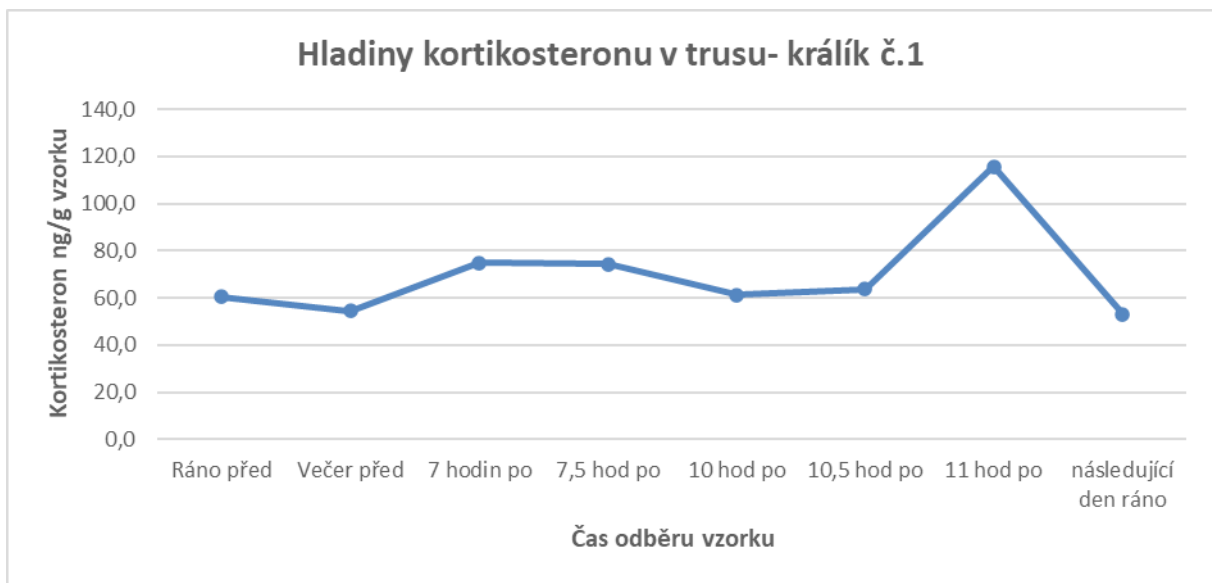
Dalšími vzorky, které jsme analyzovali, byly vzorky z následujícího dne ráno, abychom si ověřili možnost detekce po delší době, než je uváděné rozmezí, případně návrat k původním ranním hodnotám před stresorem.

Po odběru byly vzorky ihned zamrazeny a skladovány při teplotě -20 °C po dobu 6 týdnů. Analýza glukokortikoidů byla provedena s využitím komerčního ELISA kitu pro stanovení kortikosteronu (Cayman Chemical). Uvedený kit je použitelný pro stanovení kortikosteronu v plazmě/séru a také v exkrementech. Použitá protilátka vykazuje křížovou reaktivitu ke kortikosteronu (100 %), 11-deoxykortikosteronu (15,8 %), prednisolu (3,4 %), 11-dehydrokortikosteronu (2,9 %), kortizolu (2,5 %) a progesteronu (1,4 %). Křížová reaktivita byla potvrzena i pro další jiné deriváty, ale je menší než 1 %. V prvním kroku byla provedena homogenizace vzorků a pro vlastní analýzu bylo navažováno 500 mg exkrementů, ke kterým bylo napipetováno 5 ml 80 % methanolu. Vzniklá směs byla extrahována 30 minut na třepače a 5 minut v ultrazvukové lázni. Extrakt byl následně odstředěn (20 minut, 2 500 x g) a bylo provedeno oddělení supernatantu. Do skleněné zkumavky byl převeden 1 ml supernatantu, bylo provedeno jeho odpaření do sucha v atmosféře dusíku při zvýšené teplotě (37 °C) a následně byl rozpuštěn v 0,5 ml pufru. Takto připravený vzorek byl použit k analýze. Použitá metoda je založena na kompetici mezi kortikosteronem obsaženým ve vzorku a kortikosteronem značeným acetylcholinesterázou o omezený počet vazebných míst protilátky, kterou jsou pokryty jamky mikrotitrační destičky. Po inkubaci a důkladném promytí je do jamek mikrotitrační destičky aplikován Ellmanův roztok, který obsahuje acetylthiocholin a 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzovou kyselinu). Acetylcholinesteráza vázaná na kortikosteron následně katalyzuje hydrolyzu acetylthiocholínu na thiocholin, který reaguje s 5,5'-dithio-bis-(2-nitrobenzovou kyselinou) za vzniku žluté sloučeniny – 5-thio-2-nitrobenzové kyseliny. Intenzita zbarvení vzniklé sloučeniny se stanovila spektrofotometricky pomocí readru mikrotitračních destiček. Konečné výsledky jsou vyjádřeny v ng glukokortikoidů na gram vzorku.

Výsledky

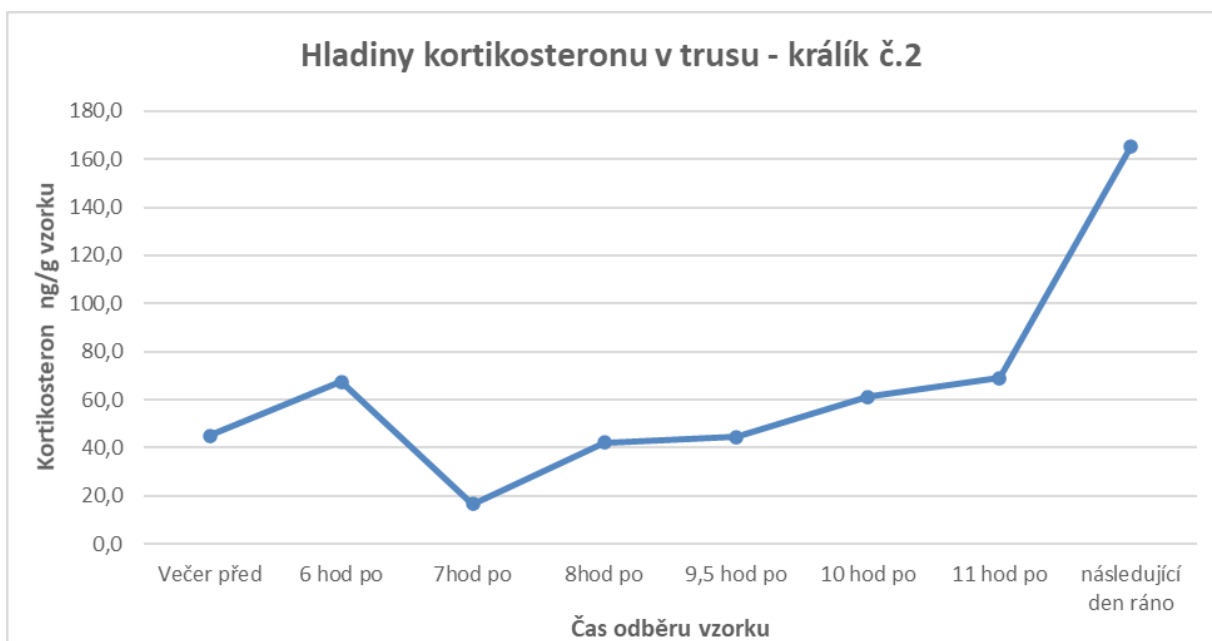
Analyzovali jsme 48 vzorků metodou ELISA za použití komerčního kitu pro stanovení kortikosteronu v trusu. K analýze byly vybrány ranní vzorky před působením stresoru, večerní vzorky před působením stresoru k porovnání s ranními hladinami a vyloučení či potvrzení cirkadiálních rytmů, které mohou mít vliv na hladinu kortikosteronu v trusu. Dále byly analyzovány vzorky odebrané v rozmezí 6-12 hodin po vystavení stresoru, kdy předpokládaný peak hladin kortikosteronu je 12 hodin po působení podnětu. Následující den byly odebrány ranní vzorky k porovnání s ranními hodnotami před vystavením předpokládanému stresoru.

Graf č. 1. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 1



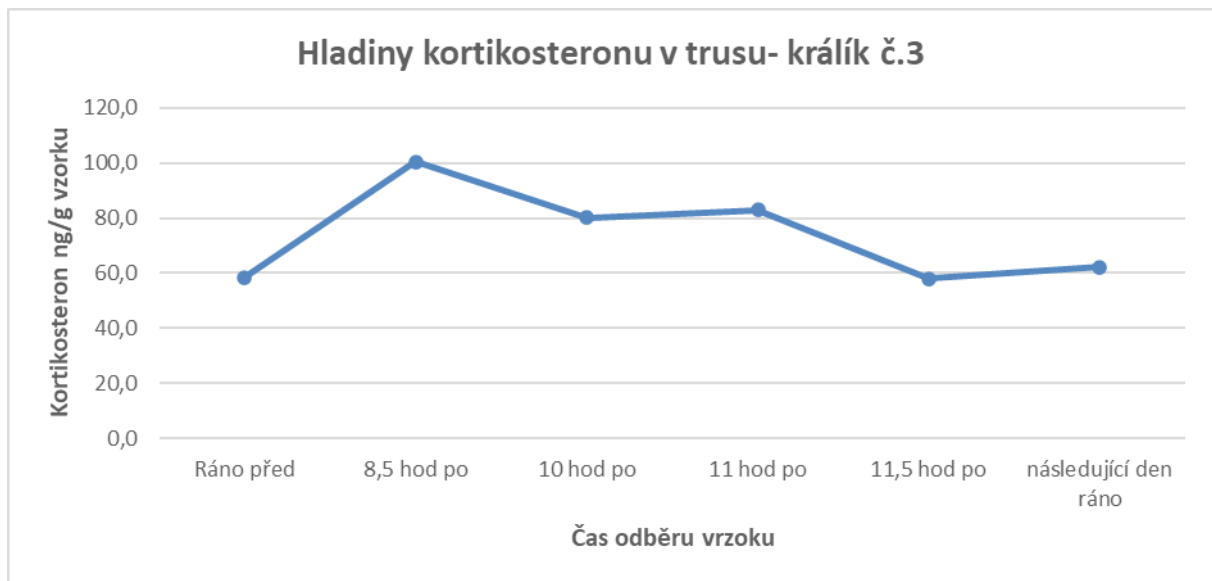
U králíka č. 1 došlo k zvýšení hladiny kortikosteronu v trusu 11 hodin po působení stresoru, s návratem k běžným ranním hodnotám hladiny kortikosteronu v trusu následující den.

Graf. č. 2. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 2



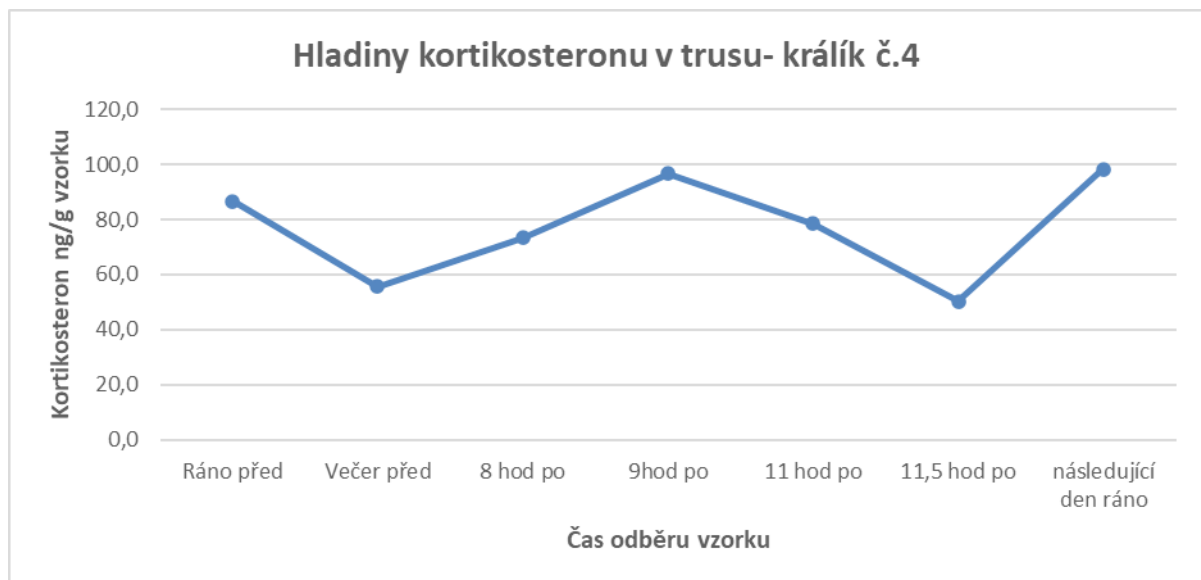
U králíka č. 2 nebylo možno odebrat bazální ranní hodnoty před působením stresového podnětu. Po působení předpokládaného stresoru jsme u králíka nezachytili peak v předpokládaném časovém intervalu, ale hodnoty následující den ráno dosahují výrazného nárůstu oproti bazálním večerním hodnotám před stresem. Z toho usuzujeme, že u králíka č. 2 došlo k peaku hladin kortikosteronu později, než okolo udávaných 12 hodin po stresoru.

Graf č. 3. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 3



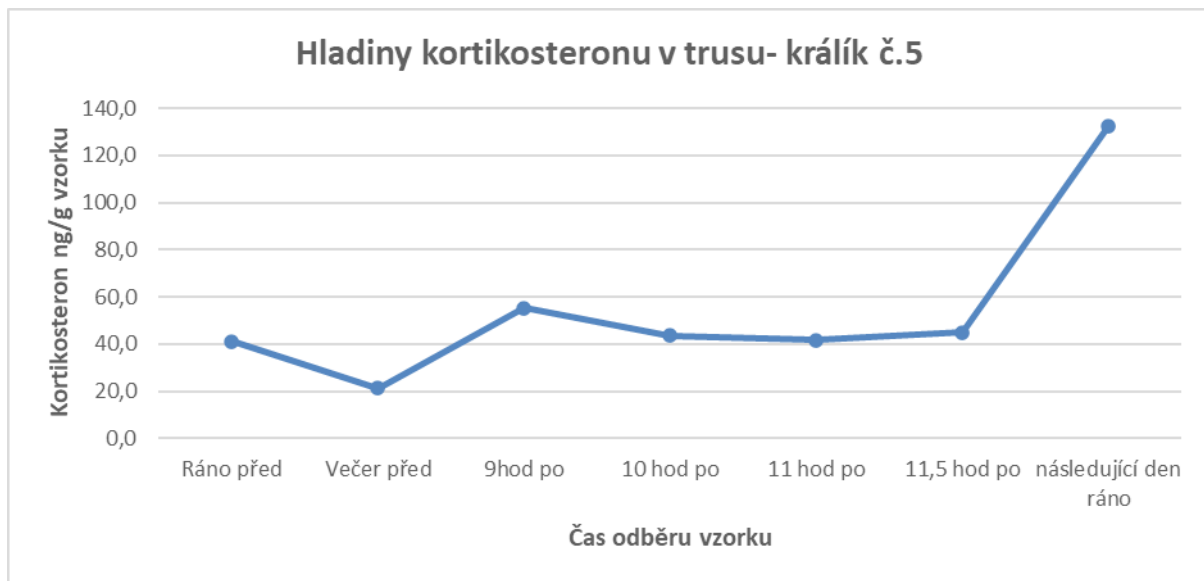
U králíka č. 3 došlo k nárůstu hodnot kortikosteronu již 8,5 hodiny po působení stresoru, dále se hladina kortikosteronu snižovala a ranní vzorek následujícího dne měl podobnou hladinu kortikosteronu jako měl ranní vzorek před stresem. Zkumavka se vzorkem s bazální večerní hodnotou se při analýze rozbila, a proto vzorek nebyl analyzován.

Graf č. 4. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 4



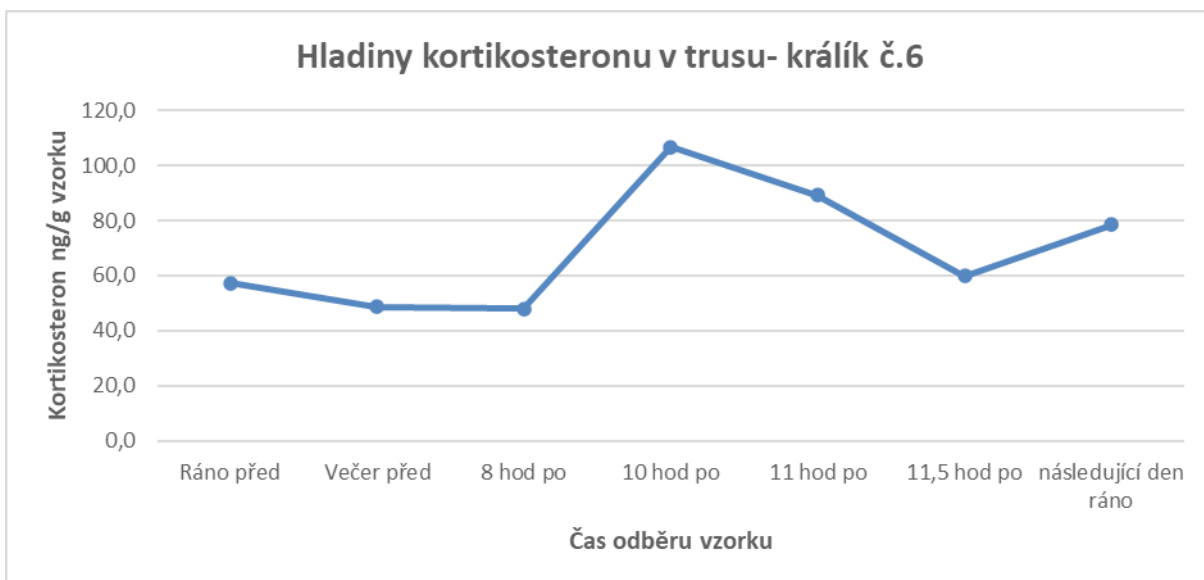
U králíka č. 4 byly pozorovány vyšší hladiny ranních vzorků před stresem než u ostatních králíků. Ve vzorcích odebíraných 6-12 hodin po stresoru došlo k výraznějšímu nárůstu hodnot 9 hodin po stresoru s postupným snižováním v době předpokládaného peaku. Ranní vzorek z následujícího dne měl nejvyšší hodnotu z analyzovaných vzorků, proto předpokládáme pozdější peak u tohoto jedince.

Graf č. 5. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 5



U králíka č. 5 nebylo zaznamenáno zvýšení hodnot během sledovaného rozmezí 6-12 hodin po působení stresoru, hodnoty byly srovnatelné s ranními hodnotami před působením stresoru. Následující ranní vzorek vykazoval výrazný nárůst hodnoty, proto předpokládáme, že k peaku hladin kortikosteronu došlo až po 12 hodinách po působení stresoru.

Graf č. 6. Testování hladiny kortikosteronu u králíka č. 6



U králíka č. 6 došlo k největšímu nárůstu hodnot 10 hodin po působení stresoru. Následující vzorky vykazovaly postupné snižování hodnot a následující ranní vzorek vykazoval stále zvýšené hodnoty oproti ranním vzorkům před působením stresoru.

Večerní vzorky trusu před působením stresoru u všech králíků vykazovaly nižší hladiny kortikosteronu než ranní vzorky. Odběr vzorků byl ukončen po 12 hodinách po působení stresového podnětu z důvodu, že již nedošlo do večerních hodin k defekaci a abychom nenarušovali přirozený chod v chovu, pokračovali jsme s odběrem druhý den ráno. Všichni sledovaní králíci reagovali zvýšenou sekrecí kortikosteronu na stresový podnět, pouze

u králíka č. 1 byl zachycen peak hladin v námi předpokládané době peaku. U králíka č. 2, 4 a 5 předpokládáme peak v pozdějších hodinách po působení stresoru (12-24 hod). U králíka č. 3 a 6 došlo k významnému zvýšení hladin během sledovaného intervalu, mimo časové období peaku a k opětovnému mírnému nárůstu hodnot následující den ráno. Peak u těchto dvou králíků tedy předpokládáme dříve než po 12 hodinách od stresoru.

Diskuze

V posledních dvou desetiletích povědomí veřejnosti o welfare hospodářských zvířat se rozšířilo do celého světa (Maria, 2006; Blokhuis et al., 2008; You et al., 2014). Koncept pohody zvířat je velmi složitý a je definován jako stav, ve kterém zvíře přežívá jako plně fyzicky a psychicky zdravý jedinec, který je schopen úspěšně se vyrovnávat s podmínkami prostředí (Hughes, 1976; Broom, 1986). Stále diskutovanou otázkou ale je, jak definovat dobré životní podmínky zvířat. Potencionálním ukazatelem dobrých životních podmínek a tím dobrého welfare zvířat je absence stresu (Hofer and East, 1998). Je známo, že stres má negativní dopad nejen na růst zvířat, ale také na jejich produkci, reprodukci nebo náchylnost k nemocem (Kumar et al., 2012).

Buijs et al. (2011) použili měření koncentrace metabolitů glukokortikoidů v králíčím trusu jako neinvazivní indikátor stresu. Párové vzorky trusu byly odebírány individuálně propadem na tácy, u králíků umístěných individuálně v kleci. První vzorek byl odebrán 18–8 hodin před stresovým vlivem. Vzorek po stresovém vlivu byl odebrán 6-18 hodin po působení stresoru, kdy se předpokládá, že hodnoty metabolitů glukokortikoidů v trusu dosahují píku 12 hodin po působení akutního stresoru.

Některé studie použily zvýšené koncentrace glukokortikoidů k definování chronického stresu (Mendoza et al., 2000). Malé změny v bazálních koncentracích glukokortikoidů způsobené chronickým stresem nejsou detekovatelné analýzou vzorku krve, ale mohou být detekovány kvantifikací metabolitů glukokortikoidů v trusu (Mormede et al., 2007).

Pro naši studii jsme vybrali neinvazivní metodu stanovení míry stresové zátěže pomocí detekce metabolitů glukokortikoidů v trusu. Králíci byli chováni individuálně v obohacených klecích s přírodním okusem. Testována byla situace běžně se vyskytující v chovu, které se nelze vyvarovat, a to manipulace s králíkem, kontrola zdravotního stavu, přemístění z klece do přepravky a návrat na původní stanoviště. Jednalo se tedy o akutní stresovou zátěž, na kterou nejsou králíci zvyklí na denní bázi. Byla stanovena bazální hladina kortikosteronu v trusu u jednotlivých králíků individuálně. S králíky nebylo nijak manipulováno 7 dní před odběrem prvních vzorků, abychom mohli co nejpřesněji určit bazální hodnoty a vliv akutního stresového podnětu na hladiny kortikosteronu v trusu. Ačkoliv individuální rozdíly metabolitů glukokortikoidů v trusu jsou většinou velké, použití jednotlivých zvířat jako vlastní kontroly může redukovat tento vliv (Palme et al., 1999). Námi provedená studie prokázala, že i podnět působící pouze 30 minut má výrazný vliv na hodnoty kortikosteronu v trusu a že i běžné úkony v chovu mohou být pro králíky významným akutním stresorem.

Závěr

Metoda stanovení metabolitů glukokortikoidů v trusu je u králíků vhodná ke zhodnocení welfare, jelikož se jedná o metodu neinvazivní, zatímco samotný odběr krve by byl pro králíka velice stresující a výsledky by byly manipulací zkreslené. Stanovení bazální koncentrace metabolitů glukokortikoidů v trusu může být užitečnou pomůckou při hodnocení chronického stresu a na základě výsledků můžeme vyhodnotit úroveň welfare v chovu. Rovněž můžeme analýzou párových vzorků trusu monitorovat vliv úkonů běžně se vyskytujících v chovu, jakožto akutních stresorů a tím vyjádřit míru stresu při provádění jednotlivých úkonů.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Argente M.J., De Laluz García, M., Birlanga, V., Muelas, R. 2014. Relationship between cortisol and acute phase protein concentrations in female rabbits. *The Veterinary Journal* 202: 172-175.
- Baumans, V. 2005. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits and research. *ILAR Journal* 46: 162-170.
- Beattie, V.E., O'Connell, N.E., Kilpatrick, D.J., Moss, B.W. 2000. Influence of environmental enrichment on welfare-related behavioural and physiological parameters in growing pigs. *Animal Science* 70: 443-450.
- Belz, E.E., Kennell, J.S., Czambel, R.K., Rubin, R.T., Rhodes, M.E. 2003. Environmental enrichment lower stress-responsive hormones in singly housed male and female rats. *Pharmacology Biochemistry and Behaviour* 76: 481-486.
- Blokhuis, H.J., Keeling, L.J., Gavinelli, A., Serratos, J., 2008. Animal welfare's impact on the food chain. A review. *Trends in Food Science and Technology* 19: S79-S87.
- Boioti, C., Yalow, R.S. 1978. Corticosteroid response of rabbits and rats to exogenous ACTH. *Endocrine Research Communication* 5: 21-33.
- Buijs, S., Keeling, L.J., Rettebacher, S. 2011. Glucocorticoid metabolites in rabbit faeces- Influence of environmental enrichment and cage size. *Physiology and Behaviour* 104: 469-473.
- Comin, A., Zufferli, V., Peric, T., Cavavese, F., Bardetta, D., Prandi, A. 2012. Hair cortisol levels determined at different body sites in the new zealand white rabbit. *World Rabbit Science* 20: 149-154.
- Drescher, B. 1992. Housing of rabbits with respect to animal welfare. *Journal of Applied Rabbit Research* 15: 678-683.
- Elsasser, T.H., Klesing, K.C., Filipoy, N., Thompson, F. 2000. Metabolic consequences of stress. In: Moberg, G. P., Mench, J. A. (Eds.). *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*, CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 77-110.
- Hofer, H.; East, M. L. 1998. Biological conservation and stress. *Advances in the Study of Behaviour*. 27: 405-525.
- Hughes, B.O. 1976. Behaviour as and index of welfare. *Proceedings of the 5th European Poultry Conference*. Malta Branch: World Poultry Science Association 1005-1018.
- Kumar, B., Manuja, A., Aich, P. 2012. Stress and its impact on farm animals. *Frontiers in Bioscience E4*: 1759-1767.
- Lane, J. 2006. Can non-invasive glucocorticoid measures be used as reliable indicators of stress in animals? *Animal Welfare* 15: 331-342.
- Liste, M.G., María G.A., García-Belenguer S., Chacón, G., Gazzola, P., Villarroel, M. 2008. The effect of transport time, season and position on the truck on stress response in rabbit. *World Rabbit Science* 16: 229-235.
- Maertens, L., De Groote, G. 1984. Influence of the number of fryer rabbits per cage on their performance. *Journal of Applied Rabbit Research* 7: 151-155.
- María, G.A., 2006. Public perception of farm animal welfare in Spain. *Livestock Science* 103: 250-256.
- Meijer, M.K., Sommer, R., Spruijt, B.M., Van Zutphen, L.F.M., Baumans, V. 2007. Influence of environmental enrichment and handling on the acute stress response in individually housed mice. *Laboratory Animals* 41: 161-173.
- Mendoza, S.P., Capitano, J.P., Mason, W.A. 2000. Chronic social stress: studies in non-human primates. In: Moberg GP, Mench JA, editors. *The biology of animal stress*. CABI Publishing, pp. 227-247.

- Mormede, P., Andanson, S., Auperin, B., Beerda, B., Guemene, D., Malmkvist, J. et al. 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behaviour* 92: 317-339.
- Möstl, E., Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology* 23: 67-74.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: An overview. *The Veterinary Journal* 168: 28-40.
- Onbasilar, E.E., Onbasilar, I. 2007. Effect of cage density and sex on growth, food utilization and some stress parameters of young rabbits. *Scandinavian Journal of Laboratory Animal Science* 34: 189-195.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S.M., Mostl, E. 2005. Stress hormones in mammals and birds - comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Academy of Science* 1040: 162-171.
- Palme, R., Robia, C., Messman, S., Hofer, J., Mostl, E. 1999. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminant: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift* 86: 237-241.
- Pohle, K., Cheng, H.W. 2009. Comparative effects of furnished and battery cages on egg production and physiological parameters in white leghorn hens. *Poultry Science* 88: 2042-2051.
- Podberscheck, A.L., Blackshaw, J.K., Beattie, A.W. 1991. The behaviour of group penned and individually caged laboratory rabbits. *Applied Animal Behaviour Science* 28: 365-373.
- Rampin, F., Piccirillo, A., Schiavon, E., Poppi, L., Grilli, G. 2008. Detection of pathological lesions in slaughtered rabbits. *Italian Journal Animal Science* 7: 105-111.
- Salak, J.L., Mcglone, J.J., Lyte, M. 1993. Effects of in vitro adrenocorticotrophic hormone, cortisol and human recombinant interleukin-2 on porcine neutrophils migration and luminol-dependent chemiluminescence. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 39: 327-337.
- Spooler, H.A.M., Burbidge, J.A., Edwards, S.A., Simmins, P.H., Lawrence, A.B. 1996. Effect of food level and straw bedding during pregnancy on sow performance and responses to an acth challenge. *Livestock Production Science* 47: 51-57.
- Stauffacher, M. 1992. Group housing and enrichment cages for breeding, fattening and laboratory rabbits. *Animal Welfare* 1: 105-125
- Szendro, Z., Luzi, F. 2006. Group size and stocking density. Maertens, L., Coundert, P. (Eds.): *Recent advances in rabbit sciences, institute for agriculture and fisheries research, melle*, pp. 121-126.
- Szeto, J., Gonzales, J.A., Spitzer, S.B., Levine, J.E., Zaias, J., Saab, P.G. et al. 2004. Circulating levels of glucocorticoid hormones in whhl and nzw rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology* 29: 861-866.
- Touma, C., Palme, R., Sachser, N. 2004. Analyzing corticosterone metabolites in fecal samples of mice: a noninvasive technique to monitor stress hormones. *Hormones and Behavior* 45: 10-22.
- Turner, A.I., Hemsworth, P.H., Tilbrook, A.J. 2005. Susceptibility of reproduction in female pigs to impairment by stress or elevation of cortisol. *Domestic Animal Endocrinology* 29: 398-410.
- Van de Weerd, H.A., Day, J.E.L. 2009. A review of environmental enrichment for pigs housed in intensive housing systems. *Applied Animal Behaviour Science* 116: 1-20.
- Verga, M., Luzi, F., Carezzi, C. 2007. Effects of husbandry and management system on physiology and behaviour of farmed and laboratory rabbits. *Hormones and Behaviour* 52: 122-129.
- Whary, M., Peper, R., Borkowski, G., Lawrence, W., Ferguson, F. 1993. The effects of group housing on the research use of the laboratory rabbit. *Laboratory Animals* 27: 330-341.

You, X., Li, Y., Zhang, M., Yan, H., Zhao, R. 2014. A survey of Chinese citizens' perceptions on farm animal welfare. *PLoS One* 9: e109177.

Screening incidence cystinurie u vybraných plemen psů z pohledu dopadu na jejich welfare

Simona Kovaříková, Petr Maršálek, Jana Blahová, Kateřina Vrbová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Cystinurie je dědičná metabolická porucha, při které je narušen mechanismus reabsorbce cystinu v proximálních tubulech a dochází tak k vylučování nadměrného množství cystinu do definitivní moči. Tato porucha byla v současnosti popsána u již více než 70 plemen psů. Cílem této práce bylo vyvinout a validovat novou metodu pro stanovení cystinu v moči a metodu dále aplikovat na reálné vzorky moči psů a srovnat výsledky stanovení cystinu v moči ve skupině plemene irských teriérů s výsledky získanými od různých plemen. Vyvinutá metoda využívá vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií s ionizací vyhříváním elektrosprejem. Metoda dále využívá derivatizaci dansylchloridem. Takto koncipovaná metoda nabízí dostatečnou mez detekce (0,036 mg/l moči). Zároveň poskytuje dostatečný dynamický rozsah proto, aby bylo možné stanovit koncentrace cystinu až 1000 mg/l bez úpravy ředícího schématu. Metoda byla aplikována na sérii vzorků moči psů. Při srovnání výsledků stanovení cystinu v moči od plemene irský teriér s ostatními plemeny byla zjištěna statisticky významně vyšší koncentrace cystinu u psů plemene irský teriér ve srovnání s fenami plemene irský teriér ($p < 0,01$) a se psy ($p < 0,05$) a fenami ostatních plemen ($p < 0,01$). Celkově u 6 psů z 15 vyšetřených psů plemene irský teriér byla překročena hraniční koncentrace cystinu pro cystinurii.

Úvod

Cystinurie je dědičná metabolická porucha definovaná jako selektivní defekt transportu cystinu a dibazických aminokyselin (ornitinu, lyzinu a argininu) v renálních tubulech. Cystinurie byla u psů jako vrozená porucha popsána již v roce 1823 (Lassaigne, 1823).

Aminokyselina cystin je normálně v malém množství přítomná v plazmě a je volně filtrována v glomerulech. Většina filtrovaného cystinu je aktivně reabsorbována v proximálních tubulech. Při cystinurii je tento transportní mechanismus narušen a tak dochází k vylučování nadměrného množství cystinu do definitivní moči. Nicméně plazmatické koncentrace cystinu jsou u postižených psů typicky v normě. Za určitých podmínek může cystin v moči krystalizovat a vést ke vzniku močových kamínků, které jsou odpovědné za klinické příznaky.

Cystinurie byla v současnosti popsána u již více než 70 plemen psů. Mezi nejčastěji postižovaná plemena patří podle statistik Minnesota Urolith Center anglický buldok (20 %), kříženci (13 %), jezevčík (10 %), mastif, baset, novofundlandský pes (5 %), stafordširský bulteriér (3 %) a francouzský buldoček (2 %). Mezi další zmiňovaná plemena patří také australský honácký pes, basenji, bišonek, border kolie, bulmastif, čivava, německá doga, jack russel teriér, lhasa apso, maltézský psík, trpasličí pinč, malý pudl, malý knírač, pitbulterirér, krysařík, rotvajler, skotský jelení pes, shih-tzu, silky teriér, welsh corgi a yorkshirský teriér (Osborne et al., 1999). Prevalence cystinové urolitiázy se liší podle geografické lokalizace, přičemž obecně patří mezi málo časté typy urolitiázy. U psů ve Spojených státech se pohybuje v rozmezí 1-3 % (Bovee and McGuire, 1984; Ling and Ruby, 1986; Osborne et al., 2009), ve Švédsku 8,5 % (Wallerstrom et al., 1992), ale v některých centrech Evropy až 39 % (Hicking et al., 1981). Takto významné rozdíly mezi výsledky jednotlivých studií mohou být dány větší

popularitou plemen predisponovaných k cystinurii v těchto zemích. V České republice se prevalence cystinové urolitiázy pohybuje kolem 5 % (Sosnar et al., 2005). Průměrný věk psů s cystinovou urolitiázou je 4-6 let, dominantně jsou postižováni samci (98 %) ve srovnání se samicemi (2 %). Výjimkou se v tomto směru zdají být novofundlandští psi, u nichž se cystinová urolitiáza objevuje v nižším věku (i u mladších jednoho roku) a obě pohlaví jsou postižena rovnoměrně (Osborne et al., 1999).

Za cystinurii jsou zodpovědné dva geny – SLC3A1 a SLC7A9 (SLC superrodina – solute carrier family – kóduje membránové transportéry). Mutace v těchto genech tak vede k defektu transportu. Dědičnost cystinurie u psů je poměrně heterogenní, v současnosti je cystinurie klasifikována do 3 typů (Tabulka 1).

Tabulka č. 1. Klasifikace psí cystinurie

fenotyp	Typ IA	Typ IIA	Typ IIB	Typ III
dědičnost	autozomálně recesivní	autozomálně dominantní	autozomálně dominantní	závislá na pohlaví
mutace genu	SLC3A1	SLC3A1	SLC7A9	neurčeno
pohlaví	psi a feny	psi a feny	psi a feny	intaktní dospělí psi ano
závislost na androgenech	ne	ne	ne	ano
plemena	novofundlandský pes, labrador	australský honácký pes	trpasličí pinč	mastiff a příbuzná plemena, skotský jelení pes, irský teriér

Krystaly cystinu v moči jsou typicky bezbarvé, ploché, hexagonální destičky, které se mohou vyskytovat jednotlivě nebo ve shlucích. Cystinové urolity jsou typicky hladké, sférické a jejich velikost se pohybuje v rozmezí od 1 mm až po více než 3 cm v průměru. U postižených psů se obvykle vyskytují ve větším počtu. Při rentgenografickém posouzení vykazují urolity střední radiodenzitu (jsou méně radiodenzní než kalcium oxaláty a struvity, ale radiodenznější než uráty). Cystinové urolity se většinou (98 %) nacházejí v dolních cestách močových (močovém měchýři a uretře). Právě přítomnost v močovém traktu je odpovědná za klinické příznaky – hematurii, dysurii, strangurii a případně obstrukci močové trubice s následnou anurií. Běžné jsou i rekurentní infekce močového traktu. Psi s cystinurii ale bez močových kamenů klinické příznaky postižení močového traktu nemají (Osborne et al., 1999).

Diagnostika cystinurie u psů je založena na detekci urolitů a následném určení jejich minerálního typu nebo nálezu krystalů při vyšetření močového sedimentu. U postižených psů bez urolitů a krystalurie může být diagnostika komplikovanější. V minulosti se hojně vyžíval kyanid-nitroprusidový test (Brandův test) (Kachmar et al., 1987). V současnosti se preferuje kvantitativní stanovení pomocí COLA testu (stanovení koncentrace cystinu, ornithinu, lysinu a argininu v moči). U některých plemen je možné využít specifický genetický test pro určení konkrétní mutace. Bohužel vzhledem k počtu postižených plemen není tato možnost dostupná u všech.

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat metodu pro stanovení cystinu v moči a dále zjistit koncentrace cystinu v moči psů – konkrétně ve skupině irských teriérů a srovnat s výsledky získanými od různých plemen.

Materiál a metodika

Do studie byli zařazeni klinicky zdraví psi – zástupci plemene irský teriér a zástupci ostatních plemen. Majitelé irských teriérů byli osloveni prostřednictvím chovatelského klubu, vzorky od ostatních plemen psů byly získány v klinické praxi, případně na požádání. Všichni se studie účastnili dobrovolně. Vzorky moči byly od psů odebírány spontánní mikcí. Po odběru bylo provedeno základní klinické vyšetření moči, které spočívalo ve zjištění hustoty pomocí refraktometru, posouzení chemických vlastností moči (pH, bílkovina, glukóza, ketolátky, urobilinogen, bilirubin, krev, HeptaPHAN, Erba Lachema) a vyšetření močového sedimentu připraveného standardním postupem. Vzorky moči byly poté zamrazeny a uchovány do další analýzy. Do studie bylo zařazeno celkem 50 vzorků od 50 různých psů. Jednalo se o 23 irských teriérů a 27 zástupců ostatní plemen. Ve druhé skupině byla tato plemena: kříženci (4), australský ovčák (3), border kolie (2), německý krátkosrstý ohař (2) a po jednom maďarský ohař, novofundlandský pes, dalmatin, rhodézský ridgeback, belgický ovčák malinois, vipet, střední knírač, Nova Scotia Duck Tolling Retriever, výmarský ohař, labrador, yorkshirský teriér, Parson Russel teriér, Jack Russel teriér, královský pudl, hovawart a sibiřský husky. Bližší charakteristika skupin je uvedena v tabulce 2. Stanovení kreatininu bylo provedeno pomocí komerčního kitu (Biovendor, ČR) na přístroji Konelab 20i (Thermo Scientific, USA).

Tabulka č. 2. Charakteristika skupin psů, od kterých pochází vzorky moči

	Skupina irských teriérů	Skupina ostatní plemen
n	23	27
psi / z toho kastrování	15/3	15/4
feny / z toho kastované	8/1	12/2
průměrný věk (roky)	3,9	6,0
věkové rozmezí	9 měsíců – 9 let	1-14,5 let

Standard cystinu, izotopicky značený standard cystin- C^{13}_2 , hydroxid sodný, hydrogen uhličitán sodný, dansyl chlorid, mravenčan amonný a vodný roztok amoniaku (25 %) byly zakoupeny u Sigma–Aldrich (USA). Methanol, acetonitril a aceton byly LC/MS čistoty (Chromservis, s.r.o., CZ). Deionizovaná voda byla vyrobena přístrojem Milli-Q (Milipore, USA). Zásobní roztoky standardů cystinu a cystin- C^{13}_2 o koncentraci 50 mg/l byly připraveny rozpuštěním přesně naváženého množství v deionizované vodě. Pracovní roztoky standardů o koncentraci 4 mg/l použité pro záznam spekter a optimalizaci hmotnostního spektrometru byl připraveny ředěním zásobních roztoku s deionizovanou vodou. Kalibrační roztoky standardů o koncentraci 1,25; 5,0; 12,5 a 25 mg/l byly připraveny ředěním zásobních roztoku s deionizovanou vodou. Roztok hydrogenuhlíčitanového pufru (100 mM; pH=8,9) byl připraven rozpuštěním hydrogen uhličitánu sodného a úpravou pH pomocí 1M roztoku hydroxidu sodného. Roztok dansyl chloridu (1 mg/ml) byl připraven vážením a rozpuštěním dansyl chloridu v acetonu. Roztok amoniakálního pufru (5 mM; pH=8,9) byl připraven rozpuštěním mravenčanu amonného v deionizované vodě a úpravou pH pomocí 8 % roztoku amoniaku.

Pro každý vzorek moči bylo do 3 skleněných zkumavek (10 ml) pipetováno 50, 100 a 300 μ l vzorku moči, dále bylo přidáno 100 μ l roztoku izotopicky značeného interního standardu cystin- C^{13}_2 (50 mg/l v deionizované vodě) a vzorek byl doplněn deionizovanou vodou na objem 2 ml. Takto naředěný vzorek byl dále použit k přečištění pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Pro extrakci na pevné fázi byly použity kolonky Oasis WAX (3ml, 60mg, 30 μ m) (Waters, USA). Kolonky byly nejprve propláchnuty 1 ml methanolu do sucha a dále 1 ml deionizované vody do sucha. Na takto připravené kolonky byl nanesen naředěný vzorek

(1 ml) a kolonky byly opět vysušeny. Následně byl cystin eluován do skleněných zkumavek (10 ml) methanolem (1 ml) a odpařen pod proudem dusíku (40 °C). Poté bylo do zkumavky přidáno 0,3 ml hydrogenuhlíčanového pufru (pH=8,9) a 0,3 ml roztoku dansyl chloridu v acetonu, zkumavky byly zakryty parafilmem a vzorek byl 30 min derivatizován při 70 °C. Roztok byl následně odpařen pod proudem dusíku (40 °C) a vzorek byl rekonstituován v 1 ml methanolu, filtrován přes stříkačkový nylonový filtr (0,22 µm) (Millipore, USA) a použit k LC/MS analýze.

Sestava LC/MS se skládala z kvartérní chromatografické pumpy Thermo Scientific UHPLC Accela 1250 (Thermo Scientific, USA), autosampleru CTC PAL (CTC Analytics AG, Švýcarsko) vybaveného 100-µl dávkovací stříkačkou, 6-cestným dávkovacím ventilem se 2-µl dávkovací smyčkou, hmotnostního spektrometru s trojitým kvadrupolem Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX vybaveného ionizací vyhřívaným elektrosprejem (HESI-II). Celý systém LC/MS byl řízen softwarem Thermo Scientific Xcalibur 2.0. Chromatografická kolona byla Titan C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.9 µm) od Supelco (USA). Mobilní fáze se skládala z vodného roztoku amoniakálního pufru (5 mM; pH=8,9) (A) a methanolu (B). Byl použit gradient s následujícími parametry: 0–2 min lineární gradient z 20 na 95 % B; 2–8 min drženo na 95 % B; 8–8,4 min z 95 na 20% B a 8,4–9 min drženo na 20% B. Objem injektovaného vzorku byl 2 µL. Po chromatografické separaci byly analyty uvedeny do iontového zdroje. Vyhřívaný elektrosprej pracoval za následujících podmínek: teplota 300,0 °C; “sheath gas” tlak 35,0 psi; “Auxiliary gas” tlak 10 a.u.; napětí 3300 V. Optimalizované iontové přechody pro dvojnásobný dansyl derivát cystinu a cystin-C¹³₂ jsou uvedeny v Tabulce 3. Kalibrace byla provedena metodou interního standardu s využitím izotopicky značeného cystin-C¹³₂.

Tabulka č. 3. Optimalizované iontové přechody pro dvojnásobný dansyl derivát cystinu a cystin-C¹³₂

Látka	Prekurzorový iont	polarita	Produktový iont	Kolizní energie (V)
Dansyl ₂ -cystin	707,4	+	169,1	34
			170,1	41
			*355,2	26
			428,2	21
			Dansyl ₂ - cystin-C ¹³ ₂	709,4
			203,4	28
			*356,2	26
			475,3	26

*Produktové ionty vybrané pro kvantifikaci

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programů Statistica 8.0 pro Windows (StatSoft, Inc., USA) a Microsoft Excel (Microsoft, USA). Jednotlivé soubory dat byly nejprve testovány na normalitu pomocí Shapiro-Wilk testu. Rozdíl mezi jednotlivými skupinami byl testován pomocí vícevýběrového mediánového testu. Statistická významnost byla stanovena pro hodnotu $p < 0,05$. K jednotlivým souborům dat byly spočítány základní popisné charakteristiky (průměr, medián, výběrová směrodatná odchylka, relativní směrodatnou odchylka a střední chyba průměru)

Výsledky

Vývoj a validace metody

Studie ionizace a fragmentace pro cystin a cystin- C^{13}_2 byly prováděny jak v pozitivním, tak v negativním módu. Ionizace byla studována pro cystin a cystin- C^{13}_2 po derivatizaci s dansyl chloridem a s využitím vyhřívaného elektrospreje (HESI) i chemické ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Hmotnostní spektra byla měřena ve fullscan módu prvního kvadrupólu pomocí dávkování standardního roztoku přes smyčku (1 mg/l; 5 μ l) do proudu mobilní fáze (methanol/voda; 50/50; v/v; 200 μ l/min) a následně přímo do iontového zdroje hmotnostního spektrometru. Ionty s výrazně vyššími intenzitami byly získány v pozitivním módu jak pro HESI, tak pro APCI. Ve spektrech byly nalezeny očekávané ionty, a to především protonované $[M+H]^+$ a deprotonované $[M-H]^-$ pseudomolekulové ionty odpovídající jednonásobně dansylovanému cystinu (dansyl-cystin), resp. dvojnásobně dansylovanému cystin- C^{13}_2 (dansyl-cystin- C^{13}_2) a dvojnásobně dansylovanému cystinu (dansyl₂-cystin), resp. dvojnásobně dansylovanému cystin- C^{13}_2 (dansyl₂-cystin- C^{13}_2). Optimalizace iontových přechodů byla provedena s využitím infuze standardních roztoků (2 μ g/mL; 20 μ L/min) do proudu mobilní fáze (methanol/voda; 50/50; v/v; 200 μ L/min). Tabulka 3 obsahuje údaje optimalizovaných iontových přechodů pro dansyl₂-cystin, resp. dansyl₂-cystin- C^{13}_2 . Pro výběr konkrétního způsobu ionizace bylo provedeno hodnocení citlivosti, přístrojové meze detekce. Jako ionizace s nižší mezí detekce a větší citlivostí se ukázal vyhřívaný elektrosprej (HESI).

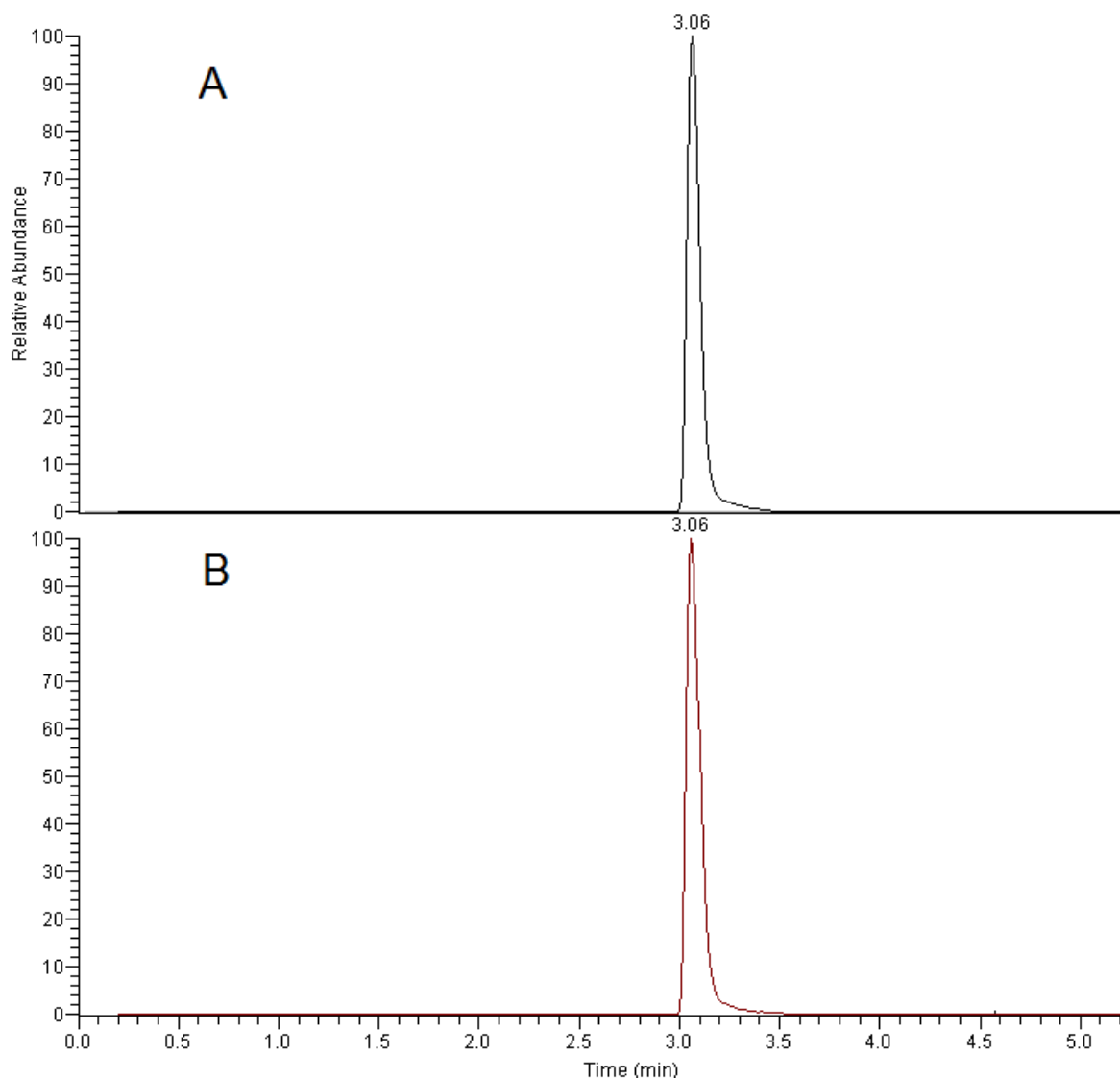
Při chromatografické separaci byl jako silná eluční složka zvolen methanol, který ve srovnání s testovaným acetonitrilem zajišťoval optimální retenční charakteristiky pro dansyl₂-cystin, resp. dansyl₂-cystin- C^{13}_2 . Pro dosažení optimálních retenčních charakteristik bylo také optimalizováno pH vodné složky mobilní fáze, které je pH=8,9 a je zajištěno amoniakálním puferem. Výsledný program gradientové eluce tvořený methanolem a vodným roztokem amoniakálního pufru zajišťuje dostatečnou retenci i ostrost píku (Obrázek 1).

Pro stanovení cystinu byla zvolena derivatizace dansylchloridem proto, aby bylo dosaženo optimálních retenčních a ionizačních a charakteristik. Při samotné derivatizaci vznikaly jak jednonásobně, tak i dvojnásobně dansylované deriváty cystinu. Z toho důvodu bylo optimalizováno pH, teplota a čas derivatizace tak, aby bylo dosaženo maximalizace množství vzniklého dvojnásobně dansylovaného derivátu cystinu. Výsledné hodnoty podmínek derivatizace jsou pH=8,9; teplota $t=70$ °C a doba derivatizace 30 minut. Pro přípravu vzorku byly vybrány SPE kolonky Oasis Wax, které obsahují ve vodě smáčitelný sorbent tvořený navázanými slabými anexovými skupinami. Kolonky jsou určeny pro jednoduchou a selektivní přípravu vzorků při stanovení kyselých sloučenin.

Jako kalibrační model byla zvolena metoda interního standardu s využitím izotopicky značeného cystin- C^{13}_2 . Tato metoda umožňuje kompenzovat a minimalizovat vlivy extrakční výtěžnosti i matričního efektu na konečný výsledek stanovení.

Souhrnné výsledky validace jsou uvedeny v Tabulce 4. Matriční efekt (ME) byl vyhodnocen na základě post-extrakčního standardního přídatku. Pět vzorků moči bylo doplněno standardním přídatkem izotopicky značeného cystin- C^{13}_2 o cílové koncentraci v moči 80 mg/l. Matriční efekt byl vypočítán podle rovnice $ME (\%) = (B/A - 1) \times 100$, kde A je plocha píku čistého standardu a B je plocha píku post-extrakčního standardního přídatku. Výtěžnost extrakce (RE) byla vyhodnocena metodou pre-extrakčního přídatku. Pět vzorků moči bylo doplněno standardním přídatkem izotopicky značeného cystin- C^{13}_2 o cílové koncentraci v moči 80 mg/l. Výtěžnost extrakce byla vypočítána podle rovnice $RE (\%) = C/B \times 100$, kde C je plocha píku pre-extrakčního standardního přídatku a B je plocha píku post-extrakčního standardního přídatku. Procesní účinnost byla vypočítána podle rovnice $PE (\%) = C/A \times 100$.

Obrázek č. 1. Chromatogram vzorku moči: dansyl₂-cystin (A) a dansyl₂-cystin-C¹³₂ (B)



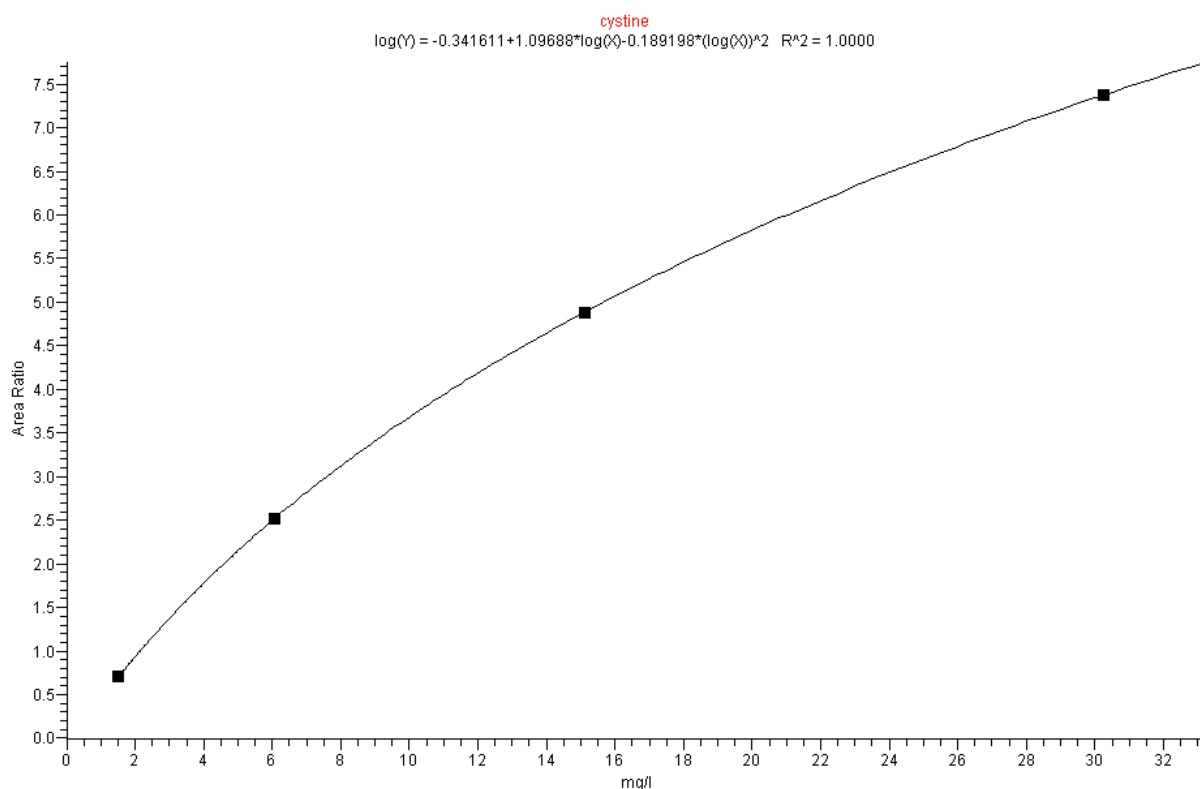
Pro stanovení linearity byly ředěné vzorky moči doplněny standardním přídatkem ve čtyřech různých cílových koncentračních úrovních (1,25; 5,0; 12,5 a 25 mg/l). Vzhledem k tomu, že metoda nebyla v testovaném rozsahu lineární, byla jako kalibrační model zvolena logaritmická závislost na logaritmu kvadratické funkce (Obrázek 2). Mez detekce (LOD) byla stanovena jako hodnota poměru signál/šum (S/N) rovna 3. Mez stanovitelnosti byla stanovena jako hodnota poměru signál/šum (S/N) rovna 10. Hodnoty S/N byly vypočítány na základě poměru ploch píků analytu a ploch píků šumu stanoveného pomocí matricového slepého pokusu.

Za účelem stanovení preciznosti a pravdivosti byl vzorek moči doplněn standardním přídatkem cystinu o cílové koncentraci v moči 80 mg/l. Opakované stanovení (n=10) koncentrací cystinu v takto připravených vzorcích bylo provedeno během dvou dnů. Preciznost byla vyjádřena jako relativní směrodatná odchylka a vypočítána jako poměr směrodatné odchylky a průměru všech měření. Pravdivost měření (%) byla vyhodnocena jako poměr odchylky průměru všech měření od hodnoty standardního přídatku a hodnoty standardního přídatku.

Tabulka č. 4. Výsledky validace metody stanovení cystinu v moči

Parametr metody	výsledek
Přístrojový LOD (pg)	12
LOD (mg/l moči)	0,036
LOQ (mg/l moči)	0,12
Výtěžnost extrakce (%)	79,7
Matriční efekt (%)	-13,6
Procesní účinnost (%)	68,8
Preciznost (%)	8,6
Pravdivost (%)	-5,1

Obrázek č. 2. Příklad kalibrace pro dansyl₂-cystin s využitím interního standardu, kterým byl dansyl₂-cystin-C¹³₂



Výsledky stanovení cystinu v moči psů

Výsledky stanovení cystinu v moči psů jsou souhrnně uvedeny v Tabulce 5. Cystin byl detekován u všech vyšetřených vzorků moči. Pomocí vícevýběrového mediánového testu byla zjištěna statisticky významně vyšší koncentrace cystinu u psů plemene irský teriér ve srovnání s fenami plemene irský teriér ($p < 0,01$) a se psy ($p < 0,05$) a fenami ostatních plemen ($p < 0,01$). Celkově u 6 psů z 15 vyšetřených psů plemene irský teriér byla překročena hraniční koncentrace cystinu pro cystinurii, která je 178 mg/g kreatininu (Brons et al. 2013). Dále už byla tato hranice překročena jen u jednoho psa plemene jack russel teriér a jednoho psa plemene německý krátkosrstý ohař.

Tabulka č. 5. Koncentrace cystinu ve vzorcích moči (mg/g kreatininu)

	irský teriér		ostatní plemena	
	psi	feny	psi	feny
	60,2	13,6	18,0	5,25
	23,4	10,1	8,39	8,43
	21,3	22,1	18,6	9,99
	35,8	3,52	17,4	8,76
	*240	17,2	8,58	15,0
	*409	11,1	11,6	7,65
	162	12,0	10,4	9,58
	*239	9,91	*318	17,8
	*366		38,7	13,5
	45,2		11,3	8,19
	45,0		10,9	4,51
	59,9		8,68	19,8
	9,12		*192	
	*299		11,8	
	*346		97,4	
průměr	157	12	52	11
medián	60,2	11,5	11,8	9,17
SD	145	5,50	88,6	4,79
RSD	92,0	44,2	170,1	44,8
SEM	37,4	1,94	22,9	1,38

*Výsledky překročily hranici pro cystinurii (178 mg/g kreatininu).

SD je výběrová směrodatná odchylka

RSD je relativní směrodatná odchylka (%)

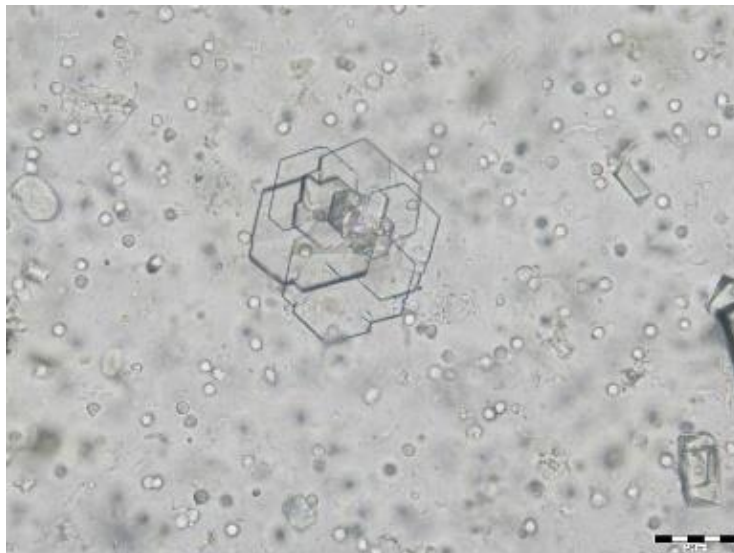
SEM je střední chyba průměru

Diskuze

I když je cystinová urolitiáza psů spíše minoritní problém ve srovnání s ostatními minerálními typy, u některých plemen incidence stoupá. Příkladem může být irský teriér, u něhož se v posledních letech objevuje v České republice více postižených jedinců. To byl důvod, proč bylo zvoleno pro studii právě toto plemeno. Jako kontrolní skupina potom pak slouží psi různých plemen. Zástupci těchto plemen byli voleni zcela náhodně, ve skupině jsou tak i plemena, u nichž byla v minulosti cystinurie popsána. Diagnostika cystinurie u psů bez urolitiázy nemusí být vždy přímočará, neboť taková psi nemají klinické obtíže. Majitelé tak nejsou k diagnostice nuceni, genetická vyšetření jsou dostupná pouze pro některá plemena a povinná vyšetření na detekci cystinurie se požadují pouze v některých chovatelských klubech (Brons et al., 2013). Většina chovatelů ale nemá o existenci tohoto onemocnění ani ponětí.

Nejsnazší metodou pro zjištění cystinurie je klasické vyšetření moči a močového sedimentu. Nález typických bezbarvých plochých hexagonálních krystalů je pro cystinurii patognomický (Obrázek 3), tyto krystaly se u nepostižených jedinců nevyskytují (Osborne et al., 1999). Absence krystalů ale cystinurie nevylučuje. To se potvrdilo v naší studii – i přes nález vysokých koncentrací cystinu v moči u 8 psů, nebyla u žádného zjištěna cystinová krystalurie, v sedimentu byly pozorovány pouze struvitové a kalciumoxalátové krystaly

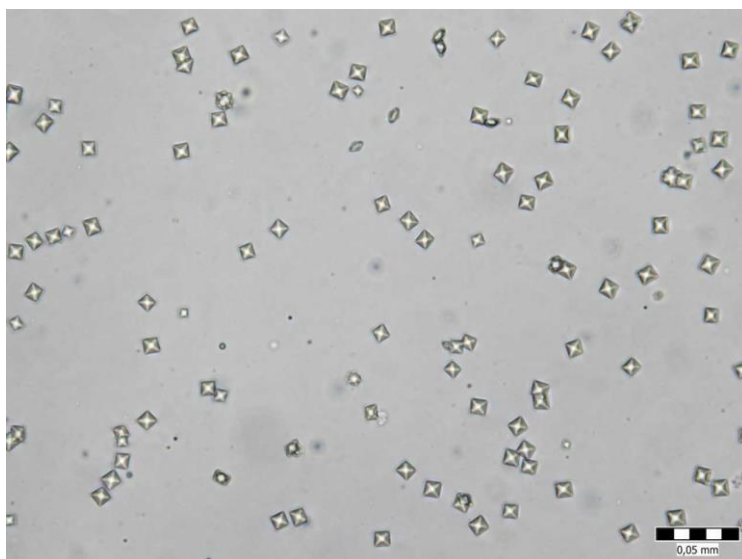
(Obrázek 4 a 5). Krystalizace je ovlivněna různými faktory a přesný mechanismus v případě cystinu nebyl dosud popsán. Obecně největší roli hraje koncentrace krystalotvorných látek (Bartges et al., 2004), tudíž v koncentrované moči vznikají krystaly snáz. Velkou roli hraje pH moči – cystiny spíše krystalizují v kyselém prostředí. Roli ale pravděpodobně hrají určité promotory a inhibitory krystalizace, nicméně ty zatím nebyly identifikovány.



Obrázek č. 3. Shluk cystinových krystalů, v okolí leukocyty a struvity. Močový sediment, nebarveno



Obrázek č. 4. Struvitvé krystaly. Močový sediment, nebarveno



Obrázek č. 5. Krystaly kalcium oxalátu. Močový sediment, nebarveno

Další možností je kyanid-nitroprusidový test (Brandův), který spočívá v konverzi cystinu na cystein pomocí kyanidu sodného, který rozštěpí jeho disulfidické vazby. V dalším kroku přidaný nitroprusid reaguje s volnými SH-skupinami a způsobuje fialové zbarvení vzorku. Citlivost testu se udává 75-125 mg/g kreatininu (Osborne et al., 1999). Velkou nevýhodou testu je potřeba nebezpečných chemikálií, což limituje obecné používání testu. Navíc test neumožňuje kvantifikaci cystinurie.

Ke kvantifikaci cystinurie lze použít i chromatografické metody, komerčně dostupný je tzv. COLA-test, při kterém se v moči stanovuje koncentrace cystinu, ornithinu, lysinu a argininu. Pro mnoho majitelů ale může být takový test finančně nákladný. Z výše uvedených důvodů je zřejmé, že ve většině případů je detekce případné cystinurie nedostatečná.

V naší studii bylo vyšetřeno 23 vzorků pocházejících od irských teriérů. U irských teriérů se vyskytuje typ III cystinurie, který je závislý na pohlaví – je androgen dependentní a objevuje se tedy pouze u intaktních dospělých psů. V námi sledované skupině bylo celkem 15 samců, z toho 3 byli kastrování. Posuzovali jsme tedy 12 intaktních psů. U šesti psů (50 %) byly zjištěny nadlimitní koncentrace cystinu v moči, což naznačuje velké zatížení tohoto plemene cystinurií. Zajímavý je i anamnestický údaj jednoho z kastrováných psů plemene irský teriér – u tohoto jedince byla v minulosti diagnostikována cystinurie a následně byl pes vykastrován. Změřená koncentrace cystinu v tomto případě byla obdobná fenám, je tedy zřejmé, že kastrace byla kurativní. V kontrolní skupině byla zvýšená koncentrace cystinu zjištěna pouze u dvou nekastrováných psů z jedenácti. V jednom případě se jednalo o desetiletého Jack Russel teriéra, tedy plemeno, u něhož byla cystinurie v minulosti popsána. U tohoto jedince ale byla současně detekována proteinurie (UPC = 1), takže je možné, že se jednalo o jiný typ tubulopatie. Druhým psem byl německý krátkosrstý ohař (věk 4,5 roku), u něhož byl zjištěn téměř dvojnásobek hraniční hodnoty pro koncentraci cystinu v moči. Majitel neudával anamnesticky žádný problém, při vyšetření čerstvé moči nebyly zjištěny žádné abnormality. Také u tohoto plemene byla v minulosti cystinurie popsána. U tohoto konkrétního jedince je pak na místě další vyšetření např. pomocí zobrazovacích metod a sledování.

Závěr

Screening incidence cystinurie u irských teriérů je podle výsledků naší studie nutný a potřebný. Problém tohoto onemocnění spočívá v tom, že urolitiáza a s ní související klinické příznaky se objevují až ve věku 4-6 let a v tomto věku už mohou mít uchovnění psi za sebou několik krytí a tak potomků. Vzhledem ke genetické povaze tohoto onemocnění tak dochází k rozšiřování problému do dalších generací. U irských teriérů zatím není dostupný genetický test, který by včas (před zařazením do chovu) detekoval postižené jedince, v současnosti probíhá výzkum této možnosti na univerzitě v Bernu. Detekce psů se zvýšenou exkrecí cystinu do moči pomocí LC/MS a jejich následné nezařazení do chovu by mohlo ozdravit chov tak, aby se nerodili postižení jedinci. Urolitiáza je spojena s výraznou morbiditou a v případech obstrukce uretry se může jednat až o život ohrožující stav. Snížení incidence cystinurie tak povede ke zvýšení welfare psů tohoto plemene.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Bartges, J.W., Kirk, C., Lane, I.F. 2004. Update: Management of calcium oxalate uroliths in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 34: 969-987.
- Brons, A.K., Henthorn, P.S., Raj, K., Fitzgerald, C.A., Liu, J., Sewell, A.C., Giger, U. 2013. SLC3A1 and SLC7A9 Mutations in autosomal recessive or dominant canine cystinurie: A new classification system. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27: 1400-1418.
- Bovee, K., McGuire, T. 1984. Qualitative and quantitative analysis of uroliths in dogs: Definitive determination of chemical type. *Journal of American Veterinary Medical Association* 185: 983-987.
- Hicking, W., Hesse, H., Genhardt, M. 1981. Investigation with polarizing microscopy for the classification of urinary stones from humans and dogs. In: Smith, L.H., Robertson, W.G., Finlayson, B. (Eds): *Urolithiasis: Clinical and Basic Research*. New York, Plenum Press, 901-906.
- Kachmar, J.F., Tietzt, N., Saunders, W.B. 1987. Proteins and amino acids. *Fundamentals of Clinical Chemistry* 177-262.
- Lassaigne, J. 1823. Observation sur l'existence de l'oxide cystique dans un calcul vesical du chien, et assai analytique sur la composition élémentaire de cette substance particuliere. *Annales de chimie et de physique* 23: 328-334.
- Ling, G.V., Ruby, A.L. 1986. Canine uroliths: Analysis of data derived from 813 specimens. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 16: 303-317.
- Osborne, C.A., Sanderson, S.L., Lulich, J.P., Bartges, J.W., Ulrich, L.K., Koehler, L.A., Bird, K.A., Swanson, L.L. 1999. Canine cystine urolithiasis. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 29: 193-211.
- Osborne, C.A., Lulich, J.P., Kruger, J.M., Ulrich, L.K., Koehler, L.A. 2009. Analysis of 451,891 canine uroliths, feline uroliths, and feline urethral plugs from 1981-2007: Perspectives from the Minnesota Urolith Center. *Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice* 39: 183-197.
- Sosnar, M., Bulkova, T., Ruzicka, M. 2005. Epidemiology of canine urolithiasis in the Czech Republic from 1997 to 2002. *Journal of Small Animal Practice* 46: 177-184.
- Wallerstrom, B.I., Wageburg, T.I., Langergren C.H. 1992. Cystine calculi in the dog: An epidemiological retrospective study. *Journal of Small Animal Practice* 33: 78-84.

Vliv transportního stresu na hladiny metabolitů kortikosteronu v trusu bažantů

Martina Volfová, Zuzana Machovcová, Pavel Forejtek, Eva Voslářová, Iveta Bedáňová,
Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Monitoring endokrinních markerů je dobře známou metodou pro hodnocení stresu. Zatímco odběr krve má značná omezení, stanovení hormonálních ukazatelů stresu z výkalů minimalizuje ovlivnění hladin odběrem vzorků a umožňuje jejich časté odebírání. Neinvasivní metody sledování adrenokortikální aktivity však vyžadují validaci pro konkrétní druhy sledovaných zvířat. Cílem této studie bylo posoudit změny hladin metabolitů kortikosteronu (CM) v souvislosti s transportem u bažantů obecných (*Phasianus colchicus*). Monitoring byl prováděn v zařízení pro chov bažantů. Pro účely studie bylo náhodně vybráno 16 jedinců (8 samců a 8 samic), kteří byli umístěni jednotlivě do klecí po dobu dvou týdnů před transportem. Všichni mezi sebou měli vizuální a hlasový kontakt. Ve věku 17 týdnů byli bažanti naloženi do transportních kontejnerů a přepravováni po dobu 3,5 hodiny na vzdálenost 140 km k cílovému odběrateli. Vzorky trusu byly odebírány během 3 dnů před (pro stanovení bazálních koncentrací) a 3 dnů po transportu. Koncentrace CM v trusu byly stanoveny pomocí nekomerční EIA vyvinuté v laboratoři. Transport představuje pro zvířata velký stres, což se také projevilo zvýšením koncentrací CM v trusu u bažantů sledovaných v této studii. Během 24 hodin po transportu se koncentrace CM zvýšily ($P < 0,01$) ve srovnání s hladinami před transportem (533,82 ng / g vs. 228,85 ng / g) a pokračovaly v růstu dalších 24 hodin (745,35 ng / g). Tři dny po transportu koncentrace CM klesly zpět na výchozí hodnoty (297,97 ng / g). EIA použitá v této studii se ukázala být dostatečně citlivá k detekci biologicky významných změn adrenokortikální aktivity bažantů při jejich transportu. Výsledky potvrzují, že je možné měřit stres související s přepravou u bažantů neinvasivně ze vzorků trusu a bylo prokázáno, že koncentrace zůstaly zvýšené déle než 36 hodin.

Úvod

Stresory různé povahy mohou být odpovědné za aktivaci hypotalamo-pituitárně-adrenální osy (HPA), čímž spustí sekreci příslušných hormonů (Palme et al., 2005). Hlavními vylučovanými hormony produkovanými nadledvinami jsou kortizol a kortikosteron, přičemž druhý zmíněný je u ptáků vylučován dominantně (Möstl and Palme, 2002; Palme et al., 2005). Monitoring endokrinních markerů je dobře známou metodou pro hodnocení stresu. Zatímco odběr krve má značná omezení, stanovení hormonálních ukazatelů stresu z výkalů minimalizuje ovlivnění hladin odběrem vzorků a umožňuje jejich časté odebírání. Neinvasivní metody sledování adrenokortikální aktivity však vyžadují validaci pro konkrétní druhy sledovaných zvířat (Dehnhard et al., 2003; Möstl et al., 2005; Touma and Palme, 2005; Palme, 2019).

Hodnocení míry stresu u ptáků neinvasivně bylo provedeno v několika studiích. Dehnhard et al. (2003) například hodnotili vztah mezi hladinami kortikosteronu v plazmě a v trusu u tří druhů ptáků, konkrétně u kuřat (*Gallus domesticus*), kormorána velkého (*Phalacrocorax carbo*) a jestřába lesního (*Accipiter gentilis*) pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) po aplikaci ACTH. Rettenbacher et al. (2004) ve své studii vyvinuli a validovali metodu pro měření metabolitů kortikosteronu z trusu kuřat. U tetřeva hlušce (*Tetrao urogallus*) byl taktéž pozorován vývoj koncentrací metabolitu kortikosteronu v trusu (Thiel et al., 2005). Podobně tomu bylo u husy sněžní (*Chen*

caerulescens) (Legagneux et al., 2011). Vliv transportního stresu byl hodnocen u nosnic přepravovaných po dobu jedné hodiny (Rettenbacher and Palme, 2009). U tučňáků brylových (*Spheniscus demersus*) držení v zajetí byla taktéž provedena validace neinvazivní metody pro měření stresu (Anfossi et al., 2014). U puštíků karibských severních (*Strix occidentalis caurina*) byla stanovována nejvíce efektivní metoda vyšetření po aplikaci ACTH (Wasser et al., 2000).

U bažantů obecných (*Phasianus colchicus*) prozatím nebyla podobná studie provedena. Publikovány dosud byly pouze studie hodnotící úroveň stresu na základě koncentrace glukokortikoidů a dalších stresových markerů (laktátu a glukózy) v krevní plazmě po různé době manipulace (Chloupek et al., 2009) a po transportu (Voslářová et al., 2006; 2012).

Cílem této studie bylo posoudit změny hladin metabolitů kortikosteronu (CM) v trusu v souvislosti s transportem bažantů obecných (*Phasianus colchicus*) vzhledem k tomu, že transport představuje pro zvířata významný stressor (Mitchell and Kettlewell, 2009).

Materiál a metodika

Monitoring byl prováděn před i po transportu v zařízení pro chov bažantů. Pro účely studie bylo náhodně vybráno 16 jedinců (8 samců a 8 samic), kteří byli umístěni jednotlivě do klecí po dobu dvou týdnů před transportem. Všichni však mezi sebou měli po celou dobu pozorování vizuální a hlasový kontakt. Každý jedinec byl také označen jiným barevným kroužkem na běháku pro lepší odlišení. Krmení a voda byla po celou dobu poskytnuta *ad libitum*. Ve věku 17 týdnů byli bažanti naloženi do transportních kontejnerů a přepravováni po dobu 3,5 hodiny na vzdálenost 140 km k cílovému odběrateli. Vzorky trusu byly odebírány během 3 dnů před (pro stanovení bazálních koncentrací) a 3 dnů po transportu. Pro zabezpečení bezproblémového odběru byly pod klece instalovány plastové desky, ze kterých byl trus jednoduše odebrán. Celkem bylo odebráno 464 vzorků (29 vzorků od každého bažanta). Všechny vzorky byly odebírány do jedné hodiny po defekaci, vloženy do plastových uzavíratelných sáčků, označeny a zmrazeny při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zpracování vzorků a analýza glukokortikoidních hormonů z trusu byla provedena na Veterinární univerzitě ve Vídni v Rakousku. Vzorky byly rozmrazeny, jednotlivě homogenizovány a poté postupně navážený do zkumavek o hmotnosti 0,480 - 0,520 g. K odváženým vzorkům bylo přidáno 5 ml 60 % metanolu. Každý vzorek s extrakčním činidlem byl následně 30 minut míchán na třepače a poté při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ centrifugován (3750 g, 10 minut). Koncentrace CM v trusu byly stanoveny pomocí nekomerční EIA vyvinuté v laboratoři. Jako standard byl použit kortizon (4-pregnene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione) a hodnoty byly vyjádřeny jako ekvivalent kortizonu v ng na g trusu.

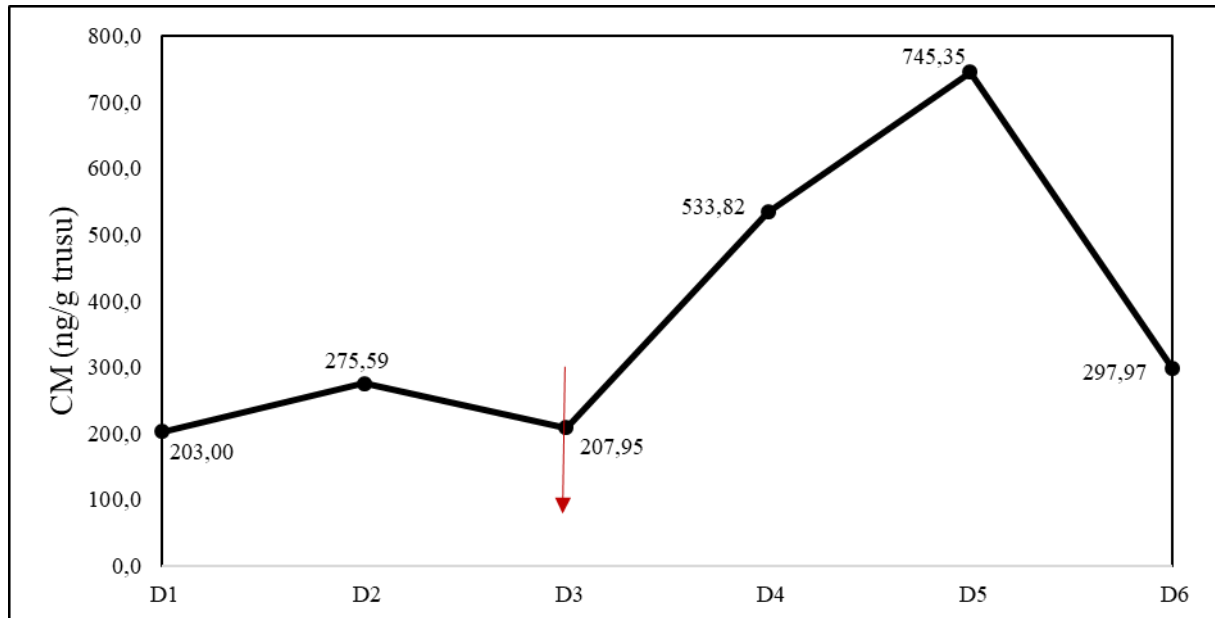
Pro jednotlivá zvířata byla vypočítána průměrná hodnota CM za každý den. Následně byly vypočítány průměrné hladiny CM zvlášť pro samice a samce, které byly mezi sebou porovnávány pomocí statistického program Unistat 5.6. (Unistat Ltd., London, GB). Protože se koncentrace CM mezi samci a samicemi signifikantně nelišily, byla pro další analýzu použita směsná data od obou pohlaví. Normalita dat byla otestována pomocí Shapiro-wilk testu a vzhledem k tomu, že data byla rozložena v Gaussově křivce, byla statistická významnost rozdílů hladin koncentrací CM zjišťována pomocí parametrického ANOVA testu. Následně byl použit Tukey-HSD test pro stanovení významných rozdílů v koncentracích CM z trusu mezi všemi odběrovými dny. Hodnota $P < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Výsledky

Po transportu bažantů došlo u všech 16 jedinců ke zvýšení koncentrací CM v trusu. Během 24 hodin po transportu se průměrné koncentrace CM významně zvýšily ($P < 0,01$) ve

srovnání s hladinami před transportem (533,82 ng/g vs. 228,85 ng/g), jak lze vidět na Grafu č. 1.

Graf č. 1. Průměrné koncentrace metabolitů kortikosteronu (CM) v trusu bažantů naměřené před a po transportu.

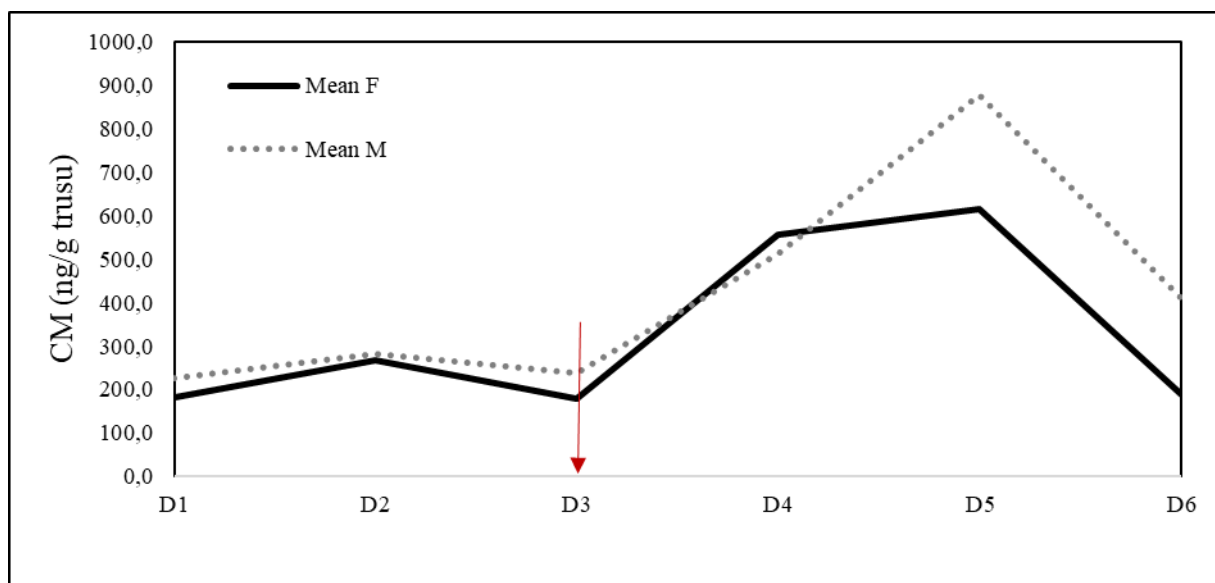


Vysvětlivky: D1 - D6 = 1. až 6. den odběru; červená šipka znázorňuje den transportu bažantů.

Nárůst průměrných koncentrací CM pokračoval ještě dalších 24 hodin, pík byl tedy zaznamenán druhý den po transportu bažantů (D5 = 745,35 ng/g). Tři dny po transportu se koncentrace CM přibližovaly zpět k výchozím hodnotám (297,97 ng/g).

Při porovnání skupiny samců a samic bažantů obecných nebyly zjištěny žádné významné rozdíly ($p < 0,05$). U obou pohlaví měl vývoj CM podobný průběh (Graf č. 2).

Graf č. 2. Průměrné koncentrace metabolitů kortikosteronu (CM) u samic (F) a samců (M) bažantů před a po transportu.



Vysvětlivky: D1 - D6 = 1. až 6. den odběru; červená šipka znázorňuje den transportu bažantů.

Diskuze

Přeprava bažantů ze zařízení pro jejich odchov k cílovému zákazníkovi je v evropských zemích běžnou praxí (Draycott et al., 2005; Voslářová et al., 2012). Ptáci jsou transportováni na kratší či delší vzdálenosti v různých věkových kategoriích a během transportu se musí vypořádat s řadou stresujících vlivů, jako jsou odchyt, umístění do přepravek, naložení, přeprava, a vykládka do nového prostředí. Během samotné přepravy navíc welfare zvířat ovlivňuje spousta dalších faktorů, jako je teplota, vlhkost, hustota osazení transportního boxu, délka transportu, ale také denní doba a roční období (Morgan and Tromborg, 2007; Mitchell and Kettlewell, 2009). Jak již prokázalo mnoho studií, už samotná manipulace se zvířetem může být značně stresující (Balcombe et al., 2004; Chloupek et al., 2009; Torne'-Noguera et al., 2014). To potvrzuje i naše studie, kde se tří hodinový transport bažantů obecných promítl ve zvýšených hladinách CM oproti hladinám před transportem. Zatímco se hladiny CM před transportem držely v rozmezí 203,00 ng/g až 275,59 ng/g, po transportu narostly v průměru až na 745,35 ng/g CM v trusu. Tento více než 3 násobný nárůst byl prokázán i u nosnic, které byly transportovány jednu hodinu (Rettenbacher and Palme, 2009). Rettenbacher and Palme (2009) zjistili, že zvýšené hladiny CM přetrvávaly déle než 36 hodin po transportu, což se prokázalo i v naší studii u bažantů.

Pohlaví se obecně uvádí jako faktor ovlivňující výsledné koncentrace glukokortikoidních metabolitů v trusu (Goymann, 2005). Například Rettenbacher et al. (2004) a Baltic et al. (2005) ve svých studiích uvádějí, že mezi samci a samicemi nosnic existují odchylky v hladinách CM, stejně jako mezi samci a samicemi tetřívka obecného (*Tetrao tetrix*). V našem případě byly zaznamenány rozdíly v absolutních hodnotách, kdy byly hladiny naměřených CM vyšší u samců. Nicméně statisticky významné rozdíly prokázány nebyly. Hladiny glukokortikoidů v trusu mezi samci a samicemi jsou ovlivněny různými fyziologickými a behaviorálními aspekty. Jsou prokazovány jak vyšší hladiny u samců (například u kura domácího, Rettenbacher et al., 2004), tak u samic (například u některých savců, Schatz and Palme, 2001). V některých případech nebyly dokonce žádné rozdíly zaznamenány (například u hrdliček karolinských, Washburn et al., 2003). Například u některých samců se zvýšenou hladinou androgenů cirkulujících v krvi (u slonů v období tzv. "musthu") jsou ovlivněny výsledné hladiny CM ve výkalech. U samic je zase značné množství cirkulujících glukokortikoidů v krvi vázáno na "globulin vázající pohlavní steroidy", a proto mohou být celkové hladiny glukokortikoidů vyšší než u samců (Touma and Palme, 2005; Palme, 2019).

Pro stanovení míry transportního stresu u bažantů obecných byla použita EIA poprvé popsána ve studii Rettenbacher et al. (2004) zacílená na protilátku 4-pregnene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione-21-HS. Tato analýza je použitelná u různých druhů ptáků z řádu hrabaví (*Galliformes*) a jednalo se o nekomeční EIA analýzu vyvinutou přímo v laboratoři. Některé studie uvádějí, že je možné pro stanovení CM v trusu u ptáků použít i komerčně vyráběné ELISA kity, které měří kortikosteron. Dle Rettenbacher et al. (2004) kortikosteron samotný není do trusu u ptáků vylučován, ale kity jsou schopny zaznamenat i hladiny jeho metabolitů na základě křížové reaktivity. Celé spektrum těchto metabolitů ještě není důkladně prozkoumáno. Ze studie Dehnhard et al. (2003) a Rettenbacher et al. (2004) vyplývá, že nejvhodnější je použít analýzu zacílenou na kortizon, tak jako v naší studii, protože zachytí více druhů metabolitů obsažených v trusu ptáků.

Z naší studie vyplývá, že měření metabolitů kortikosteronu pomocí nekomeční EIA se standardem 4-pregnene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione je vhodná k měření adrenokortikální aktivity u bažantů obecných.

Závěr

Z hlediska welfare a ochrany zdraví přepravovaných zvířat je nutné získat co nejvíce informací o jejich reakci na tento stresor a pokusit se přepravní podmínky co nejvíce zdokonalit. Enzymová imunoanalýza použitá v této studii se ukázala být dostatečně citlivá k detekci biologicky významných změn adrenokortikální aktivity bažantů při jejich transportu. Výsledky potvrzují, že je možné měřit stres související s přepravou u bažantů neinvazivně ze vzorků trusu a bylo prokázáno, že koncentrace CM zůstaly zvýšené déle než 36 hodin po působení stresoru.

Tato práce byla financovaná grantem FVHE/Večerek/ITA2020.

Literatura

- Anfossi, A., Ozella, L., Di Nardo, F., Giovannoli, C., Passini, C., Favaro, L., Pessani, D., Möstl, E., Baggiani, C. 2014. Broad-selective enzyme immunoassay for non-invasive stress assessment in african penguins (*Spheniscus demersus*) held in captivity. *Analytical Methods* 6: 8222-8231.
- Balcombe, J.P., Barnard, N.D., Sandusky, C. 2004. Laboratory routines cause animal stress. *American Association for Laboratory Animal Science* 43:42-51.
- Baltic, M., Jenni-Eiermann, S., Arlettaz, R., Palme, R. 2005. A Noninvasive technique to evaluate human-generated stress in the Black Grouse. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 81-95.
- Dehnhard, M., Schreer, A., Krone, O., Jewgenow, K., Krause, M., Grossmann, R. 2003. Measurement of plasma corticosterone and fecal glucocorticoid metabolites in the chicken (*Gallus domesticus*), the great cormorant (*Phalacrocorax carbo*), and the goshawk (*Accipiter gentilis*). *General and Comparative Endocrinology* 131: 111-120.
- Draycott, R.A.H., Woodburn, M.I.A., Carroll, J.P., Sage, R.B. 2005. Effects of spring supplementary feeding on population density and breeding success of released pheasants *Phasianus colchicus* in Britain. *Wildlife Biology* 11: 117-182.
- Goymann, W. 2005. Noninvasive monitoring of hormones in bird droppings: Physiological validation, sampling, extraction, sex differences, and the influence of diet on hormone metabolite levels. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 35-53.
- Chloupek, P., Voslářová, E., Suchý Jr., P., Bedáňová, I., Pištěková, V., Vitula, F., Chloupek, J., Večerek, V. 2009. Influence of pre-sampling handling duration on selected biochemical indices in the Common Pheasant (*Phasianus colchicus*). *Acta Veterinaria Brno* 78: 23-28.
- Legagneux, P., Gauthier, G., Chastel, O., Picard, G., Bety, J. 2011. Do glucocorticoids in droppings reflect baseline level in birds captured in the wild? A case study in snow geese. *General and Comparative Endocrinology* 172: 440-445.
- Mitchell, M.A., Kettlewell, P.J. 2009. Welfare of poultry during transport – a review. *Poultry Welfare Symposium Cervia, Italy*, p. 90.
- Morgan, K.N., Tromborg, C.H.T. 2007. Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science* 102: 262-302.
- Möstl, E., Palme, R. 2002. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*, 23: 67-74.
- Möstl, E., Rettenbacher, S., Palme, R. 2005. Measurement of corticosterone metabolites in birds' droppings: An analytical approach. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 17-34.
- Palme, R., Rettenbacher, S., Touma, C., El-Bahr, S.M., Möstl, E. Stress hormones in mammals and birds: Comparative aspects regarding metabolism, excretion, and noninvasive measurement in fecal samples. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1040: 162-171.

- Palme, R. 2019. Non-invasive measurement of glucocorticoids: Advances and problems. *Physiology & Behavior* 199: 229-243.
- Rettenbacher, S., Möstl, E., Hackl, R., Ghareeb, K., Palme, R. 2004. Measurement of corticosterone metabolites in chicken droppings. *British Poultry Science* 45: 704-711.
- Rettenbacher, S., Palme, R. 2009. Biological validation of a non-invasive method for stress assessment in chickens. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 122: 8-12.
- Schatz, S., Palme, R. 2001. Measurement of faecal cortisol metabolites in cats and dogs: noninvasive method for evaluating adrenocortical function. *Veterinary Research Communications* 25: 271-287.
- Thiel, D., Jenni-eiermann, S., Palme, R. 2005. Measuring corticosterone metabolites in droppings of capercaillies (*Tetrao urogallus*). *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 96-108.
- Torne'-Noguera, A., Pagani-Nu'ñez, E., Senar, J.C. 2014. Great Tit (*Parus major*) breath rate in response to handling stress: Urban and forest birds differ. *Journal of Ornithology* 155: 315-318.
- Touma, Ch., Palme, R. 2005. Measuring fecal glucocorticoid metabolites in mammals and birds: The importance of validation. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1046: 54-74.
- Voslářová, E., Bedáňová, I., Večerek, V., Pištěková, V., Chloupek, P., Suchý, P. 2006. Changes in haematological profile of common pheasant (*Phasianus colchicus*) induced by transit to pheasantry. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 113: 361-400.
- Voslářová, E., Bedáňová, I., Chloupek, P., Pištěková, V., Chloupek, J., Večerek, V. 2012. Changes in selected biochemical indices in common pheasants in response to their transport. *Folia Veterinaria* 56: 58-59.
- Washburn, B.E., Millspaugh, J.J., Schulz, J.H., Jones, S.B., Mong, T. 2003. Using Fecal Glucocorticoids for Stress Assessment in Mourning Doves. *The Condor* 105: 696-706.
- Wasser, S.K., Hunt, K.E., Brown, J.L., Cooper, K., Crockett, C.M., Bechert, U., Millspaugh, J.J., Larson, S., Monfort, S.L. 2000. A generalized fecal glucocorticoid assay for use in a diverse array of nondomestic mammalian and avian species. *General and Comparative Endocrinology* 120: 260-275.

Vliv věku, pohlaví a manipulace na strach u bažantů chovaných v odchovném zařízení

Eva Voslářová, Vladimír Večerek, Iveta Bedáňová, Dora Satinská, Pavel Forejtek

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

Abstrakt

Z důvodu poklesu divoké populace je mnoho bažantů odchováno v zajetí a v různém věku následně vypouštěno do přírody. Míra přežití primárně závisí na schopnosti bažantů vyhnout se predátorům a je tedy potřeba, aby si bažanti udrželi své únikové reflexy a plachost. Ztuhnutí a nehybnost jsou reakce na strach a jsou typickým chováním při vyhýbání se predátorům popsáným u různých druhů pernaté zvěře. Cílem této studie bylo posoudit vliv věku, pohlaví a manipulace na tonickou imobilitu (TI) bažantů obecných (*Phasianus colchicus*). Testy TI byly prováděny v odchovném zařízení určeném pro odchov bažantů obecných v 6., 8., 10., 12., 14. a 16. týdnu věku bažantů. Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtu pokusů o indukci TI mezi sledovanými skupinami bažantů (naprostá většina bažantů zůstala nehybná již při prvním pokusu). Manipulace s bažanty před testem TI však vedla k delší ($P < 0,001$) době trvání TI ve srovnání s ptáky, kteří podstoupili testování TI bezprostředně po odchytu ($461,0 \pm 22,4$ s vs. $304,9 \pm 19,5$ s), a to bez ohledu na jejich věk. Tato reakce na možné nebezpečí je významná pro úspěšné přežití ptáků v přírodě. Nejkratší doba trvání TI ($157,4 \pm 31,2$ s) byla zjištěna u bažantů ve věku 6 týdnů. U starších bažantů (8 – 16 týdnů) trvala TI statisticky vysoce významně ($P < 0,001$) déle ve srovnání s nejmladšími testovanými bažanty (věk 6 týdnů). Mezi skupinami bažantů ve věku od 8 do 16 týdnů nebyl zjištěn žádný rozdíl v době trvání TI. Nebyla nalezena žádná interakce mezi manipulací a věkem a nebyl zjištěn vliv pohlaví.

Úvod

Z důvodu značného poklesu divoké populace je mnoho bažantů obecných odchováno v zajetí. Následně jsou v určitém věku vypuštěni za účelem zvýšení počtu ptáků ve volné přírodě nebo honitbě (Draycott et al., 2002; 2005; Rütting et al., 2007; Butler and Davis, 2010; Whiteside et al., 2016). Přežití těchto ptáků je však zpochybňováno. Studie prokázaly, že mláďata odchovaná jejich biologickými rodiči vykazovala účinnější anti-predatorní chování v kombinaci s nehybností než ptáci odchovaní uměle (Santilli and Bagliacca, 2019).

Obranné reakce zvyšují fitness u volně žijících zvířat, předpokládaná délka jejich života se prodlužuje, pokud se svým chováním dokáží vyvarovat nebezpečí, resp. predátorům (Jones et al., 1992; Dwyer, 2004). Strach je obecně definován jako reakce na očekávané momentální ohrožení, přičemž úzkost je reakce na potenciální nebezpečí, které ohrožuje integritu jedince (Boissy, 1998). Reakce na strach jsou fyziologické a připravují zvíře na vyrovnání se s nebezpečím. Reakce na strach jsou velmi variabilní a záleží na charakteru hrozby. Existují aktivní přístupy přímo vůči hrozbě (útok), aktivní vyhnutí se nebezpečí (útěk, úlet, ukrytí se) i pasivní vyhnutí se (imobilita) (Erhard and Mendl, 1999). Mnoho druhů zvířat reaguje na hrozbu právě pasivním vyhnutím se jí (Erhard et al., 1999).

Pro hodnocení úrovně strachu se obvykle používá test tonické imobility (TI). Test TI je založen na přirozené obranné reakci, kterou používají ptáci žijící ve volné přírodě při snaze uniknout před predátorem. Principem této obranné strategie je eliminace pohybu ulovené kořisti (ptáka), která deaktivuje následující útok predátora. Doba trvání tonické imobility odráží míru strachové reakce jedince. Čím déle pták setrvá ve stavu tonické imobility, tím negativnější dopad (strach, stres) na něho měla situace, která tento stav vyvolala (Balážová

a Baranyiová, 2009). Vzhledem k úzkému vztahu mezi reakcí TI a úrovní strachu prokázanému v různých studiích je dobrým ukazatelem obecné bázlivosti a nejen strachové reakce specifické pro daný podnět (Jones and Mills, 1983; Jones, 1987; Jones et al., 1991).

Během standardizace testu tonické imobility bylo zjištěno, že optimální čas pro vyvolání strachové reakce je 15 vteřin, po které pták leží na pravém boku, výzkumník drží jednu ruku na jeho hrudi a druhou na jeho hlavě, čímž imituje chování predátora, což vede k vyvolání anti-predatorního chování u bažanta, který coby lovené zvíře předstírá smrt, aby v predátorovi vyvolal snížení pozornosti a mohl se pokusit o útěk. Délka imobility je doba mezi odstraněním rukou člověka z ptáka a postavením se ptáka na obě pánevní končetiny. Pokud je čas od ustoupení výzkumníka do postavení se bažanta delší než 10 vteřin, jedná se o platný pokus (Gallup et al., 1971; Jones, 1986; Forkman et al., 2007). Zvíře může v tonické imobilitě setrvat vteřiny až hodiny. Rekordní tonická imobilita byla naměřena u kuřete kura domácího a trvala 5 hodin a 45 minut (Gallup, 1977).

Cílem této studie bylo posoudit vliv věku, pohlaví a manipulace na strach u bažantů obecných (*Phasianus colchicus*) chovaných v odchovném zařízení na základě hodnocení TI.

Materiál a metodika

Testování bylo prováděno v odchovném zařízení určeném pro odchov bažantů obecných (*Phasianus colchicus*). Ptáci byli chováni ve venkovních voliérách (každá voliéra měřila přibližně 5 m × 30 m, průměrná velikost hejna byla 200 ptáků na voliéru). Testy TI (metodika dle Benoff and Siegel, 1976) byly provedeny v 6., 8., 10., 12., 14. a 16. týdnu věku bažantů. Po umělém navození tonické imobility byl měřen čas, po který byl bažant imobilní, až do doby, kdy se reflexivně postavil na nohy. Současně byl také zaznamenáván u každého jedince počet pokusů nutných k navození tonické imobility. Pokud se pták postavil za méně než 10 s, byl test opakován. Pokud nebyla TI navozena ani po třech pokusech, byla zapsána doba trvání TI 0 s. Pokud se pták nepostavil do 10 minut, byl test ukončen a byla zapsána doba trvání TI 600 s. Při každém testu bylo hodnoceno třicet náhodně vybraných ptáků. Pro účely testování byli bažanti jednotlivě odchytáváni v různých voliérách, aby nedošlo k rušení ptáků před testy TI. V kontrolní skupině byli ptáci testováni ihned po odchytu. Ve skupině vystavené manipulaci byli ptáci individuálně drženi po dobu 5 minut před vlastním testem TI. Po provedení testu TI bylo u každého ptáka určeno a zaznamenáno pohlaví a hmotnost. Počet samců a samic v každé skupině byl přibližně stejný.

Získané výsledky byly vyhodnoceny pomocí statistického programu Unistat 6.5. Data byla nejprve testována na normalitu pomocí Shapiro-Wilkova testu (Zar, 1999) a následně zpracována pomocí metody 3 faktorová ANOVA (hlavní faktory: pohlaví, věk, manipulace). Protože nebyl prokázán vliv pohlaví, byla data sloučena a následně byla k jejich hodnocení použita 2 faktorová ANOVA včetně Tukey-HSD testu (Zar, 1999) pro mnohonásobné porovnání všech možných kombinací dvojic skupin a zjištění významností jejich rozdílů. Hodnota $P < 0,05$ byla při testování považována za statisticky významnou.

Výsledky

Výsledky hodnocení vlivu věku a manipulace na počet pokusů o navození TI a dobu trvání TI u bažantů v odchovném zařízení jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtu pokusů o indukci TI mezi sledovanými skupinami bažantů (naprostá většina bažantů zůstala nehybná již při prvním pokusu).

Manipulace s bažanty před testem TI však vedla k delší ($P < 0,001$) době trvání TI ve srovnání s ptáky, kteří podstoupili testování TI bezprostředně po odchytu ($461,0 \pm 22,4$ s vs. $304,9 \pm 19,5$ s), a to bez ohledu na jejich věk.

Nejkratší doba trvání TI ($157,4 \pm 31,2$ s) byla zjištěna u bažantů ve věku 6 týdnů. U starších bažantů (8 – 16 týdnů) trvala TI statisticky vysoce významně ($P < 0,001$) déle ve srovnání s nejmladšími testovanými bažanty (věk 6 týdnů). Mezi skupinami bažantů ve věku od 8 do 16 týdnů nebyl zjištěn žádný rozdíl v době trvání TI.

Nebyla nalezena žádná interakce mezi manipulací a věkem.

Tabulka č. 1. Vliv věku a manipulace na tonickou imobilitu (TI) u bažantů

Faktor	n	Počet pokusů o navození TI	Trvání TI (s)
Manipulace			
Klid	97	$1,14 \pm 0,05^a$	$304,9 \pm 19,5^b$
Stres	65	$1,08 \pm 0,05^a$	$461,0 \pm 22,4^a$
Věk			
6 týdnů	25	$1,32 \pm 0,11^a$	$157,4 \pm 31,2^b$
8 týdnů	29	$1,03 \pm 0,03^a$	$414,1 \pm 35,1^a$
10 týdnů	27	$1,11 \pm 0,11^a$	$423,5 \pm 38,4^a$
12 týdnů	26	$1,08 \pm 0,05^a$	$410,5 \pm 38,2^a$
14 týdnů	30	$1,03 \pm 0,03^a$	$417,0 \pm 30,8^a$
16 týdnů	25	$1,16 \pm 0,11^a$	$350,4 \pm 36,4^a$
ANOVA			
Manipulace (M)		N.S.	$P = 0,0001$
Věk (V)		N.S.	$P = 0,0008$
M x V		N.S.	N.S.

^{a,b} hodnoty v rámci jednoho faktoru ve stejném sloupci s různými indexy se liší ($P < 0,01$)

Diskuze

Délku trvání TI ovlivňuje řada faktorů. V naší studii byl ze tří testovaných faktorů (věk, pohlaví, manipulace) prokázán statisticky významný vliv u věku a manipulace. Vliv pohlaví zjištěn nebyl, je však třeba uvést, že ptáci testovaní v naší studii ještě nebyli pohlavně dospělí. Vliv pohlaví na délku trvání TI neprokázali ani Launay et al. (1993) u křepelk japonských (*Coturnix japonica*) při testech prováděných v době od 1 do 10 týdnů věku. V jejich studii však nebyl prokázán ani vliv věku. Naopak u bažantů obecných v naší studii se doba trvání TI u různých věkových kategorií lišila. Nejkratší doba trvání TI ($157,4 \pm 31,2$ s) byla zjištěna u bažantů ve věku 6 týdnů. U starších bažantů (8 – 16 týdnů) trvala TI statisticky vysoce významně déle ve srovnání s nejmladšími testovanými bažanty (věk 6 týdnů). Rozdíl v trvání TI u bažantů obecných různého věku zjistili také Nowaczewski et al. (2012), kteří porovnávali dobu TI u několika druhů z čeledi bažantovitých (*Phasianidae*), a to u bažanta obecného (*Phasianus colchicus*), křepelky polní (*Coturnix coturnix*) a koroptve polní (*Perdix perdix*). Bažanti obecní testovaní ve věku 35 dnů vykazovali statisticky významně delší TI než bažanti ve věku 10 dní. U křepelky polní ani koroptve polní vliv věku na dobu TI v jejich studii prokázán nebyl. Ve srovnání s touto studií byli v naší studii bažanti testovaní během

širšího věkového rozpětí (6. – 16. týdnů) a výsledky naznačují, že prodlužování doby TI není lineárně závislé na věku bažantů. Statisticky významný rozdíl (prodloužení) u doby TI byl zjištěno pouze mezi skupinou bažantů ve věku 6 týdnů a všemi ostatními sledovanými věkovými skupinami bažantů. Mezi skupinami bažantů ve věku od 8 do 16 týdnů nebyl zjištěn žádný rozdíl v době trvání TI. Avšak je zajímavé, že zatímco u bažantů ve věku 8 až 14 týdnů se doba TI pohybovala od $410,5 \pm 38,2$ do $423,5 \pm 38,4$ s, u ptáků testovaných ve věku 16 týdnů trvala doba TI $350,4 \pm 36,4$ s. Tento pokles nebyl statisticky významný, a protože ptáci byli následně vyskládněni z odchovného zařízení, ve kterém probíhalo sledování, nebylo možné provést další testování. Pokud však taková tendence existuje a dochází v pozdějším věku opět ke snížení doby trvání TI, může to znamenat, že je obranný mechanismus u starších ptáků narušený, což je zvláště znepokojující u ptáků, kteří jsou vypouštěni po 16 týdnech věku do přírody.

Řada studií dokládá, že míra přežití uměle odchovaných bažantů po jejich vypuštění je ve volné přírodě nízká. Bažanti z volně žijících populací vykazují mnohem vyšší míru přežití v přírodě než ti, kteří byli do stejného prostředí vypuštěni ze zajetí (Anderson, 1964; Krauss et al., 1987; Hill and Robertson, 1988; Brittas et al., 1992; Leif, 1994). Většina ztrát bažantů vypuštěných do volné přírody je způsobena predátory (Dumke and Pils, 1973; Leif, 1994; Sodeikat et al., 1995; Bliss et al., 2005). Míra přežití tedy primárně závisí na schopnosti bažantů vyhnout se predátorům a je potřeba, aby si bažanti udrželi své únikové reflexy a plachost. Ztuhnutí a nehybnost jsou reakce na strach a jsou typem chování při vyhýbání se predátorům popsáným u různých druhů pernaté zvěře (Gallup et al., 1971; Borchelt and Ratner, 1973; Sargeant and Eberhardt, 1975; Gallup, 1977; Thompson et al., 1981; Odén et al., 2005). Tyto projevy jsou posledním stadiem různých anti-predatorních mechanismů vedoucích k tomu, že predátor ztratí zájem o svou kořist (Jones et al., 1991). Při současném způsobu intenzivního chovu bažantů jsou k líhnutí vajec využívány mechanické inkubátory a k odchovu mláďat umělé kvočny. Nedostatek rodičovské péče však může mít důsledky na chování a welfare těchto ptáků a ovlivňovat také jejich přežití po vypuštění do volné přírody. Santilli and Bagliacca (2019) porovnali reakci 4-týdenních bažantů (odchovaných pod slepicí-pěstounkou a uměle chovaných) a zjistili, že doba TI se mezi oběma skupinami ptáků významně lišila. Bažanti odchovaní pěstounskou slepicí vykazovali silnější odezvu na vzdušného predátora ve srovnání s uměle odchovanými bažanty.

TI lze interpretovat jako index strachu a ukazatel anti-predatorního chování. Delší doba nehybnosti vždy pozitivně koreluje se strachem (Jones, 1987; Schütz et al., 2001; Odén et al., 2005). Z toho pohledu je žádoucí, aby si bažanti držení v zajetí uchovali vrozené reakce na nebezpečí a nedocházelo k jejich vymizení, např. v důsledku habituace na opakující se podněty, které v danou chvíli nemají biologický význam. U bažantů odchovávaných v zajetí za účelem jejich následného vypuštění do přírody toto může být zásadní problém na rozdíl od zvířat trvale držených v zajetí, u kterých je naopak snaha, aby se jejich strach z neznámého snížil. Je doloženo, že opakovaná manipulace s testovanými ptáky, komplexnost a obohacenost prostředí jejich odchovu mají značný vliv na zkrácení délky trvání tonické imobility (Forkman et al., 2007; Hrabčáková et al., 2012). Z toho pohledu je pozitivní, že všichni testovaní bažanti v naší studii reagovali na manipulaci prodloužením doby TI ve srovnání s bažanty, kteří podstoupili testování TI bezprostředně po odchytu ($461,0 \pm 22,4$ s vs. $304,9 \pm 19,5$ s), a to bez ohledu na jejich věk. Bažanti, kteří si uchovají svoji strachovou reakci, jsou sice citlivější ke stresu v odchovně, na druhou stranu v přírodě mohou vykazovat lepší obranné mechanismy vůči predátorům.

Závěr

Byl prokázán vliv věku a manipulace na dobu trvání TI. Všichni testovaní bažanti reagovali na manipulaci prodloužením doby TI, což dokládá zvýšenou strachovou odezvu

u bažantů vystavených tomuto podnětu, a to bez ohledu na jejich věk. Tato reakce na možné nebezpečí je významná pro úspěšné přežití ptáků v přírodě. Vliv věku se manifestoval tak, že nejkratší doba trvání TI byla zjištěna u bažantů ve věku 6 týdnů. U starších bažantů (8 – 16 týdnů) trvala TI statisticky vysoce významně déle ve srovnání s nejmladšími testovanými bažanty (věk 6 týdnů). Mezi skupinami bažantů ve věku od 8 do 16 týdnů nebyl zjištěn žádný rozdíl v době trvání TI. Bylo by však vhodné sledovat vývoj anti-predatorního chování v závislosti na věku v delším časovém horizontu, aby bylo možné zhodnotit podmínky odchovu a zachování obranných mechanismů a jejich případných změn během umělého odchovu bažantů a určit vhodný věk pro jejich vypuštění do přírody.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Anderson, W.L. 1964. Survival and reproduction of pheasants released in Southern Illinois. *Journal of Wildlife Management* 28: 254-264.
- Balážová, L., Baranyiová, E. 2009. Tonic imobilita u kurčiat znáškového typu. In: XI. Konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Brno: VFU Brno, s. 78-80.
- Benoff, F.H., Siegel, P.B. 1976. Genetic analyses of tonic immobility in young Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Animal Learning & Behavior* 4: 160-162.
- Bliss, T.H., Brandon, A., Draycott, C., Roger, A.H., Carrol, J.P. 2005. Survival of wild pheasants (*Phasianus colchicus*) on a managed hunting estate in Lower Austria. In: Pohlmeier, K. (Ed.): Extended Abstracts of the XXVIIth Congress of the IUGB. Hannover: IUGB, pp. 50-51.
- Boissy, A. 1998. Fear and fearfulness in determining behaviour. In: Grandin, T. (Ed.): Genetics and the behaviour of domestic animals. Academic Press, San Diego, USA, pp. 67-111.
- Borchelt, P.L., Ratner, S.C. 1973. Development of freezing and immobility predator defenses in the bobwhite quail. *Behavioral Biology* 8: 83-92.
- Brittas, R., Marström, V., Kenward, R.E., Karlbom, M. 1992. Survival and breeding success of reared and wild ring-necked pheasants in Sweden. *Journal of Wildlife Management* 56: 368-376.
- Butler, D.A., Davis, C. 2010. Effects of plastic bits on the condition and behaviour of captive-reared pheasants. *Veterinary Record* 166: 398-401.
- Draycott, R.A.H., Pock, K., Carroll, J.P. 2002. Sustainable management of a wild pheasant population in Austria. *Zeitschrift für Jagdwissenschaft* 48: 346-353.
- Draycott, R.A.H., Woodburb, M.I.A., Carroll, J.P., Sage, R.B. 2005. Effects of spring supplementary feeding on population density and breeding success of released pheasants *Phasianus colchicus* in Britain. *Wildlife Biology* 11: 177-182.
- Dumke, R.T., Pils, C.M. 1973. Mortality of radio-tagged pheasants on the Waterloo Wildlife Area. Wisconsin Department of Natural Resources, Technical Bulletin number 72, Madison, USA.
- Dwyer, C.M. 2004. How has the risk of predation shaped the behavioural responses of sheep to fear and distress? *Animal Welfare* 13: 269-281.
- Erhard, H.W., Mendl, M. 1999. Tonic immobility and emergence time in pigs – more evidence for behavioural strategies. *Applied Animal Behavioural Science* 61: 227-237.
- Erhard, H.W., Mendl, M., Christiansen, S.B. 1999. Individual differences in tonic immobility may reflect behavioural strategies. *Applied Animal Behaviour Science* 64: 31-46.
- Forkman, B., Boissy, A., Meunier-Salaün, M.C., Canali, E., Jones, R.B. 2007. A critical review of fear tests used on cattle, pigs, sheep, poultry and horses. *Physiology and Behaviour* 92: 340-374.

- Gallup Jr., G.G. 1977. Tonic immobility: The role of fear and predation. *The Psychological Record* 27: 41-61.
- Gallup Jr., G.G., Nash, R.F., Wagner, A.M. 1971. The tonic imobility reaction in chickens: Response characteristics and methodology. *Behavior Research Methods & Instrumentation* 3: 237-239.
- Hill, D., Robertson, P. 1988. Breeding success of wild and hand-reared ring-necked pheasants. *Journal of Wildlife Management* 52: 446-450.
- Hrabčáková, P., Bedáňová, I., Voslářová, E., Pištěková, V., Večerek, V. 2012. Evaluation of tonic immobility in common pheasant hens kept in different housing systems during laying period. *Archiv fur Tierzucht* 55: 626-632.
- Jones, R.B. 1986. The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. *Worlds Poultry Science Journal* 42: 82-96.
- Jones, R.B. 1987. Assessment of fear in adult laying hens: correlational analysis of methods and measures. *British Poultry Science* 28: 319-326.
- Jones, R.B., Mills, A.D. 1983. Estimation of fear in two lines of the domestic chick: correlations between various methods. *Behavioural Processes* 8: 243-253.
- Jones, R.B., Mills, A.D., Faure, J.M. 1991. Genetic and experimental manipulation of fear-related behavior in Japanese quail chicks (*Coturnix coturnix japonica*). *Journal of Comparative Psychology* 105: 15-24.
- Jones, R.B., Satterlee, D.G., Ryder, F.H. 1992. Fear and distress in Japanese quail of two lines genetically selected for low or high adrenocortical response to immobilization stress. *Hormones and Behaviour* 26: 385-393.
- Krauss, G.D., Graves, H.B., Zervanos, S.M. 1987. Survival of wild and game-farm cock pheasants released in Pennsylvania. *Journal of Wildlife Management* 51: 555-559.
- Launay, F., Mills, A. D., Faure, J.M. 1993. Effects of test age, line and sex on tonic immobility responses and social reinstatement behaviour in Japanese quail *Coturnix japonica*. *Behavioural Processes* 29: 1-16.
- Leif, A.P. 1994. Survival and reproduction of wild and pen-reared ring-necked pheasant hens. *Journal of Wildlife Management* 58: 500-506.
- Nowaczewski, S., Gosk, J., Kolanoś, B., Wolc, A., Kontecka, H. 2012. Characteristics of the tonic immobility reaction in young farm-reared ring-neck pheasants, common quails and grey partridges. *Journal of Ethology* 30: 289-294.
- Odén, K., Gunnarsson, S., Berg, C., Algers, B. 2005. Effects of sex composition on fear measured as tonic immobility and vigilance behaviour in large flocks of laying hens. *Applied Animal Behaviour Science* 95: 89-102.
- Rütting, T., Brandt, H., Clauß, W., Dzapo, W., Selzer, D. 2007. Comparative study of predator avoidance of pheasants (*Phasianus colchicus*) of different genetic origin. *European Journal of Wildlife Research* 53: 171-177.
- Santilli, F., Bagliacca, M. 2019. Fear and behavior of young pheasants reared with or without parent figure. *Avian Biology Research* 12: 23-27.
- Sargeant, A.B., Eberhardt, E.E. 1975. Death feigning by ducks in response to predation by red foxes (*Vulpes fulva*). *The American Midland Naturalist* 94: 108-119.
- Schütz, K.E., Forkman, B., Jensen, P. 2001. Domestication effects on foraging strategy, social behaviour and different fear responses: a comparison between the red jungle fowl (*Gallus gallus*) and a modern layer strain. *Applied Animal Behaviour Science* 74: 1-14.
- Sodeikat, G., Niepel, L., Fehlberg, U., Pohlmeyer, K. 1995. Comparative-study on survival of released pheasants (*Phasianus colchicus* spec.) reared in intensive and extensive animal keeping. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 102: 112-116.

- Thompson, R.K.R., Foltin, R.W., Boylan, R.J., Sweet, A., Graves, C.A., Lowitz, C.E. 1981. Tonic immobility in Japanese quail can reduce the probability of sustained attack by cat. *Animal Learning & Behavior* 9: 145-149.
- Whiteside, M.A., Sage, R., Madden, J.R. 2016. Multiple behavioural, morphological and cognitive developmental changes arise from a single alteration to early life spatial environment, resulting in fitness consequences for released pheasants. *Royal Society Open Science* 3: 160008.
- Zar, J.H. 1999. *Biostatistical Analysis*. 4th ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey.

Výskyt endoparazitů v chovu bažantů

Jarmila Konvalinová, Lucie Halešová, Pavel Forejtek, Martina Volfová, Iveta Bedáňová

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

Abstrakt

Od března do října 2020 byl prováděn odběr trusu v chovných hejnech bažantů a odchovných kuřat ve 3 bažantnicích náležejícím k honitbám Lesního závodu Židlochovice. V chovných hejnech byl trus sbírán 1x týdně, v odchovných byl odběr trusu prováděn 2x týdně. Do odchoven byla kuřata umístěna v 1 týdnu věku a byla zde sledována po dobu 14 týdnů. Vzoroky trusu byly vyšetřeny na přítomnost parazitů pomocí kvantitativní flotační metody. Celkem byly v chovech bažantů prokázány a sledovány 4 druhy parazitů. Jednalo se o kokcidie, kapilárie, roupy a *S. trachea*. Ve výskytu kokcidií nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi chovnými hejny ($P = 0,09$), u kapilárií také nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu vajíček parazitů ($P = 0,69$). V případě výskytu vajíček roupů byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P = 0,02$) mezi oběma chovnými hejny, v případě výskytu *S. trachea* nebyl rozdíl statisticky významný ($P = 0,10$). V odchovných bažantích kuřat byly dominantním parazitem kokcidie. Vajíčka kapilárií, roupů a *S. trachea* byla zachycena jen v několika případech a jejich počty se pohybovaly od 50 do 100 v 1 g trusu. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P = 0,45$) mezi výskytem kokcidií v jednotlivých odchovných kuřat.

Úvod

Původní oblastí výskytu bažanta kolchického (*Phasianus colchicus*) je údolí řeky Phasis na Kavkaze. První písemný záznam o výskytu v Čechách pochází z roku 1330 (Beklová et al., 1998). Bažanti se chovali v bažantnicích divokým nebo polodivokým způsobem. Od poloviny 80. let 19. století začaly stavy bažantů v Čechách významně klesat. Postupně se začaly zavádět různé systémy umělého chovu. V současné době je umělý odchov bažanta založený na snůšce vajec v ostruhárnách, kuřata se líhnou v elektrických líhních a odchov probíhá ve velkokapacitních odchovných halách s následným převodem mladých bažantů do volnosti prostřednictvím vypouštěcích voliér. Tento způsob chovu vede ke kumulaci jedinců na relativně malé ploše a tím se značně zvyšuje riziko výskytu a přenosu infekčních a parazitárních onemocnění. Častým problémem v odchovných bažantů je kokcidióza, trichomonóza, histomonóza, heterakidóza, kapilarióza a syngamóza (Forejtek and Chroust, 2010).

Kokcidióza

Jedná se o druhově specifické jednobuněčné parazity. U bažantů se nejčastěji vyskytují kokcidie rodu *Eimeria* a byl popsán i 1 druh rodu *Isospora* (Beklová et al., 1998; Gassal, 2003; McDougald and Fitz-Coy, 2013). Lokalizace parazitů závisí na druhu kokcidií, infekce postihují celé střevo včetně slepých střev. Prevalence u volně žijících bažantů se pohybuje od 13 do 82 %. Největší význam mají kokcidie v umělých odchovech. Intenzita a průběh onemocnění závisí na koncentraci kuřat v odchovně, zoohygieně chovu, kvalitě krmení a napájení. Nejčastěji se vyskytují ve věku 2-8 týdnů, ojediněle u bažantů starých 9-14 týdnů (Forejtek and Chroust, 2010). Dospělí mají oocysty kokcidií v trusu běžně, onemocní ale jen výjimečně. U kuřat se objevuje průjem, hynou na dehydrataci organismu. Ke ztrátám dochází i v důsledku shlukování, ušlapáním a následným udušením. K terapii se používají sulfonamidy a toltrazuril.

Trichomonóza

Původcem je jednobuněčný bičíkovec *Trichomonas phasiani*. Nejčastěji onemocní bažanti ve věku 3-6 týdnů věku. Letální infekce byly zjištěny i u 10 denních kuřat a akutní onemocnění i u ptáků ve věku 10 týdnů (Forejtek and Vodňanský, 2013). K infekcím dochází často v návaznosti na kokcidiózu, která vede ke snížení odolnosti střevní sliznice (Forejtek, 2006). Lokalizují se především v tlustém střevě a slepých střevěch. Typický je vodnatý, zpěněný tzv. hořčicový průjem. K terapii se používal ronidazol, metronidazol či carnidazol. Jejich použití není u potravinových zvířat povoleno a ověřují se nové látky ze skupiny tzv. chalkonů (Atkinson et al., 2008).

Histomonóza

Původcem je prvok *Histomonas meleagridis*. Jeho bičíkaté formy parazitují ve slepých střevěch, bezbičíkaté, ameboidní formy se nachází i v játrech. Významně se na šíření tohoto parazita podílí roup kuří (*Heterakis gallinarum*) v jehož těle a zejména vajíčkách se hromadí. Významným epizootologickým faktorem jsou také žížaly. Onemocnění se vyskytuje u bažantů od věku 3 týdnů. Objevuje se inapetence, apatie a žlutozelený průjem. Dříve k terapii používané imidazolové deriváty jsou dnes u potravinových zvířat nepovolené. Prevencí je zabránit výskytu roupů v chovu.

Heterakidóza

Původcem je hlístice rodu *Heterakis*. Jedná se o geohelmita, jako paratenický hostitel se mohou uplatňovat žížaly. Vajíčka roupů jsou poměrně odolná, ve vlhku vydrží 8-9 měsíců. Parazitují ve slepém střevě. Klinické příznaky zahrnují apatii, průjem a silně páchnoucí výkaly. Součástí prevence je pravidelná dehelmintizace, důležité je odstraňování trusu a zoohygienická opatření. K terapii se používají anthelmintika (Jurajda, 2003).

Kapilarióza

Původci jsou nitkovité hlístice rodu *Capillaria*. Parazitují v jícnu, voleti a tenkých střevěch mnoha druhů volně žijících i domácích ptáků (Permin et al., 1999) Jejich vývoj je přímý i nepřímý. Jako mezihostitelé se uplatňují žížaly. Vývoj vajíček ve vnějším prostředí trvá 22 dní, i déle než 1 měsíc. Vajíčka jsou dosti odolná, vydrží infekční více jak 1 rok. U postižených zvířat působí kapilárie hubnutí, apatii, průjmy a anémii. Pro prevenci je důležitá opakovaná dehelmintizace a asanace prostředí. K terapii se používají anthelmintika (mebendazol, thiabendazol).

Syngamóza

Původcem je hlístice *Syngamus trachea*. Parazituje v průdušnici hrabavých ptáků, živí se krví. Vajíčka jsou vykašlána, spolknuta a vyloučena trusem. Vývoj je přímý, ale uplatňují se zde jako rezervoároví hostitelé žížaly, plži nebo hmyz. V žížale dokáže přežít až 4 roky, ve vnějším prostředí 9 měsíců. Závažná onemocnění působí zejména u mladých ptáků. Projevuje se anémií a různě stupně dušnosti. K terapii se používají anthelmintika (benzimidazoly).

Vzhledem ke zvýšenému riziku zavlečení vyjmenovaných parazitů do chovu se tak do popředí dostává prevence a jejich včasná diagnostika. Cílem této práce bylo provést monitoring parazitóz v chovných hejnech bažantů a v odchovných kuřat bažantů, a zjistit, zda se jednotlivé chovy ve výskytu parazitů liší.

Materiál a metodika

Od března do října 2020 byl prováděn odběr trusu v chovných hejnech bažantů a odchovných kuřat ve 3 bažantnicích náležejícím k honitbám Lesního závodu Židlochovice.

V chovných hejnech (Ch1 a Ch2) byl trus sbírán 1x týdně, v období od začátku března až do začátku června. Po tomto datu došlo k rozpuštění chovných hejn a nebylo možno dále sledovat výskyt parazitů ve stejné skupině ptáků. V jednom chovném hejnu bylo cca 3000 ptáků. V odchovných byl odběr trusu prováděn 2x týdně. Do odchoven byla kuřata umístěna v 1 týdnu věku a byla zde sledována po dobu 14 týdnů. Jednalo se o tři odchovná zařízení

(O1, O2 a O3), v odchovných bylo O1 7000, O2 4000 a O3 6000 kuřat. Reprezentativní vzorky trusu byly sbírány rovnoměrně po celé ploše voliéry. Vyšetřování proběhlo nejpozději do druhého dne v laboratoři pomocí kvantitativní flotační metody. Vzorek byl nejprve homogenizován, potom bylo odebráno množství o hmotnosti 3g. K vzorku trusu bylo přidáno 42 ml vody. Po důkladném promíchání byl vzorek přecezen přes sítko a suspenze nalita do zkumavky o objemu 15 ml. Následně byl vzorek odstředován při 2000 otáčkách po dobu 5 minut. Po té byl supernatant slit a k sedimentu přidán nasycený roztok cukru (1,3 g/cm³). Obsah zkumavky byl řádně promíchán a roztok byl pomocí pipety přenesen do McMasterovy komůrky. Po 5 minutách bylo provedeno mikroskopické vyšetření při zvětšení 100x. Vajíčka parazitů byla spočítána a jejich počet byl vynásoben 50x, čímž byl získán počet vajíček parazitů v 1 gramu trusu (EPG). Výsledné hodnoty byly zpracovány ve formě tabulek a grafů.

Získané výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat 6.5. Data byla nejprve testována na normalitu, a protože nebyla rozložena v Gaussově křivce, byly pro jejich zpracování použity neparametrické statistické metody. V případě porovnání 2 souborů dat byl použit Mann-Whitneyův pořadový test a v případě porovnání 3 souborů byla použita Kruskal-Wallis ANOVA. Hodnota $P < 0,05$ byla při testování považována za statisticky významnou.

Výsledky

Celkem byly v chovech bažantů prokázány a sledovány 4 druhy parazitů. Jednalo se o kokcidie, kapilárie, roupý a *S. trachea*.

Chovná hejna

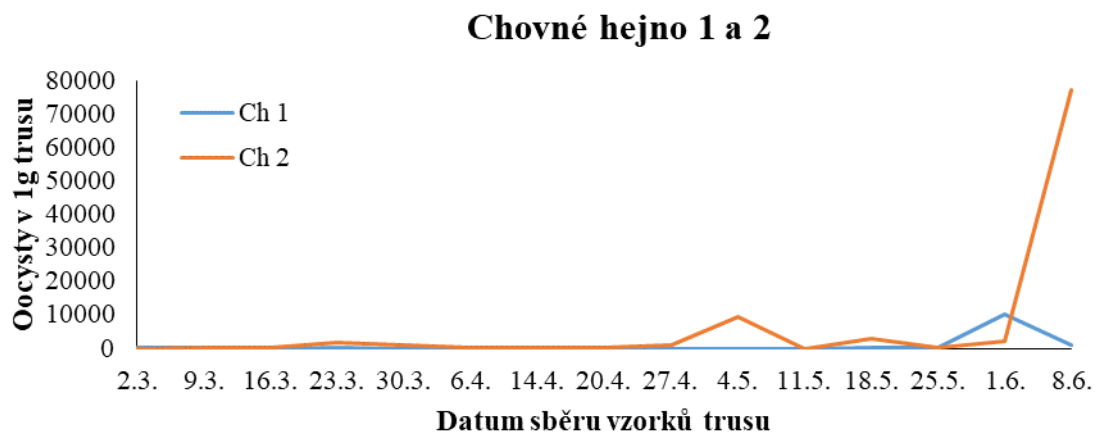
V tabulce č. 1 jsou souhrnně uvedeny počty jednotlivých parazitů v 1 g trusu v jednotlivých odběrech. U kokidií nebyl prokázán statisticky významný rozdíl mezi Ch 1 a Ch 2 ($P = 0,0884$), u kapilárií také nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ve výskytu vajíček parazitů ($P = 0,6891$). V případě výskytu vajíček roupů byl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P = 0,0248$) mezi oběma chovnými hejny, v případě výskytu *S. trachea* nebyl rozdíl statisticky významný ($P = 0,0996$).

Tabulka č. 1. Výskyt vajíček jednotlivých parazitů v chovných hejnech 1 a 2

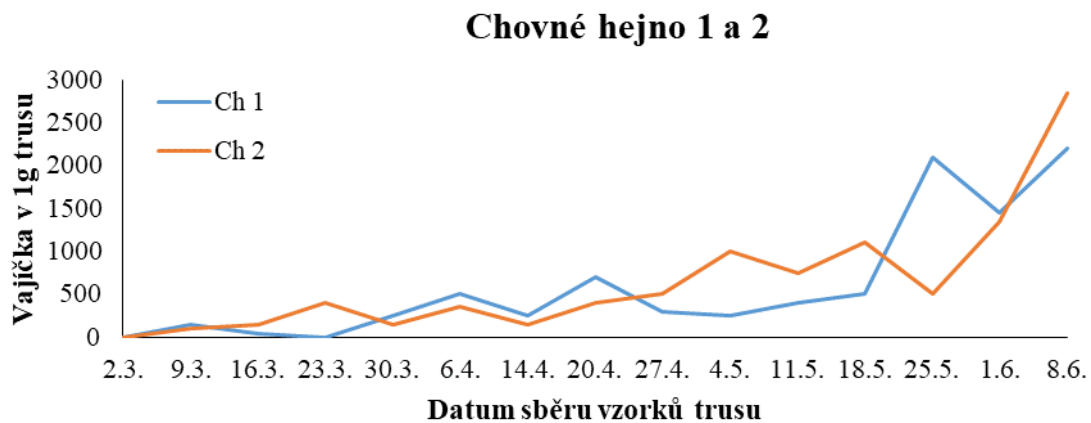
parazit	chov	termín odběru														
		2.3.	9.3.	16.3.	23.3.	30.3.	6.4.	14.4.	20.4.	27.4.	4.5.	11.5.	18.5.	25.5.	1.6.	8.6.
kokcidie	Ch 1	50	350	0	100	0	50	200	150	0	0	0	250	100	10050	1150
	Ch 2	0	300	150	1850	1150	100	60	50	1150	9550	0	3050	100	2000	77250
kapilárie	Ch 1	0	150	50	0	250	500	250	700	300	250	400	500	2100	1450	2200
	Ch 2	0	100	150	400	150	350	150	400	500	1000	750	1100	500	1350	2850
roupý	Ch 1	50	100	150	0	50	50	0	100	650	350	450	100	50	1100	1050
	Ch 2	0	50	250	100	50	550	200	700	1100	1700	2000	3650	3850	7600	42050
<i>S.trachea</i>	Ch 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Ch 2	0	0	0	0	0	0	0	0	200	50	0	0	50	150	0

Grafy č. 1-4 zobrazují dynamiku ve výskytu prokázaných parazitů v chovném hejnu 1 a 2 během prováděných odběrů.

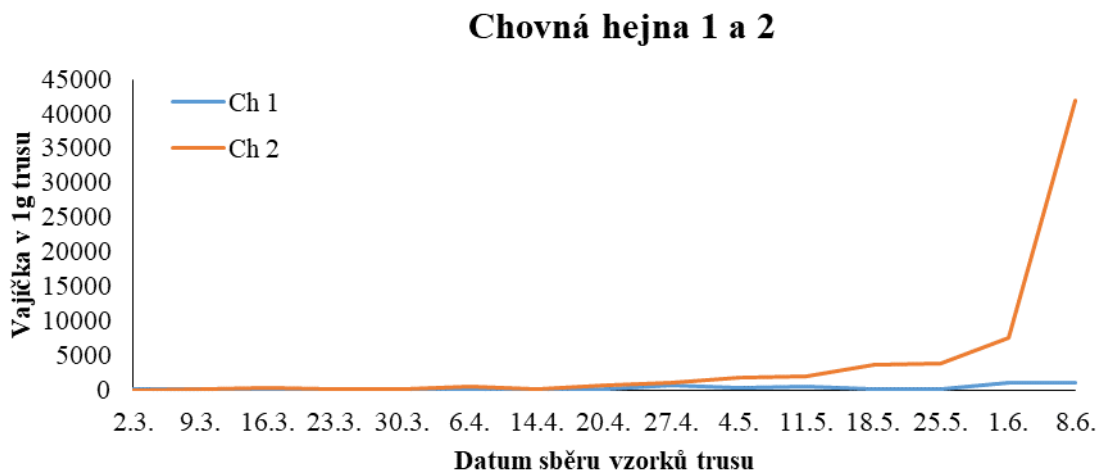
Graf č. 1. Dynamika výskytu oocyst kokciidií v 1 g trusu u chovného hejna 1 a 2



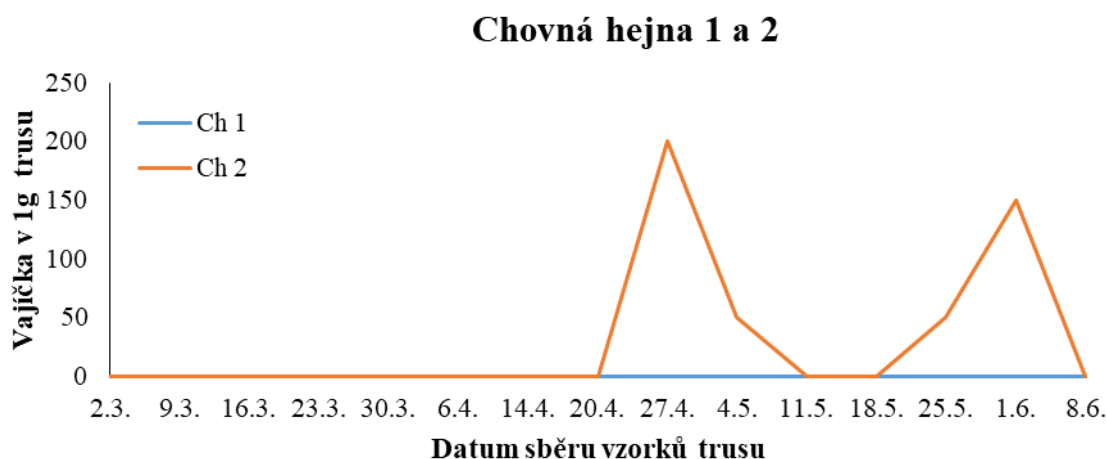
Graf č. 2. Dynamika výskytu vajíček kapilárií v 1 gramu trusu u chovného hejna 1 a 2



Graf č. 3. Dynamika výskytu vajíček roupů v 1 gramu trusu u chovného hejna 1 a 2



Graf č. 4. Dynamika výskytu vajíček *S. trachea* v 1 gramu trusu u chovného hejna 1 a 2



Odchovny kuřat

V odchovných bažantích kuřat byly dominantním parazitem kokcidie. Vajíčka kapilárií, roupů a *S. trachea* byla zachycena jen v několika případech a jejich počty se pohybovaly od 50 do 100 v 1 g trusu (viz. Tab. č. 3).

Tab. č. 2 zachycuje průměrný počet oocyst kokcidií v 1 gramu trusu v jednotlivých týdnech ve všech odchovných bažantích kuřat.

Grafy č. 5-7 ukazují dynamiku výskytu kokcidií ve všech třech odchovných po dobu 14 týdnů. Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($P = 0,4541$) mezi výskytem kokcidií v odchovných O1, O2 a O3.

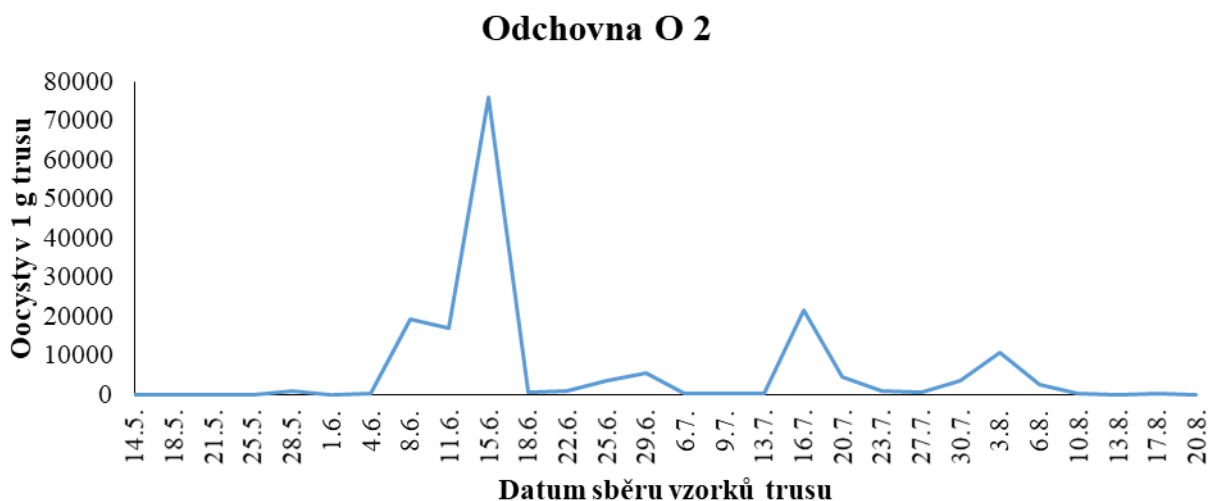
Tabulka č. 2. Průměrný počet oocyst kokcidií v 1 gramu trusu v jednotlivých týdnech v odchovných O1, O2 a O3

odchovna	týden													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
O 1	0	11375	29400	25610	7975	11200	10325	1875	1350	18745	375	250	450	3000
O 2	25	0	550	9725	46600	725	4550	425	10975	2725	2250	6775	200	175
O 3	0	5550	21075	10700	1100	24450	125	4175	475	725	1150	1700	2000	800

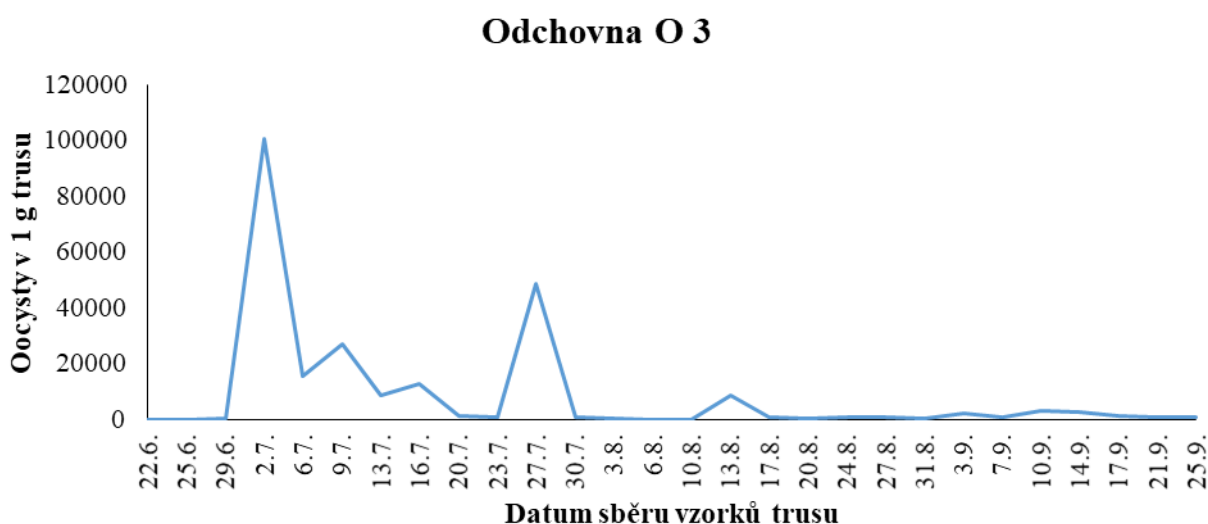
Graf č. 5. Počty oocyst kokcidií v 1 g trusu v jednotlivých odběrech v odchovně O 1



Graf č. 6. Počty oocyst kokciidií v 1 g trusu v jednotlivých odběrech v odchovně O 2



Graf č. 7. Počty oocyst kokciidií v 1 g trusu v jednotlivých odběrech v odchovně O 3



Tabulka č. 3 ukazuje druh parazita a četnost jeho zachycení v odchovných kuřat. Množství vajíček parazitů se v jednotlivých záchytech pohybovalo od 50 do 100 vajíček v 1 g trusu.

Tabulka č. 3. Ostatní parazité zachycení v odchovných kuřat

Odchovna	Kapilárie	Roup	<i>S. trachea</i>
O 1	1x	6x	3x
O 2	4x	7x	4x
O 3	0	1x	1x

Diskuze

Při vyšetřování vzorků trusu u chovných hejn bažantů jsme prokázali přítomnost celkem 4 druhů parazitů. Jednalo se o oocysty kokciidií, vajíčka kapilárií, roupů a vajíčka *S. trachea*.

Chovná hejna

Kokcidie

V chovném hejnu 1 se počty oocyst kokcidií pohybovaly v březnu, dubnu a květnu na nízkých hodnotách, od 50 do 350 v gramu trusu, k nárůstu došlo až v červnu, kdy se počty vyšplhaly až na 10 050 oocyst v 1 g trusu. V chovném hejnu 2 se počty oocyst kokcidií v trusu pohybovaly již od března na vyšších hodnotách (1 850 v 1 g trusu) a v průběhu dubna dosáhly hodnot až 1 150. V květnu pak nejvyšší záchyt činil 9 550 a červnu došlo k nárůstu až na 77 250 oocyst v 1 g trusu. Rozdíl ve výskytu oocyst kokcidií (průměr/medián za celé sledované období) mezi chovnými hejny byl statisticky nevýznamný. Po tomto datu došlo k rozpuštění chovných hejn a nebylo možno dále sledovat výskyt parazitů ve stejné skupině ptáků. Chovné hejno 2 bylo umístěno ve voliérách uprostřed lesa, chovné hejno 1 na konci obce Židlochovice. Vyšší záchyt kokcidií u hejna 2 by se dal vysvětlit umístěním v přirozenějších podmínkách s větší možností přístupu i volně žijících ptáků. Nejvyšších počtů zachycených oocyst kokcidií v trusu bylo zjištěno v obou chovných hejnech v měsíci květnu a červnu.

Kapilárie

Vajíčka kapilárií byla nacházena v chovném hejnu 1 od začátku března až do poloviny dubna v malých množstvích, do 500 v gramu trusu, koncem května počet dosáhl hodnot 700 a k nárůstu došlo v měsíci květnu a červnu až na hodnoty 2 200 vajíček v gramu trusu. V chovném hejnu 2 se počty vajíček v březnu a dubnu pohybovaly do 500 v gramu trusu, v květnu došlo k nárůstu až na 1 100 a v červnu až na 2 850 vajíček v gramu trusu. Rozdíl ve výskytu vajíček kapilárií (průměr/medián za celé sledované období) mezi chovnými hejny byl statisticky nevýznamný. V obou hejnech se výskyt vajíček kapilárií pohyboval zhruba ve stejných počtech s nejvyšším nárůstem v měsících květnu a červnu.

Roupi

Počet vajíček roupů se v březnu pohyboval v chovném hejnu 1 do 150 v gramu trusu, v dubnu a květnu došlo k mírnému nárůstu až na hodnoty 650 vajíček v gramu trusu a nejvyššího počtu bylo dosaženo v červnu – 1 100 vajíček v gramu trusu. V chovném hejnu 2 byly počty nalezených vajíček vyšší. V březnu až 250, dubnu 1 100, v květnu 3 850 a nejvíce v červnu – až 42 050 v gramu trusu. Rozdíl ve výskytu vajíček roupů (průměr/medián za celé sledované období) mezi chovnými hejny byl statisticky významný.

S. trachea

V chovném hejnu 1 nebyla ve sledovaném období zachycena ani jednou přítomnost vajíček *S. trachea* ve vyšetřovaných vzorcích trusu. V chovném hejnu 2 byla vajíčka prokázána celkem 4x. Jeden záchyt v dubnu (200 vajíček v gramu trusu), 2 záchyty v květnu (50 a 50 vajíček v gramu trusu) a jeden v červnu (150 vajíček v gramu trusu). Nízký záchyt by mohl být vysvětlen tím, že v těchto měsících panovalo na našem území sucho a vzhledem k tomu, že mezihostitelem tohoto parazita jsou žížaly, byla snížena možnost nákazy pozřením mezihostitele.

Celkově se dá říci, že počet prokázaných parazitů v trusu byl vyšší v chovném hejnu 2. To může být dáno faktem, že chovné hejno 1 bylo umístěno v lokalitě na kraji města Židlochovice a chovné hejno uprostřed lesů. Ptáci z chovného hejna 2 byli tak více situováni ve volné přírodě s větší možností přístupu volně žijícího ptactva a tak i vyššímu riziku vystavení parazitům.

Odchovny bažantích kuřat

V odchovných kuřat byly hlavním parazitem kokcidie. U ostatních vajíček parazitů se jednalo jen o několik záhytů (viz Tab. č. 3). Do odchoven přicházeli bažantí kuřata ve věku 1 týdne a byla zde sledována po dobu 14 týdnů. Odchov probíhal nejprve v halách, později byli bažanti vypuštěni do voliér. Do odchovny 1 byla kuřata naskladněna 9. 6. a první kokcidie

v trusu byli zachyceny 22. 6., tj. ve stáří 19 dní, nejvyšší počty oocyst v trusu byly zjištěny 2. a 6. 7. (až 53 700/g trusu) a v druhé polovině srpna – 24. 8. (36 950/g trusu), tedy ve věku 4 a 10 týdnů. Do odchovny 2 byla kuřata naskladněna 12. 5. a první záchyt kokcidií byl 18. 5., respektive 28. 5., tedy ve stáří 23 dní. Nejvyšší záchyt byl zaznamenán 15. 6. (76 050/g trusu) a pak 16. 7. (21 500/g trusu), tedy ve věku 5 a 9 týdnů. Do odchovny 3 byla kuřata naskladněna 16. 6. A první záchyt kokcidií byl 29. 6., tedy ve věku 27 dní. Nejvyšší záchyt byl zaznamenán 2. 7. (100 700/g trusu) a 27. 7. (48 350/g trusu), tedy ve věku 3 a 7 týdnů. Rozdíl ve výskytu oocyst kokcidií (průměr/medián za celé sledované období) mezi jednotlivými odchovnými byl statisticky nevýznamný. Forejtek and Chroust (2010) uvádějí, že kokcidie se nejčastěji vyskytují ve věku 2-8 týdnů, ojediněle u bažantů starých 9-14 týdnů. Tyto údaje korelují s námi zjištěnými údaji. Přesto, že krmivo pro bažanty je medikováno antikokcidiky, dochází v odchovnách opětovně k nárůstu výskytů kokcidií v trusu. V odchovnách po nejvyšším nárůstu počtu kokcidií musel být podán toltrazuril, ale už za 4-5 dní po podání se počty zachycených kokcidií znovu začaly zvyšovat, To odpovídá údajům Forejtky and Chrousta (2010), kteří uvádějí, že po úspěšné léčbě se následná nová infekce může projevit již za 5-7 dní. Kapilárie byly v odchovně 1 zachyceny 1x, v O2 4x a v O3 zachyceny nebyly. Nízký výskyt kapilárií v odchovnách lze přisoudit tomu, že mláďata jsou nejprve chována v halách, a aby se nakazila, je potřeba pozřít mezipřenositele, kterým jsou různé druhy zemních žížal. Kapilárie pohlavně dospívají za 3-4 týdny po infekci v trávicím traktu. První záchyt v O1 byl 25. 5. a ostatní záchyty spadají do konce srpna a začátku září. Roupy byly v odchovnách zachyceny častěji než kapilárie, v O1 6x, v O2 7x a v O3 1x. Polovina záchyťů spadala do období srpna a září. Relativně častější výskyt tohoto parazita v odchovnách lze vysvětlit tím, že se jedná o geohelmita a jeho vajíčka jsou ve vnějším prostředí odolná, ve vlhku vydrží až 8-9 měsíců. Vajíčka *S. trachea* byla nalezena v odchovně O1 3x, v O2 4x a v O3 1x. Polovina záchyťů spadala do období srpna a září, kdy se kuřata mohla nakazit požitím žížaly nebo plže.

Závěr

Vyšetření trusu v chovech bažantů prokázalo přítomnost 4 druhů parazitů. Jednalo se o kokcidie, kapilárie, roupy a *S. trachea*. V chovných hejnech se tyto parazity vyskytovali běžně (s výjimkou *S. trachea*) a k navýšení jejich počtu docházelo zejména v měsíci červnu. V odchovnách kuřat byly dominantním parazitem kokcidie, záchyty ostatních parazitů byly jen sporadické. První kokcidie se objevily v trusu u bažantů ve věku 19-27 dní a nejvyšších nárůstů bylo dosaženo ve věku 3-5 a 7-10 týdnů. Pro úspěšný odchov bažantů kuřat je monitorování výskytu kokcidií zásadní.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Atkinson, C.T., Thomas, N.J., Hunter, D.B. 2008. Parasitic Diseases of Wild Birds. John Wiley & Sons, Inc.
- Beklová, M. 1998. Lovná pernatá zvěř - ekologie, chov, choroby a veterinární zajištění chovu. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita.
- Eckert, J., Friedhoff, K.T., Zahner, H., Deplazes, P. 2008. Lehrbuch der Parasitologie für die Tiermedizin. Enke Verlag Stuttgart, 632.
- Forejtek, P., Chroust, K. 2010. Parazitární onemocnění pernaté zvěře vyvolaná prvoky. Myslivost 5: 64–65.
- Forejtek, P., Chroust, K. 2010. Hlístice trávicího traktu pernaté zvěře. Myslivost 11: 62-63.
- Forejtek, P., Vodňanský, M. 2013. Zdravotní problematika zvěře: příručka pro mysliveckou praxi. Brno: Středoevropský institut ekologie zvěře.

- Gassal, S. 2003. Untersuchungen zum Ekto- und Endoparasitenbefall von Fasanhähnen (*Phasianus colchicus*). Dissertation, Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig, 255.
- Jurajda, V. 2003. Nemoci drůbeže a ptactva – metabolické poruchy, parazitární infekce, nemoci trávicího ústrojí. Brno: VFU Brno.
- McDougald, L.R., Fitz-Coy, S.H. 2013. Coccidiosis. In: Swayne, D.E., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Suarez, D.L., Nair, V. (Eds.): Diseases of Poultry 13th edn. Ames, IA: Wiley-Blackwell, pp. 1148-1166.
- Permin, A., Bisgaard, M., Frandsen, F., Perman, M., Kold, J., Nansen, P. 1999. Prevalence of gastrointestinal helminths in different poultry production systems. British Poultry Science 40: 439-443.

Savci v záchranných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchranných stanicích v České republice

Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Záchranné stanice každoročně přijímají velké množství savců s cílem poskytnout jim péči či léčbu a navrátit je zpět do přírody. Důvodů k přijetí savců do záchranných stanic je celá řada a zahrnují přímé či nepřímé důsledky antropogenní činnosti nebo dalších neantropogenních příčin vedoucích k neschopnosti zvířat se o sebe postarat a přežít. Za období let 2010 až 2019 bylo do záchranných stanic přijato celkem 74 558 savců, nejčastěji z řádu letounů (42,71 %), hmyzožravců (32,60 %), hlodavců (7,59 %) a zajíců (6,44 %). Nejčastějším důvodem příjmu byl příjem mláďat (30,30 %), jiné, blíže nepopsané důvody (16,75 %), probuzení hibernujícího savce (11,13 %) a proniknutí zvířete do budovy (10,28 %). V menší míře byly provedeny záchranné transfery (7,83 %) a přijata zvířata po zranění mimo zranění způsobených elektrickým zařízením (4,95 %), po střetu se silničním vozidlem (4,59 %) a po pokousání jiným živočichem (4,11 %). Další důvody příjmu (uvíznutí, zbytečně odchycená zvířata, odchyt, převoz z jiné stanice, infekční onemocnění a další) byly zastoupeny u méně než 4 % z celkového počtu zvířat. Nejméně přijatých savců bylo na základě zranění elektrickým zařízením (0,01 %). Velká část savců byla úspěšně vypuštěna (50,45%), 25,73 % bylo utraceno nebo uhynulo, 5,09 % zůstalo nadále v zajetí po předání jiné osobě, organizaci nebo po převedení k expozičním účelům. Další savci byli léčeni v době odevzdání evidence (8,74 %), byli vyřazeni z neznámého důvodu (4,53 %) nebo unikli (0,15 %). Ve sledovaném období let 2010 až 2019 byl potvrzen stoupající trend v počtu každoročně přijatých savců ($r_{sp} = 0,9515$, $p < 0,01$).

Úvod

Dle zákona na ochranu přírody a krajiny je za záchrannou stanicí považováno zařízení, které poskytuje komplexní péči zvířatům dočasně či trvale neschopným přežít ve volné přírodě s hlavním cílem je do přirozeného prostředí navrátit. Příčin vzniku handicapu a tedy důvodu pro příjem savců do záchranných stanic je celá řada a velkou část zaujímají dopady lidské činnosti (Schenk and Souza, 2014). Právě antropogenní činnost je jednou z příčin úbytku či ohrožení zdraví volně žijících zvířat (Lande, 1998). Mezi tyto příčiny patří, ať přímo či nepřímo následkem lidské činnosti, poranění domácími zvířaty (Loss et al., 2013; Loyd et al., 2017; Woods et al., 2003), střet s vozidlem a úmrtnost na silnicích (Carvalho et al., 2018; Haigh et al., 2014; Fahrig and Ritwinski, 2009), obchod se zvířaty (Nijman, 2010; Said et al., 2018), fragmentace a úbytek stanovišť (Laurance et al., 2000) a mnoho dalších. Existuje i celá řada neantropogenních vlivů, jako jsou zranění, nemoci a další situace během života jedince, která mu znemožní se o sebe postarat. Všechny tyto faktory, tedy antropogenní i ty bez přičinění člověka, vedou ke vzniku různorodých handicapů a právě taková zvířata jsou, za přičinění veřejnosti, přijímána do záchranných stanic. Handicapovaní savci a jejich mláďata zaujímají každoročně velkou část přijímaných zvířat (Grogan and Kelly, 2013; Molina-López et al., 2017).

Mezi první úkony v záchranné stanici po příjmu handicapovaného zvířete patří zhodnocení zdravotního stavu, následuje léčba či péče o opuštěná mláďata a další činnosti (Bandouchová et al., 2014). U volně žijícího druhu zvířete je také důležité zhodnotit přínos léčby s ohledem na welfare zvířat a prognózu do budoucnosti, neboť navrácení do přírody je

hlavním cílem. Důležité je také u těchto druhů zhodnotit míru stresu, které jsou vystaveni během manipulace a přítomnosti člověka (Narayan and Vanderneut, 2019). Volba vhodné lokality pro vypuštění živočicha na svobodu je rovněž důležitým aspektem nejen pro přežití konkrétního jedince, ale také pro stávající populaci volně žijících zvířat v dané lokalitě, která tím může být ovlivněna (Kirkwood and Best, 1998). Stanovit úspěšnost přežití zvířat po vypuštění není zcela jednoduché, nicméně lze použít některé metody ke sledování těchto zvířat a posouzení míry přežití (Molony et al., 2006). Vzhledem ke klesajícímu počtu volně žijících zvířat a přibývání ohrožených a kriticky ohrožených druhů (Hoffmann et al., 2011) je činnost záchranných stanic nezanedbatelná v oblasti ochrany přírody.

Cílem této práce bylo zjistit celkový počet savců přijímaných do záchranných stanic v letech 2010 až 2019 a dále vyhodnotit důvody jejich přijetí do záchranné stanice a vyřazení z evidence záchranných stanic.

Materiál a metodika

Data pro analýzu byla získána z databáze Ministerstva životního prostředí. Předmětem analýzy byly údaje z 35 záchranných stanic o počtech přijatých zvířat, datu a důvodu přijetí a datu a důvodu vyřazení z evidence během období let 2010 až 2019. V celkových počtech jsou zahrnuta také domácí zvířata a exotické druhy, protože některé záchranné stanice se podílí i na péči o tato zvířata, jednalo se však o minoritní počty.

K statickému zpracování dat byl využit program UNISTAT Excel 6.5 for Excel. Byly zhodnoceny celkové počty savců přijatých v letech 2010 až 2019. Pro posouzení trendu vývoje počtu přijatých savců v průběhu let jsme použili Spearmanův pořadový test. Výsledkem tohoto testu bylo zjištění koeficientu pořadové korelace, který určil pozitivní nebo negativní trend vývoje. Dále byly sledovány počty a procentuální zastoupení savců dle jednotlivých řádů. Ke statistickému posouzení byla využita neparametrická metoda kontingenčních tabulek s využitím Yatesovy korekce. Stejnou metodou byly také hodnoceny důvody k zařazení zvířat do evidence záchranných stanic a rovněž důvody jejich vyřazení.

Výsledky

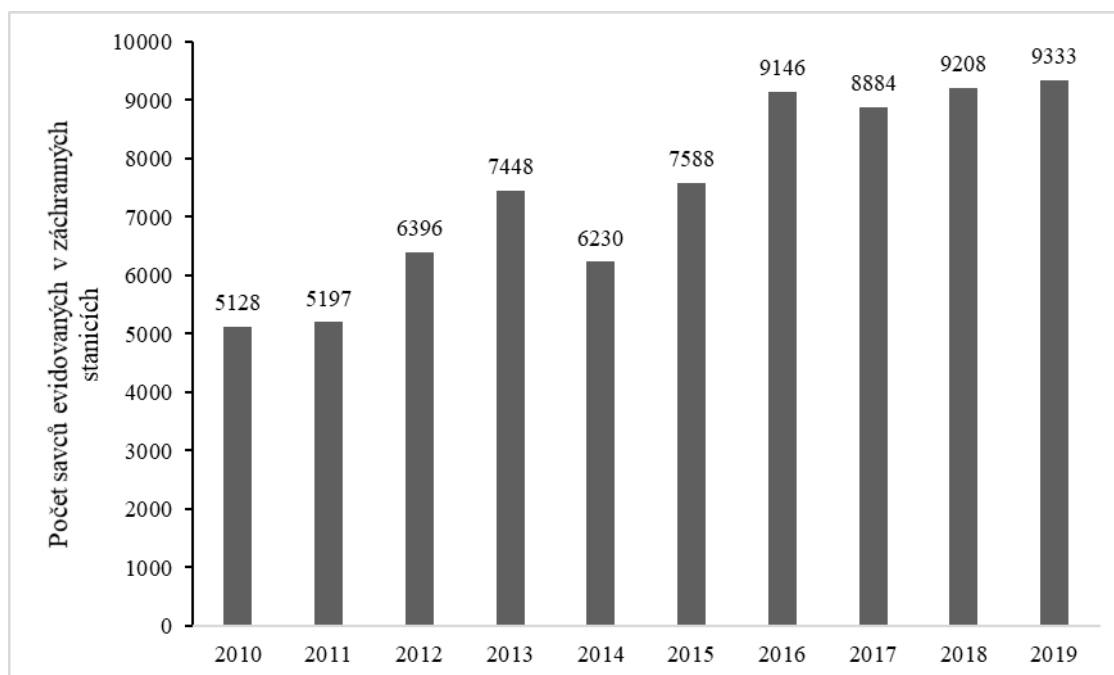
Během období let 2010 až 2019 bylo v záchranných stanicích evidováno celkem 74 558 savců. Z grafu č. 1 je patrný vzestupný trend ($r_{sp} = 0,9515$, $p < 0,01$) v počtu savců přijímaných do záchranných stanic v jednotlivých letech sledovaného období.

Druhové zastoupení savců přijatých do záchranných stanic (v rozdělení dle řádu) uvádí tabulka č. 1. Nejčastěji přijímanou skupinou byli letouni (42,71 %) a hmyzožravci (32,599 %), ostatní řády byly zastoupeny významně méně.

Tabulka č. 2 uvádí důvody přijetí savců do záchranných stanic během sledovaného období. Nejčastěji se jednalo o mláďata (30,30 %), přijetí hibernujících zvířat po probuzení (11,13 %) nebo zvířat nalezených v budovách (10,28 %). Méně přijatých zvířat bylo z důvodu záchranných transferů (7,83 %), zranění mimo zranění elektrickým zařízením (4,95 %), po střetu se silničním vozidlem (4,59 %) a po pokousání jiným živočichem (4,11 %). Další důvody k přijetí do záchranných stanic jsou zastoupeny méně jak 4 % (uvíznutí, zbytečně odchycená zvířata atd.). U významné skupiny savců (16,75 %) nebyl důvod přijetí specifikován.

Důvod vyřazení zvířat z evidence záchranných stanic během sledovaného období uvádí tabulka č. 3. Nejčastějším důvodem k vyřazení z evidence bylo úspěšné vypuštění (50,45 %). U 25,73 % došlo k úhynu nebo utracení.

Graf č. 1. Počet savců evidovaných v záchranných stanicích v období let 2010 až 2019



Tabulka č. 1. Druhové zastoupení savců přijatých do záchranných stanic během období let 2010 až 2019

Řád	počet	%
Letouni	31 842	42,708 ^a
Hmyzožravci	24 305	32,599 ^b
Hlodavci	5 657	7,587 ^c
Zajíci	4 799	6,437 ^d
Šelmy	3 978	5,335 ^e
Sudokopytníci	3 964	5,317 ^e
Lichokopytníci	7	0,009 ^f
Málozubí	6	0,008 ^g

a,b,c,d,e,f,g rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Tabulka č. 2. Důvod zařazení savců do evidence záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod příjmu	počet	%
Mláďata	22 594	30,30 ^a
Jiné důvody	12 487	16,75 ^b
Probuzení z hibernace	8 300	11,13 ^c
Proniknutí do budovy	7 663	10,28 ^d
Záchranný transfer	5 840	7,83 ^e
Zranění (mimo elektrické zařízení)	3 687	4,95 ^f
Sřet se silniční dopravou	3 420	4,59 ^g
Pokousání jiným živočichem	3 064	4,11 ^h
Uváznutí	2 897	3,89 ⁱ
Zbytečný odchyt	2 010	2,70 ^j
Infekce	758	1,02 ^k
Únik / opuštění	510	0,68 ^l
Výjezd	451	0,61 ^l
Otrava	348	0,47 ^m
Převoz z jiné stanice nebo chovu	142	0,19 ⁿ
Zachycení, zamotání	105	0,14 ^p
Odchov mláďat narozených ve stanici	84	0,11 ^p
Nezákonný odchyt	80	0,11 ^p
Sřet s vlakem	55	0,07 ^q
Zabavení	37	0,05 ^q
Postřelení	18	0,02 ^r
Zranění elektrickým zařízením	8	0,01 ^r

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,,n,o,p,q,r rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Tabulka č. 3. Důvod vyřazení savců z evidence záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod k vyřazení z evidence	počet	%
Vypuštění / přesun	37 613	50,45 ^a
Úhyn / utracení	19 186	25,73 ^b
Léčení	6 516	8,74 ^c
Jiné důvody	3 957	5,31 ^d
Zůstává v zajetí	3 797	5,09 ^d
Neznámé důvody	3 379	4,53 ^e
Ztráta / únik	110	0,15 ^f

a,b,c,d,e,f rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Diskuze

Záchranné stanice plní svou úlohu péče o handicapovaná zvířata s cílem vypustit je zpět do přírody a savci zaujímají velkou část těchto zvířat. Během období let 2010 až 2019 bylo do záchranných stanic v ČR přijato 74 558 savců, přičemž v průběhu let byl vysledován stoupající trend v počtu přijatých handicapovaných savců s nejvyšším počtem v roce 2019 (9 333 zvířat). Počet přijímaných savců se v ostatních studiích různí dle lokality, sledovaného období a počtu sledovaných záchranných stanic. Například Molina-López et al. (2017) popisují 3 293 přijatých savců za období let 1995 až 2013 v jedné ze záchranných stanic

v Katalánsku, zatímco Hanson et al. (2019) uvádějí mezi lety 2012 a 2014 v oblasti New Yorku 25 490 přijatých savců.

Z hlediska druhů byli v České republice ve sledovaném období nejčastěji přijímáni letouni následováni hmyzožravci. Molina et al. (2017) uvádějí opačné pořadí na prvních dvou místech, tedy nejčastější přijímanou skupinou v jejich studii byli hmyzožravci. Do tohoto řádu patří ježci, které jako vůbec nejčastěji přijímaný druh v záchranných stanicích ve Velké Británii uvádějí Kirkwood and Best (1998). V rámci řádu letounů se jedná především o netopýry, kteří mohou být například rušeni návštěvníky v jeskyních během období rozmnožování (Lim et al., 2018), případně jsou také problematická jejich stanoviště v blízkosti lidí, při přestavbách budov a podobně (Andreas et al., 2010).

Nejčastějším důvodem přijetí savců do záchranných stanic ve sledovaném období byl příjem mláďat, jak zjistili také Kelly et al. (2010) v Anglii a Wimberger and Downs (2010) v Jižní Africe. Jako nejčastější tento důvod uvádějí rovněž Loyd et al. (2017), kteří jako druhý nejčastější důvod uvádějí poranění kočkou. V naší práci poranění domácími zvířaty spadá pod skupinu pokousání jiným živočichem a týkalo se 4,11 % zvířat z celkového počtu přijatých savců.

Příjem mláďat není vždy nejčastějším důvodem příjmu handicapovaných savců. Například ve svém výzkumu týkajícím se lišek obecných v záchranných stanicích ve Virginii uvádějí Kelly and Sleeman (2003) jako nečastější důvod příjmu zranění (46 %) a až poté následují osiřelá mláďata (23 %). Trauma jako nejčastější důvod příjmu do záchranných stanic u koal v Austrálii uvádějí také Griffith et al. (2013) a u savců v Chile Romero et al. (2019).

Polovina všech přijatých savců (50,45 %) byla následně vypuštěna zpět do přírody. Podobné výsledky ve své studii z Anglie uvádějí i Molony et al. (2007), kteří však rovněž zdůrazňují, že tento podíl není u všech skupin živočichů stejný a také záleží na typu postižení u těchto zvířat. Obdobně Grogan and Kelly (2013) uvádějí 40 % uzdravených a vypuštěných zvířat, rovněž v Anglii. Hanson et al. (2019) popisují z celkového počtu přijatých zvířat v New Yorku bez ohledu na třídu polovinu vypuštěných zvířat a téměř polovinu uhynulých nebo utracených zvířat. V námi sledovaném období bylo v záchranných stanicích v ČR utraceno nebo uhynulo 25,73 % zvířat. Úspěšnost vypuštění zvířat ze záchranných stanic se liší dle důvodu přijetí a stáří zvířat, například osiřelá mláďata mají větší šanci na přežití než zvířata s infekčním onemocněním nebo po střetu s dopravním prostředkem (Crespo et al., 2014).

Závěr

V období let 2010 až 2019 bylo do záchranných stanic přijato celkem 74 558 savců na základě různých důvodů, nejčastějším byl příjem mláďat (30,30 %). Nejčastější skupinou přijímaných savců byli letouni (42,708 %) následováni hmyzožravci (32,599 %). Ne vždy byla péče úspěšná, i přesto se podařilo 37 613 (50,45 %) handicapovaných savců navrátit zpět do přírody.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Abi-Said, M.R., Outa, N.R., Makhoulf, H., Amr, Z.S., Eid, E. 2018. Illegal trade in wildlife species in Beirut, Lebanon. *Vertebrate Zoology* 68: 1-4.
- Andreas, M., Cepáková, E., Hanzal, V. 2010. Metodická příručka pro praktickou ochranu netopýrů: Metodika AOPK ČR. Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.
- Band'ouchová, H., Pikula, J. 2014. Péče o hendikepované volně žijící živočichy. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav ekologie a chorob zvířat, ryb a včel.

- Carvalho, F., Lourenço, A., Carvalho, R., Alves, P.C., Mira, A., Beja, P. 2018. The effects of a motorway on movement behaviour and gene flow in a forest carnivore: Joint evidence from road mortality, radio tracking and genetics. *Landscape and Urban Planning* 178: 217-227.
- Crespo Martínez, J., Izquierdo Rosique, A., Surroca Royo, M. 2014. Causes of admission and final dispositions of hedgehogs admitted to three Wildlife Rehabilitation Centers in eastern Spain. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy* 25: 107-110.
- Fahrig, L., Rytwinski, T. 2009. Effects of roads on animal abundance: an empirical review and synthesis. *Ecology and Society* 14: 21.
- Griffith, J.E., Dhand, N.K., Krockenberger, M.B., Higgins, D.P. 2013. A retrospective study of admission trends in koalas to a rehabilitation facility over 30 years. *Journal of Wildlife Diseases* 49: 18-28.
- Grogan, A., Kelly, A. 2013. A review of RSPCA research into wildlife rehabilitation. *Veterinary Record* 172: 211.
- Hanson, M., Hollingshead, N., Schuler, K., Siemer, W.F., Martin, P., Bunting, E.M. 2019. Species, causes, and outcomes of wildlife rehabilitation in New York State [Preprint]. *Ecology*.
- Haigh, A., O’Riordan, R.M., Butler, F. 2014. Hedgehog *Erinaceus europaeus* mortality on Irish roads. *Wildlife Biology* 20: 155-160.
- Hoffmann, M., Belant, J.L., Chanson, J.S., Cox, N.A., Lamoreux, J., Rodrigues, A.S.L., Schipper, J., Stuart, S.N. 2011. The changing fates of the world’s mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 366: 2598-2610.
- Kelly, A., Scrivens, R., Grogan, A. 2010. Post-release survival of orphaned wild-born polecats *Mustela putorius* reared in captivity at a wildlife rehabilitation centre in England. *Endangered Species Research* 12: 107-115.
- Kelly, T.R., Sleeman, J.M. 2003. Morbidity and Mortality of Red Foxes (*Vulpes vulpes*) and Gray Foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) Admitted to the Wildlife Center of Virginia, 1993–2001. *Journal of Wildlife Diseases* 39: 467-469.
- Kirkwood, J., Best, R. 1998. Treatment and rehabilitation of wildlife casualties: Legal and ethical aspects. *In Practice* 20: 214-216.
- Lande, R. 1998. Anthropogenic, ecological and genetic factors in extinction and conservation. *Researches on Population Ecology* 40: 259-269.
- Laurance, W.F., Vasconcelos, H.L., Lovejoy, T.E. 2000. Forest loss and fragmentation in the Amazon: Implications for wildlife conservation. *Oryx* 34: 39-45.
- Lim, T., Cappelle, J., Hoem, T., Furey, N. 2018. Insectivorous bat reproduction and human cave visitation in Cambodia: A perfect conservation storm? *Plos One* 13: e0196554.
- Loss, S.R., Will, T., Marra, P.P. 2013. The impact of free-ranging domestic cats on wildlife of the United States. *Nature Communications* 4: 1396.
- Loyd, K.A.T., Hernandez, S.M., McRuer, D.L. 2017. The role of domestic cats in the admission of injured wildlife at rehabilitation and rescue centers: Admission of injured wildlife to rescue centers. *Wildlife Society Bulletin* 41: 55-61.
- Molina-López, R.A., Mañosa, S., Torres-Riera, A., Pomarol, M., Darwich, L. 2017. Morbidity, outcomes and cost-benefit analysis of wildlife rehabilitation in Catalonia (Spain). *Plos One* 12: e0181331.
- Molony, S.E., Dowding, C.V., Baker, P.J., Cuthill, I.C., Harris, S. 2006. The effect of translocation and temporary captivity on wildlife rehabilitation success: An experimental study using European hedgehogs (*Erinaceus europaeus*). *Biological Conservation* 130: 530-537.
- Molony, S.E., Baker, P.J., Garland, L., Cuthill, I.C., Harris, S. 2007. Factors that can be used to predict release rates for wildlife casualties. *Animal Welfare* 16: 361-367.

- Narayan, E., Vanderneut, T. 2019. Physiological stress in rescued wild koalas are influenced by habitat demographics, environmental stressors, and clinical intervention. *Frontiers in Endocrinology* 10: 18.
- Nijman, V. 2010. An overview of international wildlife trade from Southeast Asia. *Biodiversity and Conservation* 19: 1101-1114.
- Romero, F., Espinoza, A., Sallaberry-Pincheira, N., Napolitano, C. 2019. A five-year retrospective study on patterns of casuistry and insights on the current status of wildlife rescue and rehabilitation centers in Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 92: 6.
- Schenk, A.N., Souza, M.J. 2014. Major anthropogenic causes for and outcomes of wild animal presentation to a wildlife clinic in East Tennessee, USA, 2000–2011. *Plos One* 9: e93517.
- Wimberger, K., Downs, C.T. 2010. Annual intake trends of a large urban animal rehabilitation centre in South Africa. *Animal Welfare* 19: 501-513.
- Woods, M., McDonald, R.A., Harris, S. 2003. Predation of wildlife by domestic cats *Felis catus* in Great Britain: Predation of wildlife by domestic cats. *Mammal Review* 33: 174-188.
- Zákon č. 114/1992 Sb, o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpsů. In: *zákonyprolidi.cz*. [vid. 8. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-114>.

Ptáci v záchranných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchranných stanicích v České republice

Gabriela Lukešová, Eva Voslářová, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Ptáci jsou častými pacienty v záchranných stanicích a v letech 2010 až 2019 jich bylo evidováno celkem 115 065. Nejčastější byl příjem mláďat (35,89 %), dále ptáků se zraněními (23,61 %), po pokousání (7,33 %), po střetu se silničním vozidlem či vlakem (7%), po zranění elektrickým proudem (5,01 %). Další důvody příjmu byly méně zastoupené (například uvíznutí nebo zamotání se do cizího předmětu, proniknutí do budovy, následkem infekce atd.). Nejčastěji evidovanými ptáky byly druhy z řádu pěvců (39,54 %) a dravci (19,94 %). Téměř polovinu (48,22 %) ptáků bylo možné následně vypustit zpět do přírody, avšak třetina (36,56 %) ptáků musela být utracena nebo uhynula.

Úvod

Ptáci patří mezi nejčastěji přijímané živočichy v záchranných stanicích (Hanson et al., 2019; Molina-López et al., 2017) a obdobně jako u jiných skupin živočichů ani ptákům se nevyhýbají důsledky lidské činnosti v krajině. Urbanizace má velký vliv na pokles počtu druhů ptáků i způsob jejich života (Miller and Hobbs, 2002; Sol et al., 2014), ovšem ptáci, na rozdíl od některých jiných volně žijících druhů zvířat, z blízkosti velkých lidských sídel zcela nevymizeli (Seress and Liker, 2015). Některé druhy dokáží z lidské blízkosti profitovat natolik, že se jejich počty ve městech dokonce zvýší, obvykle však v těchto místech dochází ke snížení druhové rozmanitosti (Chace and Walsh, 2006).

European Red List of Birds z roku 2015 uvádí, že na evropském kontinentu se nachází více jak 530 druhů ptáků, z toho více než 90 druhů je endemických. Z celkového počtu je dle tohoto seznamu 13 % druhů ohrožených. Dle vyhlášky č. 395/1992 Sb. se za kriticky ohrožené ptáky dle zákona na ochranu přírody a krajiny považují například bukáček malý, orlův mořský, tetřev hlušec, polák malý a mnoho dalších.

S ohrožením ptáků souvisí celá řada příčin, často jde o přímý či nepřímý důsledek antropogenní činnosti. Jedná se o nelegální lov (Arizaga and Laso, 2015), nelegální sběr vajec (Mondreti et al., 2017), trávení zvířat (Dietrich et al., 1995), úmrtnost na silnicích (Erritzoe et al., 2003) a další. Nepřímo jsou ptáci ohroženi elektrickým vedením (Bevanger, 1998), skleněnými výplněmi oken a dalších prostor, které jsou pro ptáky prakticky neviditelné a dochází zde k nárazům způsobující zranění nebo úhyn (Klem, 1989) a rovněž predací domácích zvířat, především koček (Woods et al., 2003). Ptáci zahrnují mnoho různorodých řádů, a proto i důvody vzniku handicapů se napříč těmito skupinami mohou lišit. S lovem některých druhů je spojeno používání olověných kulek, které vedou k otravám (Gangoso et al., 2009; Kenntner et al., 2007). Extrémem je poškození opeření olejovými a ropnými látkami u mořských nebo vodních ptáků (Mullineaux, 2016), stejně jako riziko uvíznutí nebo zamotání se do rybářských náčiní u těchto druhů (Parker and Blomme, 2007). Dravci mohou svým lovem způsobovat škody na hospodářské nebo zájmové činnosti člověka (McPherson et al., 2016) a stávají se v jejich očích konkurentem, což může vést ke konfliktům mezi člověkem a zvířetem. Zpěvní ptáci jsou ovlivňováni hlukem tvořeným lidskou činností (Proppe et al., 2013) a toto rušení ovlivňuje přirozený způsob jejich života a denní aktivity (Sierro et al., 2017).

Sledování ptáků, ať už k zjištění stavu populace nebo úspěšnosti přežití po vypuštění ze záchranných stanic, je dnes možné pomocí různorodých sledovacích technik a využívá se například kroužkování ptáků (Anderson and Green, 2009), monitorování hnízd pomocí kamer (Uhe et al., 2020) nebo použití GPS lokátorů (Silva et al., 2017). Rovněž i možnosti jak chránit jedince nebo druhy je mnoho. Například úprava elektrických sloupů vede ke snížení úmrtnosti a vzniku zranění u dravých ptáků (Tintó et al., 2010). Vzhledem k blízkému soužití ptáků s lidmi se i veřejnost podílí na ochraně, například krmením ptáků v krmítkách. Tato aktivita má pozitivní, ale i negativní důsledky, například v přenosu nemocí (Jones and Reynolds, 2008; Lawson et al., 2018; Robb et al., 2008), a je proto důležité pokračovat v osvětě problematiky ochrany ptáků.

Cílem této práce bylo zjistit celkový počet ptáků přijímaných do záchranných stanic v letech 2010 až 2019 a dále vyhodnotit důvody jejich přijetí do záchranné stanice a vyřazení z evidence záchranných stanic.

Materiál a metodika

Evidence ptáků přijatých do 35 záchranných stanic spadajících do Národní sítě záchranných stanic za období let 2010 až 2019 byla získána z evidence Ministerstva životního prostředí. Data týkající se ptáků obsahovala informace týkající se počtu, druhů, řádů, do kterých spadají, data a důvodu přijetí do záchranné stanice a data a důvody ukončení pobytu v záchranné stanici či odepsání z jejich evidence. Pro účely této práce byli z databáze vyřazeni a nebyli předmětem analýzy papoušci, pštrosi a kasuáři, protože se nejedná o zvířata vyskytující se volně v přírodě České republiky.

V rámci studie byly vyhodnoceny počty evidovaných ptáků v jednotlivých letech a k posouzení trendu vývoje počtu ptáků přijatých ve sledovaném období byl použit Spearmanův pořadový test. Výsledkem tohoto testu bylo zjištění koeficientu pořadové korelace, který určil pozitivní nebo negativní trend vývoje.

Dále byly uvedeny počty a procentuální zastoupení ptáků dle jednotlivých řádů ve sledovaném období a obdobně také dle důvodu přidání a odebrání ptáků z evidence záchranných stanic. K porovnání těchto četností byla využita neparametrická metoda kontingenčních tabulek s využitím Yatesovy korekce.

Výsledky

Během období let 2010 až 2019 bylo v záchranných stanicích evidováno 115 065 ptáků. Graf č. 1 znázorňuje počet evidovaných ptáků v jednotlivých letech sledovaného období.

Z grafu je patrný téměř každoroční nárůst ptáků přijatých do záchranných stanic. Vzestupný trend byl také statisticky potvrzen ($r_{Sp} = 0,9636$, $p < 0,01$). Ptáci evidovaní v záchranných stanicích zahrnovali 17 různých řádů.

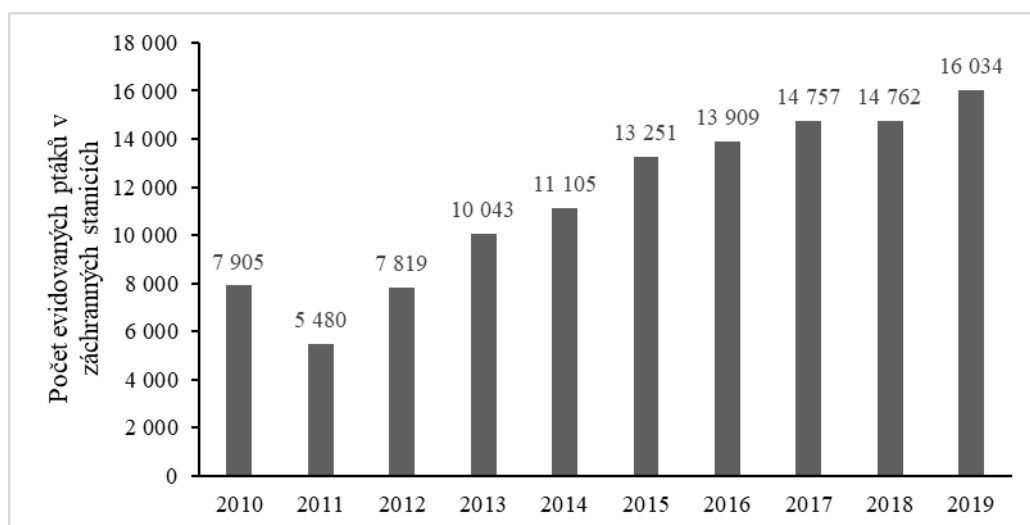
Tabulka č. 1 uvádí zastoupení přijatých ptáků do záchranných stanic dle jednotlivých řádů. Pěvci zaujímali výrazně vyšší počet přijatých jedinců (39,54 %) než ptáci z ostatních řádů. Rovněž početně zastoupeným řádem byli dravci (19,94 %) a měkkozobí (12,20 %).

Tabulka č. 2 uvádí důvody přijetí ptáků do evidence záchranných stanic během sledovaného období.

Příjem mláďat byl nejčastějším důvodem k evidenci ptáků v záchranných stanicích (35,89 %), druhým nejčastějším byli zranění ptáci (23,61 %).

Důvod vyřazení ptáků z evidence záchranných stanic během sledovaného období uvádí tabulka č. 3.

Graf č. 1. Počet ptáků evidovaných v záchranných stanicích v období let 2010 až 2019



Tabulka č. 1. Druhové zastoupení ptáků (dle řádu) evidovaných v záchranných stanicích v období let 2010 až 2019

Řád	počet	%
Pěvci	45 499	39,54 ^a
Dravci	22 941	19,94 ^b
Měkkozobí	14 038	12,20 ^c
Vrubozobí	10 824	9,41 ^d
Svišťouni	7 790	6,77 ^e
Sovy	5 455	4,74 ^f
Šplhavci	3 611	3,14 ^g
Brodiví	1 974	1,72 ^h
Hrabaví	1 008	0,88 ⁱ
Dlouhokřídlí	876	0,76 ^j
Krátkokřídlí	401	0,35 ^k
Srostloprstí	318	0,28 ^l
Potápky	143	0,12 ^m
Kukačky	65	0,06 ⁿ
Veslonoží	61	0,05 ⁿ
Lelkové	37	0,03 ^o
Potáplice	24	0,02 ^o

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Tabulka č. 2. Důvod zařazení ptáků do evidence záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod zařazení do evidence	počet	%
Mláďata	41 297	35,89 ^a
Zranění	27 171	23,61 ^b
Neznámé	14 611	12,70 ^c
Pokousání	8 431	7,33 ^d
Silniční a vlaková doprava	8 058	7,00 ^e
Elektrické zařízení	5 761	5,01 ^f
Proniknutí do budovy	2 443	2,12 ^g
Uváznutí, zamotání	2 012	1,75 ^h
Nezákonný / zbytečný odchyt	1 737	1,51 ⁱ
Infekce	815	0,71 ^j
Převoz z jiného chovu nebo stanice	690	0,60 ^k
Záchranný transfer	588	0,51 ^l
Únik / opuštění	531	0,46 ^m
Postřelení	454	0,39 ⁿ
Otrava	380	0,33 ^o
Nezdařený odchyt	86	0,07 ^p

a,b,c,d,e,f,g,h,i,j,k,l,m,n,o,p rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Tabulka č. 3. Důvod vyřazení ptáků z evidence záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod vyřazení	počet	%
Vypuštění	55 483	48,22 ^a
Úhyn / utracení	42 073	36,56 ^b
Neznámé	7 106	6,18 ^c
Léčen	5 573	4,48 ^d
Zůstává v zajetí	4 501	3,91 ^e
Únik / ztráta	243	0,21 ^f
Nezdařený odchyt	86	0,07 ^g

a,b,c,d,e,f,g rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Ukončit pobyt ptáků vypuštěním zpět do přírody se podařilo v 48,22 % případů, úhyn nebo utracení nastalo u 36,56 %. Uniknout se podařilo 243 ptákům (0,21 %) a 4 501 zvířat (3,91 %) nebylo vhodné vypustit do přírody, a proto zůstali v chovu v zajetí ať už k expozičním účelům nebo byli převedeni k jiné organizaci nebo osobě.

Diskuze

Ve sledovaném období došlo téměř každoročně k navýšení počtu ptáků evidovaných v záchranných stanicích. Vysoký počet přijímaných ptáků popisují také jiní autoři, například Molina et al. (2017) ve Španělsku nebo Mazaris et al. (2008) v Řecku. Antropogenní příčiny vzniku handicapů v našich výsledcích zaujímaly vysoké procento v případě silniční a vlakové dopravy obdobně jako pokousání jiným živočichem, což potvrzují Schenk and Sauza (2014) ve své studii hodnotící antropogenní příčiny příjmu ptáků do záchranných stanic a prezentují

vysoké procento ptáků po střetu se silničním vozidlem nebo po pokousání domácími psy a kočkami. Příjem na základě kolizí s dopravními a vlakovými vozidly je v našem případě u 7 % přijatých ptáků, podle Erritzoe et al. (2003) jsou nejčastějšími oběťmi dopravy vrabec domácí (*Passer domesticus*) a kos černý (*Turdus merula*). Dle Mazaris et al. (2008) jsou nejčastějšími důvody příjmu do záchranných stanic zranění následkem postřelení (32 %), které naopak v našem případě zaujímalu jednu z nejméně častých příčin příjmu. Dle stejného autora jsou druhým nejčastějším důvodem střety s dopravními prostředky následované osiřelými mláďaty, ta jsou obvykle přijímána jen v určitých obdobích roku (Komnenou et al., 2005).

Ptáci v naší studii spadali do 17 různých řádů, přičemž dravci byli druhou nejčastěji přijímanou skupinou v záchranných stanicích, celkem 22 941 dravců (19,94 %). Mnoho zahraničních studií se věnuje příjmu a přežití dravců v záchranných stanicích. Jako hlavní důvod přijetí dravců popisují Harris and Sleeman (2007) traumata a pouze u 1 % zvířat jde o příjem mláďat. Montesdeoca et al. (2016) potvrzují traumata jako nejčastější důvod příjmu u dravců, rovněž uvádějí 20 % přijímaných mláďat. Velké procento těchto dravců je zraněno elektrickým proudem (Rodríguez et al., 2010).

I když nejčastějším důvodem vyřazení z evidence bylo vypuštění ptáků zpět do přírody, nastal u 36,56 % ptáků úhyn nebo museli být utraceni. Mezi příčiny úhynu u ptáků v záchranných stanicích patří například infekční onemocnění (Stenkat et al., 2013), infekce ran po pokousání domácími kočkami (Korbel et al., 1992) a další, které vedou k utrpení zvířete a špatné prognóze léčby v záchranných stanicích.

Závěr

Během období let 2010 až 2019 bylo v záchranných stanicích v ČR evidováno celkem 115 065 ptáků. Nejčastější byl příjem mláďat (35,89 %) a zraněných zvířat (23,61 %). Pěvci a dravci tvořili největší část přijatých ptáků, naopak lelkové a potáplice se v záchranných stanicích vyskytovali vzácněji. Přestože určitá část ptáků své zranění či jiný typ handicapu nepřežila nebo je nebylo možné vyléčit a muselo být utraceno, téměř polovina přijatých ptáků se po pobytu v záchranných stanicích dostala zpět do přírody.

Literatura

- Anderson, G.Q.A., Green, R.E. 2009. The value of ringing for bird conservation. *Ringling & Migration* 24: 205–212.
- Arizaga, J., Laso, M. 2015. A quantification of illegal hunting of birds in Gipuzkoa (north of Spain). *European Journal of Wildlife Research* 61: 795–799.
- Bevanger, K. 1998. Biological and conservation aspects of bird mortality caused by electricity power lines: A review. *Biological Conservation* 86: 67–76.
- Dietrich, D.R., Schmid, P., Zweifel, U., Schlatter, Ch., Jenni-Eiermann, S., Bachmann, H., Bohler, U., Zbinden, N. 1995. Mortality of birds of prey following field application of granular carbofuran: A case study. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 29: 140–145.
- Erritzoe, J., Mazgajski, T.D., Rejt, Ł. 2003. Bird Casualties on European Roads—A Review. *Acta Ornithologica* 38: 77–93.
- Gangoso, L., Álvarez-Lloret, P., Rodríguez-Navarro, Alejandro. A.B., Mateo, R., Hiraldo, F., Donazar, J.A. 2009. Long-term effects of lead poisoning on bone mineralization in vultures exposed to ammunition sources. *Environmental Pollution* 157: 569–574.
- Hanson, M., Hollingshead, N., Schuler, K., Siemer, W.F., Martin, P., Bunting, E.M. 2019. Species, causes, and outcomes of wildlife rehabilitation in New York State [Preprint]. *Ecology*.

- Harris, M.C., Sleeman, J.M. 2007. Morbidity and mortality of Bald eagles (*Haliaeetus leucocephalus*) and Peregrine falcons (*Falco peregrinus*) admitted to the wildlife center of Virginia, 1993 – 200. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 38: 62–66
- Chace, J.F., Walsh, J.J. 2006. Urban effects on native avifauna: A review. *Landscape and Urban Planning* 74: 46–69.
- Jones, D.N., James Reynolds, S. 2008. Feeding birds in our towns and cities: A global research opportunity. *Journal of Avian Biology* 39: 265–271.
- Kenntner, N., Crettenand, Y., Fünfstück, H.J., Janovsky, M., Tataruch, F. 2007. Lead poisoning and heavy metal exposure of golden eagles (*Aquila chrysaetos*) from the European Alps. *Journal of Ornithology* 148: 173–177.
- Klem, D. 1989. Bird – window collisions. *Wilson Bull* 101: 606-620.
- Kommenou, A.T., Georgopoulou, I., Savvas, I., Dessiris, A. 2005. A retrospective study of presentation, treatment, and outcome of free-ranging raptors in Greece (1997–2000). *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 36: 222–228.
- Korbel, R., Gerlach, H., Bisgaard, M., Hafez, H.M. 1992. Further Investigations on *Pasteurella multocida* Infections in Feral Birds Injured by Cats. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 39: 10–18.
- Lawson, B., Robinson, R.A., Toms, M.P., Risely, K., MacDonald, S., Cunningham, A.A. 2018. Health hazards to wild birds and risk factors associated with anthropogenic food provisioning. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373: 20170091.
- Mazaris, A.D., Mamakis, Y., Kalpakis, S., Pouloupoulos, Y., Matsinos, Y.G. 2008. Evaluating potential threats to birds in Greece: An analysis of a 10-year data set from a rehabilitation centre. *Oryx* 42: 408-414.
- McPherson, S.C., Brown, M., Downs, C.T. 2016. Diet of the crowned eagle (*Stephanoaetus coronatus*) in an urban landscape: Potential for human-wildlife conflict? *Urban Ecosystems* 19: 383–396.
- Miller, J.R., Hobbs, R.J. 2002. Conservation Where People Live and Work. *Conservation Biology* 16: 330–337.
- Molina-López, R.A., Mañosa, S., Torres-Riera, A., Pomarol, M., Darwich, L. 2017. Morbidity, outcomes and cost-benefit analysis of wildlife rehabilitation in Catalonia (Spain). *PLoS ONE* 12: e0181331.
- Mondreti, R., Davidar, P. Grémillet, D. 2018. Illegal egg harvesting and population decline in a key pelagic seabird colony of the eastern Indian ocean. *Marine Ornithology* 46: 103-107.
- Montesdeoca, N., Calabuig, P., Corbera, J.A., Orós, J. 2016. Causes of Admission for Raptors to the Tafira Wildlife Rehabilitation Center, Gran Canaria Island, Spain: 2003–13. *Journal of Wildlife Diseases* 52: 647.
- Mullineaux, E. 2016. *Bsava manual of wildlife casualties*. 2nd ed. British Small Animal Veterinary Association.
- Parker, G.H., Blomme, C.G. 2007. Fish-line Entanglement of Nesting Mourning Dove, *Zenaida macroura*. *The Canadian Field-Naturalist* 121: 436.
- Proppe, D.S., Sturdy, C.B., St. Clair, C.C. 2013. Anthropogenic noise decreases urban songbird diversity and may contribute to homogenization. *Global Change Biology* 19: 1075–1084.
- Robb, G.N., McDonald, R.A., Chamberlain, D.E., Bearhop, S. 2008. Food for thought: Supplementary feeding as a driver of ecological change in avian populations. *Frontiers in Ecology and the Environment* 6: 476–484.
- Rodríguez, B., Rodríguez, A., Siverio, F., Siverio, M. 2010. Causes of Raptor Admissions to a Wildlife Rehabilitation Center in Tenerife (Canary Islands). *Journal of Raptor Research* 44: 30–39.

- Seress, G., Liker, A. 2015. Habitat urbanization and its effects on birds. *Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae* 61: 373–408.
- Schenk, A.N., Souza, M.J. 2014. Major Anthropogenic Causes for and Outcomes of Wild Animal Presentation to a Wildlife Clinic in East Tennessee, USA, 2000–2011. *PLoS ONE* 9: e93517.
- Sierro, J., Schloesing, E., Pavón, I., Gil, D. 2017. European Blackbirds Exposed to Aircraft Noise Advance Their Chorus, Modify Their Song and Spend More Time Singing. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5: 68.
- Silva, R., Afán, I., Gil, J. A., Bustamante, J. 2017. Seasonal and circadian biases in bird tracking with solar GPS-tags. *PLoS ONE* 12: e0185344.
- Sol, D., González-Lagos, C., Moreira, D., Maspons, J., Lapiedra, O. 2014. Urbanisation tolerance and the loss of avian diversity. *Ecology Letters* 17: 942–950.
- Stenkat, J., Krautwald-Junghanns, M.E., Schmidt, V. 2013. Causes of Morbidity and Mortality in Free-Living Birds in an Urban Environment in Germany. *EcoHealth* 10: 352–365.
- The European Red List of Birds. 2015. Compiled by BirdLife International [vid. 2. 7. 2020]. Dostupné z: <https://portals.iucn.org/library/sites/library/files/documents/RL-4-020.pdf>
- Tintó, A., Real, J., Mañosa, S. 2010. Predicting and Correcting Electrocutation of Birds in Mediterranean Areas. *Journal of Wildlife Management* 74: 1852–1862.
- Uhe, L., Albrecht, K., Schleicher, A., Engler, J.O. 2020. Adjusting trail cameras to improve monitoring of small open cup nesting birds. *Journal of Ornithology* 161: 893–899.
- Vyhláška č. 395/1992 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona národní rady č. 114/1992, o ochraně přírody a krajiny. In: [zakonyprolidi.cz](http://www.zakonyprolidi.cz). [vid. 1. 7. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-395>.
- Woods, M., McDonald, R.A., Harris, S. 2003. Predation of wildlife by domestic cats *Felis catus* in Great Britain: Predation of wildlife by domestic cats. *Mammal Review* 33: 174–188.

Plazi v záchranných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchranných stanicích v České republice

Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Plazi patří mezi ohroženou skupinu zvířat a výzkum stávajících i nových druhů a příčin jejich ohrožení patří mezi zásadní činnosti v ochraně těchto živočichů. V souvislosti s jejich ochranou jsou plazi v České republice umísťováni také v záchranných stanicích pro handicapovaná zvířata. V období let 2010 až 2019 to bylo celkem 1 502 jedinců zahrnujících 11 druhů vyskytujících se na našem území. Nejčastěji přijímanými druhy byla užovka obojková (29,76 %), želva nádherná (25,97 %) a zmije obecná (14,65 %), naopak nejméně bylo evidováno ještěrek zelených (0,40 %), ještěrek živorodých (0,40 %) a užovek stromových (0,20 %). Důvodem jejich příjmu v záchranných stanicích bylo nejčastěji uniknutí zvířete z chovu (17,11 %) nebo proniknutí do budovy (16,91 %), méně často bylo důvodem zranění, záchranný transfer nebo pokousání jiným živočichem. Vypustit zpět do přírody se podařilo 50,73 % plazů, 18,51 % zůstalo kvůli svému handicapu v trvalém zajetí po převedení k jiné organizaci nebo pro využití k expozičním účelům ve stávající záchranné stanici, 8,99 % plazů uhynulo nebo bylo utraceno. Vráceno majiteli bylo 1,60 % plazů.

Úvod

Třída plazů je rozmanitou skupinou živočichů, v rámci které bylo popsáno více než 9 000 druhů (Uetz and Stylianou, 2018). Toto číslo však pravděpodobně není konečným výčtem všech druhů, které patří mezi velmi ohroženou skupinu živočichů a jejich počty rychle klesají (Reading et al., 2010). Zhodnocení populací zejména v delším čase je složité (Sewell et al., 2012; Vlašín et al., 2007) a právě neznalost nových i stávajících druhů plazů, četností jejich populací i způsobu života je překážkou ve stanovení příčin jejich ohrožení a zůstává výzvou v ochraně těchto druhů.

Příčin poklesu počtu plazů je mnoho. Jde o degradaci a ztrátu stanovišť (McAlpine et al., 2015), stále se rozvíjející zemědělské využití půdy (Tolley et al., 2016), úmrtnost na silnicích (Heigl et al., 2017), invazivní druhy, infekční onemocnění (Gibbon et al., 2000), využívání plazů k medicínským účelům (da Nóbrega Alves et al., 2008) a mnoho dalších. Dopad změny klimatu na plazy zřejmě není zcela jasný. Někteří autoři se přiklánějí k názoru, že plazi nejsou k rychlým změnám přizpůsobitelní a mohou být vůči nim vysoce vnímaví (Huey et al., 2009; Lourenço-de-Moraes et al., 2019), naopak pro některé zůstává otázkou, zda globální oteplování může mít u některých druhů dokonce pozitivní dopad (Huang et al., 2013). Podle França and Araújo (2006) jsou nejhroženějšími plazy ti, kteří mají speciální požadavky na potravu nebo stanoviště a velmi těžko se adaptují na změny. Plazů se také týká kaskádovité vymírání, například následkem ubývání obojživelníků jako potravního zdroje některých druhů (Zipkin et al., 2020). Plazi jsou rovněž ohroženi jejich sběrem v přírodě za účelem chovu v zajetí, protože jsou pro mnoho chovatelů stále velmi zajímavou skupinou tvorů (Böhm et al., 2013; Pérez et al., 2004).

V České republice jsou ohroženy všechny druhy plazů. Dle Červeného seznamu obojživelníků a plazů z roku 2017 je ještěrka zední kriticky ohroženým druhem, mezi ohrožené druhy spadá ještěrka zelená, užovka podplamatá a užovka stromová. Tento seznam nemá stanovenou úroveň ohrožení u želvy bahenní, přestože tento druh je dle vyhlášky č. 395/1992 Sb. provádějící zákon č. 114/1992, o ochraně přírody a krajiny, ve znění

pozdějších předpisů považován za kriticky ohrožený. V Červeném seznamu je u tohoto druhu uvedena zkratka DD (data deficient), tedy jde o druh, o němž jsou nedostatečné údaje. Jak již bylo řečeno, nejdůležitější v ochraně plazů je získávání informací o těchto druzích a zjišťování příčin jejich úbytku (Bland and Böhm, 2016; Böhm et al., 2013; Rodrigues, 2005), které mohou být přínosné k ochraně známých i nově objevených druhů plazů (Meiri, 2016). Jeden z plazů vyskytující se na území České republiky je považován za nepůvodní – jde o želvu nádhernou (Standfuss et al., 2016).

Cílem této práce bylo na základě analýzy počtu a druhů plazů přijatých do záchranných stanic, důvodů jejich přijetí i vyřazení z evidence v období let 2010 až 2019 zhodnotit činnost záchranných stanic České republiky v oblasti ochrany plazů.

Materiál a metodika

Údaje o plazech evidovaných v záchranných stanicích v období let 2010 až 2019 byly získány z databáze Ministerstva životního prostředí obsahující evidenci zvířat přijatých ve sledovaném období do 35 záchranných stanic spadajících do Národní sítě záchranných stanic. Předmětem analýzy byly pouze údaje týkající se druhů plazů vyskytujících se na našem území, vyřazeny tedy byly všechny cizokrajné a exotické druhy. Evidence záchranných stanic obsahovala údaje o druhu, počtu zvířat, datum a důvod příjmu a datum a důvod vyřazení z evidence.

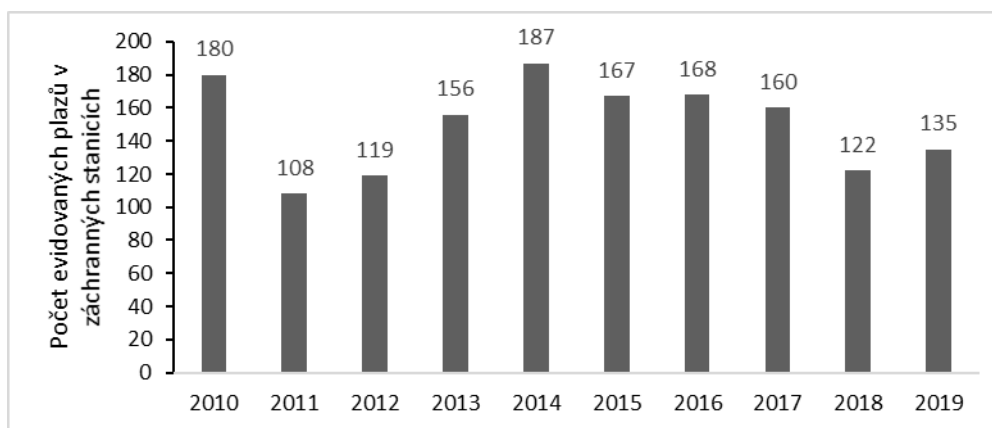
Data byla vyhodnocena statistickým programem UNISTAT 6.5 for Excel. Pomocí Spearmanova koeficientu byl zjištěn koeficient pořadové korelace prokazující pozitivní nebo negativní trend vývoje v počtu plazů evidovaných během jednotlivých let sledovaného období.

Zhodnocení počtu a procentuálního zastoupení jednotlivých druhů bylo vyhodnoceno s využitím neparametrické metody kontingenčních tabulek s využitím Yatesovy korekce. Stejně tak byly vyhodnoceny počty a procentuální zastoupení plazů dle důvodu přijetí do záchranné stanice a dle důvodu vyřazení z evidence záchranných stanic.

Výsledky

V období let 2010 až 2019 bylo do záchranných stanic v ČR přijato celkem 1 502 plazů patřících k druhům volně žijícím v České republice. Graf č. 1 zobrazuje počty přijatých plazů v jednotlivých letech. Nejvyšší počet evidovaných plazů byl v roce 2014 (187), naopak nejnižší v roce 2011 (108). Během sledovaného období se však počty přijímaných plazů statisticky významně neměnily ($r_{sp} = -0,0303$, $p > 0,05$).

Graf č. 1. Celkový počet plazů evidovaných v záchranných stanicích v České republice za období let 2010 až 2019



Druhové zastoupení plazů vedených v evidenci záchranných stanic během sledovaného období je uvedeno v tabulce č. 1. Nejčastěji evidovaným plazem mezi hady byla užovka obojková (29,76 %), mezi želvami želva nádherná (25,97 %) a mezi ještěry ještěrka obecná (8,32 %).

Tabulka č. 1. Druhové zastoupení plazů v záchranných stanicích v letech 2010 až 2019

Druh plaza	počet	%
Užovka obojková	447	29,76 ^a
Želva nádherná	390	25,97 ^b
Zmije obecná	220	14,65 ^c
Užovka hladká	148	9,85 ^d
Ještěrka obecná	125	8,32 ^{d,e}
Slepýš křehký	100	6,66 ^e
Želva bahenní	39	2,60 ^f
Užovka podplamatá	18	1,20 ^g
Ještěrka zelená	6	0,40 ^h
Ještěrka živorodá	6	0,40 ^h
Užovka stromová	3	0,20 ^h

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Důvody přijetí plazů do záchranných stanic během sledovaného období jsou uvedeny v tabulce č. 2. Často se jednalo o zvířata uniklá ze zajetí či opuštěná (17,11 %), zvířata odchycená z důvodu vniknutí do budovy (16,91 %) či uvíznutí (10,65 %). Nejčastěji (23,50 %) se však jednalo o důvody blíže nespecifikované, odlišné od důvodů, které jsou v tabulce uvedeny v rámci samostatných kategorií.

Tabulka č. 2. Důvody přijetí plazů do záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod evidence	počet	%
Jiné důvody	353	23,50 ^a
Únik / opuštění	257	17,11 ^b
Proniknutí do budovy	254	16,91 ^b
Uvíznutí / zamotání	160	10,65 ^c
Záchranný transfer	159	10,59 ^c
Mláďata	76	5,06 ^d
Probuzení hibernujícího plaza	76	5,06 ^d
Zranění	72	4,79 ^d
Pokousání	43	2,86 ^e
Převoz z jiné stanice nebo chovu	25	1,66 ^f
Zranění dopravou na silnicích	18	1,20 ^{e,f,g}
Zbytečný odchyt	8	0,53 ^g
Infekční onemocnění	1	0,07 ^h

^{a-h} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Důvody vyřazení plazů z evidence záchranných stanic během sledovaného období uvádí tabulka č. 3. Polovinu (50,73 %) plazů přijatých do záchranných stanic se podařilo následně vypustit do přírody. Zbývající plazi byli v době ukončení studie stále v léčení (9,32 %) nebo již bylo rozhodnuto o jejich trvalém chovu v zajetí a byli převedeni k držení u jiné osoby či organizace nebo byli použiti k expozičním účelům (18,51 %), protože je nebylo možné zcela vyléčit nebo vypustit. 8,99 % plazů uhynulo nebo bylo utraceno, 1,60 % bylo vráceno majiteli.

Tabulka č. 3. Důvody vyřazení plazů z evidence záchranných stanic v letech 2010 až 2019

Důvod vyřazení z evidence	počet	%
Vypuštění	762	50,73 ^a
Zůstává v zajetí	278	18,51 ^b
Léčen	140	9,32 ^c
Úhyn / utracení	135	8,99 ^{c,d}
Jiné důvody	105	6,99 ^d
Neznámé důvody	56	3,73 ^e
Vrácen majiteli	24	1,60 ^f
Únik / ztráta	2	0,13 ^g

^{a-g} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$)

Diskuze

Během sledovaného období bylo do záchranných stanic v ČR přijato celkem 1 502 plazů zahrnujících 11 druhů vyskytujících se v České republice. Počet přijatých plazů do záchranných stanic v zahraničních studiích se liší dle sledovaného období, počtu sledovaných záchranných stanic a dalších aspektů. Molina et al. (2017) popisují za období let 1995 – 2013 v Katalánsku celkem 2 705 evidovaných jedinců této třídy a jako nejčastější důvod k evidenci v záchranných stanicích uvádějí přesuny zvířat, tedy záchranné transfery, a na druhém místě zranění. V jejich případě také bylo přijato více želv než plazů z řádu šupinatých. Hartup (1996) uvádí v oblasti státu Illinois v USA u 48 % plazů jako důvod příjmu trauma, přičemž nejčastěji to bylo zranění způsobené automobilovou dopravou, po požití rybářského háčku nebo po zranění domácími zvířaty. Celkově tento autor popisuje 489 přijatých plazů v období 1980 až 1994 s převahou želv. Brown and Sleeman (2002) potvrzují zranění způsobené automobilovým nebo jiným silničním prostředkem za nejčastější příčinu traumat u želv přijatých do záchranných stanic ve Virginii, v případě šupinatých šlo především o traumata způsobená zahradní technikou. V jejich případě bylo za období let 1991 až 2000 přijato 694 plazů, větší část tvořily želvy. Na rozdíl od naší studie, kde bylo zjištěno zbytečně odchycených plazů 0,53 %, v případě práce těchto autorů šlo o 3 %.

Nejčastěji přijímaným druhem v ČR byla užovka obojková z řádu šupinatých. Vyšší počet může souviset s tím, že jde o relativně rozšířeného plaza v České republice (BioLib, 2020). Patří však mezi druhy, které jsou ohroženy infekcí Snake fungal disease (SFD) způsobenou houbou *Ophidiomyces ophidiicola*, která je považována za velkou hrozbu pro tyto druhy (Franklinos et al., 2017). I přes rozšíření této nemoci bylo v záchranných stanicích v našem případě přijato jediné zvíře s blíže nespecifikovanou infekční nemocí.

Želva nádherná představuje druhý nejčastěji evidovaný druh plaza (25,97 %) v českých záchranných stanicích. Jedná se o nepůvodní druh, který může být ohrožením pro zde původní kriticky ohroženou želvu bahenní (Verneau et al., 2011). Do přírody se zřejmě dostala vinou

chovatelů, kteří tato zvířata vypustili. Nepředpokládá se však, že by se želva nádherná nadále množila, ale spíše se udržuje v přírodě díky své dlouhověkosti (Mikula and Kopecký, 2007). Je rovněž uvedena v Seznamu invazivních druhů s významným dopadem na Evropskou unii. K želvě nádherné vydala názor také Ústřední komise pro ochranu zvířat, kde mimo jiné uvádí, že tento druh by neměl být považován za volně žijící druh, ale za opuštěné či toulavé zvíře a jako takové by nemělo být přijímáno do záchranných sanic, ale do útulků. Záchranné stanice mají za úkol vypouštět zvířata zpět do volné přírody, což v tomto případě není žádoucí.

Želva bahenní se oproti želvě nádherné vyskytovala v záchranných stanicích nebo v rámci jejich aktivit v desetinovém množství. Jde o kriticky ohrožený druh, důvodem ohrožení je řada důsledků antropogenní činnosti (Trakimas and Sadaravičius, 2008), degradace sladkovodních ploch (Ficetola et al., 2004), sbírání želv k soukromému chovu (Velo-Antón et al., 2011) a další.

Úspěšně vypuštěno bylo ze záchranných stanic v ČR během období let 2010 až 2019 do přírody 762 plazů, což celkově tvoří více jak polovinu případů (50,73 %). Hartup (1996) ve své studii popisuje 84 % úspěšně vypuštěných plazů. Dále uvádí, že tato zvířata nebyla dále monitorována, což může být zásadním problémem v ochraně druhu. Molina et al. (2017) v případě vypuštění uvádějí až 75 % úspěšnost, nicméně vzápětí upozorňují na rozdílné hodnoty v závislosti na daném jedinci a typu zranění či jiného handicapu. V naší studii tedy byl počet plazů vypuštěných do přírody výrazně nižší než v zahraničních studiích, velká část plazů přijatých do záchranných stanic zůstala trvale v zajetí nebo uhynula.

Závěr

Plazi zauímají v záchranných stanicích menší část přijímaných živočichů, nejde však o zanedbatelnou činnost. Během období let 2010 až 2019 bylo v 35 záchranných stanicích v České republice přijato celkem 1 502 jedinců, z čehož 447 bylo užovek obojkových (29,76 %) a 390 želv nádherných (25,97 %). Nejčastěji se jednalo o zvířata uniklá ze zajetí či opuštěná, zvířata odchycená z důvodu vniknutí do budovy či uvíznutí. V polovině případů bylo možné plazy následně vypustit zpět do volné přírody, úhyn nebo utracení nastalo pouze u 8,99 % zvířat.

Studie byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Biolib. 2020. Užovka obojková (*Natrix natrix*) [online]. [vid. 1. 7. 2020]. Dostupné z: <https://www.biolib.cz/cz/taxon/id368/>
- Bland, L.M., Böhm, M. 2016. Overcoming data deficiency in reptiles. *Biological Conservation* 204: 16-22.
- Böhm, M., Collen, B., Baillie, J.E.M., Bowles, P., Chanson, J., Cox, N., Hammerson, G., Hoffmann, M., Livingstone, S.R., Ram, M., Rhodin, A.G.J., Stuart, S.N., van Dijk, P.P., Young, B.E., Afuang, L.E., Aghasyan, A., García, A., Aguilar, C., Ajtic, R., Zug, G. 2013. The conservation status of the world's reptiles. *Biological Conservation* 157: 372-385.
- Bonnet, X., Naulleau, G., Shine, R. 1999. The dangers of leaving home: Dispersal and mortality in snakes. *Biological Conservation* 89: 39-50.
- Brown, J.D., Sleeman, J.M. 2002. Morbidity and mortality of reptiles admitted to the wildlife center of Virginia, 1991 to 2000. *Journal of Wildlife Diseases* 38: 699-705.
- da Nóbrega Alves, R.R., da Silva Vieira, W.L., Santana, G.G. 2008. Reptiles used in traditional folk medicine: Conservation implications. *Biodiversity and Conservation* 17: 2037-2049.
- França, F.G.R., Araújo, A.F.B. 2006. The conservation status of snakes in central Brazil. *South American Journal of Herpetology* 1: 25-36.

- Franklinos, L.H.V., Lorch, J.M., Bohuski, E., Rodriguez-Ramos Fernandez, J., Wright, O.N., Fitzpatrick, L., Petrovan, S., Durrant, C., Linton, C., Baláž, V., Cunningham, A.A., Lawson, B. 2017. Emerging fungal pathogen *Ophidiomyces ophiodiicola* in wild European snakes. *Scientific Reports* 7: 3844.
- Gibbon, J.W., Scott, D.E., Ryan, T.J., Buhlmann, K.A., Tuberville, T.D., Metts, B.S., Greene, J.L., Mills, T., Leiden, Y., Poppy, S., Winne, C.T. 2000. The global decline of reptiles, déjà vu amphibians. *BioScience* 50: 653.
- Hartup, B.K. 1996. Rehabilitation of native reptiles and amphibians in DuPage County, Illinois. *Journal of Wildlife Diseases* 32: 109-112.
- Heigl, F., Horvath, K., Laaha, G., Zaller, J.G. 2017. Amphibian and reptile road-kills on tertiary roads in relation to landscape structure: Using a citizen science approach with open-access land cover data. *BMC Ecology* 17: 24.
- Huang, S., Chiou, C., Lin, T., Tu, M., Lin, C., Porter, W.P. 2013. Future advantages in energetics, activity time, and habitats predicted in a high-altitude pit viper with climate warming. *Functional Ecology* 27: 446-458.
- Huey, R.B., Deutsch, C.A., Tewksbury, J.J., Vitt, L.J., Hertz, P.E., Álvarez Pérez, H.J., Garland, T. 2009. Why tropical forest lizards are vulnerable to climate warming. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276: 1939-1948.
- Chobot, K., Němec, M. 2017. Červený seznam ohrožených druhů České republiky. *Příroda* 34: 1-182.
- Lourenço-de-Moraes, R., Lansac-Toha, F.M., Schwind, L.T.F., Arrieira, R.L., Rosa, R.R., Terribile, L.C., Lemes, P., Fernando Rangel, T., Diniz-Filho, J.A.F., Bastos, R.P., Bailly, D. 2019. Climate change will decrease the range size of snake species under negligible protection in the Brazilian Atlantic Forest hotspot. *Scientific Reports* 9: 8523.
- McAlpine, C.A., Bowen, M.E., Smith, G.C., Gramotnev, G., Smith, A.G., Lo Cascio, A., Goulding, W., Maron, M. 2015. Reptile abundance, but not species richness, increases with regrowth age and spatial extent in fragmented agricultural landscapes of eastern Australia. *Biological Conservation* 184: 174-181.
- Meiri, S. 2016. Small, rare and trendy: Traits and biogeography of lizards described in the 21st century. *Journal of Zoology* 299: 251-261.
- Mikula, J., Kopecký, O. 2007. Želva nádherná *Trachemys scripta* (Schoepff. 1792) na Vsetínsku. *Časopis Slezského zemského muzea* 56: 185-186.
- Ministerstvo zemědělství. 2012. Názor Ústřední komise pro ochranu zvířat na řešení problematiky náleží želvy nádherné v české přírodě [online]. [vid. 1. 7. 2020]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/143067/Nadherne_zelvy.pdf
- Molina-López, R.A., Mañosa, S., Torres-Riera, A., Pomarol, M., Darwich, L. 2017. Morbidity, outcomes and cost-benefit analysis of wildlife rehabilitation in Catalonia (Spain). *Plos One* 12: e0181331.
- Pérez, I., Giménez, A., Sánchez-Zapata, J.A., Anadón, J.D., Martínez, M., Esteve, M.Á. 2004. Non-commercial collection of spur-thighed tortoises (*Testudo graeca graeca*): A cultural problem in southeast Spain. *Biological Conservation* 118: 175-181.
- Prováděcí nařízení Komise (EU) 2016/1141. In: EUR-lex [právní informační systém]. Úřad pro publikace Evropské unie [vid. 1. 7. 2020]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/?uri=CELEX%3A32016R1141>
- Reading, C.J., Luiselli, L.M., Akani, G.C., Bonnet, X., Amori, G., Ballouard, J.M., Filippi, E., Naulleau, G., Pearson, D., Rugiero, L. 2010. Are snake populations in widespread decline? *Biology Letters* 6: 777-780.
- Rodrigues, M.T. 2005. The conservation of Brazilian reptiles: Challenges for a megadiverse country. *Conservation Biology* 19: 659-664.

- Sewell, D., Guillera-Aroita, G., Griffiths, R.A., Beebee, T.J.C. 2012. When is a species declining? Optimizing survey effort to detect population changes in reptiles. *Plos ONE* 7: e43387.
- Standfuss, B., Lipovšek, G., Fritz, U., Vamberger, M. 2016. Threat or fiction: Is the pond slider (*Trachemys scripta*) really invasive in Central Europe? A case study from Slovenia. *Conservation Genetics* 17: 557-563.
- Tolley, K.A., Alexander, G.J., Branch, W.R., Bowles, P., Maritz, B. 2016. Conservation status and threats for African reptiles. *Biological Conservation* 204: 63-71.
- Uetz, P., Stylianou, A. 2018. The original description of reptiles and their subspecies. *Zootaxa* 4375: 257-264.
- Vlašín, M., Mikátová, B., Český svaz ochránců přírody. 2007. Metodika sledování výskytu plazů v České republice. ZO ČSOP Veronica.
- Webb, J.K., Brook, B.W., Shine, R. 2002. Collectors endanger Australia's most threatened snake, the broad-headed snake *Hoplocephalus bungaroides*. *Oryx* 36: 170-181.
- Zipkin, E.F., DiRenzo, G.V., Ray, J.M., Rossman, S., Lips, K.R. 2020. Tropical snake diversity collapses after widespread amphibian loss. *Science* 367: 814-816.
- Verneau, O., Palacios, C., Platt, T., Alday, M., Billard, E., Allienne, J.F., Basso, C., Du Preez, L.H. 2011. Invasive species threat: Parasite phylogenetics reveals patterns and processes of host-switching between non-native and native captive freshwater turtles. *Parasitology* 138: 1778-1792.
- Trakimas, G., Sidaravičius, J. 2008. Road mortality threatens small northern populations of the European pond turtle, *Emys orbicularis*. *Acta Herpetologica* 3: 161-166.
- Ficetola, G.F., Padoa-Schioppa, E., Monti, A., Massa, R., Bernardi, F.D., Bottoni, L. 2004. The importance of aquatic and terrestrial habitat for the European pond turtle (*Emys orbicularis*): Implications for conservation planning and management. *Canadian Journal of Zoology* 82: 1704-1712.
- Velo-Antón, G., Wink, M., Schneeweiß, N., Fritz, U. 2011. Native or not? Tracing the origin of wild-caught and captive freshwater turtles in a threatened and widely distributed species (*Emys orbicularis*). *Conservation Genetics* 12: 583-588.
- Vyhláška č. 395/1992 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona národní rady č. 114/1992, o ochraně přírody a krajiny. In: [zakonyprolidi.cz](https://www.zakonyprolidi.cz). [vid. 8. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-395>

Obojživelníci v záchranných stanicích - analýza příčin jejich příjmu, způsobu a doby ukončení pobytu v záchranných stanicích v České republice

Gabriela Lukešová, Eva Voslášková, Vladimír Večerek

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

Abstrakt

Aktivity v oblasti ochrany obojživelníků jsou zásadní pro zachování těchto druhů, které patří do skupiny nejohroženějších živočichů. Záchranné stanice v ČR evidovaly v letech 2010 až 2019 celkem 23 616 obojživelníků zahrnujících 13 druhů. Nejčastějším evidovaným druhem byla ropucha obecná (76,31 %), dále skokan zelený (9,27 %), skokan hnědý (4,35 %), ropucha zelená (3,15 %), čolek obecný (2,70 %), blatnice skvrnitá (1,50 %) a kuňka obecná (1,45 %). Ostatní druhy byly zastoupeny méně než 1 %. Nejčastějším zásahem záchranných stanic byl záchranný transfer a to v 98,31 % případů. Zbylou část tvořili obojživelníci přijatí do záchranných stanic na základě zranění, uvíznutí, proniknutí do budovy a následném odchytu nebo po probuzení během hibernace. Vypuštěno nebo přesunuto bylo 99,66 % zvířat, pouze 0,18 % obojživelníků uhynulo nebo bylo utraceno.

Úvod

Na světě žije přes 8 000 druhů obojživelníků a velká část je ohrožena vyhoubením (IUCN, 2020). V České republice se vyskytuje 21 druhů a 90 % z nich spadá do kategorií s různým stupněm ohrožení (Mikátová et al., 2002). Celkově v rámci Evropy klesá početnost u 59 % druhů zde se nacházejících (Temple et al., 2009). Mezi příčiny poklesu počtu obojživelníků patří změny v krajině - vysoušení mokřadů, rovnání toků a další zásahy do krajiny, kdy dochází k ubývání přirozených stanovišť využívaných obojživelníky a k izolaci jejich populací (Cushman, 2006; Mikátová et al., 2002; Temple et al., 2009). Dalšími možnými příčinami jsou infekční onemocnění (Frías-Alvarez et al., 2008; Rachowicz et al., 2006; Teacher et al., 2010), klimatické změny (Araújo et al., 2006) a přímé úhyny na silnicích při migraci za potravou, rozmnožováním nebo na zimoviště (Downie et al., 2019). Negativní vlivy jsou pozorovány také při používání pesticidů, insekticidů a dalších látek, které mají dopad na larvální stádia obojživelníků (Sparling and Fellers, 2009).

Právní ochrana obojživelníků v České republice je zakotvena v zákoně č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů. Dle vyhlášky č. 395/1992 provádějící tento zákon je mnoho druhů obojživelníků považováno za kriticky ohrožené (čolek dravý, čolek hranatý, čolek karpatský, ropucha krátkonohá, skokan ostronosý, skokan skřehotavý), silně ohrožené (blatnice skvrnitá, čolek horský, čolek obecný, čolek velký, kuňka ohnivá, kuňka žlutobřichá, mlok skvrnitý, ropucha zelená, rosnička zelená, skokan menší, skokan štíhlý, skokan zelený) nebo ohrožené (ropucha obecná). Dle Červeného seznamu obojživelníků a plazů České republiky z roku 2017 je 71 % obojživelníků zařazeno do tří nejvyšších kategorií ohrožení, ale žádný druh nebyl prozatím vyhuben. Oproti roku 2003 bylo několik druhů přeřazeno do kategorie s vyšším stupněm ohrožení (ropucha krátkonohá, ropucha zelená, ropucha obecná, čolek horský, čolek obecný a skokan hnědý), naopak do skupiny s nižším stupněm ohrožení byl přeřazen čolek dravý.

Ochrana obojživelníků se opírá zejména o oblast výzkumu druhů, ochranu genofundu a biotopů a ochranu během migrace. Důležitým prvkem v ochraně obojživelníků je sledování jejich výskytu, ochrana těchto míst a budování dalších. Rovněž je důležité chránit obojživelníky v období migrace, kdy hrozí velký úbytek zvířat na silnicích (Hels and Buchwald, 2001). Existuje několik možností, jak zabránit ohrožení putujících zvířat – jde

o budování podchodů, záchranné transfery nebo upozornění řidičů na výskyt migrujících zvířat (Mikátová et al., 2002). Především podchody a zábrany okolo silnic se jeví jako účinná metoda v ochraně obojživelníků během migrace (Helldin and Petrovan, 2019; Jarvis et al., 2019).

Cílem této práce bylo zhodnocení činnosti záchranných stanic České republiky v oblasti ochrany obojživelníků v letech 2010 až 2019 na základě analýzy počtu přijatých zvířat, jejich druhového zastoupení, důvodu příjmu těchto zvířat a také důvodu jejich vyřazení z evidence záchranných stanic.

Materiál a metodika

Pro účely této studie byly získány údaje z evidence 35 záchranných stanic spadajících pod Národní síť záchranných stanic České republiky v období let 2010 až 2019. Předmětem analýzy byly údaje o evidovaných obojživelnících, tj. počty a druhy obojživelníků přijatých do záchranných stanic během sledovaného období, důvod / způsob přijetí do stanice a obdobně také důvod / způsob vyřazení z evidence. Analyzovány byly pouze druhy přirozeně se vyskytující v přírodě ČR, z analýzy byli tedy vyřazeni dva jedinci druhu axolotl mexický.

Data byla vyhodnocena statistickým programem UNISTAT 6.5 for Excel. Trend vývoje počtu obojživelníků v záchranných stanicích během sledovaného období byl zhodnocen pomocí Spearmanova pořadového testu. Četnosti zastoupení jednotlivých druhů byly mezi sebou porovnány pomocí neparametrické metody kontingenčních tabulek s využitím Chí kvadrát testu s Yatesovou korekcí. Obdobně jako u jednotlivých druhů obojživelníků byly s použitím Chí kvadrát testu s Yatesovou korekcí také srovnány počty obojživelníků z hlediska důvodu jejich příjmu do záchranné stanice včetně záchranných transferů. Skupina zraněných zvířat obsahovala také zvířata pokousána jiným živočichem. Stejnou statistickou metodou byly také zhodnoceny počty zvířat dle důvodu vyřazení z evidence záchranných stanic.

Výsledky

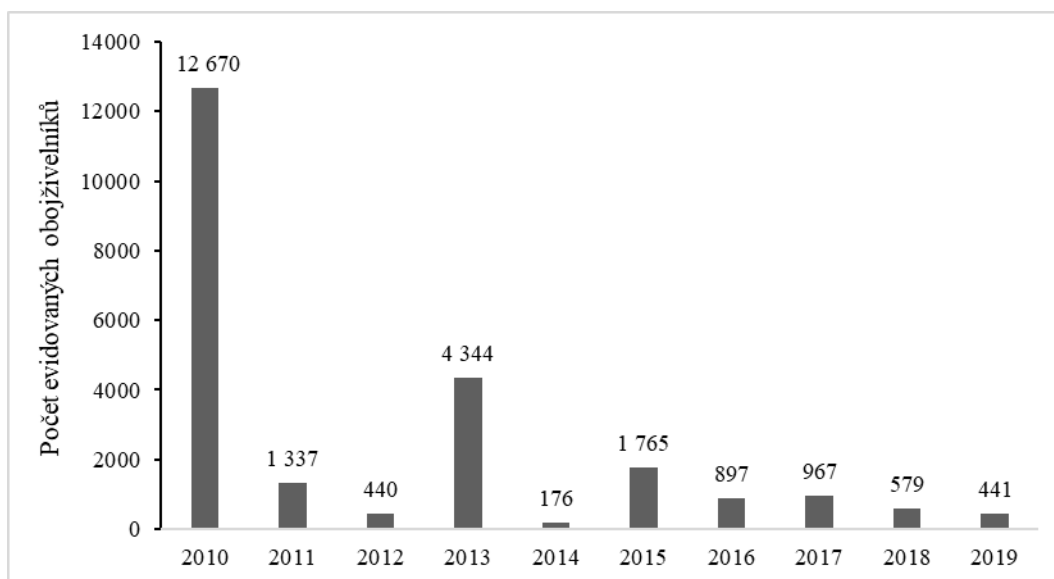
V období let 2010 až 2019 bylo v záchranných stanicích evidováno celkem 23 616 obojživelníků. Počty obojživelníků v jednotlivých letech kolísaly (graf č. 1) s nejvyšším počtem zvířat evidovaných v roce 2010 (12 670 jedinců). V ostatních letech byly počty výrazně nižší, avšak nebyl prokázán sestupný trend v počtu evidovaných obojživelníků během sledovaného období ($r_{sp} = -0,4182$, $p > 0,05$).

Druhové zastoupení obojživelníků evidovaných v záchranných stanicích v letech 2010 až 2019 je uvedeno v tabulce č. 1. Nejčastěji evidovaným obojživelníkem byla ropucha obecná (76,31 %). Z řádu ocasatých byl nejvíce zastoupen čolek obecný (2,70 %).

Důvody zařazení obojživelníků do evidence záchranných stanic během období let 2010 až 2019 jsou uvedeny v tabulce č. 2. Nejčastějším úkonem ze strany záchranných stanic v oblasti ochrany obojživelníků byly záchranné transfery, kdy tímto způsobem bylo přesunuto 23 216 obojživelníků (98,31 % ze všech evidovaných). Ostatní důvody přijetí byly zastoupeny méně než 1 %.

Důvody vyřazení obojživelníků z evidence záchranných stanic v období let 2010 až 2019 popisuje tabulka č. 3. Nejčastěji byli obojživelníci vypuštěni nebo přemístěni, jednalo se celkem o 23 535 zvířat (99,66 %) z celkového počtu 23 616. Tato skutečnost souvisí s tím, že nejčastější prováděnou činností s obojživelníky v rámci záchranných stanic byly záchranné transfery.

Graf č. 1. Počet evidovaných obojživelníků v záchranných stanicích v období let 2010 až 2019



Tabulka č. 1. Druhové zastoupení obojživelníků evidovaných v záchranných stanicích v letech 2010 až 2019

Název druhu	počet	%
Ropucha obecná	18 019	76,306 ^a
Skokan zelený	2 189	9,270 ^b
Skokan hnědý	1 027	4,349 ^c
Ropucha zelená	743	3,146 ^d
Čolek obecný	637	2,698 ^e
Blatnice skvrnitá	353	1,495 ^f
Kuňka obecná	343	1,453 ^f
Skokan štíhlý	178	0,754 ^g
Rosnička zelená	51	0,216 ^h
Čolek horský	40	0,169 ^h
Mlok skvrnitý	19	0,080 ⁱ
Čolek velký	14	0,059 ⁱ
Kuňka žlutobřichá	1	0,004 ^j

^{a-j} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Tabulka č. 2. Důvody zařazení obojživelníků do evidence záchranných stanic v období let 2010 až 2019

Důvod evidence v záchranné stanici	počet	%
Záchranný transfer	23 216	98,306 ^a
Uvznutí	233	0,987 ^b
Jiné důvody	56	0,237 ^c
Probuzení z hibernace	51	0,216 ^c
Zranění	44	0,186 ^c
Proniknutí do budovy	10	0,042 ^d
Zranění silniční dopravou	6	0,025 ^d

^{a-d} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Tabulka č. 3. Důvody vyřazení obojživelníků z evidence záchranných stanic v období let 2010 až 2019

Důvod vyřazení z evidence	počet	%
Vypuštěn / přesunut	23 535	99,657 ^a
Úhyn / utracení	43	0,182 ^b
Léčen	28	0,119 ^b
Neznámé důvody	7	0,030 ^c
V zajetí	3	0,013 ^c

^{a,b,c} rozdílná písmena indikují statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$)

Diskuze

Ochrana obojživelníků je důležitou, ale zároveň veřejnosti nepříliš známou oblastí ochrany přírody. Celkové počty obojživelníků v záchranných stanicích nejsou vysoké s výjimkou roku 2010, kdy byla v záchranných stanicích evidována více než polovina z celkového počtu obojživelníků evidovaných za celé sledované období let 2010 až 2019. Tento fakt však nemusí znamenat, že ochrana obojživelníků je v České republice zanedbatelná, protože ochranou a záchrannými transfery se zabývají také jiné organizace. Molina et al. (2017) popisují v jedné záchranné stanici v Katalánsku pouze 141 obojživelníků během období let 1995 až 2013, což potvrzuje, že živočichové z této třídy nejsou v záchranných stanicích běžní. Obdobně Hartup et al. (1996) uvádějí pouze 97 případů přijetí obojživelníků do záchranných stanic ve státu Illinois (USA) během období let 1980 až 1994.

Nejčastěji zastoupeným druhem v evidenci záchranných stanic v ČR byla ropucha obecná. Tato skutečnost by mohla být dána relativně velkým rozšířením tohoto druhu (Amphibiaweb, 2020) a také jarní migrací ropuch obecných za rozmnožováním, na rozdíl například od kuňky žlutobřiché, uvedené v evidenci na posledním místě, jejímž hlavním důvodem ohrožení je devastace vodních ploch, nikoli migrace (Mikátová et al., 2002).

Záchranné transfery byly jednoznačně nejčastějším důvodem (98%) nakládání s obojživelníky ze strany záchranných stanic. Záchranné transfery, pokud jsou správně provedeny a načasovány, mohou být přínosné v ochraně populací (Vojar, 2007) a jsou často využívanou metodou v ochraně obojživelníků. Pro tuto činnost je důležitá znalost migračních tras těchto zvířat. Při zakládání nových populací v bezpečných místech bývají nejúspěšnější transfery v počtu 1000 jedinců a více (Germano and Bishop, 2009).

Není příliš běžné, aby byli obojživelníci do záchranných stanic v ČR přijímáni jiným způsobem. V období let 2010 až 2019 se jednalo jen o několik málo jedinců zraněných či

jinak handicapovaných. Tato skutečnost může indikovat neznalost či nezájem ze strany veřejnosti, která má obecně velkou zásluhu na příjmu handicapovaných zvířat do záchranných stanic. Naopak Hartup et al. (1996) uvádějí 52 % obojživelníků přijatých do záchranných stanic na základě zranění, především po střetu s dopravním prostředkem, během prací na zahradě a po zranění jiným živočichem (pokousáním), což odpovídá také důvodům přijetí obojživelníků do záchranných stanic v ČR.

Se záchrannými transfery souvisí také velké procento vypuštěných nebo přesunutých zvířat jako způsob ukončení pobytu v záchranných stanicích nebo odepsání z jejich evidencí. Úhyn nebo utracení byly výrazně méně zastoupeny, nicméně souvisí s nízkým počtem obojživelníků přímo v záchranných stanicích léčených. Dle studie Hartup et al. (1996) bylo 68 % z přijatých obojživelníků úspěšně vypuštěno. Tento výsledek však nelze srovnávat, neboť v naší studii jsou v kategorii evidovaných zvířat zahrnuta také zvířata v rámci záchranných transferů, která nebyla přímo držena v prostorách záchranných stanic.

Závěr

Během období let 2010 až 2019 bylo v 35 záchranných stanicích České republiky evidováno celkem 23 616 obojživelníků. Pomoc této skupině živočichů v záchranných stanicích sestává především v provádění záchranných transferů, které napomáhají dostat živočichy do místa určení, aniž by došlo ke snižování stavů v důsledku pohybu přes silnice a jiných nebezpečných nástrah. Přijetí obojživelníků a jejich léčba není obvyklá a zabírá minoritní část činnosti záchranných stanic.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Amphibiaweb. 2020. Species by the numbers [online]. [vid. 23. 6. 2020]. Dostupné z: <https://amphibiaweb.org/amphibian/speciesnums.html>
- Araújo, M.B., Thuiller, W., Pearson, R.G. 2006. Climate warming and the decline of amphibians and reptiles in Europe. *Journal of Biogeography* 33: 1712-1728.
- Cushman, S.A. 2006. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus. *Biological Conservation* 128: 231-240.
- Downie, J.R., Larcombe, V., Stead, J. 2019. Amphibian conservation in Scotland: A review of threats and opportunities. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 29: 647-654.
- Frías-Alvarez, P., Vredenburg, V.T., Familiar-López, M., Longcore, J.E., González-Bernal, E., Santos-Barrera, G., Zambrano, L., Parra-Olea, G. 2008. Chytridiomycosis survey in wild and captive Mexican amphibians. *EcoHealth* 5: 18-26.
- Germano, J.M., Bishop, P.J. 2009. Suitability of amphibians and reptiles for translocation. *Conservation Biology* 23: 7-15.
- Hartup, B.K. 1996. Rehabilitation of native reptiles and amphibians in DuPage County, Illinois. *Journal of Wildlife Diseases* 32: 109-112.
- Helldin, J.O., Petrovan, S.O. 2019. Effectiveness of small road tunnels and fences in reducing amphibian roadkill and barrier effects at retrofitted roads in Sweden. *PeerJ* 7: e7518.
- Hels, T., Buchwald, E. 2001. The effect of road kills on amphibian populations. *Biological Conservation* 99: 331-340.
- IUCN – amphibians. 2020. IUCN SSC Amphibians Specialist Group [online]. [vid. 23. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.iucn-amphibians.org/>
- Jarvis, L.E., Hartup, M., Petrovan, S.O. 2019. Road mitigation using tunnels and fences promotes site connectivity and population expansion for a protected amphibian. *European Journal of Wildlife Research* 65: 27.

- Mikátová, B., Vlašín, M., Mikát, M., Rozínek, R. 2002. Ochrana obojživelníků. Český svaz ochránců přírody, Základní organizace Veronica, EkoCentrum Brno.
- Molina-López, R.A., Mañosa, S., Torres-Riera, A., Pomarol, M., Darwich, L. 2017. Morbidity, outcomes and cost-benefit analysis of wildlife rehabilitation in Catalonia (Spain). *Plos One* 12: e0181331.
- Rachowicz, L.J., Knapp, R.A., Morgan, J.A.T., Stice, M.J., Vredenburg, V.T., Parker, J.M., Briggs, C.J. 2006. Emerging infectious disease as a proximate cause of amphibian mass mortality. *Ecology* 87: 1671-1683.
- Sparling, D.W., Fellers, G.M. 2009. Toxicity of two insecticides to California, USA, Anurans and its relevance to declining amphibian population. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1696.
- Teacher, A.G.F., Cunningham, A.A., Garner, T.W.J. 2010. Assessing the long-term impact of *Ranavirus* infection in wild common frog populations: Impact of *Ranavirus* on wild frog populations. *Animal Conservation* 13: 514-522.
- Temple, H.J., Cox, N.A. 2009. European red list of amphibians. Office for Official Publications of the European Communities.
- Vojar, J. 2007. Ochrana obojživelníků: Ohrožení, biologické principy, metody studia, legislativní a praktická ochrana: doplněk k metodice č. 1 Českého svazu ochránců přírody. Český svaz ochránců přírody, ZO Hasina Louny.
- Vyhláška č. 395/1992 Sb., kterou se provádějí některá ustanovení zákona národní rady č. 114/1992, o ochraně přírody a krajiny. In: [zakonyprolidi.cz](https://www.zakonyprolidi.cz). [vid. 8. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-395>.
- Zákon č. 114/1992 Sb., o ochraně přírody a krajiny, ve znění pozdějších předpisů. In: [zakonyprolidi.cz](https://www.zakonyprolidi.cz). [vid. 8. 6. 2020]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/1992-114>

Rezidua vybraných sulfonamidů, nesteroidních antiflogistik a analgetik-antipyretik v povrchových vodách v povodí řeky Labe (Česká republika)

Marie Skočovská¹, Martin Ferenčík^{2,3}, Martin Svoboda⁴, Zdeňka Svobodová⁵

¹ Klinická laboratoř pro velká zvířata, Fakulta veterinárního lékařství VFU Brno, ² Povodí Labe, státní podnik, ³ Ústav environmentálního a chemického inženýrství, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, ⁴ Klinika chorob přežvýkavců a prasat, Fakulta veterinárního lékařství VFU Brno, ⁵ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VFU Brno

Abstrakt

Výskyt reziduí humánních i veterinárních i léčiv v povrchových vodách je způsoben nedostatečným odstraněním z odpadních vod. Rezidua léčiv mají za následek narušení rovnováhy vodního ekosystému, negativně působí na necílové organismy a představují významné riziko pro lidské zdraví. Cílem studie bylo stanovení koncentrací reziduí 8 léčiv ze skupiny sulfonamidů (sulfathiazol, sulfadiazin, sulfadimidin, sulfamethoxazol, sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfamerazin, sulfachlorpyridazin), 4 léčiv ze skupiny nesteroidních antiflogistik (ibuprofen, ketoprofen, naproxen, diklofenak) a 1 zástupce analgetik-antipyretik (acetaminofen, tj. Paracetamol) v povrchových vodách v povodí řeky Labe. Dalším cílem bylo zjištění korelace mezi průtokem vody na sledovaných lokalitách a koncentrací reziduí léčiv. Celkem 65 vzorků povrchových vod povodí řeky Labe bylo odebráno během měsíce srpna roku 2018, kdy bylo počasí konstantní bez významných výkyvů. Vlastní analýza byla provedena metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS). Výsledky ukazují četný výskyt reziduí sulfamethoxazolu, ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a acetaminofenu (paracetamolu). Statisticky významná negativní korelace mezi intenzitou říčního průtoku na sledovaných lokalitách a koncentrací reziduí byla zjištěna u ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a acetaminofenu (paracetamolu). Nejvýznamnější nálezy reziduí sledovaných léčiv byly většinou stanoveny na malých tocích pod většími městskými sídly s nemocničním nebo jiným zdravotnickým zařízením.

Úvod

Znečištění povrchových vod rezidui farmak je celosvětovým problémem (Hruška a Fránek 2012), jehož příčinou je rostoucí spotřeba humánních i veterinárních léčiv a jejich nedostatečné odstranění v čistírnách odpadních vod (ČOV). Významné zástupce léčiv představují sulfonamidy, nesteroidní antiflogistika (NSAIDs) a analgetika-antipyretika, jakožto léčiva hojně používaná v humánní i veterinární medicíně (Nikolaou et al., 2007).

Sulfonamidy jsou skupinou antibiotik, která se ve veterinární medicíně používají především při terapii bakteriálních infekcí v chovech prasat a skotu (Hruška a Fránek, 2012). Kvůli nesnadné degradabilitě sulfonamidů představují intenzivní chovy prasat a skotu významné ekologické riziko pro znečištění povrchových vod rezidui těchto léčiv (Zhou et al., 2009). Rezidua antibiotik v životním prostředí podporují rozvoj multirezistentních kmenů bakterií, proti kterým známá léčiva nezabírají. Ve vodních organismech pak může docházet v bioakumulaci a biomagnifikaci těchto léčiv (Bai et al., 2014).

Nesteroidní antiflogistika jsou léčiva rozšířená v humánní i veterinární medicíně používaná především k terapii bolesti (Nikolaou et al., 2007). Jedná se o heterogenní skupinu léčiv s analgetickými, antipyretickými, antiflogistickými účinky. Některá léčiva mají též antiagregační a antiuratický účinek (Olejárová, 2008; Martínková et al., 2018; Pavelka, 2002; Forejtová, 2017). Rezidua nesteroidních antiflogistik mají v životním prostředí negativní

dopady. Nejzávažnějším příkladem je diklofenak, který zodpovídá za stav kritického ohrožení u 3 druhů supů rodu *Gyps* (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) žijících v jižní Asii (Swan et al., 2006). Při požívání mršin zvířat léčených před smrtí diklofenakem byli supi vystaveni toxickému působení léčiva a studie potvrzují korelaci mezi expozicí diklofenakem a renálním selháním u supů (Oaks et al., 2004).

Analgetika-antipyretika jsou skupinou léčiv působících proti bolesti a horečce. Někdy bývají řazeny mezi NSAIDs, ale na rozdíl od nich mají zanedbatelný protizánětlivý účinek. Typickým zástupcem je paracetamol (acetaminofen) (Gerrett, 2005).

Léčiva se do povrchových vod dostávají několika způsoby. Jedním z hlavních zdrojů kontaminace povrchových vod rezidui léčiv jsou odpady z nemocničních zařízení, výrobních míst a především komunální odpad (Sukul and Spiteller, 2006). Použití léčiv v akvakultuře a vyloučení jejich reziduí spolu s exkrementy vede ke kumulaci v sedimentu. Aplikace kontaminovaných hnojiv a kalů z ČOV na půdu s cílem dosažení udržitelné recyklace živin je další možnou cestou vstupu léčiv do životního prostředí. Rezidua léčiv v kontaminovaných exkrementech venkovně chovaných zvířat pronikají z části do půdy a z části jsou dešťovou vodou svedeny do povrchových vod (Hamscher et al., 2004), kde dochází k inkorporaci reziduí do sedimentu, popřípadě podlehnou abiotické nebo biotické degradaci (Hruška a Fránek, 2012; Sukul and Spiteller, 2006). Je znám i přenos léčiv na prachových částicích vzniklých z krmiva, podestýlky, exkrementů zvířat a zvířat samotných (Hamscher et al., 2003). Úroveň znečištění je dána mnoha faktory. Příkladem je počet chovaných zvířat, technologie hnojení, výběr léčiv, typ půdy aj. (Hruška a Fránek, 2012). Následkem nedostatečného odstranění reziduí léčiv v ČOV dochází k jejich výskytu v povrchových vodách, kde negativně působí na vodní organismy a narušují rovnováhu vodního ekosystému (Stancova et al., 2015).

Znečištění povrchových vod antibiotiky je poprvé popsáno ve studii z roku 1982, kdy byla zjištěna kontaminace říčních vod v Anglii vždy alespoň jednou látkou ze skupiny makrolidů, sulfonamidů a tetracyklinů v koncentraci 1 µg/l (Watts et al., 1982). První zmínka o kontaminaci povrchových vod NSAIDs pochází z kanadské studie z roku 1986, kdy byla při výtoku z ČOV stanovena rezidua ibuprofenu a naproxenu (Rogers et al., 1986).

Cílem předkládané studie bylo zjistit koncentrace reziduí vybraných léčiv v povrchových vodách v povodí řeky Labe a zhodnotit vztah mezi jejich koncentracemi a intenzitou říčních průtoků.

Materiál a metodika

Bylo odebráno celkem 65 bodových vzorků vody z různých lokalit povodí řeky Labe (obr. 1 a 2). Vzorky byly odebrány jednorázově do 1 l skleněných nádob se zábrusovou zátkou a zchlazeny během přepravy do laboratoře. Odběry byly provedeny během měsíce srpna roku 2018, kdy bylo počasí stabilní, a tak stabilní byla i intenzita průtoků na jednotlivých lokalitách.

Vlastní stanovení koncentrací reziduí léčiv bylo provedeno metodou kapalinové chromatografie s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC-MS/MS).

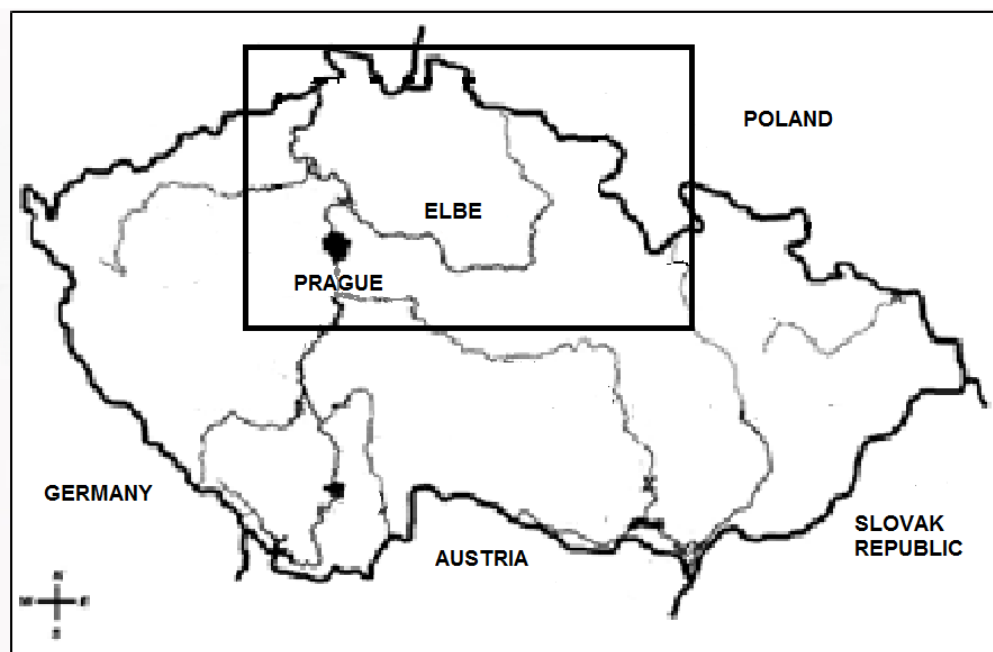
Mez stanovitelnosti byla u všech sledovaných léčiv vyšší než 5 ng/l. Výjimkou byl pouze paracetamol (acetaminofen), u kterého byla mez stanovitelnosti vyšší než 10 ng/l.

V rámci studie byla stanovena rezidua celkem třinácti léčiv. Osm látek bylo ze skupiny sulfonamidů (sulfathiazol, sulfadiazin, sulfadimidin, sulfamethoxazol, sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfamerazin a sulfachlorpyridazin), čtyři látky ze skupiny nesteroidních antiflogistik (ibuprofen, ketoprofen, naproxen a diklofenak) a jedna látka ze skupiny analgetik-antipyretik (paracetamol, tj. acetaminofen).

Statistické zpracování dat bylo provedeno pomocí programu Unistat for Excel 5.6. Nejprve bylo k testování dat využito Shapiro-Wilkova testu pro zhodnocení normálního

rozdělení, které nebylo potvrzeno. Následně byla data testována pomocí neparametrických testů a s využitím Spearmanova pořadového koeficientu bylo provedeno posouzení korelace mezi průtokem a koncentrací sledovaných analytů. Pro korelační analýzu byla použita pouze data s pozitivním nálezem reziduí léčiv a hladina významnosti byla $p \leq 0,05$, $p \leq 0,01$.

Obrázek č. 1. Mapa České republiky, povodí řeky Labe



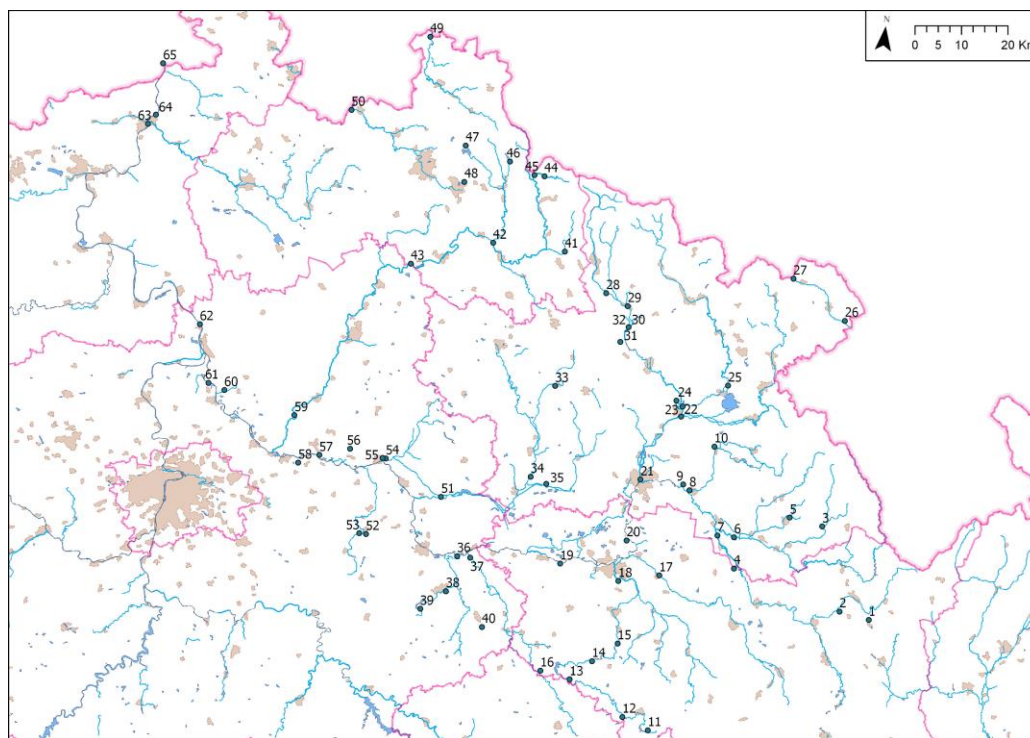
Výsledky

Celkem u následujících 7 léčiv byly zjištěny koncentrace nad mezí stanovitelnosti: sulfadimidin, sulfamethoxazol, diklofenak, ibuprofen, ketoprofen, naproxen, paracetamol (acetaminofen). Zatímco rezidua sulfadimidinu a ketoprofenu byly naměřeny pouze ve 3 odběrových lokalitách, koncentrace reziduí zbylých 5 léčiv (sulfamethoxazol, ibuprofen, naproxen, diklofenak a paracetamol, tj. acetaminofen) byly stanoveny ve většině lokalit. Korelační analýzou byla prokázána statisticky významná negativní závislost mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací reziduí léčiv u ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a paracetamolu (acetaminofenu).

Sulfamethoxazol (obr. 3) byl stanoven celkem u 48 vzorků a nejvyšší koncentrace (270 ng/l) byla naměřena ve vzorku z řeky Cidliny v obci Luková (vz. 34). Vzorek z řeky Výmola v obci Císařská Kuchyně (vz. 58) obsahoval rezidua sulfamethoxazolu v koncentraci 190 ng/l a významné koncentrace (140 a 130 ng/l) byly naměřeny z řeky Lužické Nisy v Hrádku nad Nisou (vz. 50) a Olešnici ve Zlíči (vz. 25). Korelační analýza neprokázala statisticky významnou závislost mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací sulfamethoxazolu ($p = 0,1385$).

Ibuprofen (obr. 4) byl nalezen ve 43 vzorcích s nejvyšší koncentrací (1600 ng/l) ve vzorku z řeky Cidliny v obci Luková (vz. 34). Významné koncentrace (530 a 280 ng/l) ibuprofenu byly stanoveny ve vzorcích z řeky Chrudimky v části obce Vítanov – Stan (vz. 12) a Boreckého potoka v obci Souvrat' (vz. 31). Korelační analýzou byla zjištěna statisticky významná negativní korelace mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací ibuprofenu ($p = 0,0019$).

Obrázek č. 2. Mapa odběrových lokalit v povodí řeky Labe



Vysvětlivky: vzorek č. (průtok m^3/s)

1 – Černná, Petrovice u Lanškrouna; 2 – Dobroučka, Dolní Dobrouč; 3 – Zdobnice, Pěčín (1,27); 4 – Černná, Malá Černná nad Orlicí (2,59); 5 – Javornický potok, Rychnov nad Kněžnou (0,24); 6 – Divoká Orlice, Čestice (4,26); 7 – Tichá Orlice, Žďár nad Orlicí (3,94); 8 – Dědina, Třebechovice por Orebom (0,893); 9 – Orlice, Nepasice (8,78); 10 – Zlatý potok, České Meziříčí (0,22); 11 – Chrudimka, Silnice nad Hlinskem (0,21); 12 – Chrudimka, Stan (0,385); 13 – Chrudimka, Klokočov (1,001); 14 – Chrudimka, Mezisvětí (1,027); 15 – Chrudimka, Svidnice (0,86); 16 – Doubrava, Spačice (0,368); 17 – Loučná, Dašice (0,658); 18 – Chrudimka, Nemošice (1,7); 19 – Labe, Valy (26,62); 20 – Labe, Němčice (22); 21 – Labe, Hradec Králové (21,8); 22 – Metuje, Jaroměř (1,612); 23 – Úpa, Jaroměř (1,14); 24 – Labe, Hořenice (8,66); 25 – Olešnice, Zlič (0,279); 26 – Stěnavá, Otovice (0,69); 27 – Stěnavá, Starostín (0,22); 28 – Labe, Klášterská Lhota (2,966); 29 – Čistá, Hostinné (0,59); 30 – Labe, Debrné (4,04); 31 – Borecký potok, Souvrať (0,56); 32 – Kalenský potok, Debrné (0,232); 33 – Javorka, Ostroměř (0,084); 34 – Cidlina, Luková (0,513); 35 – Bystřice, Kosičky (0,163); 36 – Labe, Veletov; 37 – Doubrava, Záboří nad Labem (0,42); 38 – Vrchlice, Kutná Hora (ČOV – úpravná, surová voda) (0,53); 39 – Vrchlice, Malešov (před ústím do nádrže) (0,32); 40 – Brslenka, Drobovice (0,28); 41 – Jizerka, Dolní Štěpanice (3,65); 42 – Kamenice, Spálov (1,71); 43 – Jizera, Příšovice (7,55); 44 – Mumlava, Harrachov (1,04); 45 – Mumlava, Mýtiny (2,05); 46 – Černá Desná (v.n. Souš), Souš (0,043); 47 – Kamenice, nad nádrží (0,425); 48 – Lužická Nisa, Jablonecké Paseky (0,407); 49 – Smědá, Ves u Černous (0,972); 50 – Lužická Nisa, Hrádek nad Nisou (1,93); 51 – Cidlina, Sány (0,666); 52 – Bečvářka, Žabonosy (0,28); 53 – Výrovka, Zalešany (1,94); 54 – Mrlina, Nymburk (1,41); 55 – Labe, Nymburk (30); 56 – Vlkava, Hronětice (0,61); 57 – Labe, Lysá nad Labem; 58 – Výmola, Císařská Kuchyně (0,35); 59 – Jizera, Tuřice (2,35); 60 – Košátecký potok, Tišice (0,7); 61 – Labe, Obríství (42); 62 – Labe, Dolní Beřkovice – Liběchov (85); 63 – Labe, Děčín (130); 64 – Labe, Loubí; 65 – Labe, Hřensko / Schmilka PB (137)

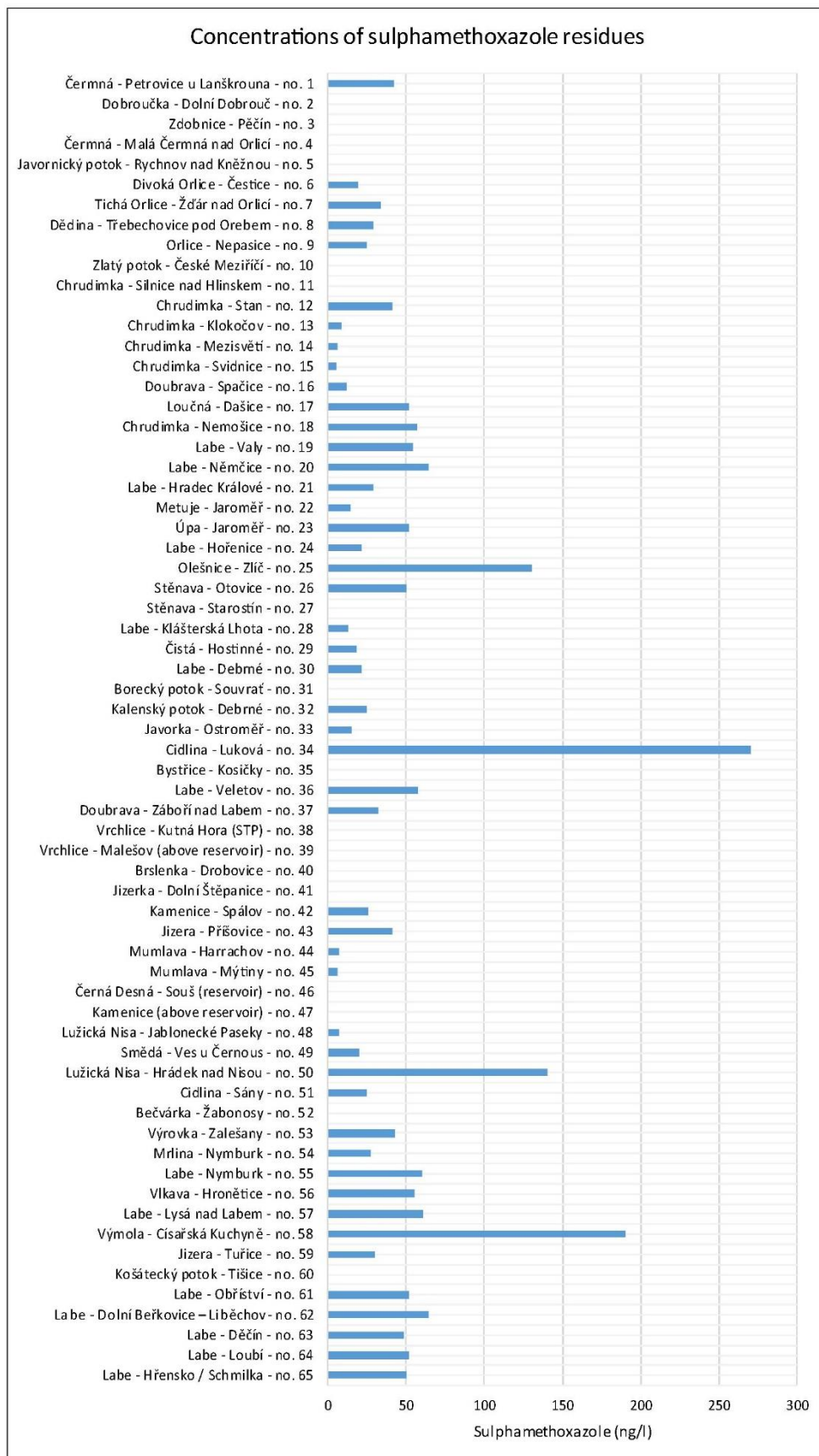
Naproxen (obr. 5) byl naměřen u 19 vzorků a nejvyšší koncentrace (160 ng/l) dosahoval ve vzorku z řeky Stěnavy v obci Starostín (vz. 27). Vysoká koncentrace (110 ng/l) naproxenu byla stanovena ve vzorku z Boreckého potoka v obci Souvrať (vz. 31). Další významné nálezy (69 a 58 ng/l) byly zjištěny ve vzorcích z řek Cidliny v obci Luková (vz. 34) a Výmoly v obci Císařská Kuchyně (vz. 58). Korelační analýza potvrdila statisticky

významnou negativní závislost mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací reziduí naproxenu ($p = 0,05$).

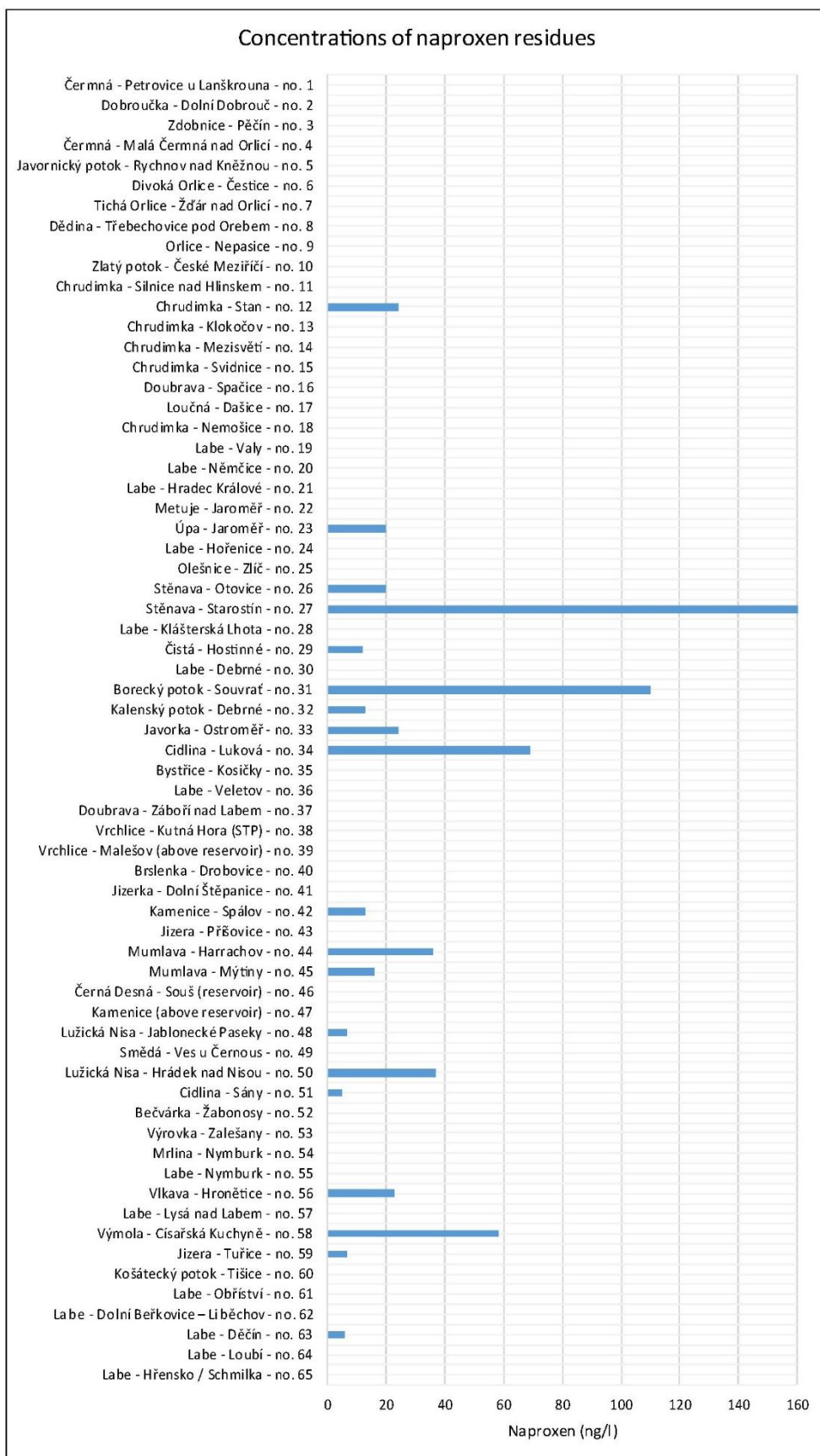
Diklofenak (obr. 6) byl zastoupen v nejvíce vzorcích, a to v 51, z nichž nejvyšší koncentrace (310 ng/l) dosahoval ve vzorku z řeky Výmoly v obci Císařská Kuchyně (vz. 58). Vysoká hladina (260 ng/l) diklofenaku byla naměřena ve vzorku z řeky Cidliny v obci Luková (vz. 34). Významné nálezy se stejnou koncentrací (200 ng/l) byly zjištěny ve vzorcích z řek Chrudimky v části obce Vítanov – Stan (vz. 12) a Stěnavy z obce Starostín (vz. 27). Korelační analýzou byla zjištěna statisticky významná negativní závislost mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací reziduí diklofenaku ($p = 0,0021$).

Paracetamol, tj. acetaminofen (obr. 7) byl stanoven ve 27 vzorcích s nejvyšší koncentrací (530 ng/l) ve vzorku z řeky Chrudimky z části obce Vítanov – Stan (vz. 12). Vysoké hladiny (250 a 130 ng/l) paracetamolu (acetaminofenu) byly zjištěny ve vzorcích z řek Lužické Nisy z obce Jablonecké Paseky (vz. 48) a Čisté v obci Hostinné (vz. 29). Byla prokázána statisticky významná negativní korelace mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací reziduí paracetamolu, tj. acetaminofenu ($p = 0,0189$).

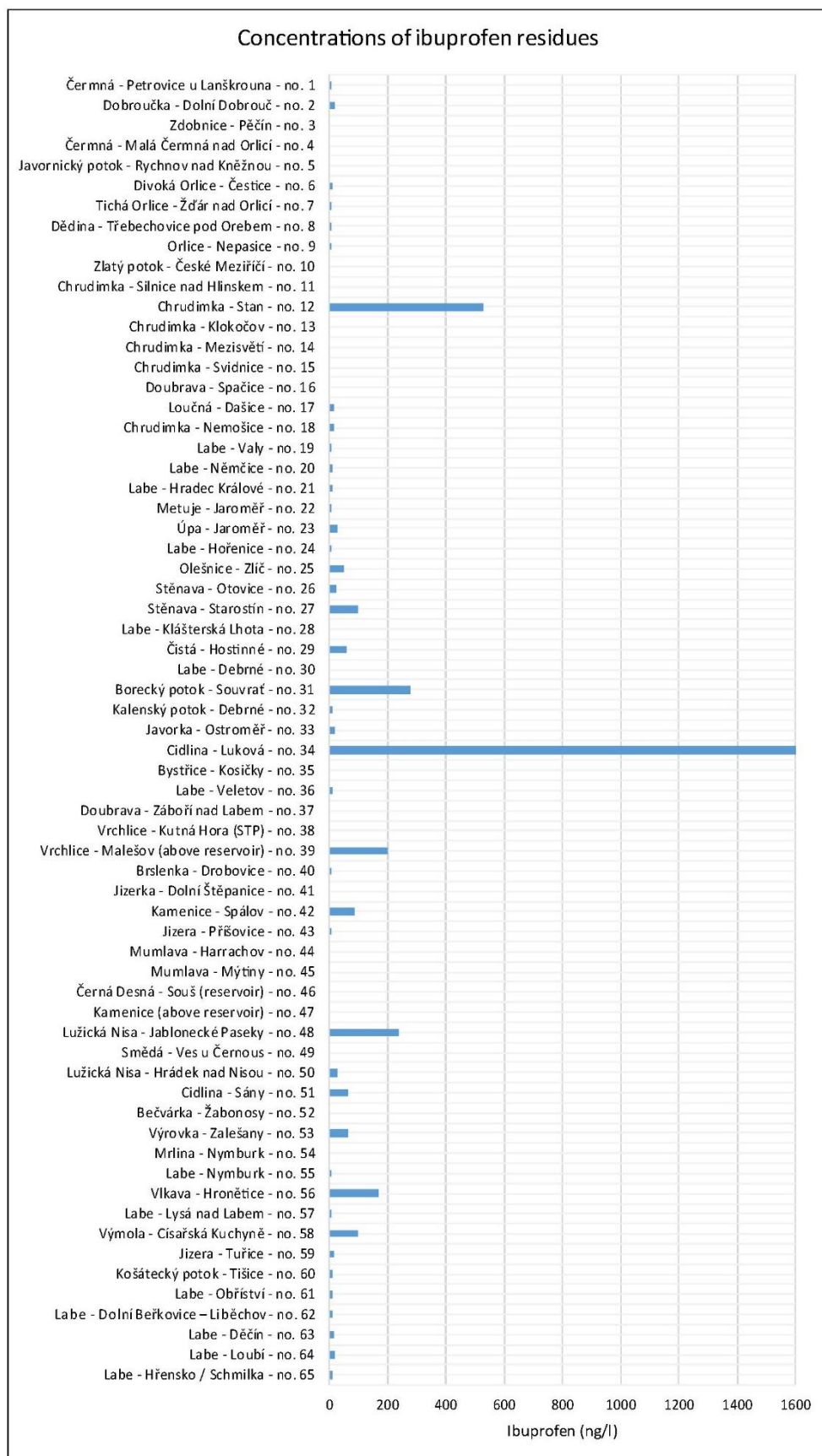
Obrázek č. 3. Koncentrace reziduí sulfamethoxazolu



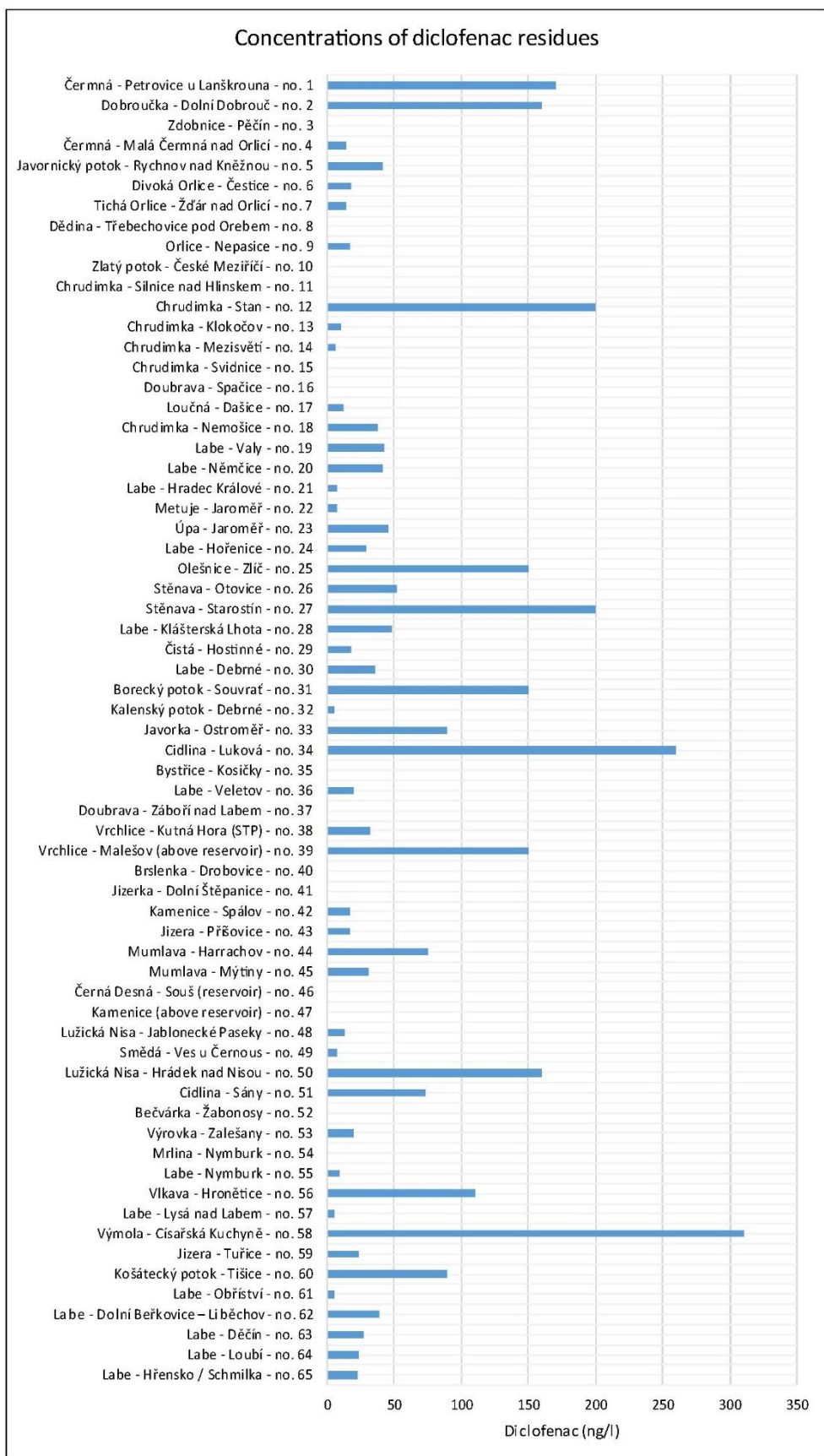
Obrázek č. 4. Koncentrace reziduí naproxenu



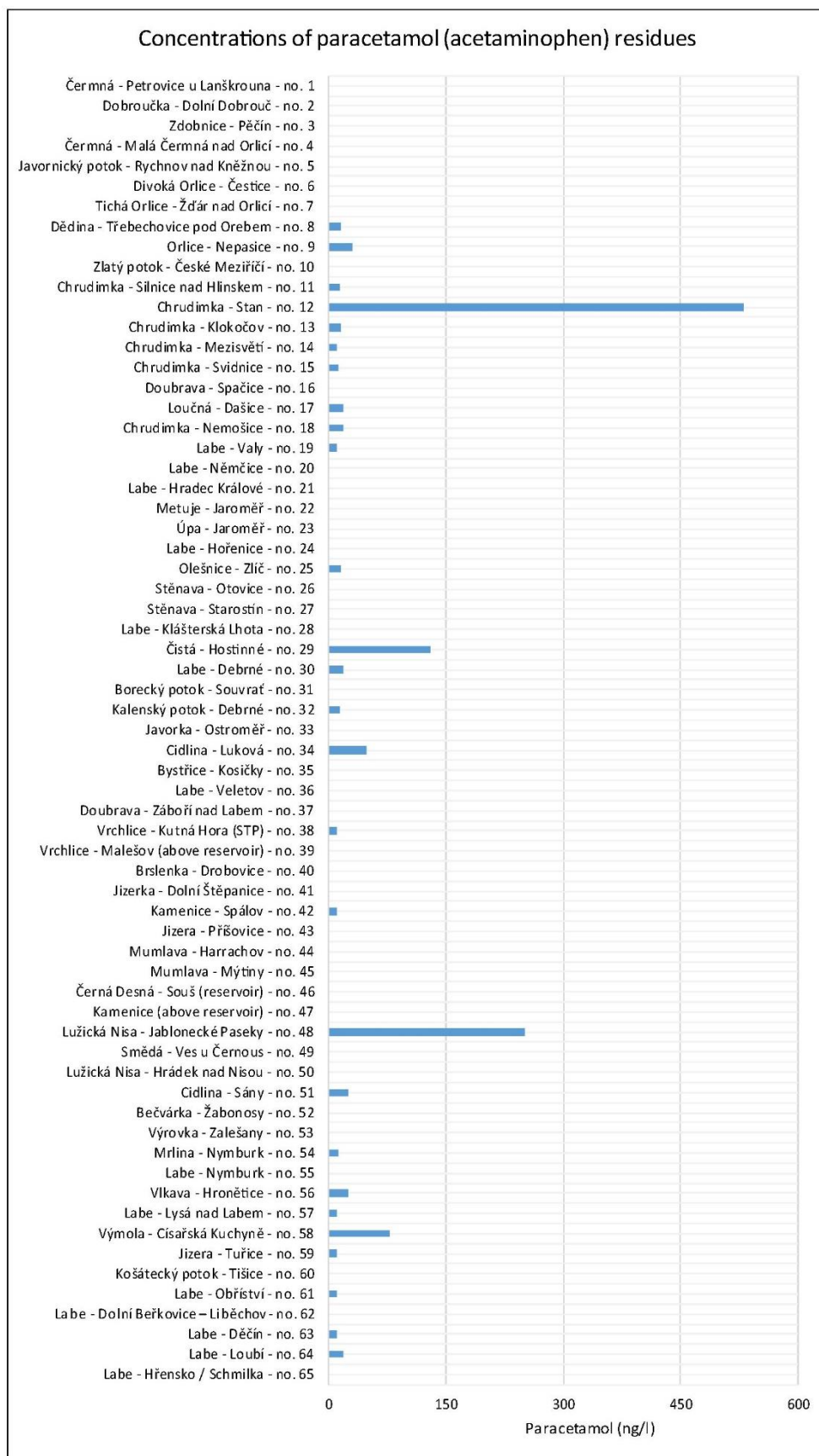
Obrázek č. 5. Koncentrace reziduí ibuprofenu



Obrázek č. 6. Koncentrace reziduí diklofenaku



Obrázek č. 7. Koncentrace reziduí paracetamolu (acetaminofenu)



Diskuze

Výsledky naší práce potvrzují výskyt reziduí u 7 stanovovaných léčiv ve vzorcích z povrchových vod povodí řeky Labe. Významné koncentrace na většině lokalit byly zjištěny u 5 léčiv (sulfamethoxazol, ibuprofen, naproxen, diklofenak, paracetamol, tj. acetaminofen). Důležitou částí výsledků je potvrzení statisticky významné negativní korelace mezi intenzitou říčních průtoků a koncentracemi reziduí u ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a paracetamolu (acetaminofenu). Nízká intenzita průtoku v malých tocích vede pouze k minimálnímu naředění reziduí léčiv, a jejich koncentrace jsou proto vyšší. Závislost koncentrace reziduí léčiv na intenzitě říčních průtoků se ve své studii zabývají i jiní autoři (Castiglioni and Zuccato, 2011; Kasprzyk-Hordern et al., 2008; Kolpin et al., 2004; Hirsch et al., 1999, Ternes, 1998; Marsik et al., 2017; Veras et al., 2019). Studie autorů Castiglioni and Zuccato (2011) se zabývá koncentracemi reziduí farmak v řekách s různým průtokem. Jedná se o řeku Pád (600-1000 m³/s), řeku Lambro (5 m³/s), řeku Olona (0,5 m³/s) a Arno (4-10 m³/s). Řeka Pád jako hlavní tok severní Itálie s vysokým průtokem obsahovala obecně nižší koncentrace reziduí farmak, což je dáno větším naředěním reziduí. Kasprzyk-Hordern et al. (2008) se zabývali studiem reziduí léčiv v řekách Taff (velká řeka) a Ely (malý tok) v jižním Walesu ve Velké Británii, kde se vlivem sucha snížil průtok v řekách a tím i ředění reziduí léčiv, což vedlo k výraznému zvýšení jejich koncentrací. V rámci studie byly stanovovány i látky sulfamethoxazol, ibuprofen, naproxen, diklofenak a paracetamol (acetaminofen). Studie autorů Kolpin et al. (2004) pojednává o různých koncentracích reziduí antibiotik v závislosti na intenzitě průtoku v tocích státu Iowa. Studie porovnává toky s nízkým průtokem ($F = 0,001$), toky se středním průtokem ($F = 0,11$) a toky s vysokým průtokem ($F = 0,42$). Nejvyšší koncentrace reziduí antibiotik byly stanoveny za podmínek nízkého průtoku, kdy dochází pouze k minimálnímu naředění léčiv. Hirsch et al. (1999) v rámci studie sledovali rezidua antibiotik, mezi nimi i sulfamethoxazol, která byla ve vyšších koncentracích stanovena v malých tocích oproti velkým řekám jako je např. Rýn. Ternes (1998) uvádí, že rezidua léčiv, mimo jiné i ibuprofenu a diklofenaku, se vyskytují ve vyšších koncentracích v malých tocích než ve velkých řekách jako je Rýn a Mohan. Marsik et al. (2017) ve své studii uvádějí, že koncentrace všech sloučenin s výjimkou ibuprofenu byly významně vyšší v odběrových lokalitách s nízkým průtokem (potoky) než ve velkých vodních tocích. Studie autorů Veras et al. (2019) byla zaměřena na přítomnost reziduí NSAIDs na dvou lokalitách řeky Beberibe v Peixinhos (Brazílie). První lokalitou byla chráněná oblast bez větší urbanizace, zatímco druhá byla z oblasti s intenzivní urbanizací. Nejvyšší koncentrace reziduí byly stanoveny ve vzorcích z druhé lokality pravděpodobně v důsledku antropogenní interference. Studii byly dále pozorovány nejvyšší koncentrace reziduí během období sucha.

Sledování reziduí léčiv v povrchových vodách a přírodním ekosystému vůbec poutá po celém světě stále větší pozornost. Výskyt reziduí sulfonamidů, nesteroidních antiflogistik i analgetik-antipyretik je považován za celosvětový problém, o čemž svědčí mnohé studie (Lindim et al., 2016; Bean et al., 2018; Ferrer and Thurman, 2012; Matongo et al., 2015; Rivera-Jaimes et al., 2018; Paíga et al., 2016). Důvodem je především potenciální toxicita, teratogenita a genotoxicita reziduí léčiv a jejich směsí pro necílové organismy. Rezidua antibiotik jsou navíc sledována kvůli rostoucí bakteriální rezistenci, což je v současnosti jedno z nejnámennějších zdravotních rizik pro člověka (Liu et al., 2018; Qiao et al., 2018). Ben et al. (2019) popisují možnou interakci reziduí antibiotik s mikrobiomem lidského střeva, což může způsobit mikrobiální nerovnováhu vedoucí k množení oportunních patogenů střeva a různým střevním poruchám (pseudomembranózní kolitida, kolorektální karcinom, aj.). Jsou popsány případy, kdy došlo vlivem bakteriální rezistence až k úmrtí pacienta z důvodů nevléčitelnosti (Ben et al., 2019).

Toxicitou reziduí léčiv a potenciálními negativními účinky na růst a vývoj necílových organismů se zabývá mnoho studií, avšak stále chybí poznatky o chronickém působení těchto

reziduí a toxickém působení jejich směsí na vodní organismy (Sanderson et al., 2004; Pomati et al., 2004; Gao et al., 2013). V rámci studie autorů Brain et al. (2004) zabývající se toxickým působením sulfonamidů na *Lemna gibba* bylo zjištěno, že nejtoxičtějším sulfonamidem jsou sulfamethoxazol, sulfadimethoxin a sulfamethazin. Sehonova et al. (2017) se zabývali toxickými účinky sodné soli naproxenu a jeho směsi s tramadolem hydrochloridem při subchronické expozici raných stádií *Cyprinus carpio*. Studie potvrdila negativní vliv na líhnutí, vývoj, morfologii, oxidační stres i úmrtnost ryb.

Vzhledem k rizikům, která mohou rezidua léčiv ve vodním prostředí způsobovat, je zapotřebí se nadále výzkumu v této oblasti věnovat. Dle našeho názoru by se mělo zabývat též otázkou zdokonalení čistící schopnosti ČOV, jakožto prevencí negativního působení na necílové organismy a zdraví člověka. Cílem bádání by měla být snaha o minimalizaci rizika pro zdraví člověka a necílových organismů.

Nejvýznamnější nálezy reziduí sledovaných léčiv byly zjištěny ve vzorcích z řeky Cidliny (obec Luková), Výmoly (obec Císařská Kuchyně), Chrudimky (část obce Vítanov – Stan) a ve vzorku z Boreckého potoka (obec Souvrat'). Vzorek z řeky Cidliny (obec Luková) obsahoval rezidua sulfamethoxazolu, ibuprofenu, naproxenu a diklofenaku. Hlavní zdroj kontaminace představuje pravděpodobně město Nový Bydžov s počtem obyvatel 6794 k 1. 1. 2020 (Web 1). Odpadní vody z nemocnice Nový Bydžov jsou odváděny do ČOV Nový Bydžov, která zaústíje do řeky Cidliny. Ve vzorku z řeky Výmoly (obec Císařská Kuchyně) byla ve významných koncentracích stanovena rezidua sulfamethoxazolu, naproxenu a diklofenaku. Významný zdroj kontaminace je patrně město Úvaly s počtem obyvatel 6552 k 1. 1. 2020 (Web 2). Odpadní vody z Polikliniky Úvaly s.r.o. jsou sváděny do ČOV Úvaly a následně zaústíjí do řeky Výmoly nad odběrovou lokalitou v obci Císařská Kuchyně. Ve vzorku z řeky Chrudimky (část obce Vítanov – Stan) byly významné koncentrace stanoveny u reziduí ibuprofenu, diklofenaku a paracetamolu (acetaminofenu). Předpokládaným zdrojem kontaminace je město Hlinsko s počtem obyvatel 9584 k 1. 1. 2020 (Web 3). Do ČOV Hlinsko, která leží nad odběrovou lokalitou, vedou odpadní vody z Polikliniky Hlinsko a z velkých průmyslových podniků (Mlékárna Hlinsko, a.s.; Elektro-Praga Hlinsko, a.s.). Ve vzorku z Boreckého potoka (obec Souvrat') byly stanoveny významné koncentrace reziduí ibuprofenu a naproxenu. Zdrojem kontaminace Boreckého potoka je pravděpodobně obec Mostek s počtem obyvatel 1177 k 1. 1. 2020 (Web 4), ačkoliv se zde nenachází žádné zdravotnické zařízení. Nicméně ČOV Mostek je spádovou oblastí pro odpadní vody z Mosteckých Lázní. ČOV Mostek zaústíje do Boreckého potoka, pro který mohou být právě Mostecké Lázně zdrojem kontaminace. Z našich výsledků vyplývá, že nejvýznamnější nálezy reziduí sledovaných léčiv byly stanoveny na malých tocích (s nízkým průtokem) pod většími městskými sídly, ve kterých se vyskytují nemocniční či jiná léčebná zařízení. Taktéž studie autorů Liška et al. (2015) popisuje výskyt nejvyšších koncentrací reziduí léčiv (mimo jiné i sulfamethoxazolu, ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a paracetamolu, tj. acetaminofenu) především v drobných tocích s menším objemem vody pod středně velkými a velkými městskými sídly, ve kterých se nachází nemocniční či jiná zdravotnická zařízení.

Závěr

Výsledky naší studie svědčí o výskytu významných koncentrací reziduí 5 léčiv – sulfamethoxazol, ibuprofen, naproxen, diklofenak a paracetamol (acetaminofen) s nejvyšší koncentrací (1600 ng/l) u ibuprofenu. Nejvyšší výskyt reziduí léčiv byl zjištěn v malých tocích s nízkým průtokem, ve kterých dochází pouze k minimálnímu naředění. Byla zjištěna statisticky významná negativní korelace mezi intenzitou říčního průtoku a koncentrací reziduí u ibuprofenu, naproxenu, diklofenaku a paracetamolu (acetaminofenu).

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Bai, Y., Meng, W., Xu, J., Zhang, Y., Guo, C. 2014. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Liao River Basin in China. *Environmental Science: Processes Impacts* 16: 586-593.
- Bean, T.G., Rattner, B.A., Lazarus, R.S., Day, D.D., Burket, S.R., Brooks, B.W., Haddad, S.P., Bowerman, W.W. 2018. Pharmaceuticals in water, fish and osprey nestlings in Delaware River and Bay. *Environmental Pollution* 232: 533-545.
- Ben, Y., Fu, C., Hu, M., Liu, L., Wong, M.H., Zheng, C. 2019. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research* 169: 483-493.
- Brain, R.A., Johnson, D.J., Richards, S.M., Sanderson, H., Sibley, P.K., Solomon, K.R. 2004. Effects of 25 pharmaceutical compounds to *Lemna gibba* using a seven-day static renewal test. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23: 371-382.
- Castiglioni, S., Zuccato, E. 2011. Occurrence of illicit drugs in wastewater and surface water in Italy. In: Castiglioni, S., Zuccato, E., Fanelli, R.: *Illicit Drugs in the Environment*, Willey, Milan, pp. 137-151.
- Ferrer, I., Thurman, E.M. 2012. Analysis of 100 pharmaceuticals and their degradates in water samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1259: 148-157.
- Forejtová, Š. 2017. Systémová nesteroidní antirevmatika. In: Pavelka, K., Vencovský, J., Šenolt, L., Horák, P., Olejárová, M., Tomčík, M., Závada, J., Štěpán, J.: *Farmakoterapie revmatických onemocnění*, Maxdorf, Praha, pp. 33-46.
- Gao, L., Shi, L.J., Yuan, T. 2013. Growth inhibitive effect of typical antibiotics and their mixtures on *Selenastrum capricornutum*. *Journal of Environment and Health* 30, 6: 475-478.
- Gerrett, D. 2005. Pharmacology. In: Turner, W., Merriman, L.: *Clinical skills in treating the foot*, Churchill Livingstone, London, pp. 161-190.
- Hamscher, G., Powelzick, H.T., Höper, H., Nau, H. 2004. Antibiotics in soil: routes of entry environmental concentrations, fate and possible effects. In: Kümmerer, K.: *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Berlin, Springer-Verlag, pp.139-147.
- Hamscher, G., Powelzick, H.T., Sczesny, S., Nau, H., Hartung, J. 2003. Antibiotics in dust originating from a pig-fattening farm: A new source of health hazard for farmers? *Environmental Health Perspectives* 111: 1590-1594.
- Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L. 1999. Occurrence of antibiotics in the aquatic environment. *The Science of the Total Environment* 225: 109-118.
- Hruška, K., Fránek, M. 2012. Sulfonamides in the environment: a review and a case report. *Veterinární Medicína* 57: 1-35.
- Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R.M., Guwy, A.J. 2008. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 42: 3498-3518.
- Kolpin, D.W., Skopec, M., Meyer, M.T., Furlong, E.T., Zaugg, S.D. 2004. Urban contribution of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants to streams during differing flow conditions. *Science of the Total Environment* 328: 119-130.
- Lindim, C., Van Gils, J., Georgieva, D., Mekenyan, O., Cousins, I.T. 2016. Evaluation of human pharmaceutical emissions and concentrations in Swedish river basins. *Science of the Total Environment* 572: 508-519.
- Liška, M., Soukupová, K., Kule, L., Metelková, A., Koželuh, M. 2015. Výskyt farmak v povrchových a odpadních vodách povodí Vltavy „ve světle“ konference Water and Health – Ženeva/Annemasse 2015. *Vodní hospodářství* 11: 1-5.
- Liu, L., Wu, W., Zhang, J., LV, P., Xu, L., Yan, Y. 2018. Progress of research on the toxicology of antibiotic pollution in aquatic organisms. *Acta Ecologica Sinica* 38: 36-41.

- Marsik, P., Rezek, J., Židková, M., Kramulová, B., Tauchen, J., Vaněk, T. 2017. Non-steroidal anti-inflammatory drugs in the watercourses of Elbe basin in Czech Republic. *Chemosphere* 171: 97-105.
- Martínková, J., Grim, J., Hojdíková, H., Chládek, J., Chládková, J., Kulda, K., Libiger, J. 2018. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada Publishing.
- Matongo, S., Birungi, G., Moodley, B., Ndungu, P. 2015. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi river, KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere* 134: 133-140.
- Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D. 2007. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387: 1225-1234.
- Oaks, J.L., Gilbert, M., Virani, M.Z., Watson, R.T., Meteyer, C.U., Rideout, B.A., Shivaprasad, H.L., Ahmed, S., Chaudhry, M.J.I., Arshad, M., Mahmood, S., Ali, A., Khan, A.A. 2004. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 427: 630-633.
- Olejárová, M. 2008. *Revmatologie v kostce*. Praha: Triton.
- Paíga, P., Santos, L.H.M.L.M., Ramos, S., Jorge, S., Silva, J.G., Delerue-Matos, C. 2016. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): sources, fate and seasonal variation. *Science of the Total Environment* 573: 164-177.
- Pavelka, K. 2002. Nesteroidní antirevmatika. In: Klener, P.: *Vnitřní lékařství, Svazek VII, Revmatologie*, Galén, Praha, pp. 134-137.
- Pomati, F., Netting, A.G., Calamari, D., Neilan, B.A. 2004. Effects of erythromycin, tetracycline and ibuprofen on the growth of *Synechocystis* sp. and *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 67: 387-396.
- Qiao, M., Ying, G.-G., Singer, A.C., Zhu, Y.-G. 2018. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International* 110: 160-172.
- Rivera-Jaimes, J.A., Postigo, C., Melgoza-Alemán, R.M., Aceña, J., Barceló, D., López de Alda, M. 2018. Study of pharmaceuticals in surface and wastewater from Cuernavaca, Morelos, Mexico: occurrence and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment* 613-614: 1263-1274.
- Rogers, I.H., Birtwell, I.K., Kruzynski, G.M. 1986. Organic extractables in municipal wastewater Vancouver, British Columbia. *Water Quality Research Journal* 21: 187-204.
- Sanderson, H., Brain, R.A., Johnson, D.J., Wilson, C.J., Solomon, K.R. 2004. Toxicity classification and evaluation of four pharmaceuticals classes: antibiotics, antineoplastics, cardiovascular and sex hormones. *Toxicology* 203: 27-40.
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Prokes, M., Tichy, F., Fiorino, E., Faggio, C., Svobodova, Z. 2017. Toxicity of naproxen sodium and its mixture with tramadol hydrochloride on fish early life stages. *Chemosphere* 188: 414-423.
- Stancova, V., Zikova, A., Svobodova, Z., Kloas, W. 2015. Effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) naproxen on gene expression of antioxidant enzymes in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Pharmacology* 40: 343-348.
- Sukul, P., Spiteller, M. 2006. Sulfonamides in the environment as veterinary drugs. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 187: 67-101.
- Swan, G.E., Cuthbert, R., Quevedo, M., Green, R.E., Pain, D.J., Bartels, P., Cunningham, A.A., Duncan, N., Meharg, A.A., Oaks, J.L., Parry-Jones, J., Shultz, S., Taggart, M.A., Verdoorn, G., Wolter, K. 2006. Toxicity of diclofenac to Gyps vultures. *Biology Letters* 2: 279-282.
- Ternes, T.A. 1998. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Water Research* 32: 3245-3260.
- Veras, T.B., De Paiva, A.L.R., Duarte, M.M.M.B., Napoleão, D.C., Cabral, J.J.d.S.P. 2019. Analysis of the presence of anti-inflammatories drugs in surface water: A case study in Beberibe river – PE, Brazil. *Chemosphere* 222: 961-969.

Watts, C.D., Crathorne, B., Fielding, M., Killips, S.D. 1982. Nonvolatile organic compounds in treated waters. *Environmental Health Perspectives* 46: 87-99.

Web 1. Počet obyvatel Nový Bydžov [online]. [vid. 2020-7-15]. Dostupné z: <https://www.mistopisy.cz/pruvodce/obec/10560/novy-bydzov/pocet-obyvatel/>

Web 2. Počet obyvatel Úvaly [online]. [vid. 2020-7-15]. Dostupné z: <https://www.mistopisy.cz/pruvodce/obec/10560/novy-bydzov/pocet-obyvatel/>

Web 3. Počet obyvatel Hlinsko [online]. [vid. 2020-7-15]. Dostupné z: <https://www.mistopisy.cz/pruvodce/obec/10560/novy-bydzov/pocet-obyvatel/>

Web 4. Počet obyvatel Mostek [online]. [vid. 2020-7-15]. Dostupné z: <https://www.mistopisy.cz/pruvodce/obec/10560/novy-bydzov/pocet-obyvatel/>

Zhou, J.L., Zhang, Z.L., Banks, E., Grover, D., Jiang, J.Q. 2009. Pharmaceutical residues in wastewater treatment works effluents and their impact on receiving river water. *Journal of Hazardous Materials* 166: 655-661.

Obsah celkové rtuti ve tkáních ryb z vybraných rybníků na území ČR

Kristýna Maláčová¹, Pavla Sehonová¹, Tomáš Král¹, Přemysl Mikula¹,
Danka Haruštiaková^{2,3}, Zdeňka Svobodová¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ² RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, ³ Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita

Abstrakt

Rtuť je jednou z důležitých znečišťujících látek v životním prostředí, je proto nutné sledovat její množství zejména ve vodních ekosystémech. Hlavním cílem předkládané studie bylo porovnat obsah celkové rtuti ve tkáních kapra obecného a dravých druhů ryb (štika obecná, sumec velký, candát obecný) chovaných v prostředí rybníků na území České republiky. Dalšími cíli bylo porovnat hodnoty celkového obsahu rtuti v jednotlivých tkáních ryb, porovnat úroveň kontaminace rtutí zjištěnou v jednotlivých rybnících a pomocí výsledků vyhodnotit hygienickou kvalitu a potenciální zdravotní rizika konzumace těchto ryb. Zjištěný obsah celkové rtuti v jednotlivých tkáních klesal v následujícím pořadí: sval > játra > pohlavní žlázy > šupiny. Nejvyšší průměrný obsah celkové rtuti $0,152 \pm 0,0176$ mg/kg byl naměřen u štiky obecné odlovené z rybníku Velký Kocelovický. Nejnižší průměrný obsah celkové rtuti ve svalu $0,004 \pm 0,0003$ mg/kg byl oproti tomu zjištěn ve svalovině kaprů z Žehuňského rybníka. Potvrdili jsme, že ve tkáních dravých ryb se nachází vyšší obsah rtuti než u ryb nedravých. V žádné ze sledovaných lokalit nedošlo k překročení hygienického limitu stanoveného nařízením 1881/2006, kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. Z toho vyplývá, že konzumace ryb z daných rybníků nepředstavuje z hlediska obsahu rtuti zdravotní riziko pro konzumenty.

Úvod

Vodní prostředí obsahuje velké množství kontaminantů, které mohou představovat riziko pro lidskou populaci. Rtuť (Hg) patří mezi nejrozšířenější a všudypřítomné kontaminanty ve vodních ekosystémech, a to především díky své globální distribuci prostřednictvím atmosférických cest (Willacker et al., 2020). Rtuť se do vodního prostředí dostává přirozeně, nebo v důsledku lidské činnosti (Ditri, 1991; Monteiro and Furness, 1995; Pitter, 2015; Ciccarelli et al. 2019). Nejvýznamnější zdroje rtuti ve vodním prostředí jsou eroze, emise z průmyslu, těžba a spalování fosilních paliv (Pai et al., 2000; Hylander and Meili, 2003; Wang et al., 2004; Pacyna et al., 2010).

Rtuť má bioakumulační schopnost, její koncentrace roste v potravinovém řetězci, a proto je vyšší obsah rtuti nalezen u ryb dravých (Buck et al., 2019; Ciccarelli et al., 2019; Gentes et al., 2019; Zupo et al., 2019; Thomas et al., 2020). Ryby jsou považovány za nejlepší ukazatel kontaminace vodního prostředí těžkými kovy (Yilmaz, 2006; Gentes et al., 2019) především díky své schopnosti bioakumulace, různým trofickým úrovním, dlouhé životnosti, pohodlnému odběru vzorků a vysokému povědomí veřejnosti (Wang and Wang, 2019). Koncentrace rtuti v rybách závisí především na koncentraci rtuti ve vodním prostředí (Zhang et al., 2019), kde se díky mikroorganismům obsaženým v sedimentu dna anorganická rtuť přeměňuje na dostupnější organickou formu zvanou methylrtuť (MeHg), která se dostává přes potravní řetězec až do těla ryb (Černá, 2004; Thomas et al., 2020). V důsledku toho dochází ke hromadění methylrtuti ve vodních organismech, což představuje riziko nejen pro člověka, ale i pro divokou zvěř (Zupo et al., 2019; Willacker et al., 2020). Koncentraci rtuti také

ovlivňuje věk a hmotnost ryb (Janoušková and Švehla, 2002; Purba et al., 2020), kontaminace životního prostředí a biologické faktory (Zupo et al., 2019).

K expozici člověka rtutí dochází především konzumací vodních živočichů, zejména ryb, které pochází z kontaminovaného prostředí a jsou konzumovány často a dlouhodobě (Rakmanikhah et al., 2020). Ryby tvoří nedílnou součást jídelníčku velkého množství lidí, proto je zapotřebí obsah rtuti monitorovat, jelikož nejvyšší koncentrace rtuti nalezneme právě ve svalovině ryb (Čelechovská et al., 2007; Zhang et al., 2019).

Obsah rtuti ve svalovině upravuje Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, kde nalezneme maximální limity pro obsah rtuti ve svalovině ryb. Nařízení rozděluje ryby do dvou skupin. Pro sladkovodní druhy ryb s výjimkou štiky, úhoře a jesetera platí maximální limit je 0,5 mg/kg, zatímco pro mořské ryby a štiky, úhoře, jesetery je stanoven maximální limit rtuti ve svalovině 1 mg/kg.

Materiál a metodika

K hodnocení obsahu celkové rtuti byly vybrány 3 rybníky: Žehuňský, Myslív a Velký Kocelovický. Rybník Žehuňský (rybářství Chlumeck nad Cidlinou) je svou rozlohou cca 258 ha největším rybníkem Středočeského kraje a devátým největším v republice. Rybník Myslív (rybářství Klatovy) má rozlohu 60 ha. Rybník Velký Kocelovický (rybářství Lnáře) má rozlohu 33 ha. Rybí obsádka na těchto rybnících je složena primárně z kapra obecného (*Cyprinus carpio*) a z vedlejších druhů dravých ryb. Jsou to především sumec velký (*Silurus glanis*), štika obecná (*Esox lucius*) a candát obecný (*Sander lucioperca*).

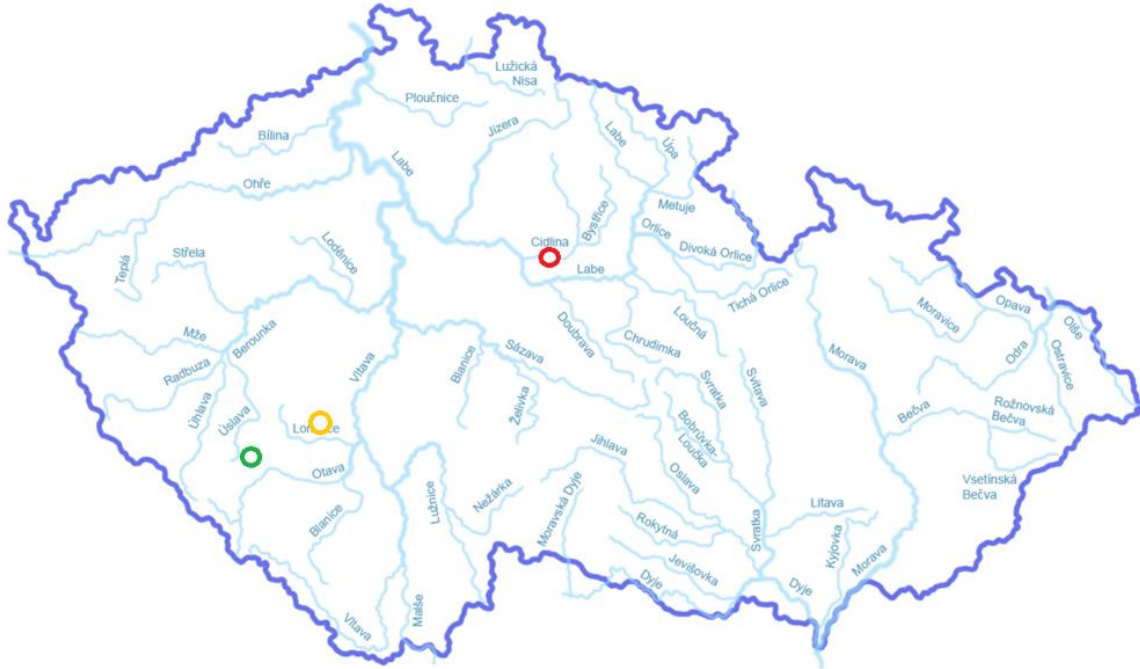
Usmrcení ryb bylo provedeno tupým úderem do hlavy s následným přetětím žaberního oblouku, aby došlo k vykrvení ryb. Ryby byly zváženy a byla změřena celková délka jejich těla. Údaje s parametry odlovených ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z těchto ryb byly odebrány vzorky svaloviny, jater, gonád a šupin. Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C až do provedení vlastní analýzy. Odebrány byly také šupiny, které byly vloženy do papírových sáčků a sloužily k následnému stanovení věku ryb.

Určování věku ryb ze získaných šupin bylo provedeno s pomocí přístroje Meoflex RI 21P. Každá šupina byla omyta a následně vložena na spodní část přístroje. Věk ryb byl odhadován na základě vizuální inspekce šupin.

Obsah celkové rtuti byl stanoven na jednoúčelovém atomovém absorpčním spektrometru AMA 254 (Altec Ltd., Czech Republic), který umožňuje stanovení celkové rtuti bez předchozí úpravy vzorků. Přesnost výsledků byla ověřována použitím standardního referenčního materiálu (CRM No. 13 HUMAN HAIR a BCR-CRM 464, Tuňák, IRMM, Belgie). Limit kvantifikace (LOQ) použité metody byl 0,001 mg/kg. Obsah celkové rtuti byl vyjádřen v mg/kg čerstvé hmotnosti analyzovaných tkání.

Statistické vyhodnocení výsledků bylo provedeno pomocí programu Unistat for Excel 5.6. V první fázi bylo pomocí Shapiro-Wilkova testu ověřeno, zda data splňují podmínku normality. Pokud bylo potvrzeno normální rozdělení, bylo pro další hodnocení využito testu ANOVA a následně post hoc testu – Tukey-HSD (porovnávání tří skupin mezi sebou) nebo nepárového t-testu (porovnávání dvou skupin mezi sebou). Při nesplnění podmínky normality byl využit vícevýběrový mediánový test (porovnávání tří skupin mezi sebou) nebo Mann-Whitneyův test (porovnávání dvou skupin mezi sebou). V případě hodnocení závislosti dvou znaků byla využita Pearsonova korelace (pro data s normálním rozdělením) nebo Spearmanův koeficient pořadové korelace (pro data nesplňující podmínku normálního rozdělení). Testování bylo provedeno na hladině významnosti $p < 0,05$ a $p < 0,01$.

Obrázek č. 1. Odběrové lokality pro studium zatížení prostředí českých rybníků rtuť - schéma. (červená – rybník Žehuňský, žlutá – rybník Myslív, zelená – rybník Velký Kocelovický)



Tabulka č. 1. Parametry ryb odlovených na jednotlivých odběrových lokalitách (průměr±SEM)

Lokalita	Druh	n	Věk [rok]	Délka těla* [cm]	Hmotnost [g]
Velký Kocelovický	kapr obecný	10	4,10±0,18	51,3±0,83	2982±67
	štika obecná	10	3,30±0,15	58,9±2,49	1327±175
	candát obecný	10	3,00±0,00	42,3±0,33	722±26
Myslív	kapr obecný	10	3,33±0,17	38,25±0,40	1251±58
	štika obecná	10	3,40±0,22	59,00±2,46	1538±154
	candát obecný	10	3,40±0,22	49,25±0,71	1292±43
Žehuňský	kapr obecný	10	4,20±0,20	46,7±0,63	2036±87
	štika obecná	10	3,50±0,17	57,1±1,99	1459±152
	sumec velký	10	-	59,9 ±3,10	2027±390

Vysvětlivky: * celková délka těla

Výsledky a diskuse

Morfometrická charakteristika analyzovaných ryb

Věk analyzovaných ryb byl vyrovnáný, pohyboval se v rozmezí 3,3–4,2 roky. U sumce nebyl stanoven věk z důvodu absence šupin. V případě kaprů byla nejvyšší hmotnost zjištěna

u ryb pocházejících z rybníka Velký Kocelovický, následoval rybník Žehuňský a v rybníce Myslív byla hmotnost kaprů nejnižší. Hmotnost štik z porovnávaných rybníků byla vyrovnaná, vyšší hmotnost candátů byla v rybníce Myslív ve srovnání s rybníkem Velký Kocelovický.

Porovnání obsahu celkové rtuti v jednotlivých tkáních ryb

Celkový obsah rtuti v jednotlivých tkáních ryb je uveden v grafu č. 1. U ryb pocházejících z lokality Velký Kocelovický rybník byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi obsahem celkové rtuti ve svalovině kapra obecného a štiky obecné. Při porovnání svaloviny štiky obecné a candáta obecného byl také zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$). Významný rozdíl ($p > 0,05$) nebyl zaznamenán v případě porovnání obsahu rtuti ve tkáních kapra obecného a candáta obecného. Statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) byl nalezen ve vzorcích jater u všech sledovaných druhů ryb. U šupin byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) u kapra obecného oproti štice obecné a candátu obecnému.

U druhů, pocházejících z rybníka Myslív byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) ve vzorcích svaloviny mezi kaprem obecným, štikou obecnou a candátem obecným. Ve vzorcích jater byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi kaprem obecným a štikou obecnou a mezi kaprem obecným a candátem obecným. Při hodnocení celkové rtuti v šupinách byl nalezen statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) u kapra obecného oproti štice a candátovi obecnému. V rybníku Žehuňský byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) nalezen u svaloviny kapra obecného oproti svalovině štiky obecné a candáta obecného. Ve vzorcích jater byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi kaprem obecným, štikou obecnou a sumcem velkým. V šupinách byly statisticky významné ($p \leq 0,01$) hodnoty mezi kaprem obecným a štikou obecnou. Gonády byly porovnávány dle lokalit. V rybníku Velký Kocelovický byl pozorován statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,05$) mezi obsahem celkové rtuti gonád u samců a samic candáta obecného. V rybníku Myslív byl ve vzorcích gonád zjištěn statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) u samců a samic štiky obecné a u samce a samice candáta obecného ($p \leq 0,05$). V rybníku Žehuňský byl nalezeno pouze statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) v gonádách samců a samic štiky obecné.

Porovnání obsahu celkové rtuti v jednotlivých sledovaných rybnících

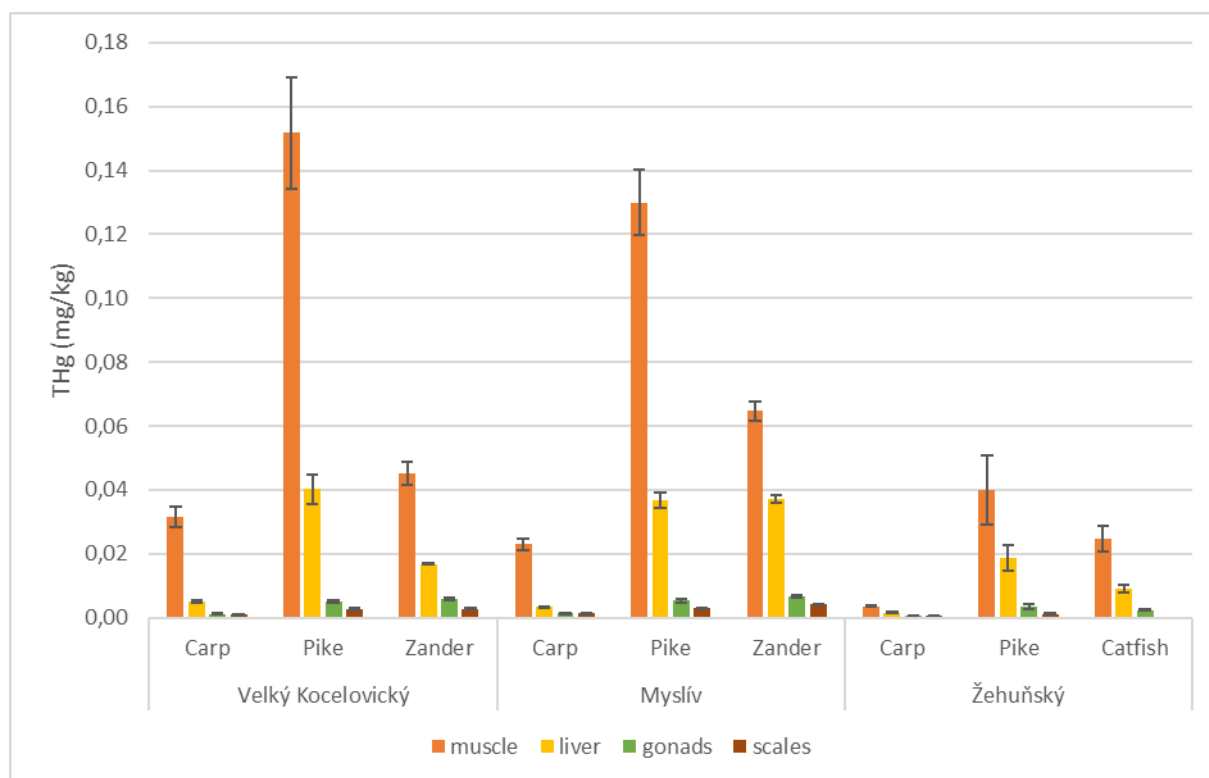
Použité ryby pro stanovení obsahu celkové rtuti byly odloveny z rybníků Velký Kocelovický, Žehuňský a Myslív. U žádného ze stanovovaných vzorků nedošlo k překročení hygienického limitu dle Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006 (0,5 mg/kg celkové rtuti ve svalovině ryb.) Průměrné hodnoty jsou uvedeny v grafu č. 1. Nejvyšší obsah celkové rtuti u ryb z rybníku Velký Kocelovický byl pozorován ve svalovině štiky obecné (0,152±0,0176 mg/kg), nejnižší obsah byl stanoven u vzorků šupin a gonád kapra obecného (0,001±0,0001 mg/kg). V rybníku Myslív byl nejvyšší obsah rtuti ve svalovině štiky obecné (0,130±0,0103 mg/kg), nejnižší hodnota byla pozorována v šupinách a gonádách kapra obecného (0,001±0,0001 mg/kg). Ve vzorcích z rybníku Žehuňský byl nejvyšší obsah rtuti ve svalovině štiky obecné (0,04±0,0108 mg/kg), naopak nejnižší hodnota byla stanovena v gonádách kapra obecného (0,001±0,0000 mg/kg) a také v šupinách kapra obecného a štiky obecné (0,001±0,0001 mg/kg).

Při porovnávání obsahu celkové rtuti v orgánech dle lokalit byl u svaloviny zaznamenán nejvyšší průměrný obsah celkové rtuti u štiky obecné (0,152±0,0176 mg/kg) z rybníku Velký Kocelovický, nejnižší hodnota pak byla detekována u kapra obecného z Žehuňského rybníka (0,004±0,0003 mg/kg). Průměrný celkový obsah rtuti klesal v pořadí Myslív > Velký Kocelovický > Žehuňský rybník. Statisticky významný rozdíl byl pozorován u svaloviny kapra obecného z rybníku Velký Kocelovický a Žehuňský ($p \leq 0,01$), mezi štikami obecnými

ve vzorcích svaloviny z rybníků Velký Kocelovický a Žehuňský ($p \leq 0,01$) a u candáta obecného u rybníků Myslív a Velký Kocelovický ($p \leq 0,01$).

Ve vzorcích jater byla nejvyšší hodnota celkové rtuti u štiky obecné z lokality Velký Kocelovický ($0,040 \pm 0,0046$ mg/kg). Nejnižší obsah byl pozorován u kapra obecného z Žehuňského rybníka ($0,002 \pm 0,0002$ mg/kg). Průměrný obsah celkové rtuti v játrech klesal dle lokalit Myslív > Velký Kocelovický > Žehuňský rybník. Statistický významný rozdíl byl pozorován ve vzorcích jater kaprů obecných ve všech třech lokalitách ($p \leq 0,01$). U štiky obecné byl statisticky významný rozdíl mezi rybníkem Žehuňský a Velký Kocelovický ($p \leq 0,05$). U candátů byl statistický významný rozdíl v játrech u rybníku Myslív a Velký Kocelovický ($p \leq 0,01$).

Graf č. 1. Obsah celkové rtuti (T_{Hg}) ve tkáních ryb dle odběrových lokalit (průměr \pm SEM)



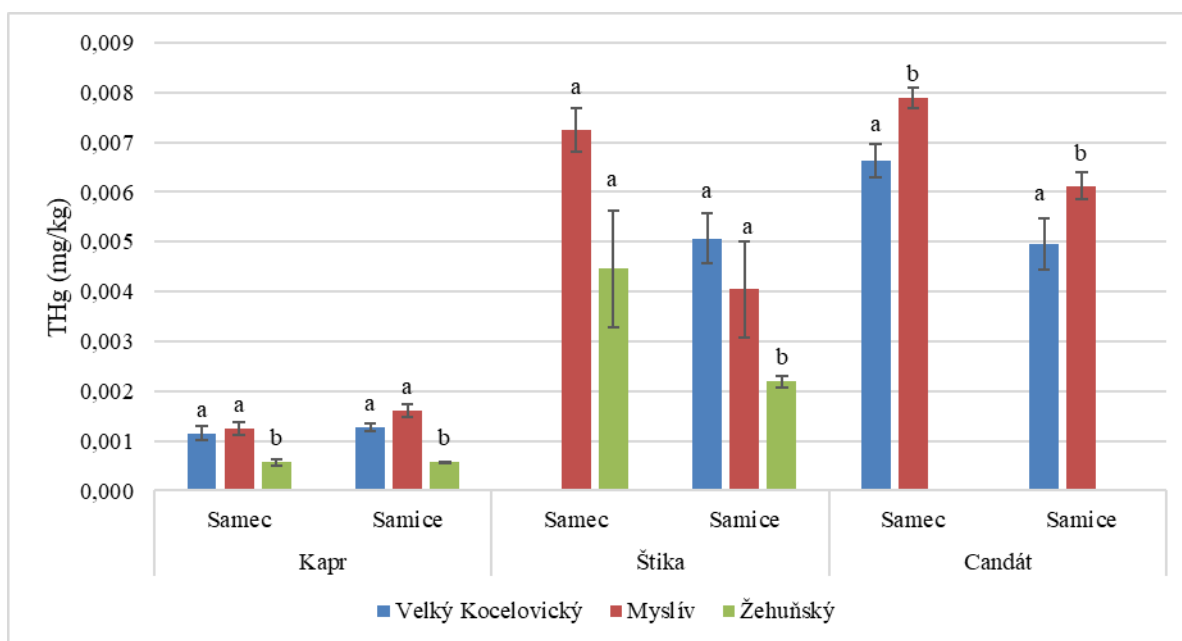
Vysvětlivky: Carp = kapr obecný, Pike = štika obecná, Zander = candát obecný, Catfish = sumec velký. Muscle = svalovina, liver = játra, gonads = pohlavní žlázy, scales = šupiny.

Ve vzorcích šupin byl nalezen nejvyšší průměrný obsah rtuti u candáta obecného ($0,004 \pm 0,0002$ mg/kg), který pocházel z rybníku Myslív. Nejnižší obsah byl stanoven u kapra obecného ($0,001 \pm 0,0001$ mg/kg). Průměrný obsah celkové rtuti v šupinách klesal v pořadí Myslív > Velký Kocelovický > Žehuňský rybník. Statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) byl nalezen u kaprů obecných mezi lokalitami Velký Kocelovický, Myslív s rybníkem Žehuňským. Ve vzorcích šupin štiky obecné byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) mezi rybníky Myslív a Žehuňský a ($p \leq 0,05$) mezi rybníkem Velký Kocelovický a Žehuňský. Vysoce statisticky významný rozdíl byl pozorován i u candáta obecného mezi lokalitami Velký Kocelovický a Myslív.

Při analýze celkové rtuti ve vzorcích gonád dle grafu č. 2 byl pozorován statisticky významný rozdíl u samců kapra obecného mezi rybníky Velký Kocelovický a Myslív ($p \leq 0,05$), u samic kapra obecného byl statisticky vysoce významný rozdíl ($p \leq 0,01$) u rybníků Velký Kocelovický a Myslív s rybníkem Žehuňský. Statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$)

nebyl pozorován mezi rybníky Velký Kocelovický a Myslív u samce a samice kapra obecného. U samic štika obecné byl statisticky významný rozdíl ($p \leq 0,01$) pozorován mezi lokalitami Velký Kocelovický a Myslív oproti Žehuňskému rybníku. U samců štika obecné nebyl pozorován statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Statisticky významný rozdíl byl pozorován u samců i samic candáta obecného ($p \leq 0,05$) mezi rybníky Velký Kocelovický a Myslív.

Graf č. 2. Obsah celkové rtuti v mlíči a jikrách odlovených ryb z jednotlivých lokalit (průměr± SEM)



Vysvětlivky: Statisticky významný rozdíl na hladině $p \leq 0,05$ je naznačen pomocí použití rozdílných písmen („a“ vs. „b“).

Diskuze

Celá řada cizorodých látek může kontaminovat povrchové vody, které tak mohou být jejich rezervoárem. Rtuť a další těžké kovy mají schopnost akumulace v tělech vodních organismů a především ryb. V České republice tvoří hlavní část konzumovaných ryb ryby pocházející z rybníčních systémů. Z tohoto důvodu je nezbytné věnovat pozornost kontrole hygienické kvality těchto surovin (Kružíková et al., 2008).

Obsah rtuti v organismu z velké míry závisí na způsobu života ryb, kdy dravé ryby jsou exponovány rtutí více, než ryby nedravé (Buck et al., 2019; Ciccarelli et al., 2019; Wang and Wang, 2019; Thomas a kol., 2020; Gentes et al., 2019). V naší práci jsme potvrdili existující rozdíl obsahu celkové rtuti mezi dravými a nedravými rybami pocházejícími ze stejných lokalit. Dle Kružíkové et al. (2013) je akumulace rtuti závislá na úrovni postavení ryb v potravním řetězci. V naší práci jsme zvolili jako zástupce dravých ryb štika obecnou, sumce velkého a candáta obecného a zástupce ryb nedravých představoval kapr obecný, u kterého nebyl obsah celkové rtuti vyšší než 0,1 mg/kg ve všech sledovaných lokalitách. Kapři pocházejí z nekontaminovaných chovných rybníků. Nízký obsah celkové rtuti u kapra obecného podporují i studie dalších autorů (Červený et al., 2014; Čelechovská et al., 2007; Maršálek et al., 2007; Vičarová et al., 2016; Zupo et al., 2019; Rakmanikhah et al., 2020). Například Vičarová et al. (2016) sledovali tři vodní nádrže v Českomoravské vrchovině (na Vysočině). V rámci výzkumu bylo odebráno celkem 75 kaprů obecných, ve kterých hodnotili obsah celkové rtuti. Obsah ve svalovině byl 0,019–0,0724 mg/kg, v játrech 0,008–0,0189

mg/kg, což odpovídá hodnotám celkové rtuti zjištěným v naší práci. Dle práce Kenšová et al. (2012) se pohybuje obsah zastoupení celkové rtuti v rybách: svalovina > játra > gonády > šupiny, což potvrzují i naše výsledky. Zhang et al. (2019) ve své studii zabývající se obsahem těžkých kovů ve tkáních kapra obecného, zjistili také nejvyšší obsah rtuti ve svalovině.

Dle Kružíková et al. (2013), lze dle poměru svalovina/játra rozeznat stupeň znečištění lokalit rtutí. Pokud činí poměr celkové rtuti nad 1, pravděpodobně se bude jednat o silně kontaminovanou lokalitu, pokud by byl poměr pod 1, budou ryby pocházet z lokalit se slabou kontaminací rtutí. Poměr u kapra obecného v našich lokalitách činil 0,13-0,5, u štiky obecné 0,26-0,48, u candáta obecného 0,38-0,57 a u sumce velkého 0,36, Poměry námi stanovených ryb ukazují na fakt, že námi sledované ryby pocházeli z málo kontaminovaných lokalit.

Závěr

V žádném ze tří sledovaných produkčních rybníků nebyl překročen stanovený hygienický limit. Z naší studie i z výsledků jiných autorů vyplývá, že ryby chované v produkčních rybnících v České republice jsou hygienicky nezávadné z hlediska obsahu celkové rtuti. V České republice je nejčastěji konzumovanou rybou ve volných vodách kapr obecný. U kapra obecného byly naměřené hodnoty celkové rtuti na velice nízké úrovni. Dále jsme ve studii potvrdili, že vyšší obsah THg je nalezen u ryb dravých, což v našem případě byla štika obecná, candát obecný a sumec obecný.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Buck, D.G., Evers, D.C., Adams, E., DiGangi, J., Beeler, B., Šamánek, J., Petrlík, J., Turnquist, M.A., Speranskaya, O., Regan, K., Johnson, S. 2019. A global-scale assessment of fish mercury concentrations and the identification of biological hotspots. *Science of the Total Environment* 687: 956-966.
- Čelechovská, O., Svobodová, Z., Žlábek, V., Macharáčková, B. 2007. Distribution of metals in tissues of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Veterinaria Brno* 76: 93-100.
- Černá, M. 2004. Development of the European Union mercury strategy. *Chemické Listy* 98: 916-921.
- Červený, D., Žlábek, V., Velíšek, J., Turek, J., Grabic, R., Grabicová, K., Fedorova, G., Rosmus, J., Lepič, P., Randák, T. 2014. Contamination of fish in important fishing grounds of the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109: 101-109.
- Ciccarelli, C., Leinoudi, M., Semeraro, A.M., Di Trani, V., Angelozzi, G., Ciccarelli, E., Corti, I. 2019. Assessment of sampling methods about level of mercury in fish. *Italian Journal of Food Safety* 8: 153-157.
- Ditri, F.M. 1991. Mercury contamination – what we have learned since Minamata. *Environmental Monitoring and Assessment* 19: 165-182.
- Gentes, S., Coquery, M., Vigouroux, R., Hanquiez, V., Allard, L., Maury-Brachet, R. 2019. Application of European water framework directive: Identification reference sites and bioindicator fish species for mercury in tropical freshwater ecosystems (French Guiana). *Ecological Indicators* 106: 105468.
- Hylander, L.D., Meili, M. 2003. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. *Science of the Total Environment* 304: 13-27.
- Janoušková, D., Švehla, J. 2002. Mercury concentrations in fish tissues in the water reservoir Římov, South Bohemia. *Series for Crop Sciences* 19: 43-48.
- Kenšová, R., Kružíková, K., Svobodová, Z. 2012. Mercury speciation and safety of fish from important fishing locations. *Czech Journal of Food Sciences* 30: 276-284.

- Kružíková, K., Kenšová, R., Sedláčková, L., Jarkovský, J., Poleszczuk, G., Svobodova, Z. 2013. The correlation between fish mercury liver/muscle ratio and high and low levels of mercury contamination in Czech localities. *International Journal of Electrochemical Science* 8: 45-56.
- Kružíková, K., Maršálek, P., Randák, T., Svobodová, Z. 2008. Zhodnocení obsahu celkové rtuti a methylrtuti v rybách z vybraných lokalit volných vod na území ČR. *Veterinářství* 58: 726-730.
- Maršálek, P., Svobodová, Z., Randák, T. 2007. The content of total mercury and methylmercury in common carp from selected Czech ponds. *Aquaculture International* 15: 299-304.
- Monteiro, L.R., Furness, R.W. 1995. Seabirds as monitors of mercury in the marine environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 80: 851-870.
- Pacyna, E.G., Pacyna, J.M., Sundseth, K., Munthe, J., Kindbom, K., Wilson, S., Steenhuisen, F., Maxson, P. 2010. Global emission of mercury to the atmosphere from anthropogenic sources in 2005 and projections to 2020. *Atmospheric Environment* 44: 2487-2499.
- Pai, P., Niemi, D., Powers, B. 2000. A North American inventory of anthropogenic mercury emissions. *Fuel Processing Technology* 65: 101-115.
- Pitter, P. 2015. *Hydrochemie*. 5. vydání. Vydavatelství VŠCHT Praha, Praha, Česká republika.
- Purba, J.S., Silalahi, J., Haro, G. 2020. Analysis of mercury in fish, North Sumatera, Indonesia by atomic absorption spectrophotometer. *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development* 8: 21-25.
- Rahmanikhah, Z., Esmailisari, A., Bahramifar, N. 2020. Total mercury and methylmercury concentrations in native and invasive fish species in Shadegan International Wetland, Iran, and health risk assessment. *Environmental Science and Pollution Research* 27: 6765-6773.
- Thomas, S.M., Melles, S.J., Mackereth, R.W., Tunney, T.D., Chu, C., Oswald, C.J., Bhavsar, S.P., Johnston, T.A. 2020. Climate and landscape conditions indirectly affect fish mercury levels by altering lake water chemistry and fish size. *Environmental Research* 188: 109750.
- Vičarová, P., Dočekalová, H., Ridošková, A., Pelcová, P. 2016. Heavy metals in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) from three reservoirs in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences* 34: 422-428.
- Wang, Q.R., Kim, D., Dionysiou, D.D., Sorial, G.A., Timberlake, D. 2004. Sources and remediation for mercury contamination in aquatic systems—a literature review. *Environmental Pollution*, 131: 323-336.
- Wang, X., Wang, W.X. 2019. The three ‘B’ of mercury in China: Bioaccumulation, biodynamics and biotransformation. *Environmental Pollution* 250: 216-232.
- Willacker, J.J., Eagles-Smith, C.A., Blazer, V.S. 2020. Mercury bioaccumulation in freshwater fishes of the Chesapeake Bay watershed. *Ecotoxicology* 29: 459-484.
- Yilmaz, L. 2006. Chaos in the water resources system. *Applied Mathematics and Computation* 183: 761-773.
- Zhang, J.L., Fang, L., Song, J.Y., Luo, X., Fu, K.D., Chen, L.Q. 2019. Health risk assessment of heavy metals in *Cyprinus carpio* (*Cyprinidae*) from the upper Mekong river. *Environmental Science and Pollution Research* 26: 9490-9499.
- Zupo, V., Graber, G., Kamel, S., Plichta, V., Granitzer, S., Gundacker, C., Wittmann, K.J. 2019. Mercury accumulation in freshwater and marine fish from the wild and from aquaculture ponds. *Environmental Pollution* 255: 112975.

Obsah rtuti v rybách z nádrží povodí Moravy (Česká republika)

Kamila Novotná¹, Zuzana Široká¹, Pavel Jurajda², Danka Haruštiaková^{3,4}, Anna Spodniewska⁵, Zdeňka Vymětalová¹, Martin Kubiček¹, Zdeňka Svobodová¹

¹ Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, ² Ústav biologie obratlovců Akademie věd, ³ Institut biostatistiky a analýz, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita, ⁴ RECETOX, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, ⁵ Ústav farmakologie a toxikologie, Fakulta veterinární medicíny, Univerzita Warmia a Mazury v Olsztyně, Polsko

Abstrakt

V této práci byl sledován obsah rtuti ve svalovině tří druhů ryb (cejn, plotice, okoun) pocházejících ze sedmi nádrží (Bojkovice; Boskovice; Hubenov; Karolinka; Landštejn; Ludkovice; Nová Říše) z povodí řeky Moravy (Česká republika). Stanovení celkové rtuti (THg) bylo provedeno atomovou absorpční spektrometrií. Obsah rtuti ve svalovině ryb se pohyboval od 0,025 do 0,824 mg.kg⁻¹. Nejvyšší obsah byl zjištěn u okounů z nádrže Landštejn, nejnižší naopak u plotice z Ludkovické nádrže. Byly zjištěny signifikantní korelace ve vztahu mezi celkovým obsahem rtuti a věkem, a to u okounů z Karolinky, Landštejnu a Nové Říše a u cejna na všech lokalitách. Žádná korelace naopak nebyla zjištěna mezi THg a věkem plotic na žádné lokalitě kromě Hubenova.

Úvod

Světová zdravotnická organizace řadí rtuť mezi deset hlavních polutantů, které mají negativní vliv na živé organismy (FAO/WHO, 2010). Rtuť je přirozeně se vyskytující prvek pocházející ze zemské kůry, který se uvolňuje do životního prostředí v důsledku lidské činnosti i přírodních procesů (Pacyna a Pacyna, 2005). Její hladiny jsou pečlivě sledovány jak v biotické, tak v abiotické části životního prostředí (Kim et al., 2016), aby se vyhodnotila možná rizika vyplývající z rostoucích koncentrací. Toxicita Hg pro člověka se liší s takovými proměnnými, jako je jeho chemická forma, dávka a rychlost expozice. Expozicí z vnějšího prostředí a přes potravní řetězec se dostává rtuť do živých organismů (Abdel-Rasu et al., 2013). Studie uvádějí, že řada onemocnění centrálního nervového systému, jakož i arytmie, kardiomyopatie či poškození ledvin jsou spojeny s expozicí rtuti (Harari et al., 2012). Elementární rtuť nebo její anorganické sloučeniny ve vodním prostředí mohou být mikrobiálně přeměněny na vysoce toxickou organickou sloučeninu methylrtuť, která se ukládá v sedimentech dna a hromadí se v potravním řetězci (Klapstein and O'Driscoll, 2018). Ryby akumulují organickou rtuť (methylrtuť) ve svých tkáních především prostřednictvím konzumace nižších organismů, které taktéž obsahují methylrtuť získanou ze sedimentů (Burger and Gochfeld, 2011).

Obsah rtuti v rybách je velmi proměnlivý a závisí na mnoha okolnostech. Kromě koncentrace rtuti v sedimentu a její biologické dostupnosti v životním prostředí ryb, které jsou nejdůležitějšími faktory pro kumulaci v živých tkáních, hrají důležitou roli i druhy ryb a jejich postavení v potravinovém řetězci. Se zvyšující se trofickou úrovní koncentrace rtuti v rybách stoupá a může docházet k biomagnifikaci. Proto jsou ryby, zejména dravé druhy, považovány za vhodné bioindikátory kontaminace vodního prostředí rtutí a jinými těžkými kovy (Wang and Wang, 2019).

Tato práce se zaměřuje na vodní nádrže, jež jsou člověkem vytvořená vodní díla s více účely (např. protipovodňová ochrana, zásobování pitnou vodou, zdroje elektrické energie atd.). V České republice je 47 nádrží (z celkového počtu 120 vodních nádrží) registrováno jako chráněné zásobárny pitné vody, aby byla zajištěna vysoká kvalita pitné vody (Jurajda a

kol., 2018). Nádrže na pitnou vodu podléhají přísným režimům, jako jsou žádné rekreační činnosti včetně zákazu rybaření nebo řízení rybolovu (Jurajda a kol., 2018). Většina z nich se také nachází na horních částech potoků a řek a daleko od hustě obydlených oblastí.

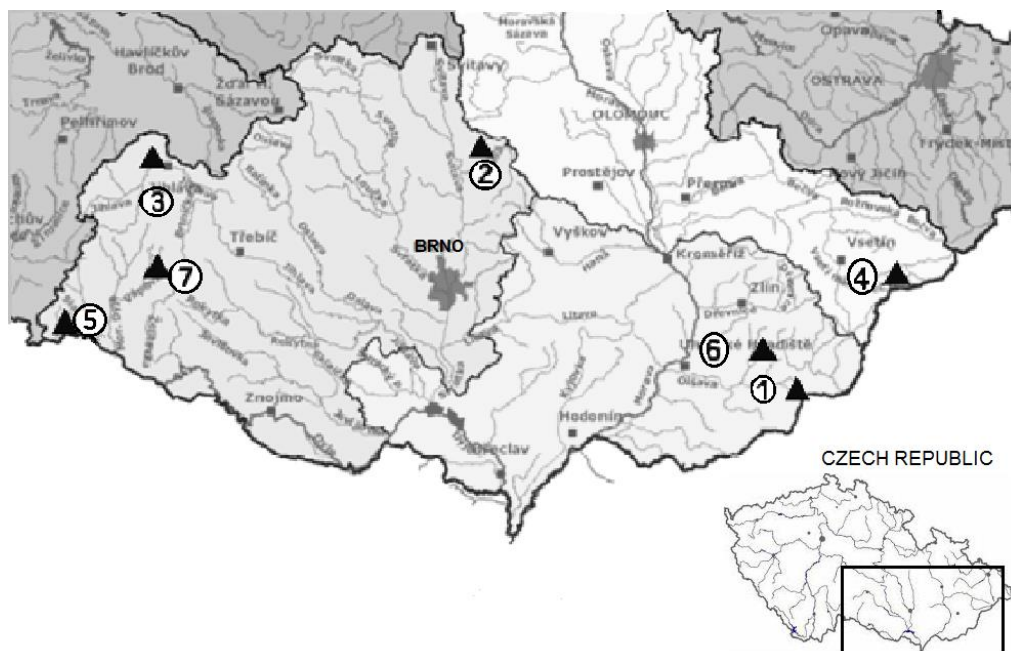
Cílem této studie bylo zhodnotit celkový obsah rtuti ve svalovině tří druhů ryb ulovených v sedmi nádržích na pitnou vodu nacházejících se v povodí řeky Moravy v České republice. Dílčími cíli bylo zjistit vztah mezi celkovým obsahem rtuti a stářím ryb, porovnat obsah celkové rtuti ve svalovině tří druhů ryb a porovnat akumulaci celkové rtuti ve svalovině mezi jednotlivými nádržemi.

Materiál a metodika

Sledované oblasti

V této práci byla pozornost zaměřena na obsah celkové rtuti ve tkáních třech druhů ryb, pocházejících ze sedmi nádrží povodí Moravy. Jednalo se o následující nádrže: Bojkovice, Boskovice, Hubenov, Karolinka, Landštejn, Ludkovice a Nová Říše (Obr. 1). Sledované nádrže poskytují zdroj pitné pro blízké aglomerace. Aby byla zachována dostatečná kvalita těchto zdrojů povrchových vod, byla ve všech těchto oblastech zřízena ochranná pásma vodních zdrojů a rekreační činnosti a rybolov nejsou zákonem povoleny. Žádný zdroj kontaminace rtutí není znám pro žádnou ze studovaných nádrží.

Obrázek č. 1. Sledované nádrže povodí Moravy



Vysvětlivky: sledované nádrže povodí Moravy: 1–Bojkovice; 2–Boskovice; 3–Hubenov; 4–Karolinka; 5–Landštejn; 6–Ludkovice; 7–Nová Říše.

Bojkovická přehrada (lokalita č. 1) na Kolelačském potoku se nachází asi 2 km severovýchodně od města Bojkovice. Vzhledem k tomu, že nádrž byla postavena jako zdroj pitné vody, byl její zásobovací potok vybrán tak, aby jeho povodí bylo převážně zalesněné a bez koncentrovaného osídlení. Lokalita č. 2 – Boskovice – je vodní nádrž na řece Bělá, která se nachází v hlubokém údolí východně od města Boskovice, asi 7 kilometrů nad soutokem řeky Bělá se Svitavou. Jedná se o jednu z naposledy postavených přehrad v povodí řeky Moravy (dokončena 1990). V současné době je dodávka vody pro okolní města přerušena kvůli tomu, že jeden z přítoků je kontaminován místními odpadními vodami, a nádrž tak slouží jako retenční nádrž a pro výrobu elektřiny v místní vodní elektrárně. Účelem nádrže

Hubenov (lokalita č. 3) je především akumulace vody pro zajištění zásobování vodou pro krajské město Jihlava. Povodí Hubenova je většinou zalesněné. Přehrada Karolinka (lokalita č. 4) byla postavena v roce 1985 pro zásobování Vsetína a okolí pitnou vodou. Karolinka je horská nádrž a voda z tohoto zdroje má vysokou kvalitu. V okolí Karolinky nejsou téměř žádné aglomerace ani průmysl. Landštejn (lokalita č. 5) byl postaven na potoce Pstruhovec, který se nachází nedaleko stejnojmenné obce (Landštejn). Jeho povodí je většinou zalesněné a bez koncentrovaného osídlení. Hlavním účelem vodního zdroje je zajistit pitnou vodu pro Staré Město pod Landštejnem a zajistit ochranu proti povodním. Vodní nádrž Ludkovice (lokalita č. 6) byla postavena v šedesátých letech na Ludkovickém potoce. Nachází se nad stejnojmennou obcí a je jednou z nejmenších nádrží v celém povodí Moravy, která slouží jako jeden ze zdrojů pitné vody pro lázeňský areál Luhačovice. Opět platí, že jeho povodí se nachází v převážně zalesněné a neobydlené oblasti. Lokalitou č. 7 je vodní nádrž Nová Říše nacházející se na Olšanském potoce v zalesněné a málo osídlené oblasti. Tato přehrada zajišťuje dostatečné zdroje pitné vody pro okolí Telče a Jihlavy.

Odběr ryb

Ryby byly získány v rámci odlovů, jež jsou součástí plánu rutinního monitoringu Povodí Moravy. Ryby (1 rok a starší) byly loveny podél pobřeží za denního světla v průběhu května až července 2016 a 2017 elektrickým agregátem (jedna ruční anoda, EFKO FEG 13000, Honda 13kW, 300 V, 60 A, 50-80Hz). Omráčené ryby se shromažďují pomocí 5 mm síťoviny. Všechny ryby byly druhově zařazeny, jednotlivě změřeny a zváženy. Pro laboratorní chemické analýzy byly použity mrtvé ryby z tenatových sítí na chytání ryb za žábry a ryby omráčené byly utraceny úderem do hlavy (Jurajda a kol., 2018). Všechny ryby byly převezeny do laboratoře na ledu. Byly odebrány šupiny pro stanovení věku ryb. Vzorok svaloviny byly odebrány pomocí nerezových skalpelů a pinzety v části těla pod postranní čarou, poté byly vloženy do polyethylenových sáčků, označeny a skladovány až do analýzy v mrazicím boxu při -18 °C. Základní charakteristiky odebraných ryb jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č. 1. Základní charakteristiky ryb odebraných na sledovaných lokalitách

Druh	Nádrž	N	Hmotnost (g)	Věk (roky)
			Průměr ± SEM	Průměr ± SEM
Cejn	Bojkovice	13	258,4 ± 73,3	6,3 ± 0,7
	Hubenov	17	156,7 ± 39,0	5,7 ± 0,5
	Ludkovice	17	324,0 ± 50,1	8,5 ± 0,5
	Nová Říše	6	141,8 ± 38,8	6,2 ± 1,2
Plotice	Bojkovice	24	124,3 ± 31,9	6,4 ± 0,4
	Boskovice	12	25,1 ± 5,1	4,7 ± 0,2
	Hubenov	24	61,3 ± 10,4	5,9 ± 0,4
	Karolinka	15	36,2 ± 5,7	4,5 ± 0,3
	Landštejn	31	78,5 ± 9,0	6,1 ± 0,3
	Ludkovice	17	60,8 ± 5,6	5,3 ± 0,2
	Nová Říše	19	153,2 ± 11,9	9,5 ± 0,3
Okoun	Hubenov	8	281,6 ± 42,5	7,5 ± 0,5
	Karolinka	7	44,8 ± 7,5	6,0 ± 0,5
	Landštejn	60	101,2 ± 9,7	6,4 ± 0,3
	Nová Říše	26	102,8 ± 11,6	6,5 ± 0,2

Vysvětlivky: SEM – střední chyba průměru

V letech 2016 a 2017 bylo pro analýzy shromážděno celkem 308 ryb. Počet ulovených ryb se v různých lokalitách a letech pohyboval od 0 do 45 ulovených ryb a do dalších ukazatelů

a statistické analýzy byly zahrnuty pouze lokality s více než 5 jedinci jednoho druhu, tedy do analýzy vstoupilo 296 vzorků ryb (12 ryb ze tří lokalit bylo vyřazeno).

Cejn velký (*Abramis brama* L.) je všežravý druh ryb z čeledi *Cyprinidae*, který je v českých řekách a nádržích velmi častý. Cejn obvykle žije v blízkosti dna (sediment) v pomalu tekoucí a mělkých vodách, a jeho strava často obsahuje zoobentos a planktonické korýše (zejména *Chydoridae*, *Sida* a *Cyclopoida*). Plotice obecná (*Rutilus rutilus* L.) je z čeledi *Cyprinidae* a žije ve všech typech vodních zdrojů v České republice. Plotice je všežravá ryba se širokým spektrem stravy (zooplankton a makrovegetace). U starších jedinců se význam zooplanktonu jako potravy snižuje a podíl makrovegetace se zvyšuje. Okoun (*Perca fluviatilis* L.) je masožravá ryba z čeledi *Percidae*, která se nejčastěji vyskytuje v potocích, rybnících nebo řekách. Ve své stravě okoun upřednostňuje menší ryby, korýše nebo larvy hmyzu (Baruš a Oliva, 1995).

Stanovení věku ryb

Jednotlivé vzorky šupin byly omyty v nasyceném fyziologickém roztoku a poté opláchnuty v čisté vodě. Dále byly šupiny fixovány mezi dvěma sklíčky. Po vysušení byl věk odečten podle letokruhů na přístroji MEOFLEX RI 21 P (Meopta, Česká republika).

Stanovení celkové rtuti

Obsah celkové rtuti (THg) ve svalovině ryb byl stanoven atomovou absorpční spektrometrií (AAS) na přístroji AMA 254 (Altec s.r.o., Dvůr Králové nad Labem, Česká republika). Vzorky byly rozmrazeny, zváženy (přibližně 50 mg), vloženy do spalovací lodičky a vloženy do přístroje bez předchozí přípravy vzorku (metodou není úprava vyžadována). Detekční limit pro THg je $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Přesnost metody pro stanovení THg byla ověřena pomocí standardního referenčního materiálu BCR-CRM 464 (Tuna fish, IRMM, Belgie). Celková koncentrace rtuti ve svalovině ryb je uvedena v $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ čerstvé hmotnosti (FW).

Statistická analýza

Zjištěná data získaná stanovením rtuti v 296 rybách byla statisticky analyzována. Vzhledem k tomu, že se hodnoty pro ryby stejného věku mezi sledovaným obdobím 2016 a 2017 nelišily (t-test), byly údaje z obou let na dané lokalitě sloučeny. Korelace mezi obsahem THg a stářím ryb byly vypočteny pomocí Pearsonova korelačního koeficientu pro každý druh ryb a lokalitu zvlášť. Rozdíly v celkovém obsahu rtuti ve svalovině ryb mezi sledovanými lokalitami během sledovaného období byly analyzovány pomocí obecného lineárního modelu (GLM) – analýzy kovariance (ANCOVA), včetně lokality jako kategorického faktoru a stáří ryb jako kontinuálního prediktoru. Očekávaný vztah celkového obsahu rtuti a stáří ryb potvrzený Pearsonovým korelačním koeficientem byl důvodem pro zohlednění účinku věku jako kovariance v GLM modelu. Interakce lokalit a roku byla zahrnuta do modelu, aby se zjistilo přibývání obsahu rtuti, jež je specifické pro danou lokalitu. V případě, že interakce nebyla významná, byl použit model s pouze hlavními účinky. Podobně byly rozdíly v celkovém obsahu rtuti v rybí svalovině mezi druhy ryb analyzovány pomocí analýzy kovariance (ANCOVA) s druhy ryb jako kategorickým faktorem a stářím ryb jako kontinuálním prediktorem. Ve všech testech byla $P < 0,05$ považována za statisticky významný rozdíl. Vyhodnocení dat a statistická analýza byla provedena v programu Statistica, verze 13 (Dell Inc., Tulsa, OK).

Výsledky

Obsah celkové rtuti ve svalovině třech indikátorových druhů ryb se pohyboval od 0,025 do 0,824 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Nejvyšší obsah byl zjištěn u okouna z nádrže Landštejn, nejnižší naopak u plotice z Ludkovické nádrže. Ve svalovině cejna obecného byl zjištěn obsah rtuti v rozmezí od 0,043 do 0,440 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tabulka č. 2), v případě plotice se rozmezí pohybovalo od 0,025 do 0,584 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (tabulka č. 3) a u okouna byl obsah rtuti nejvyšší a to mezi 0,073

a 0,824 mg.kg⁻¹ (tabulka č. 4). Uvedené jednotlivé hodnoty obsahu rtuti a jejich závislost na věku jsou uvedeny na obrázku č. 2. Dle očekávání byl zjištěn pozitivní vztah mezi věkem ryb a celkovým obsahem rtuti v rybí svalovině.

Cejn velký byl odloven na čtyřech lokalitách a obsahy rtuti mezi jednotlivými lokalitami se významně nelišily (P=0,206), ale vezmeme-li v úvahu i faktor věku, pak mezi nádržemi nacházíme signifikantní rozdíl (P<0,001). Rychlost přibývání rtuti v čase je pro cejna velkého největší v nádrži Bojkovice.

Plotice byly získány ze všech sedmi sledovaných lokalit. Je zřejmé, že se jedná o hojně vyskytovaný druh ryby. Obsah rtuti ve svalovině plotic byl ovlivněn jak sledovanou lokalitou, tak také věkem ryb (ANCOVA, vliv nádrže: P<0,001, vliv věku: P=0,001). Rychlost přibývání rtuti v čase se ale naopak u plotic mezi sledovanými lokalitami neliší.

Okouni byli odloveni stejně jako cejn také na 4 lokalitách a stejně jako plotice byl zjištěn jak rozdíl mezi věkem ryb, tak také rozdíl mezi lokalitami (ANCOVA, vliv nádrže: P<0,001, vliv věku: P < 0,001). Rychlost přibývání rtuti v čase se u okounů taktéž neliší.

Signifikantní korelace byly zjištěny ve vztahu mezi celkovým obsahem rtuti a věkem, a to u okouna z Karolinky, Landštejnu a Nové Říše a u cejna na všech lokalitách. Na druhou stranu žádná korelace nebyla zjištěna mezi THg a věkem plotic na žádné lokalitě kromě Hubenova. Plotice jako nedravé ryby se živí v dospělosti makrovegetací (nižší obsahy rtuti než v živočišné stravě), a proto se zde již s věkem obsah rtuti nezvyšuje.

Tabulka č. 2. Obsah celkové rtuti ve svalovině cejna obecného podle věku

Věk (roky)	Bojkovice		Hubenov		Ludkovice		Nová Říše	
	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM
3								
4	2	0,114 ± 0,001	5	0,057 ± 0,009			3	0,068 ± 0,003
5	7	0,101 ± 0,009	4	0,060 ± 0,002	1	0,088	1	0,094
6			5	0,075 ± 0,005	3	0,101 ± 0,007		
7			1	0,094	3	0,130 ± 0,003		
8	1	0,440			1	0,281		
9					3	0,220 ± 0,028		
10	2	0,313 ± 0,064	2	0,237 ± 0,121	2	0,200 ± 0,089	2	0,159 ± 0,009
11	1	0,391			2	0,193 ± 0,046		
12					2	0,204 ± 0,021		
Celkem	1							
m	3	0,184 ± 0,037	17	0,086 ± 0,018	17	0,172 ± 0,017	6	0,103 ± 0,019

Tabulka č. 3. Obsah celkové rtuti ve svalovině plotic podle věku

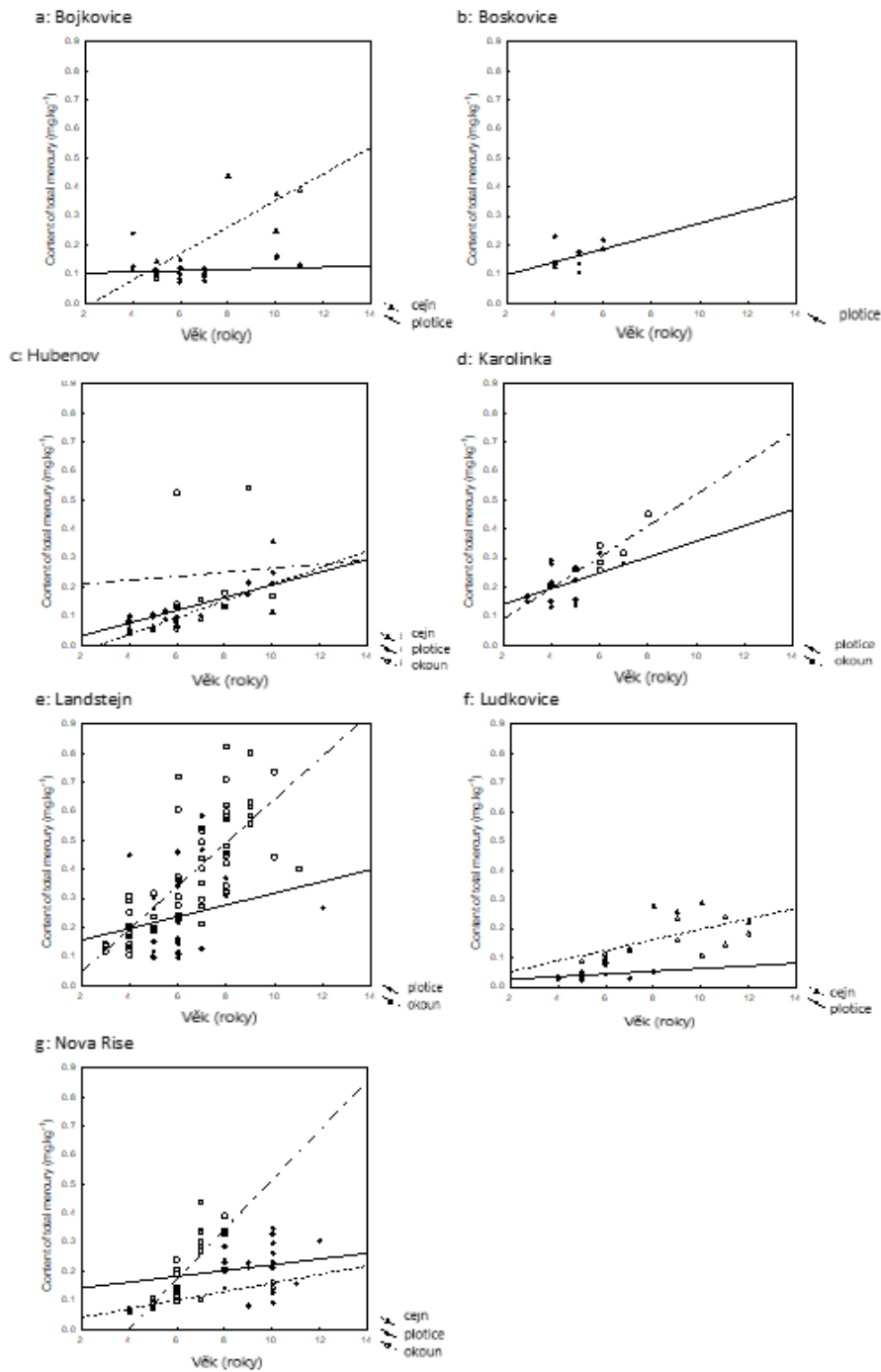
Věk (roky)	Bojkovice		Boskovice		Hubenov		Karolinka		Landštejn		Ludkovice		Nová Říše	
	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM
3							2	0,159 ± 0,010						
4	2	0,184 ± 0,057	6	0,147 ± 0,017	7	0,087 ± 0,004	6	0,215 ± 0,027	1	0,449	2	0,030 ± 0,005		
5	6	0,104 ± 0,002	4	0,148 ± 0,017	5	0,095 ± 0,009	5	0,187 ± 0,025	8	0,168 ± 0,027	11	0,041 ± 0,003		
5,5					3	0,108 ± 0,009								
6	7	0,096 ± 0,011	2	0,202 ± 0,016	3	0,106 ± 0,008	1	0,318	16	0,219 ± 0,028	2	0,060 ± 0,016		
7	6	0,099 ± 0,006			1	0,102	1	0,283	3	0,393 ± 0,138	1	0,030		
8					1	0,137			2	0,339 ± 0,031	1	0,053	5	0,219 ± 0,024
9					2	0,194 ± 0,020							3	0,174 ± 0,047
10	2	0,158 ± 0,002			2	0,231 ± 0,020							9	0,228 ± 0,030
11	1	0,132											1	0,156
12									1	0,269			1	0,306
Celkem	24	0,113 ± 0,007	12	0,157 ± 0,011	24	0,117 ± 0,010	15	0,210 ± 0,017	31	0,239 ± 0,024	17	0,042 ± 0,003	19	0,218 ± 0,018

Tabulka č. 4. Obsah celkové rtuti ve svalovině okounů podle věku

Věk (roky)	Hubenov		Karolinka		Landštejn		Nová Říše	
	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM	N	Průměr ± SEM
3					3	0,133 ± 0,007		
4			1	0,208	12	0,191 ± 0,019		
5			1	0,264	5	0,228 ± 0,024	5	0,092 ± 0,007
6	3	0,267 ± 0,130	3	0,296 ± 0,025	11	0,347 ± 0,050	9	0,155 ± 0,016
7	1	0,157	1	0,318	9	0,395 ± 0,039	7	0,296 ± 0,038
8	2	0,156 ± 0,024	1	0,451	12	0,532 ± 0,043	5	0,321 ± 0,030
9	1	0,543			5	0,638 ± 0,042		
10	1	0,168			2	0,589 ± 0,146		
11					1	0,403		
Celkem	8	0,248 ± 0,063	7	0,304 ± 0,030	60	0,373 ± 0,025	26	0,213 ± 0,022

Detailní analýza prokázala rozdíly v obsahu rtuti mezi jednotlivými druhy ryb, a to na čtyřech z šesti sledovaných nádrží. Celkový obsah rtuti v cejnech byl signifikantně vyšší než u plotic v Bojkovicích a Ludkovicích, naopak to bylo v Nové Říši. Nejvyšší obsah THg byl zjištěn u okounů z Nové Říše a Landštejna, kde zvýšení THg s věkem bylo nejstrmější, což vysvětluje význam interakce mezi druhem a věkem v GLM modelu. Obsah THg ve všech druzích ryb (cejn, plotice a okoun) ulovených z Hubenova se mezi sebou nelišil.

Obrázek č. 2. Vztah rtuti a věku pro jednotlivé indikátorové druhy na daných lokalitách



Diskuze

Kontaminace povrchových vod rtuť a její vliv na vodní organismy je předmětem mnoha studií. V naší práci jsme zjistili podobné výsledky jako Červený et al. (2014), kteří naměřili obsah rtuti v cejních obecných na mnoha nádržích v rozmezí od 0,03 do 0,0445 mg.kg⁻¹. Námi sledované vodní nádrže Bojkovice, Hubenov, Ludkovice a Nová říše jsou svým zatížením rtuť srovnatelné s velkými nádržemi jako Orlicko, Kořenisko, Slezská Harta, Dalešice nebo Vranov. V případě plotic byl zjištěn nižší obsah rtuti, než bylo zjištěno v naší studii. Podobné výsledky publikovali i Lepom et al. (2012), Kenšová et al. (2012) nebo Červený et al. (2014) a to na nádržích Belau, Věstonice nebo Mušov (0,034; 0,09; a 0,149 mg.kg⁻¹). Mezi srovnatelné nádrže však nelze zařadit nádrž Skalku známou jako historicky vysoce kontaminovanou lokalitu (zdrojem rtuti byla chemická továrna

Marktredwitz) z pohledu obsahu rtuti (Hosek et al., 2020), jejíž následky si Skalka nese až do současnosti. V nedravých druzích ryb, jako je cejn, zde dosahuje obsah celkové rtuti $0,96 \pm 0,22 \text{ mg.kg}^{-1}$, v případě plotic je to $0,81 \pm 0,28 \text{ mg.kg}^{-1}$ (Maršálek et al., 2005). Kružíková et al. (2011) se zabývala tzv. syndromem nově napuštěných nádrží, u kterých ačkoliv není znám žádný místní zdroj rtuti, jsou nacházeny vysoké obsahy sledovaného těžkého kovu ve všech druzích ryb krátce po napuštění. Nejvyšší hodnoty byly nalézány v období do 10ti let po napuštění. Námi sledované nádrže jsou napuštěny již více než 30 let, tento syndrom se jich tedy již týkat nemůže. Zjištěné obsahy rtuti námi sledovaných nádrží v současné době odpovídají nezatíženým lokalitám.

Závěr

Z výsledků studie vyplývá, že akumulace rtuti v různých druzích ryb není stejná a nejvíce rtuti je nacházeno u dravých ryb. Dále bylo potvrzeno, že s věkem ryb roste obsah rtuti. Byly zjištěny významné rozdíly mezi některými sledovanými nádržemi. Z pohledu celkového obsahu rtuti se ovšem nejedná o významně zatížené lokality. Tudíž rtuť nepředstavuje riziko pro konzumenty pitné vody z těchto nádrží. Stejně tak tato zátěž v tkáních živých organismů (ryb) nepředstavuje problém pro jejich životní pochody a tudíž negativně neovlivňuje welfare těchto vodních organismů.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

- Abde-Rasul, G.M., Abu-Salem M.A., Al-Batnony, M.A., Al-Dalarony, H.K., Allam, H.K. 2013. Neurobehavioral, respiratory, and auditory disorders among mercury-exposed fluorescent lamp workers. *Menoufia Medical Journal* 26: 58-62.
- Baruš, V., Oliva, O. 1995. *Mihulovci a ryby (2)*, Academia, Praha.
- Burger, J., Gochfield, M. 2011. Mercury and selenium levels in 19 species of saltwater fish from New Jersey as a function of species, size, and season. *Science of the Total Environment* 409: 1418-1429.
- Cervený, D., Zlabek, V., Velisek, J., Turek, J., Grabic, R., Grabicova, K., Fedorova, G., Rosmus, J., Lepic, P., Randak, T. 2014. Contamination of fish in important fishing grounds of the Czech Republic. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 109: 101-109.
- Harari, R., Harrari, F., Gerhardtsson, L., Lundh, T., Skerfving, S., Broberg, K. 2012. Exposure and toxic effects of elemental mercury in gold-mining activities in Ecuador. *Toxicology Letters* 213: 75-82.
- Hosek, M., Bednarek, J., Popelka, J., Elznicova, J., Tumov, S., Rohovec, J., Navrátil, T., Grygar T.M. 2020. Persistent mercury hot spot in Central Europe and Skalka dam reservoir as a long-term mercury trap. *Environmental Geochemistry and Health* 42: 1273-1290.
- Jurajda, P., Janac, M., Roche, K., Mikl, L., Slapansky, L., Krechler, I., Adamek, Z., Jurajdova, Z., Halacka, K. 2018. Fish communities of five drinking water reservoirs in the Morava River basin. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis* 66: 655-663.
- Kenšová, R., Kružíková, K., Svobodová, Z. (2012): Mercury speciation and safety of fish from important fishing locations in the Czech Republic. *Czech Journal of Food Sciences* 30: 276-284.
- Kim, K.H., Kabir, E., Jahan, S.A. 2016. A review on the distribution of Hg in the environment and its human health impacts. *Journal of Hazardous Materials* 306: 376-385.
- Klapstein, S.J., O'Driscoll, N.J. 2018. Methylmercury biogeochemistry in freshwater ecosystems: a review focusing on DOM and photodemethylation. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 100: 14-25.
- Kružíková, J., Dušek, L., Jarkovský, J., Hejtmánek, M., Vostradovský, J., Poleszczuk, G. and Svobodová, Z. 2011. Long-term monitoring of mercury content in fish from the Želivka reservoir - syndrome of newly filled reservoir. *International Journal of Electrochemical Science* 6: 5956-5967.
- Lepom, P., Irmer, U., Wellmitz, J. 2012. Mercury levels and trends (1993–2009) in bream (*Abramis brama* L.) and zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from German surface waters. *Chemosphere* 86:202-211.

- Maršálek P., Svobodová, Z., Randák, T. Švehla, J. 2005. Mercury and methylmercury contamination of fish from the Skalka reservoir: A case study. *Acta Veterinaria Brno* 74: 427-434.
- Pacyna, J.M., Pacyna, E.G. 2005. Anthropogenic sources and global inventory of mercury emissions. In: Parson, M.B., Percival, J.B. (Eds.): *Mercury: Sources, Measurement Cycles and Effects*, Mineralogical Association of Canada, Ottawa.
- World health organization, 2010, Summary report of the seventy second meeting of JECFA [online] [vid: 25.2.2018]. On-line: <http://www.fao.org./3/a-at868e.pdf>.
- Wang X., Wang, W.X. 2019. The three B of fish mercury in China: Bioaccumulation, biodynamics and biotransformation. *Environmental Pollution* 250: 216-232.

Srovnání citlivosti embryí ryb a obojživelníků při posuzování negativních účinků farmak vyskytujících se ve vodním ekosystému

Jana Blahová, Veronika Doubková, Pavla Sehonová, Denisa Medková, Lucie Plhalová, Zdeňka Svobodová

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

Abstrakt

V posledních dvaceti letech dochází k nárůstu spotřeby antidepresiv ve většině zemí Evropské unie. Po jejich užití dochází podobně jako u jiných farmak k jejich vyloučení z organismu a následně se mohou dostávat do vodního prostředí. Do vodního ekosystému vstupují v důsledku odpadních vod, a to v koncentracích desítek až stovek ng/l. Mezi hojně detekovaná antidepresiva patří fluoxetin a citalopram – inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Cílem naší studie bylo posouzení embryotoxicity fluoxetinu hydrochloridu a citalopramu hydrochloridu na raná vývojová stadia dávná pruhovaného (*Danio rerio*) a drápatky vodní (*Xenopus laevis*). Naše výsledky ukazují, že dokonce i environmentálně relevantní koncentrace kombinace těchto antidepresiv negativně ovlivnila embrya ryb a žab (např. zvýšení tepové frekvence a vyšší mortalita). Na základě našich výsledků je také zřejmé, že citlivějším organismem je drápatka vodní, protože jak nejvyšší koncentrace fluoxetinu hydrochloridu (10 000 µg/l), tak i citalopramu hydrochloridu (100 000 µg/l) způsobila 100% mortalitu testovaných embryí.

Úvod

Welfare vodních organismů může být významným způsobem narušeno expozicí cizorodými látkami, které do vodního prostředí vstupují především v důsledku intenzivní antropogenní činnosti. V posledních letech je vysoce aktuální problematikou narůstající koncentrace farmak, které se do vodního ekosystému dostávají především v důsledku nedostatečně přečištěných odpadních vod pocházejících z nemocnic, domácností a dalších zařízení. V odpadních i povrchových vodách mohou být farmaka přítomna ve své původní podobě nebo se zde nachází jejich metabolity. V současné době zaujímají mezi farmaky významný podíl antidepresiva (Sehonova et al., 2018). Podle statistických údajů OECD dochází každoročně ke zvyšování spotřeby uvedené skupiny léčiv, a to i přestože jejich užívání má často vedlejší účinky (např. apatie, ztráta motivace, sexuální dysfunkce). V České republice bylo od roku 2000 až do roku 2017 zaznamenáno jejich zvýšení více jak šestkrát. Je také pravděpodobné, že tento trend bude v následujících letech mít obdobnou tendenci (OECD.stat., 2020).

Antidepresiva představují významnou skupinu farmak, která se hojně využívá při léčbě onemocnění psychického charakteru (např. léčba deprese, bipolární afektivní porucha, autismus, poruchy příjmu potravy, poruchy spánku). Jejich hlavní funkcí je vytvoření neurohumorální rovnováhy v důsledku ovlivnění aktivity neurotransmiterů (Sehonova et al., 2018). Podle mechanismu účinků je můžeme rozdělit do několika skupin. Tricyklická antidepresiva (TCA), tzv. antidepresiva první generace, patří k nejstarším typům farmak využívaných při léčbě deprese. Zabraňují zpětnému vychytávání neurotransmiterů a předepisují se především v těžších případech, protože mají více vedlejších účinků. Mezi nejvýznamnější zástupce této skupiny řadíme například nortriptylin, amitriptylin nebo klomipramin. Další skupinou jsou selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu (SSRI), zástupci z této skupiny patří mezi nejčastěji předepisovaná antidepresiva. V porovnání s ostatními skupinami mají mírnější nežádoucí účinky. Mezi nejvýznamnější zástupce patří fluoxetin, sertralin, citalopram a další. Často předepisovaným typem antidepresiv jsou látky fungující na bázi inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu a noradrenalinu (SNRI). Nejvýznamnějším zástupcem je venlafaxin. Dalším typem jsou antidepresiva fungující jako selektivní inhibitory zpětného vychytávání noradrenalinu (NRI). Další skupinou jsou inhibitory monoaminoxidázy (MAOI) (např. moklobemid). Jedná se o silná antidepresiva, která zabraňují

odbourávání neurotransmiterů dopaminu, serotoninu i noradrenalinu (Ford and Fong, 2016; Sehonova et al., 2018; Lopes et al., 2020).

Necílové vodní organismy mohou být dlouhodobě vystaveni působení těchto kontaminantů, což pro ně představuje významné riziko. Ekotoxikologické studie potvrdily řadu negativních efektů, jako jsou vývojová toxicita, histopatologické nálezy, narušení antioxidační ochrany, poruchy příjmu potravy nebo výskyt morfologických anomálií (Kellner et al., 2015; Sehonova et al., 2018). Pelli and Connaughton (2015) potvrdili, že antidepresiva také významně ovlivňují chování ryb, způsobují abnormality v plavání a snižují obezřetnost ryb před potenciálním útokem predátora. Zajímavé jsou také výsledky studie realizované kolektivem autorů Foran et al. (2013). Tato práce je zaměřena na studium vlivu fluoxetinu na reprodukční aktivity medaky japonské (*Oryzias latipes*). Po 30denní expozici bylo potvrzeno statisticky významné zvýšení koncentrace estradiolu u samic, které byly vystaveny testované látce v koncentracích 0,1 a 0,5 µg/l. Ostatní sledované ukazatele jako byly gonadosomatický index a koncentrace vitellogeninu v játrech nebyly působením fluoxetinu ovlivněny.

Pro posouzení toxických účinků se v rámci testů toxicity využívají různí zástupci vodních organismů (např. ryby, obojživelníci). Z důvodu dodržování principu 3R (replacement, reduction and refinement), který zamezuje zbytečnému utrpení zvířat a snižuje počty testovaných zvířat, se stále častěji využívají embryonální stádia vodních organismů, protože v souladu s evropskou legislativou nejsou považována za pokusné zvíře. Jejich nespornou výhodou také je, že jsou zároveň velmi citlivá na působení různorodých polutantů a poskytují relevantní výsledky (Sehonová et al., 2016; Velíšek, 2018). Ze zástupců ryb patří mezi velmi často využívaný modelový organismus dánío pruhované (*Danio rerio*) nebo kapr obecný (*Cyprinus carpio*). Ze skupiny obojživelníků se potom můžeme v rámci toxikologických testů setkat například s africkou žábou – drápatkou vodní (*Xenopus laevis*) nebo drápatkou tropickou (*Xenopus tropicalis*) (Modra et al., 2011; Keshari et al., 2016; Ismail et al., 2019; Sehonova et al., 2019).

Cílem předkládané studie bylo porovnání citlivosti embryí dvou různých zástupců vodních organismů (dánío pruhované, drápatka vodní) vystavených působení farmak ze skupiny antidepresiv (fluoxetin hydrochlorid, citalopram hydrochlorid), které fungují jako selektivní inhibitory zpětného vychytávání serotoninu. Testovaná léčiva byla zvolena z důvodu jejich hojného využití v humánní medicíně a zároveň také díky jejich častému výskytu ve vodním prostředí. Hodnocení bylo prováděno pomocí embryonálního testu toxicity, kdy po dobu 96 hodin byly v pravidelných intervalech sledovány vybrané ukazatele embryotoxicity (mortalita, líhnutí, výskyt malformací, změny tepové frekvence) u testovaných jedinců.

Materiál a metodika

Embryonální testy byly provedeny s využitím modifikované metodiky OECD 236 (Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test) a ASTM E1439/98 v laboratořích Ústavu ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství (VFU Brno). Jako modelové druhy byly zvoleny dánío pruhované (*Danio rerio*) a drápatka vodní (*Xenopus laevis*). Oba tyto zástupci patří mezi často využívané modelové organismy v toxikologických testech, ve kterých jsou zjišťovány negativní účinky cizorodých látek vyskytujících se ve vodním prostředí.

Do testu byly nasazeny oplozené jikry ve stáří do 1,5 hodiny. Embrya byla umístěna do mikrotitračních destiček a po dobu 96 hodin byla vystavena působení účinku dvou antidepresiv ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu – fluoxetinu hydrochloridu a citalopramu hydrochloridu. Uvedená léčiva byla testována individuálně a ve vybraných koncentracích byly také testovány kombinace těchto dvou farmak. Použité koncentrace zahrnovaly jak environmentálně relevantní koncentrace, tak i jejich násobky, pro zhodnocení potenciálního vztahu dávky a účinku:

- fluoxetin hydrochlorid (F): 0,1; 1; 10; 100; 1000 a 10 000 µg/l;
- citalopram hydrochlorid (C): 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000; 10 000 a 100 000 µg/l;
- kombinace obou antidepresiv: nízká koncentrace (F – 0,1 µg/l, C – 0,01 µg/l), střední koncentrace (F – 10 µg/l, C – 1 µg/l), vysoká koncentrace (F – 1 000 µg/l, C – 100 µg/l).

V případě embryonálního testu na dániu pruhovaném bylo použito celkem 36 jiker pro každou testovanou skupinu. V embryonálním testu na drápatce vodní bylo použito celkem 18 vajíček pro každou skupinu. V každém testu byla také kontrolní skupina, která byla vystavena pouze ředící vodě bez přídavku testované látky. Ředící voda byla připravena dle normy ISO 7346 (1996). Testované roztoky byly pravidelně obměňovány po 24 hodinách.

Pozorování probíhalo celkem 96 hodin, přičemž každých 24 hodin bylo prováděno hodnocení mortality, líhnutí a možného výskytu malformací (např. deformace těla, změny pigmentace, edém srdce, edém žloutkového váčku). Dále byla sledována tepová frekvence. Její stavení probíhalo manuálně, a to tak, že byl měřen časový údaj pro 20 tepů. Následně byl výsledek přepočten a vyjádřen jako počet tepů za jednu minutu. U dánia pruhovaného probíhalo sledování tepové frekvence ve 48 hodinách po oplození. U drápatky vodní byla tepová frekvence měřena v 56 hodinách po oplození. V průběhu testu byla embrya umístěna v růstové komoře za konstantních podmínek (26 ± 1 °C – pro dáanio pruhované; 23 ± 1 °C – pro drápatku vodní, fotoperioda 12 h světlo/12 h tma pro oba testované druhy).

Pro statistické zpracování dat byl využit software Unistat 6.5. for Excel. Rozdíly v mortalitě, v líhnutí a ve výskytu případných morfologických změn byly testovány pouze mezi kontrolní skupinou a jednotlivými pokusnými skupinami s využitím kontingenčních tabulek 2x2. Pro zjištění statisticky významných rozdílů mezi hodnotami srdečního tepu bylo nejprve provedeno testování normality (Shapiro-Wilkův test). Vzhledem k tomu, že nebyla splněna podmínka normality, byl následně využit neparametrický vícevýběrový mediánový test. Porovnávány byly vždy experimentální skupiny vůči kontrolní skupině v daném čase pozorování. Testování bylo provedeno na hladině významnosti $p < 0,05$.

Výsledky

Jedním z hlavních ukazatelů embryotoxicity je hodnocení **kumulativní mortality**. Sledování probíhalo každých 24 hodin, po dobu 96 hodin. V případě dánia pruhovaného nebyly v průběhu embryonálního testu zjištěny statisticky významné rozdíly v kumulativní mortalitě mezi kontrolní a pokusnou skupinou, a to jak při testování jednotlivých antidepresiv, tak při hodnocení účinků jejich kombinací. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1. Nejvyšší kumulativní mortalita (8,3 %) byla zaznamenána v experimentální skupině vystavené 100 µg/l fluoxetinu hydrochloridu, a to v již v 72 hodinách po oplození. Stejná mortalita byla také zjištěna v experimentální skupině exponované kombinaci střední koncentrace antidepresiv (fluoxetin hydrochlorid – 10 µg/l, citalopram hydrochlorid – 1 µg/l). V kontrolní skupině nebyla v průběhu testu kumulativní mortalita zaznamenána.

Významně vyšší kumulativní mortalita byla pozorována v embryonálním testu, kde jako testovaný organismus byla využita drápatka vodní. Zjištěné údaje jsou uvedeny v tabulce č. 2. V kontrolní skupině byla kumulativní mortalita 5,6 %, a to již v 72 hodinách po oplození. Při testování účinků fluoxetinu hydrochloridu byla zaznamenána 100% kumulativní mortalita v dvou nejvyšších testovaných koncentracích (1 000 a 10 000 µg/l) již v 72 hodinách po oplození. Tato hodnota se statisticky vysoce významně ($p < 0,01$) lišila od hodnoty zjištěné v kontrolní skupině. Stoprocentní kumulativní mortalita byla zjištěna také v případě testování účinků citalopramu hydrochloridu, a to opět v nejvyšší testované koncentraci (100 000 µg/l) v 72 hodinách po oplození. Překvapivé výsledky byly zaznamenány při testování účinků kombinace obou antidepresiv. Nejvyšší kumulativní mortalita byla zaznamenána v 96 hodinách po oplození u nejnižší testované koncentrace (fluoxetin hydrochlorid – 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid – 0,01 µg/l). Uvedená hodnota se statisticky významně ($p < 0,05$) lišila od kumulativní mortality kontrolní skupiny ve stejném čase pozorování.

Tabulka č. 1. Kumulativní mortalita (v %) dána pruhovaného v jednotlivých embryonálních testech toxicity. Nebyly potvrzeny statisticky významné rozdíly mezi kontrolní skupinou a pokusnými skupinami ve stejném čase.

<i>FLUOXETIN HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
0,1 µg/l	0	0	0	0
1 µg/l	0	0	0	0
10 µg/l	5,6	5,6	5,6	5,6
100 µg/l	5,6	5,6	8,3	8,3
1 000 µg/l	5,6	5,6	5,6	5,6
10 000 µg/l	5,6	5,6	5,6	5,6
<i>CITALOPRAM HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
0,01 µg/l	0	0	0	2,8
0,1 µg/l	0	0	2,8	2,8
1 µg/l	0	0	0	0
10 µg/l	2,8	2,8	2,8	2,8
100 µg/l	2,8	2,8	2,8	2,8
1 000 µg/l	0	0	0	0
10 000 µg/l	0	0	0	0
100 000 µg/l	5,6	5,6	5,6	5,6
<i>KOMBINACE FLUOXETINU HYDROCHLORIDU A CITALOPRAMU HYDROCHLORIDU</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
nízká koncentrace	2,8	2,8	2,8	2,8
střední koncentrace	8,3	8,3	8,3	8,3
vysoká koncentrace	2,8	2,8	2,8	2,8

Poznámka: nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid 0,01 µg/l; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 µg/l, citalopram hydrochlorid 1 µg/l; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 µg/l, citalopram hydrochlorid 100 µg/l.

Tabulka č. 2. Kumulativní mortalita (v %) drápatky vodní v jednotlivých embryonálních testech toxicity.

(* – $p < 0,05$ – statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování, ** – $p < 0,01$ – statisticky vysoce významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)

<i>FLUOXETIN HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	5,6
0,1 µg/l	0	0	0	0
1 µg/l	0	0	0	5,6
10 µg/l	0	0	5,6	5,6
100 µg/l	0	0	0	5,6
1 000 µg/l	0	5,6	5,6	5,6
10 000 µg/l	0	5,6	100**	100**
<i>CITALOPRAM HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	5,6
0,1 µg/l	0	0	0	0
1 µg/l	0	0	0	5,6
10 µg/l	0	0	0	0
100 µg/l	0	0	5,6	0
1 000 µg/l	0	0	5,6	5,6
10 000 µg/l	0	0	0	5,6
100 000 µg/l	0	0	100**	100**
<i>KOMBINACE FLUOXETINU HYDROCHLORIDU A CITALOPRAMU HYDROCHLORIDU</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	5,6	5,6
nízká koncentrace	0	0	5,6	44,4*
střední koncentrace	0	5,6	5,6	11,1
vysoká koncentrace	0	0	0	5,6

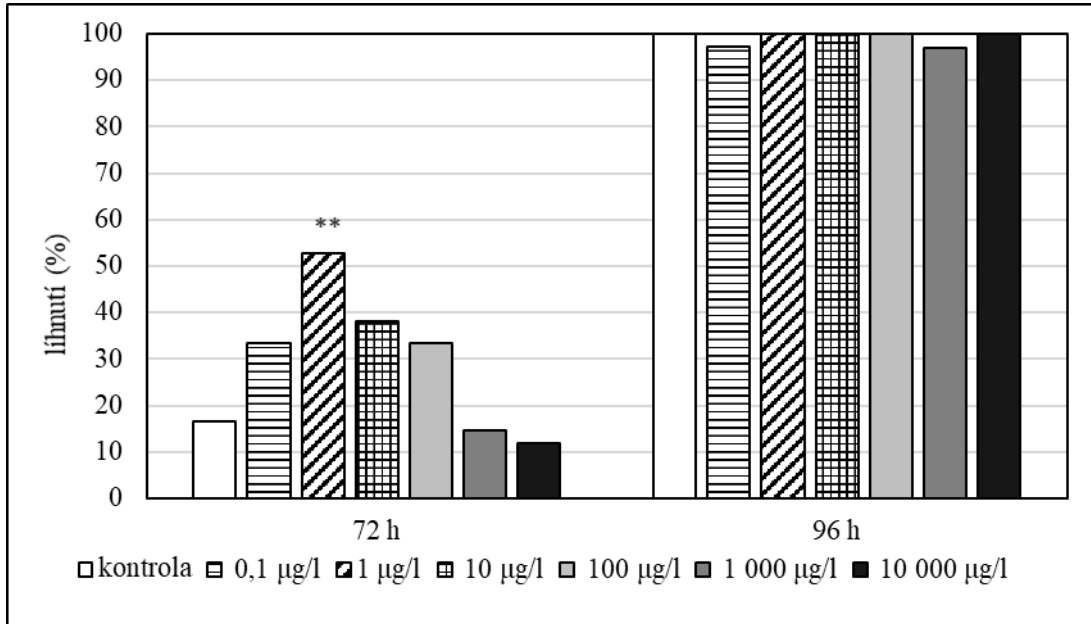
Poznámka: nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid 0,01 µg/l; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 µg/l, citalopram hydrochlorid 1 µg/l; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 µg/l, citalopram hydrochlorid – 100 µg/l.

Dalším sledovaným ukazatelem indikujícím potenciální negativní účinky testovaných látek je **líhnutí**. Detailní výsledky líhnutí z jednotlivých testů toxicity realizovaných na dániu pruhovaném jsou uvedeny v grafech č. 1 až č. 3. Údaje jsou doplněny statistickými výsledky. V embryonálním testu toxicitu provedeném na dániu pruhovaném bylo líhnutí pozorováno v 72 hodinách po oplození. V kontrolní skupině bylo v tomto čase zaznamenáno 16,7 % vylíhlých jedinců. V pokusných skupinách byl v 72 hodinách po oplození zaznamenán skoro ve všech případech větší podíl vylíhlých jedinců v porovnání s kontrolní skupinou. Při testování účinku fluoxetinu hydrochloridu byl statisticky vysoce významný rozdíl oproti kontrolní skupině potvrzen pouze v koncentraci 1 µg/l (52,8 %). V embryonálním testu toxicitu hodnotícím účinky citalopramu hydrochloridu byly statisticky vysoce významné rozdíly zjištěny v koncentracích 1 µg/l (58,3 %), 10 µg/l (54,3 %) a 100 000 µg/l (55,9 %). Při testování kombinace obou antidepresiv bylo statisticky vysoce významné zvýšení procenta vylíhlých jedinců zaznamenáno ve všech testovaných koncentracích (nízká koncentrace – 62,9 %; střední koncentrace – 69,7 % a vysoká koncentrace – 65,7 %). V 96 hodinách po oplození

byli v kontrolní skupině všichni jedinci již vylíhli. Obdobně tomu bylo také skoro ve všech pokusných skupinách, v tomto čase nikde nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v porovnání s kontrolní skupinou.

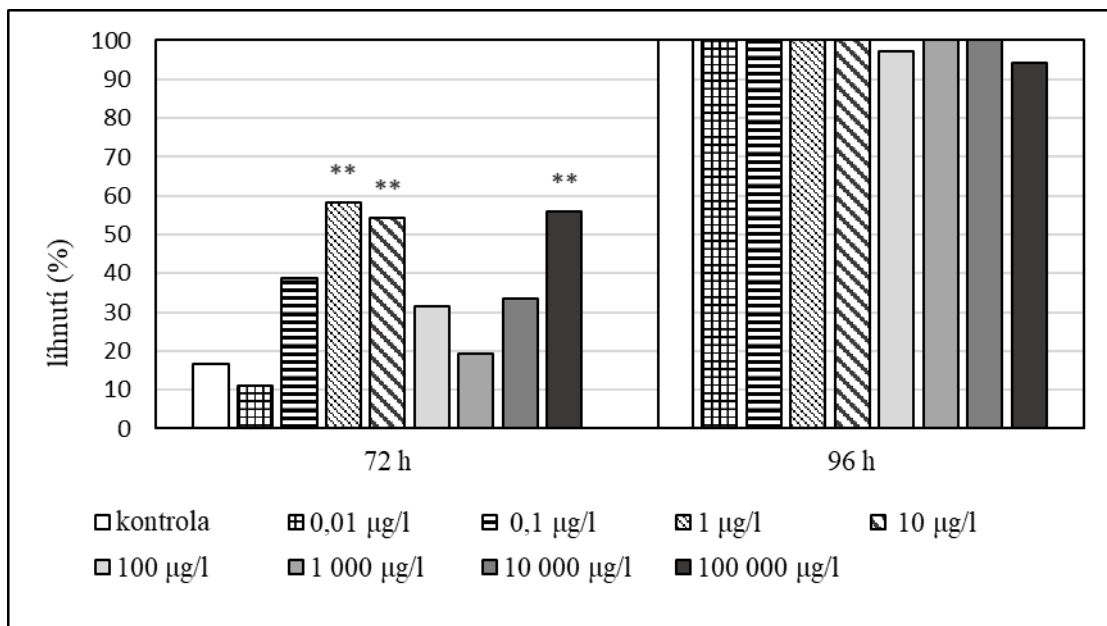
Graf č. 1. Líhnutí (v %) dání pruhovaného – testování účinků fluoxetinu hydrochloridu.

(** – $p < 0,01$ – statisticky vysoce významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)

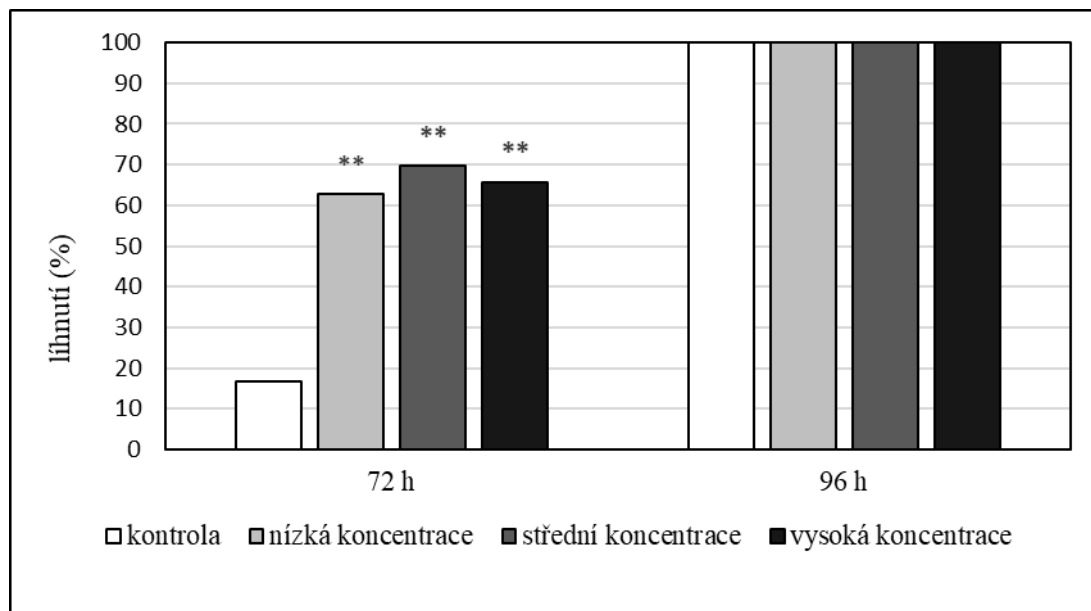


Graf č. 2. Líhnutí (v %) dání pruhovaného – testování účinků citalopramu hydrochloridu.

(** – $p < 0,01$ – statisticky vysoce významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)



Graf č. 3. Líhnutí (v %) dánia pruhovaného – testování účinků kombinace obou antidepresiv. (** – $p < 0,01$ – statisticky vysoce významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování; nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 0,01 $\mu\text{g/l}$; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 1 $\mu\text{g/l}$; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 100 $\mu\text{g/l}$)



V embryonálním testu toxicity s drápkou vodní bylo líhnutí zaznamenáno již ve 48 hodinách po oplození. V tomto čase pozorování bylo v kontrolní skupině vylíhlých 100 % jedinců. Obdobně tomu bylo i skoro ve všech pokusných skupinách s výjimkou skupin exponovaných 0,1 a 10 000 $\mu\text{g/l}$ citalopramu hydrochloridu (v obou skupinách 88,9 % vylíhlých jedinců) a 1 $\mu\text{g/l}$ fluoxetinu hydrochloridu (94,4 % vylíhlých jedinců). Statistická analýza ovšem nepotvrdila signifikantní rozdíly v líhnutí mezi kontrolní skupinou a uvedenými pokusnými skupinami. V 72 hodinách po oplození byli již všichni jedinci vylíhlí.

Významným ukazatelem embryotoxicity je výskyt různých typů **malformací** v průběhu vývoje. Při hodnocení embryonálních testů toxicity se nejčastěji setkáváme s edémem perikardu, edémem žloutkového vaku, případně lze pozorovat různé deformace páteře, ocasu či očí. Některé testované látky také mohou vést ke zvýšení nebo naopak snížení pigmentace těla. Na obrázku č. 1 je uvedena fotodokumentace z realizovaných embryonálních testů toxicity. Jsou zde uvedeny příklady některých malformací, které v průběhu experimentů byly zaznamenány v exponovaných skupinách. Pro porovnání je vždy uvedeno i foto kontrolní skupiny, kde daná malformace nebyla zaznamenána. Výsledky relativní četnosti výskytu malformací jsou uvedeny v tabulce č. 3 (pro danio pruhované) a tabulce č. 4 (pro drápkou vodní). Údaje jsou vždy vztaženy na živé jedince v daném čase.

V rámci našeho experimentu byl obecně nižší výskyt malformací pozorován v embryonálních testech využívajících jako modelový organismus danio pruhované. V průběhu celého testu nebyly zaznamenány žádné malformace u kontrolní skupiny. V experimentálních skupinách byl nejvyšší výskyt malformací zjištěn při testování účinků fluoxetinu hydrochloridu, a to především ve dvou nejvyšších koncentracích (1 000 a 10 000 $\mu\text{g/l}$). V obou koncentracích byl výskyt malformací v 72 a 96 hodinách po oplození testován jako signifikantní v porovnání s kontrolní skupinou. Z pozorovaných malformací byly zaznamenány deformace páteře a ocasu (především ohnutí ocasu), edém srdce a edém žloutkového vaku. Nejvyšší výskyt malformací byl pozorován ve skupině exponované 10 000 $\mu\text{g/l}$ fluoxetinu hydrochloridu v 96 hodinách po oplození, jednalo se o 41,2 % živých jedinců ($p < 0,01$). Při hodnocení účinků citalopramu hydrochloridu byl statisticky významně vyšší výskyt malformací zjištěn pouze u nejvyšší testované koncentrace (100 000 $\mu\text{g/l}$) v 96 hodinách po oplození (17,6 % živých jedinců). Pozorovanou malformací byl edém srdce. V rámci

embryonálního testu hodnotícího účinky kombinace obou antidepresiv byly statisticky významné rozdíly ve výskytu malformací zaznamenány pouze u střední koncentrace (fluoxetin hydrochlorid – 10 µg/l, citalopram hydrochlorid – 1 µg/l) v 96 hodinách po oplození (18,2 % živých jedinců). Nalezenou malformací byl edém žloutkového vaku.

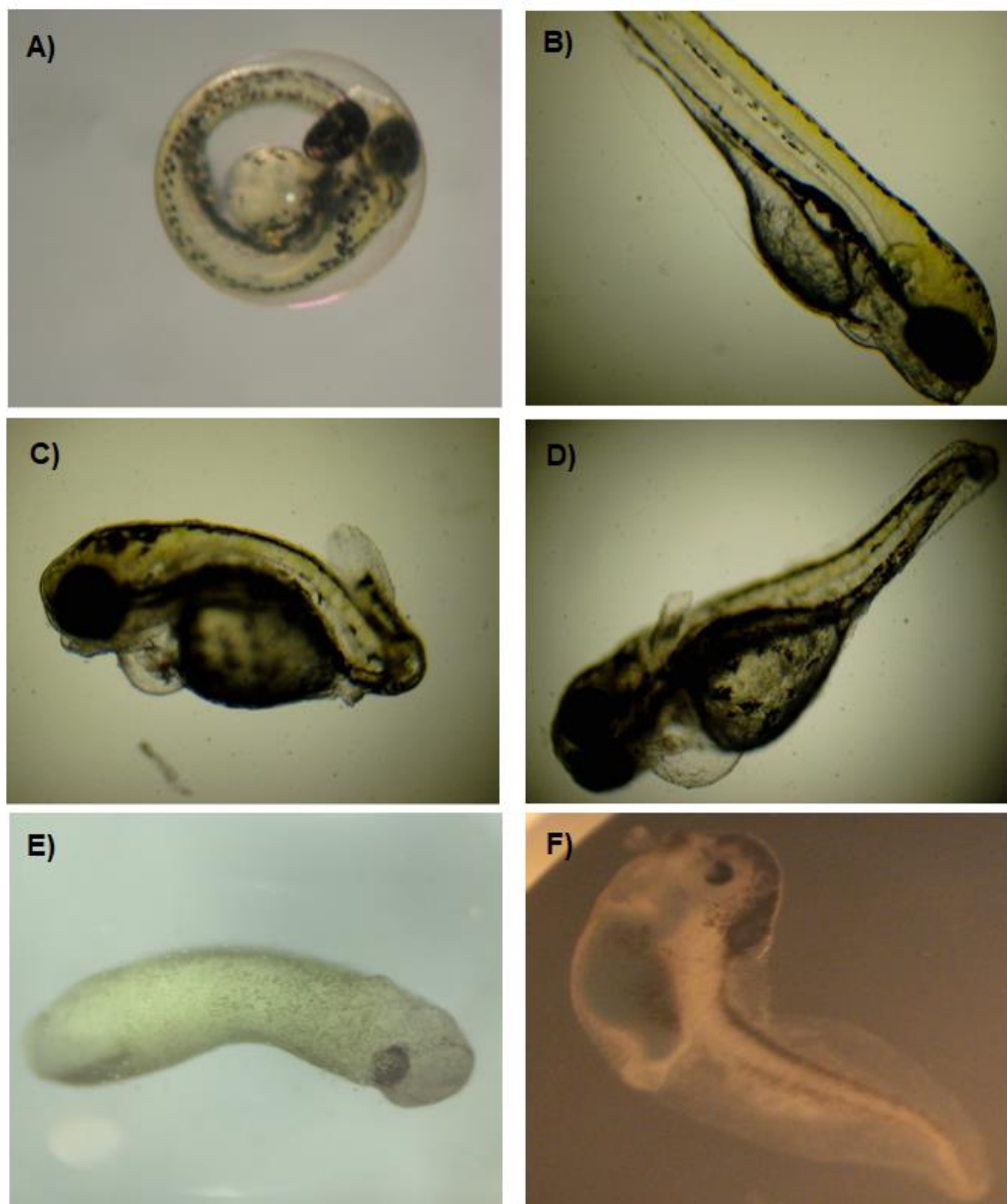
Tabulka č. 3. Výskyt malformací (v %) dána pruhovaného v jednotlivých embryonálních testech toxicity. Údaje jsou vztaženy pouze na živé jedince.

(* $p < 0,05$ – statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování, ** $p < 0,01$ – statisticky vysoce významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)

<i>FLUOXETIN HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
0,1 µg/l	0	0	11,1	0
1 µg/l	0	0	0	0
10 µg/l	0	2,9	11,8	2,9
100 µg/l	2,9	11,8	12,1	9,1
1 000 µg/l	0	0	26,5*	26,5*
10 000 µg/l	5,9	5,9	23,5*	41,2**
<i>CITALOPRAM HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
0,01 µg/l	0	2,9	0	0
0,1 µg/l	0	2,7	8,6	2,9
1 µg/l	0	0	0	2,8
10 µg/l	0	2,9	0	0
100 µg/l	0	2,9	2,9	14,3
1 000 µg/l	0	0	0	2,8
10 000 µg/l	0	2,8	5,6	2,8
100 000 µg/l	3,0	5,9	2,9	17,6*
<i>KOMBINACE FLUOXETINU HYDROCHLORIDU A CITALOPRAMU HYDROCHLORIDU</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	0	0	0
nízká koncentrace	0	2,9	11,4	5,7
střední koncentrace	0	0	0	18,2*
vysoká koncentrace	0	0	14,3	2,9

Poznámka: nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid 0,01 µg/l; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 µg/l, citalopram hydrochlorid 1 µg/l; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 µg/l, citalopram hydrochlorid 100 µg/l.

Obrázek č. 1. Fotodokumentace z průběhu jednotlivých embryonálních testů: A) dánío pruhované – 72 hodin po oplození - nevylíhlé, kontrolní skupina; B) dánío pruhované – 96 hodin po oplození - vylíhlé, kontrolní skupina; C) dánío pruhované – 96 hodin po oplození, experimentální skupina vystavena fluoxetinu hydrochloridu v koncentraci 10 000 $\mu\text{g/l}$ (deformace těla, perikardiální edém; D) dánío pruhované – 96 hodin po oplození, experimentální skupina vystavena citalopramu hydrochloridu v koncentraci 100 000 $\mu\text{g/l}$ (deformace těla, perikardiální edém); E) drápatka vodní – 24 hodin po oplození, kontrolní skupina, F) drápatka vodní – 72 hodin po oplození, experimentální skupina vystavena fluoxetinu hydrochloridu v koncentraci 1 000 $\mu\text{g/l}$ (deformace těla).



V embryonálním testu toxicity využívajícím drápatku vodní byl výskyt malformací výrazně častější. V kontrolní skupině byl nejvyšší výskyt zaznamenán v 72 a 96 hodinách po oplození, kdy dosáhl 11,8 %. Z pozorovaných malformací byl v kontrolní skupině zjištěn edém srdce a deformace páteře. Při testování účinku fluoxetinu hydrochloridu byl v experimentální skupině vystavené koncentraci 1 000 $\mu\text{g/l}$ zjištěn v 96 hodinách po oplození výskyt malformací v 41,2 % živých jedinců. Zjištěný údaj byl statisticky významně vyšší oproti nálezům v kontrolní skupině. Z pozorovaných malformací byly zaznamenány následující malformace – edémy srdce a žloutkového váčku, deformace páteře, ocasu a očí a zvýšená pigmentace. V embryonálním testu zkoumajícím účinky citalopramu hydrochloridu byl zjištěn statisticky významně vyšší průkaz malformací v experimentální

skupině vystavené 100 µg/l testované látky v 96 hodinách po oplození. Relativní četnost malformací byla 52,3 %, nejčastějšími nálezy byly deformace páteře a ocasu, a dále edém srdce. V případě hodnocení účinků kombinace obou antidepresiv byly signifikantní nálezy pouze ve skupině vystavené nízké koncentraci antidepresiv (fluoxetin hydrochlorid – 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid – 0,01 µg/l). Celkem 41,2 a 50 % živých jedinců vykazovalo malformace v 72 a 96 hodinách po oplození. Nejčastěji se jednalo o edém žloutkového vřáčku, deformaci páteře a zkrácení těla.

Tabulka č. 4. Výskyt malformací (v %) drápatky vodní v jednotlivých embryonálních testech toxicity. Údaje jsou vztaženy pouze na živé jedince.

(* $p < 0,05$ – statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)

<i>FLUOXETIN HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	5,6	11,1	11,8
0,1 µg/l	0	0	11,1	33,3
1 µg/l	0	22,2	22,2	23,5
10 µg/l	0	16,7	17,6	23,5
100 µg/l	0	11,1	11,1	11,8
1 000 µg/l	0	17,6	29,4	41,2*
10 000 µg/l	0	5,9	-	-
<i>CITALOPRAM HYDROCHLORID</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	5,6	11,1	11,8
0,01 µg/l	0	0	27,8	27,8
0,1 µg/l	0	16,7	22,2	23,5
1 µg/l	0	11,1	11,1	5,6
10 µg/l	0	11,1	16,7	16,7
100 µg/l	0	22,2	32,3	52,3*
1 000 µg/l	0	16,7	17,6	23,5
10 000 µg/l	0	16,7	16,7	17,6
100 000 µg/l	0	22,2	-	-
<i>KOMBINACE FLUOXETINU HYDROCHLORIDU A CITALOPRAMU HYDROCHLORIDU</i>				
SKUPINA	24 h	48 h	72 h	96 h
kontrola	0	5,6	11,1	11,8
nízká koncentrace	0	0	41,2*	50,0*
střední koncentrace	0	5,9	29,4	31,3
vysoká koncentrace	0	5,6	16,7	17,6

Poznámka: nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 µg/l, citalopram hydrochlorid 0,01 µg/l; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 µg/l, citalopram hydrochlorid 1 µg/l; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 µg/l, citalopram hydrochlorid 100 µg/l.

Dalším využívaným indikátorem pro posouzení negativních účinků cizorodých látek na vodní organismy je monitorování **tepové frekvence**. Výsledky tepové frekvence dávia pruhovaného a drápatky vodní po expozici testovanými antidepresivy jsou shrnuty v tabulce č. 5. Z uvedených výsledků je zřejmé, že nejvíce změn bylo zaznamenáno u dávia pruhovaného. V testu s fluoxetinem hydrochloridem došlo u uvedeného testovaného organismu ke statisticky vysoce významnému zvýšení tepové frekvence v porovnání s kontrolní skupinou. Výjimkou byla pouze experimentální skupina vystavená nejvyšší testované koncentraci, kde nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl

($p < 0,01$) oproti kontrole. Překvapivě signifikantní zvýšení bylo pozorováno i v nejnižší, environmentálně relevantní koncentraci. Obdobné závěry byly zjištěny i při testování kombinací obou antidepresiv, kdy opět došlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení tepové frekvence, a to u všech koncentrací, včetně koncentrace environmentálně relevantní. Při testování účinků citalopramu hydrochloridu došlo ke statisticky vysoce významnému zvýšení po expozici 1 000 a 10 000 $\mu\text{g/l}$. V embryonálním testu toxicity s využitím drápatky vodní bylo zaznamenáno statisticky významné zvýšení ($p < 0,05$) tepové frekvence pouze u jedné koncentrace (1 $\mu\text{g/l}$) citalopramu hydrochloridu.

Tabulka č. 5. Tepová frekvence dávia pruhovaného a drápatky vodní v jednotlivých embryonálních testech toxicity. Výsledky jsou uvedeny jako průměr \pm směrodatná odchylka. (* $p < 0,05$ – statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování, ** $p < 0,01$ – statisticky významný rozdíl mezi kontrolní a pokusnou skupinou ve stejném čase pozorování)

Tepová frekvence (počet tepů za minutu)		
FLUOXETIN HYDROCHLORID	Dávia pruhované	Drápatka vodní
kontrola	158,3 \pm 14,6	120,0 \pm 7,4
0,1 $\mu\text{g/l}$	175,0 \pm 14,1**	119,9 \pm 11,0
1 $\mu\text{g/l}$	176,4 \pm 12,6**	121,7 \pm 6,9
10 $\mu\text{g/l}$	175,9 \pm 16,1**	124,9 \pm 5,7
100 $\mu\text{g/l}$	173,3 \pm 17,0**	119,7 \pm 6,2
1 000 $\mu\text{g/l}$	181,1 \pm 14,1**	123,5 \pm 12,4
10 000 $\mu\text{g/l}$	155,1 \pm 25,7	-
CITALOPRAM HYDROCHLORID	Dávia pruhované	Drápatka vodní
kontrola	158,3 \pm 14,8	120,0 \pm 7,4
0,01 $\mu\text{g/l}$	155,8 \pm 9,4	122,1 \pm 9,7
0,1 $\mu\text{g/l}$	157,0 \pm 10,9	124,0 \pm 9,6
1 $\mu\text{g/l}$	157,4 \pm 9,4	130,1 \pm 5,6*
10 $\mu\text{g/l}$	157,7 \pm 10,6	126,3 \pm 10,0
100 $\mu\text{g/l}$	164,2 \pm 10,2	120,7 \pm 8,4
1 000 $\mu\text{g/l}$	174,9 \pm 15,7**	124,3 \pm 8,3
10 000 $\mu\text{g/l}$	179,2 \pm 12,5**	112,7 \pm 7,5
100 000 $\mu\text{g/l}$	140,3 \pm 10,3	-
KOMBINACE ANTIDEPRESIV	Dávia pruhované	Drápatka vodní
kontrola	158,3 \pm 14,8	120,0 \pm 7,4
nízká koncentrace	182,3 \pm 14,2**	118,1 \pm 6,2
střední koncentrace	186,6 \pm 11,8**	120,0 \pm 8,5
vysoká koncentrace	180,0 \pm 14,1**	122,6 \pm 9,5

Poznámka: nízká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 0,1 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 0,01 $\mu\text{g/l}$; střední koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 10 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 1 $\mu\text{g/l}$; vysoká koncentrace – fluoxetin hydrochlorid 1 000 $\mu\text{g/l}$, citalopram hydrochlorid 100 $\mu\text{g/l}$.

Diskuze

Ve vodním prostředí lze detekovat široké spektrum chemických sloučenin, které významným způsobem mohou ovlivňovat necílové vodní organismy, a to i v relativně nízkých, environmentálně relevantních, koncentracích. Jednou z možností posuzování negativních účinků těchto potenciálně škodlivých látek je provádění testů toxicity (Velíšek, 2018).

V posledních letech se při testování toxicity stále častěji setkáváme s využitím embryonálních stádií jednotlivých vodních organismů. Embryotoxicitu hodnotíme na základě sledování vybraných parametrů jako je mortalita v průběhu vývoje, líhnutí a výskyt morfologických změn (deformace páteře, edém srdce nebo žloutkového váčku, změny pigmentace a další). Další možností je například

sledování tepové frekvence, změn chování (např. změny pohybu) nebo analýzy vybraných biomarkerů v celotělních homogenátech jednotlivých embryí (např. ukazatele oxidativního stresu, hodnocení genové exprese) (OECD, 2013; Sehonová et al., 2016; Sehonova et al., 2019b; Aderemi et al., 2020). Kolektiv autorů Lammer et al. (2009) porovnávali výsledky LC50 z toxikologických testů realizovaných na embryích dáňia pruhovaného s daty z akutních testů toxicity na adultních jedincích a dospěli k závěru, že tyto embryonální testy toxicity jsou plnohodnotnou alternativou ke klasickým akutním testům toxicity.

Při řešení naší studie bylo provedeno hodnocení embryotoxicity dvou hojně využívaných antidepresiv ze skupiny selektivních inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu – citalopramu hydrochloridu a fluoxetinu hydrochloridu. Posuzovány byly jednak účinky jednotlivých antidepresiv a dále také jejich vybraných kombinací, protože ve vodním prostředí se dané látky vyskytující často současně. Jako testované organismy bylo ze zástupců ryb využito dáňio pruhované, ze skupiny obojživelníků byla vybrána drápatka vodní.

Mortalita patří mezi základní ukazatele toxicity a její sledování se provádí v rámci všech toxikologických testů. Při testování environmentálních koncentrací bývá mortalita většinou velmi nízká až nulová, toxicita testovaných látek se ovšem projevuje jinými subletálními efekty, které při chronickém působení mohou významně narušovat fyziologické funkce organismu. V embryonálních testech toxicity se embryo považuje za uhynulé, pokud je zaznamenán výskyt koagulace, nevyvinutí somitů, absence srdečního tepu nebo pokud nedojde k oddělení ocasu od žloutkového vřáčku (OECD, 2013). Sehonova et al. (2017) studovala účinky tricyklických antidepresiv (amitriptylin, nortriptylin, klomipramin) na embryo-larvální vývojová stádia kapra obecného při expozici uvedenými látkami po dobu 30 dnů. Testovány byly jednotlivé sloučeniny i jejich kombinace, a to v koncentracích 10, 100 a 500 µg/l. Kombinace všech tří antidepresiv v nejvyšší testované koncentraci způsobila signifikantní zvýšení kumulativní mortality, které již po 6 dnech od oplození dosáhlo 100 %. Skoro 100% kumulativní mortalita byla zaznamenána i v nižších koncentracích kombinované expozice, ale tento účinek byl pozorován až po delší době expozice. Signifikantní zvýšení kumulativní mortality bylo také zjištěno v nejvyšších testovaných koncentracích amitriptylinu a klomipraminu. Předpokládaným důvodem mortality u těchto raných stádií jsou kardiotoxické účinky testovaných látek. Statisticky významně zvýšená kumulativní mortalita embryí dáňia pruhovaného byla také pozorována ve studii zaměřené na zhodnocení embryotoxicity amitriptylinu, sertralínu a venlafaxinu. Nejvyšší kumulativní mortalita byla zaznamenána u experimentální skupiny vystavené amitriptylinu v koncentraci 3 000 µg/l (47 %) (Sehonova et al., 2019a). Oliveira de Farias et al. (2019) zkoumali účinky fluoxetinu na embryonální vývoj dáňia pruhovaného. Bylo potvrzeno, že nejvyšší testované koncentrace (5,51 a 15 mg/l) způsobily 100% mortalitu, a to již ve věku 120 hodin po oplození. Ve skupině vystavené koncentraci 15 mg/l to bylo již v 96 hodinách po oplození. Ze získaných výsledků autoři vyhodnotily 168h-LC50, která byla 1,18 mg/l. Dále autoři zjistili, že fluoxetin významným způsobem ovlivňuje aktivitu plavání, kdy došlo k signifikantnímu snížení uplavané vzdálenosti. Zjištěné výsledky mohou souviset s možnými neurotoxickými účinky, což bylo potvrzeno také statisticky významným snížením aktivity acetylcholinesterázy u exponovaných skupin.

Líhnutí je kritickým obdobím vývoje, a proto jeho sledování je významným ukazatelem embryotoxicity. V naší studii byly signifikantní změny zjištěny pouze u dáňia pruhovaného a ve většině případů se jednalo o dřívější líhnutí. Dřívější líhnutí po expozici antidepresivy bylo potvrzeno i v některých jiných toxikologických studiích. Sehonova et al. (2017) uvádějí, že tricyklická antidepresiva testovaná v koncentračním rozmezí 10 až 500 µg/l způsobila u embryí kapra obecného statisticky významně dřívější líhnutí v porovnání s kontrolní skupinou v 72 a 96 hodinách po oplození. Při posuzování stupně vývoje v dalších dnech testu došlo ale ke zjištění, že v některých koncentracích je stupeň larválního vývoje nižší v porovnání s kontrolní skupinou. Dřívější líhnutí embryí dáňia pruhovaného po expozici environmentálně relevantní koncentrací fluoxetinu zaznamenali také Nowakowska et al. (2020). Naproti tomu odlišné výsledky byly zjištěny ve studii autorů Oliveira de Farias et al. (2019), kteří zjistili ve 48 hodinách po oplození opožděný

vývoj ($p < 0,05$) embryí dánia pruhovaného vystaveného fluoxetinu v koncentraci 15 mg/l. V této skupině bylo vylíhlých pouze 15 % jedinců, v kontrolní skupině bylo vylíhlých 65 % jedinců.

Morfologické změny embryí po expozici různými typy antidepresiv byly zjištěny v rámci řady ekotoxikologických studií. Nowakowska et al. (2020) sledovali teratogenní účinky environmentálních koncentrací vybraných antidepresiv (sertralin, fluoxetin, mianserin, paroxetin) na embrya dánia pruhovaného. Nejčastěji nacházenou malformací byla deformace těla (např. skolióza, deformace trupu a ocasu). V několika případech byl také potvrzen perikardiální edém. Časté výskyty edémů a deformací těla (např. ohyb ocasu obdobně jako v našem experimentu) byly také potvrzeny v rozsáhlé studii, která testovala antidepresiva ze skupiny inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (sertralin, paroxetin, fluoxetin) na raná vývojová stádia drápatky vodní (Richards and Cole, 2006). Kolektiv autorů Sehonova et al. (2019a) sledoval účinky tří antidepresiv (amitriptylin, sertralin, venlafaxin) na raná stádia dánia pruhovaného a drápatky tropické. Signifikantní zvýšení výskytu malformací (edémy a vývojové deformace) bylo prokázáno pouze u nejvyšší testované koncentrace amitriptylinu (3 000 $\mu\text{g/l}$) u dánia pruhovaného. Autoři ovšem zjistili, že i environmentálně relevantní koncentrace všech testovaných antidepresiv mohou u obou testovaných druhů negativně ovlivnit expresi genů, které mají úzkou souvislost s vývojem srdce, očí, mozku a kostí.

V odborné literatuře nalezneme řadu studií, které jako jeden z ukazatelů negativních účinků využívají sledování tepové frekvence. Výsledky týkající se antidepresiv a jejich efektů na vodní organismy jsou velmi různorodé. Je zřejmé, že tento parametr je významně ovlivněn druhem testovaného organismu, věkem, ve kterém probíhá sledování, testovanou látkou a samozřejmě i použitou koncentrací. Žádné změny v tepové frekvenci nebyly zaznamenány při hodnocení účinků sertralinu na embrya dánia pruhovaného ve studii autorů Yang et al. (2021). Použité testované koncentrace byly v koncentračním rozmezí 1 až 100 $\mu\text{g/l}$. Neovlivnění tepové frekvence bylo také potvrzeno ve studii kolektivu autorů Ziegler et al. (2020), kteří testovali účinky citalopramu na larvální stadium pstruha potočního. Naopak snížení tepové frekvence bylo zaznamenáno po expozici 3 000 $\mu\text{g/l}$ amitriptylinu. Tyto změny byly zaznamenány u embryí dánia pruhovaného i drápatky vodní (Sehonova et al., 2019a).

Závěr

Z výsledků získaných v předkládané studii je zřejmé, že antidepresiva ze skupiny inhibitorů zpětného vychytávání serotoninu (fluoxetin hydrochlorid, citalopram hydrochlorid) mohou už i v environmentálně relevantních koncentracích působit embryotoxicky. V experimentální skupině vystavené nejnižší koncentraci bylo zjištěno dřívější líhnutí, zvýšený výskyt malformací a zvýšení tepové frekvence. Uvedené změny byly zaznamenány především ve skupinách vystavených kombinované expozici. Na základě našich výsledků je také zřejmé, že citlivějším organismem je drápatka vodní, protože jak nejvyšší koncentrace fluoxetinu hydrochloridu (10 000 $\mu\text{g/l}$), tak i citalopramu hydrochloridu (100 000 $\mu\text{g/l}$) způsobila 100% mortalitu testovaných embryí. Pro komplexní zhodnocení embryotoxicity by bylo vhodné provést další testování se zaměřením se na další možné markery jako je vliv na chování nebo reprodukční aktivitu. Zároveň by bylo vhodné realizovat dlouhodobější studie, které budou posuzovat vliv na různá vývojová stádia, tzn. nejen účinky na embryonální stádium, ale také na larvální případně juvenilní stádium.

Tato práce byla finančně podpořena ITA VFU Brno (FVHE/Večerek/ITA2020).

Literatura

Aderemi, A.O., Hunter, C., Pahl, O., Roberts, J., Shu, X. 2020. Developmental anomalies and oxidative stress responses in zebrafish (*Danio rerio*) following embryonic exposure to human pharmaceuticals. *Journal International Journal of Toxicology and Environmental Health*, 5: 109-125.
 Foran, Ch.M., Weston, J., Slattery, M., Brooks, B.W., Huggett, D.B. 2003. Reproductive assessment of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) following a four-week fluoxetine (SSRI) exposure. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 511-517.

- Ford, A.T., Fong, P.P. 2016. The effects of antidepressants appear to be rapid and at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 35: 794-798.
- Ismail, T., Lee, H.K., Kim, Ch., Kim, Y., Lee, H., Kim, J.H., Kwon, S., Huh, T.L., Khang, D., Kim, S.H., Choi, S.Ch., Lee, H.S. 2019. Comparative analysis of the developmental toxicity in *Xenopus laevis* and *Danio rerio* induced by Al₂O₃ nanoparticle exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 38: 2672-2681.
- ISO 7346. 1996. Water quality – Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] – Part I: Static method.
- Kellner, M., Porseryd, T., Porsch-Hällström, I., Hansen, S.H., Olsén, K.H. 2015. Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 158: 165–170.
- Keshari, V., Adeeb, B., Simmons, A.E., Simmons, T.W., Diep, C.Q. 2016. Zebrafish as a model to assess the teratogenic potential of nitrite. *Journal of Visualized Experiments* 108: 53615.
- Lammer, E., Carr, G.J., Wendler, K., Rawlings, J.M., Belanger, S.E., Braunbeck, T. 2009. Is the fish embryo toxicity test (FET) with zebrafish (*Danio rerio*) a potential alternative for the acute toxicity test? *Comparative Biochemistry and Physiology* 149: 196-209.
- Lopes, D.G., Duarte, I.A., Antunes, M., Fonseca, V.F. 2020. Effects of antidepressants in the reproduction of aquatic organisms: a meta-analysis. *Aquatic Toxicology* 227: 105569.
- Modra, H., Vrskova, D., Macova, S., Kohoutkova, J., Hajslova, J., Haluzova, I., Svobodova, Z. 2011. Comparison of diazinon toxicity to embryos of *Xenopus laevis* and *Danio rerio*: Degradation of diazinon in water. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 86: 604-604.
- Nowakowska, K., Giebulowicz, J., Kamaszewski, M., Adamski, A., Szudrowicz, H., Ostaszewska, T., Solarska-Dzieciolowska, U., Nalecz-Jawecki, G., Wroczynski, P., Drobniwska, A. 2020. Acute exposure of zebrafish (*Danio rerio*) larvae to environmental concentrations of selected antidepressants: Bioaccumulation, physiological and histological changes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology* 229: 108670.
- OECD.stat. 2020. [online] [vid. 2020-01-28]. dostupné z <https://stats.oecd.org>
- Oliveira de Farias, N., Oliveira, R., Sousa-Moura, D., Silva de Oliveira, R., C., Rodrigues, M.A.C., Andrade, T.S., Domingues, I., Camargo, N.S., Muchlmann, L.A., Grisolia, C.K. 2019. Exposure to low concentration of fluoxetine affects development, behavior and acetylcholinesterase activity of zebrafish embryos. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 215: 1–8.
- Pelli, M., Connaughton, V.P. 2015. Chronic exposure to environmentally-relevant concentration of fluoxetine (Prozac) decreases survival, increases abnormal behaviors, and delay predator escape responses in guppies. *Chemosphere* 139: 202–209.
- Richards, S.M., Cole, S.E. 2006. A toxicity and hazard assessment of fourteen pharmaceuticals to *Xenopus laevis* larvae. *Ecotoxicology* 15: 647–656.
- Sehonová, P., Plhalová, L., Blahová, J., Svobodová, Z. 2016. Embrya ryb jako alternativní modely v toxikologii. *Veterinářství* 66: 692-696.
- Sehonova, P., Plhalova, L., Blahova, J., Doubkova, V., Marsalek, P., Prokes, M., Tichy, F., Skladana, M., Fiorino, E., Mikula, P., Vecerek, V., Faggio, C., Svobodova, Z. 2017. Effect of selected tricyclic antidepressants on early-life stages of common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere* 185: 1072–1080.
- Sehonova, P., Svobodova, Z., Dolezelova, P., Vosmerova, P., Faggio, C. 2018. Effects of waterborne antidepressants on non-target animals living in the aquatic environment: A review. *Science of the Total Environment* 631: 789-794.
- Sehonova, P., Hodkovicova, N., Urbanova, M., Örn, S., Blahova, J., Svobodova, Z., Faldyna, M., Chloupek, P., Briedikova, K., Carlsson, G. 2019a. Effects of antidepressants with different modes of action on early life stages of fish and amphibians. *Environmental Pollution* 254: 112999.

- Sehonova, P., Zikova, A., Blahova, J., Svobodova, Z., Chloupek, P., Kloas, W. 2019b. mRNA expression of antioxidant and biotransformation enzymes in zebrafish (*Danio rerio*) embryos after exposure to the tricyclic antidepressant amitriptyline. *Chemosphere* 217: 516-521.
- Velíšek, J. (ed.). 2018. Vodní toxikologie pro rybáře. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Vodňany, 608 s.
- Yang, H., Liang, X., Zhao, Y., Gu, X., Mao, Z., Zeng, Q., Chen, H., Martyniuk, Ch.J. 2021. Molecular and behavioral responses of zebrafish embryos/larvae after sertraline exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 208: 111700.

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020

1. **Identifikační číslo projektu:** FVHE/Tremlová/ITA2020
2. **Název projektu:** Hodnocení zdravotní nezávadnosti a funkčních vlastností jedlých obalů potravin

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: **doc. MVDr. Bohuslava Tremlová**
Fakulta/celoškolské pracoviště: **Fakulta veterinární hygieny a ekologie**
E-mail: **tremlovab@vfu.cz**
Telefon: **602116956, 541562794**

4. Řešitelský kolektiv:

Řešitelský kolektiv tvořili akademičtí pracovníci, výzkumní pracovníci a studenti DSP Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Řešitel projektu

doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčích úkolů, hodnocení vzorků a interpretace výsledků ve všech dílčích aktivitách, příprava a kontrola publikací, vypracování zprávy o řešení projektu.

Akademičtí pracovníci

MVDr. Matej Pospiech, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčí aktivity mikroskopických a imunochemických metod, provedení mikroskopických metod na vyrobených obalech, provedení analýz na elektronovém mikroskopu, hodnocení vzorků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu.

MSc. Dani Dordevic, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – koordinace dílčí aktivity, výroby jedlých obalů, stanovení celkových polyfenolů spektrofotometricky a pomocí HPLC, textura, analýza FTIR, stanovení zeta-potenciálu a provedení migračních testů, hodnocení vzorků a interpretace výsledků, příprava a kontrola publikací, vypracování podkladů pro zprávu o řešení projektu.

Mgr. Michal Žďárský, Ph. D. akademický pracovník, úvazek 1,0 – stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů, migrační testy, provedení analýz na elektronovém mikroskopu, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Ing. Alexandra Tauferová, Ph. D. akademický pracovník, úvazek 0,6 – senzorická analýza připravených vzorků, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Ing. Martin Král, Ph.D. akademický pracovník, úvazek 1,0 – stanovení texturálních parametrů, stanovení antioxidačních vlastností, celkových polyfenolů a migrační testy hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Zdeňka Javůrková, Ph.D., akademický pracovník, úvazek 1,0 – stanovení barvy v barevných systémech CIELAB, RGB hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Ing. Marie Procházková akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, úvazek 1,0 – ELISA metody, stanovení alergenů, hodnocení výsledků, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Mgr. Marie Bartlová akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, úvazek 0,5 – provedení mikroskopických metod na vyrobených obalech, vypracování podkladů pro závěrečnou zprávu a publikace.

Studenti DSP

Ing. Simona Jančíková – koordinace dílčí aktivity, výroba jedlých obalů, stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů, stanovení texturálních parametrů, FTIR, stanovení zeta-potenciálu a migrační testy.

Ing. Bojan Antonic – stanovení antioxidační aktivity a celkových polyfenolů, stanovení texturálních parametrů a migrační testy.

Mgr. Simona Ljasovská – stanovení antioxidační aktivity, celkových polyfenolů, stanovení alergenů metodou ELISA a migrační testy.

Výzkumný pracovník

Ing. Karolína Těšíková – provádění chemických a fyzikálních analýz, zpracování a interpretace výsledků

5. Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Projekt je zaměřen na problematiku zdravotní nezávadnosti, hygieny a kvality potravin. Projekt je v souladu s podporovanými směry výzkumu na Fakultě veterinární hygieny a ekologie. Řešené téma úzce souvisí se zaměřením Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu a navazuje na předchozí výzkumné aktivity.

6. Cíle projektu:

Cílem projektu bylo ověřit zdravotní nezávadnost jedlých obalů a technologické a funkční vlastnosti modelování jejich dopadu na zdravotní nezávadnost balené potravin.

Dílčí cíle zahrnovaly:

- hodnocení sensorických vlastností obalů (barva, textura)
- hodnocení distribuce jednotlivých složek v matrici
- hodnocení přítomnosti alergenů
- hodnocení antioxidační aktivity
- hodnocení přítomnosti a změn v množství polyfenolických látek
- hodnocení technologických vlastností obalů.

7. Popis metody řešení projektu:

V první fázi řešení byly vyrobeny vzorky jedlých obalů. Polysacharidovým základem jedlého obalu byl chitosan, do kterého se přidávaly tři rozdílné koncentrace extraktů z výlisků borůvek, hroznů, kořene petržele a bezového pylu. Byly vyráběny také vzorky bez přídavku extraktů jako kontrola.

Druhou fází řešení bylo ověření dosažených kvalitativních vlastností obalů. Zejména se jednalo o stanovení texturálních, chemických a sensorických vlastností. Struktura vzniklých polymerů a distribuce přísad v obalech byla hodnocena mikroskopickými metodami.

V třetí fázi řešení se hodnotila zdravotní nezávadnost jedlých obalů. Pro hodnocení zdravotní nezávadnosti byly použity migrační testy (migrace fortifikačních přísad) a ELISA testy na přítomnost vybraných alergenů.

Konkrétní analýzy a sledované parametry byly následující:

- a) Sledování barvy samotných obalů po přidání různých koncentrací extraktů, dále změna barvy při použití standardních roztoků o konkrétním pH a také změna barvy obalu u balené potravin během kažení - parametry R, G, B (CCD čip) a CIE L, a, b (Minolta).
- b) Texturální parametry byly stanoveny pomocí TA.XT texturometru.
- c) Pro hodnocení distribuce přísad byly použity metody světlené mikroskopie s UV-VIS spektroskopem a metody skenovací elektronové mikroskopie pro hodnocení formování polymeru.
- d) Pro hodnocení přítomnosti alergenů byla použita sandwich ELISA.

- e) Chemické metody zahrnovaly: FRAP (ferric reducing antioxidant power), DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl), NOS (nitric oxide scavenging activity), ABTS [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonate)], stanovení celkových fenolů (TPC) spekrofotometricky a jednotlivých polyfenolů chromatograficky.
- f) Vlastnosti vyráběných obalů byly hodnoceny také pomocí FTIR a Ramanovy spektroskopie a dále stanovením zeta-potenciálu.
- g) Další metodou bylo použití migračních testů, aby bylo zjištěno kolik aktivních látek konkrétně přejde do simulantu balené potraviny – především polyfenolů a antioxidačních látek, stanoveny pomocí TPC, DPPH, FRAP, NOS a ABTS. Migrační testy byly provedeny dle nařízení komise (EU) č. 10/2011.

Všechny výsledky jsou statisticky vyhodnoceny metodami ANOVA, Pearsonova korelace a analýzou hlavních komponent.

8. Výsledky projektu:

Výsledky projektu ukázaly na možnost výroby jedlého obalu z matrice chitosanu, extraktu borůvek, hroznu, petržele a s přídavkem bezového pylu. Pevnost obalu se zvyšovala s přídavkem extraktů, ale naopak pružnost se snižovala. Výsledky také ukazují zvýšení polyfenolických látek s přídavkem extraktu a pylu a stejný trend byl pozorován i u antioxidační aktivity. Stanovení zeta potenciálu potvrdilo, že matrice pro výrobu obalů představují stabilní disperzní systémy. Tento výsledek potvrzuje stabilitu matrice vyráběného obalu, a představuje jeho výhodu.

Mikroskopická analýza potvrdila rozdíly mezi kontrolou a jednotlivými vzorky. Rozdíly byly potvrzeny až při zvětšení 800 000x. Přídavek bezového pylu se projevil také na povrchové struktuře obalu a potenciálně může být využito funkčních vlastností pylu při balení potravin. Dílčím výsledkem je také zjištění, že manipulace s obalem způsobuje strukturální změny a vhodnějším způsobem pro hodnocení je přímé formování gelu na vodivém terčíku.

Přítomnost alergenních proteinů v chitosanovém obalu byla potvrzena. Imunoreaktivita přítomných alergenních proteinů byla silně inhibovaná všemi přídavky kromě bezového pylu. Trend poklesu s rostoucí koncentrací přídavku byl potvrzen u všech použitých přídavků včetně přídavku bezového pylu.

Dosažené výsledky byly ověřeny a porovnány s výsledky jiných autorských kolektivů a ze závěrů vyplývá, že vzorky vyrobené z uvedených matic představují vhodnou možnost pro výrobu jedlých obalů, které by mohly přenášet funkční vlastnosti do balených potravin, ochránit balenou potravinu nebo také prodloužit její skladovatelnost a trvanlivost. Vyrobené obaly také představují ekologičtější variantu balení potravin ve srovnání s tradičními plastovými obaly.

Výsledky řešení projektu představují základ pro ověřování jedlého obalu v reálných podmínkách a na reálných potravinách.

9. Přínos projektu:

Vědecké přínosy projektu jsou následující:

- byly získány nové informace ve výzkumu jedlých obalů, týkající se jejich zdravotní nezávadnosti,
- byly získány nové informace ve výzkumu jedlých obalů, týkající se jejich složení a postupu výroby,
- byly získány nové informace ve výzkumu jedlých obalů, týkajících se jejich technologických vlastností,
- byly vytvořeny postupy pro hodnocení kvality, technologických vlastností a zdravotní nezávadnosti jedlých potravinových obalů,
- byly vytvořeny postupy pro ověření vlivu složení jedlých obalů na vlastnosti a zdravotní nezávadnost balené potravinové matrice,

- byly zavedeny nové metody (ABTS, NOS) pro stanovení antioxidačních vlastností, které ještě nebyly aplikovány na Ústavu hygieny a technologie potravin rostlinného původu.

Byly získány zcela nové dosud nepublikované výsledky, cílené pro odbornou a vědeckou veřejnost v oblasti bezpečnosti potravin. Výsledky budou publikovány zejména formou impaktovaných publikací. Téma je začleněné do současně řešené problematiky ústavu a je řešené také v rámci DSP prací.

10. Využití výsledků:

Výsledky budou využity k publikování impaktovaných článků. Výsledky výzkumu mohou potvrdit důležitost výzkumu navrhovaného k řešení z hlediska prokázání možnosti výroby jedlých obalů a jejich uplatnění pro balení a skladování různých jedlých matic. Výsledky jsou také základ pro další navazující výzkumy, které se budou v budoucnosti tímto výzkumem ještě podrobněji zabývat.

Publikace budou po uveřejnění zaslány ITA VFU Brno.

Publikace ve WoS (doložena)

Antonić, B., Jančíková, S., Dordević, D., & Tremlová, B. (2020). Grape Pomace Valorization: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Foods*, vol. 9, no. 11, 1627. **Q1**

Publikace přijatá (ještě neuveřejněná)

Antonic, B., Dordevic, D., Jancikova S., Holeckova, D., Tremlova, B., Kulawik, P. (2021). Effect of Grape Seed Flour on the Antioxidant Profile. *Textural and Sensory Properties of Waffles*. In process. **Q2**

Publikace připravená k odeslání

Incorporation of natural extracts by-products into the chitosan edible films. In process. **Q2**

11. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	639 932,40	639 873,00
Služby	55 000,00	140 468,82
Cestovné	110 200,00	884,00
Další provozní náklady	530 823,00	554 729,18
Doplňkové náklady	200 393,00	200 393,00
Celkem	1 536 348,40	1 536 348,00

Osobní náklady:

Osobní náklady včetně odvodů fakulty

- odměna hlavnímu řešiteli za zpracování podkladů k projektu, kontrolu řešení projektu, vypracování a obhájení závěrečné zprávy,

- odměna spoluřešitelů (akademičtí pracovníci, výzkumný pracovník) za vypracování podkladů, řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku, zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu, za přípravu publikací,

- stipendium studentů DSP za řešení konkrétních úkolů, odpovědnost za konkrétní metodiku zpracování výsledků a podkladů pro závěrečnou zprávu a publikaci.

Cestovné:

prezentace dílčích výsledků na konferenci European Biotechnology Congress 2020, Praha.

Služby:

servis přístrojů, jazykové korektury publikací.

Další provozní náklady:

DHM – magnetické míchačky 5 ks, datové uložení, vodní lázeň, analytické váhy, nástavce na texturometr.

Spotřební materiál – laboratorní sklo, histologické sklo, plastové laboratorní potřeby a pomůcky (obaly na vzorky, filtry, vialky, buničitá vata, alobal, rukavice, ubrousky laboratorní, špičky, zkumavky, stojany na zkumavky, Petriho misky), rostliny a další materiál pro přípravu extraktů a vzorků, chemikálie (chitosan, rozpouštědla, mobilní fáze, kyseliny, standardy), kolony, knihy.

Doplňkové náklady:

Stanovené ve výši 15 % z přímých nákladů projektu.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – výpis z IFIS je doložen.

Žádost o změnu využití finančních prostředků v jednotlivých položkách – doložena.

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

14.1.2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu odpovědného za čerpání prostředků:

14.1.2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

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

Datum, jméno a podpis

přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

14.1.2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu:

14.1.2021 Ing. Jiří Rotrekl

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

14.1.2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020

1. Identifikační číslo projektu: FVHE/Dobšíková/ITA2020 (TA202061)

2. Název projektu:

Veterinární aspekty zdravotního stavu drůbeže vlivem působení faktorů stresové zátěže a změny ve výživě

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: FVHE

E-mail: dobsikovar@vfu.cz

Telefon: 514 5622 784

4. Řešitelský kolektiv:

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

doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; hlavní řešitelka: vedení projektu a koordinace činností řešitelského kolektivu, koordinace dílčích úkolů, stanovení hematologických parametrů (PCV, RBC, Hb, MCV, MCH, MCHC, WBC, leukogram), analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

prof. Ing. Eva Straková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitelka: koordinace dílčího projektu, metodické zpracování a vedení dílčího projektu, vyhodnocení analytické činnosti, tvorba databází výsledků, statistické zpracování výsledků, publikační činnost

doc. MVDr. Alena Pechová, CSc. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitelka: stanovení biochemických parametrů (enzymy, TP, Glc, Alb, TAG, Chol), příprava publikačních výstupů

MVDr. Martin Hostovský, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitel: koordinace dílčího úkolu řešitelského kolektivu, odběr vzorků, stanovení biochemických parametrů (enzymy, TP, Glc, Alb, TAG, Chol) a parametrů oxidativního stresu (TBARS, CP, FRAP, ABTS, DPPH), analýza výsledků, statistické zpracování a vyhodnocení dat, příprava publikačních výstupů

Ing. Lucie Všeticková, Ph.D. – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), akademický pracovník, úvazek 1,0; spoluřešitelka: příprava vzorků pro chemickou analýzu, sumarizace výsledků pro statistickou analýzu, publikační činnost

Mgr. Lucie Pešková – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), studentka DSP FVHE VFU Brno, forma prezenční, akademický pracovník, úvazek 0,5; spoluřešitelka: odběr vzorků,

stanovení biochemických parametrů (enzymy, TP, Glc, Alb, TAG, Chol) a parametrů oxidativního stresu (TBARS, CP, FRAP, ABTS, DPPH), podíl na rešeršní činnosti k řešené problematice, statistické zpracování dat, příprava publikačních výstupů

MVDr. et MVDr. Viola Zentrichová – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), úvazek 0,0; student DSP FVHE VFU Brno, forma prezenční; spoluřešitelka: odběr vzorků, stanovení biochemických parametrů (enzymy, TP, Glc, Alb, TAG, Chol), podíl na rešeršní činnosti k řešené problematice, příprava publikačních výstupů

MVDr. Ivana Timová – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), studentka DSP FVHE VFU Brno, forma prezenční; spoluřešitelka: tvorba databází výsledků, zpracování a vyhodnocení získaných dat, publikační činnost

MVDr. Martin Kutlvašr – Ústav chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie (2420), student DSP FVHE VFU Brno, forma prezenční, od 10/2020 forma kombinovaná; spoluřešitel: práce spojené s literárními databázemi, konfrontace dosažených výsledků se zahraničními vědeckými poznatky, podíl na rešeršní činnosti k řešené problematice

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

Projekt byl řešen pouze na Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie FVHE VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Zaměření projektu je plně v souladu s výzkumným zaměřením Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie a směřuje do problematiky vyhodnocení vlivu vybraných vnějších faktorů na parametry vnitřního prostředí zvířat. Řešitelský kolektiv Ústavu chovu zvířat, výživy zvířat a biochemie FVHE VFU Brno je dlouhodobě orientován do oblasti ochrany zvířat, welfare a etologie, včetně působení stresorů, potažmo do problematiky vyhodnocování vlivu stresových, zátěžových faktorů na indikátory hematologického a biochemického profilu a parametrů oxidativního stresu u exponovaných zvířat, stejně jako do oblasti výživy drůbeže a hledání optimálních výživářských programů pro tuto kategorii potravinového zvířete v návaznosti na monitoring změn zdravotního stavu a produkčních ukazatelů. Dílčí výzkumné úkoly projektu jsou v souladu s výzkumným zaměřením Sekce chovu a ochrany zvířat a veřejného veterinárního lékařství a současně reflektují cíle výzkumných aktivit FVHE VFU Brno. Projekt je předpokladem pro začlenění vědecko-výzkumné činnosti ústavu do oblasti ochrany zvířat a welfare a je součástí institucionálního výzkumu v oblasti veterinárního lékařství a veterinární hygieny.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem prvního dílčího projektu bylo vyhodnocení zdravotního stavu drůbeže při zatížení transportním a manipulačním stresem v různých časových intervalech před jateční porážkou se zaměřením na změny hematologických a biochemických parametrů a indikátorů oxidačního stresu brojlerů kura

domácího. Cílem druhého projektu bylo vyhodnocení zdravotního stavu užitkových nosnic analýzou vybraných biochemických ukazatelů krevní plazmy v souvislosti s optimalizací krmných směsí.

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

Dílčí projekt 1: Odběr krve drůbeže byl realizován před porážkou na vykládce a ihned po usmrcení na porážkové lince, a to v definovaných intervalech trvání vykládky drůbeže na jatkách (na začátku směny, v přibližné polovině a na konci porážení). V jednom dni bylo odebráno celkem 90 vzorků krve pro hematologické a biochemické vyšetření a stanovení oxidativního stresu. Lipoperoxidace, míra oxidačního poškození proteinu a antioxidační kapacita plazmy byly měřeny spektrofotometricky s využitím standardizovaných laboratorních metod. Pro stanovení biochemických parametrů krve byly použity komerční sety pro rutinní diagnostiku na biochemickém analyzátoru (Sety Biovendor). Výsledky biochemických a ukazatelů oxidativního stresu byly korelovány s faktory přepravy, porážky či manipulace, statistické vyhodnocení bude provedeno v programu Unistat for Excel, verze 5.6 a v programu Statistical Analysis Software, SAS/STAT (SAS) pro multifaktoriální porovnávání výsledků. V další fázi projektu bude realizován odběr vzorků a stanovení hematologických a biochemických parametrů a parametrů oxidativního stresu ve stejném ročním období (leden-únor). V rámci projektu bude porovnán vliv dvou různých technologických systémů vykládky a porážky (malá jatka vs. velká jatka) na sledované ukazatele vnitřního prostředí drůbeže.

Dílčí projekt 2: V rámci projektu byly vytvořeny tři skupiny, tj. jedna skupina kontrolní a dvě skupiny pokusné se specifikovaným (50 % a 100 %) množstvím alternativní náhrady za sójový extrahovaný šrot. V projektu se vycházelo z již dosažených výsledků v průběhu snáškového období definovaného od 20. do 76. týdne věku za definovaných podmínek stájového chovu nosnic při respektování krmně technologických a zoohygienických podmínek. V rámci projektu byl posouzen zdravotní stav nosnic stanovením vybraných biochemických ukazatelů krevní plazmy nosnic. Získané údaje byly zpracovány a statisticky vyhodnoceny programem Unistat for Excel, verze 5.6 s využitím mnohonásobného porovnání pomocí Tukey HSD testu. Očekávaným výsledkem dílčího projektu bylo zvýšení produkční účinnosti diet na bázi alternativního zdroje vegetabilního proteinu v krmných směsích pro užitkové nosnice, a to při zachování jejich dobrého zdravotního stavu.

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

Dílčí projekt 1: V rámci projektu byly odebrány vzorky krve od 90 ks nosnic z jedné (stejně) dodávky. V krevní plazmě byly stanoveny produkty lipoperoxidace (TBARS), karbonylované proteiny (CP) a antioxidační kapacita (TEAC). V koncentraci karbonylovaných proteinů CP byl vysoce významný ($p < 0,01$) nárůst ve všech porážkových intervalech ve srovnání se skupinou nosnic odebraných na začátku směny na vykládce. Lipidní peroxidace TBARS vysoce významně ($p < 0,01$) narůstala u nosnic s vykládkou na konci směny a ve všech porážkových skupinách ve srovnání se skupinou nosnic odebraných na začátku směny na vykládce. Antioxidační kapacita TEAC vysoce významně ($p < 0,01$) klesala u nosnic s vykládkou na konci směny a ve všech porážkových skupinách ve srovnání se skupinou nosnic odebraných na začátku směny na vykládce. Mezi jednotlivými metodami stanovení ukazatelů oxidativního stresu byly rovněž nalezeny statisticky vysoce významné korelace ($p < 0,01$). Výsledky potvrzují významné souvislosti podmínek porážky drůbeže s parametry oxidativního stresu. Použité ukazatele oxidativního stresu mezi sebou mají vztah a lze je spolu s tradičními ukazateli stresu použít pro hodnocení welfare drůbeže při porážení. Porovnání s biochemickými ukazateli bude provedeno následně a statisticky vyhodnoceno v programu Unistat for Excel a Statistical Analysis Software, SAS/STAT (SAS). Dalším výsledkem dílčí části projektu je popis metody hodnocení welfare drůbeže ve vztahu k vybraným fyziologickým ukazatelům stresu.

Dílčí projekt 2: Studie měla za cíl ověřit, zda náhrada sójového šrotu šrotem lupiny bílé ovlivňuje biochemické ukazatele krevní plazmy nosnic, a ověřit produkční účinnost krmných směsí. Z výsledků je zřejmé, že dlouhodobé podávání krmných směsí s obsahem lupinového šrotu nemá negativní vliv na zdravotní stav a sledované parametry krevní plazmy nosnic. Výsledky experimentu na užitkových nosnicích dokládají vliv testované diety s 50 % šrotu ze semen lupiny bílé při jejím dlouhodobém podávání nosnicím na vybrané ukazatele metabolického profilu krve. Plazmatická koncentrace anorganických prvků u pokusných skupin se nelišila od hodnot v kontrole, pouze u vápníku došlo k mírnému snížení hodnot. Pozitivně lze hodnotit signifikantní snížení plazmatické koncentrace cholesterolu a triacylglyceridů, které by se mohlo projevit i snížením těchto ukazatelů ve vaječném žloutku nosnic, což může být odborným zájmem navazující studie. Použitá alternativní krmiva neovlivnila sledované parametry užitkovosti nosnic, náhrada sójového šrotu lupinou průkazně neovlivňuje hmotnost produkovaných vajec. Lupinový šrot v dietě pozitivně ovlivnil barvu žloutku, která byla hodnocena podle stupnice La Roche. U pokusných skupin byla zjištěna signifikantně vyšší intenzita zbarvení žloutku ve srovnání s kontrolou, vyšší intenzita zbarvení žloutku průkazně korespondovala s obsahem lupiny v dietě.

Dílčí výsledky byly prezentovány:

Timová, I., Kutlvašr, M., Straková, E., Všetičková, L., Suchý, P. Increasing the nutritional value of egg yolk fat using lupin meal in laying hen diet. In: *Nutrinet 2020*. Nitra 2020, 27. 8. 2020, s. 236–248. ISBN 978-80-552-2200-4 (ITA/FVHE 2420/TA202061)

Suchý, P., **Straková, E., Timová, I., Kutlvašr, M., Všetičková, L.** Vliv složení krmných směsí na nutriční hodnotu vajec užitkových nosnic. In: *Aktuální poznatky ve výživě a zdraví zvířat a bezpečnosti produktů 2020*. VÚŽV Uhřetěves 14. 10. 2020, s. 20–27. ISBN 978-80-7403-237-0 (ITA/FVHE 2420/TA202061)

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Dílčí projekt 1: Přínosem je propojení tradičních ukazatelů stresu s ukazateli na molekulární úrovni. Potvrzením souvislosti podmínek přepravy a porážky se změnami parametrů vnitřního prostředí lze popsat komplexní metodu pro hodnocení welfare drůbeže a při zajištění dobrých životních podmínek drůbeže při jejím jatečném využití zabezpečit produkci kvalitních produktů.

Dílčí projekt 2: Projekt přispívá k řešení problematiky optimalizace krmných směsí pro drůbež, kdy při zajištění standardně dobrého zdravotního stavu zvířat dochází vlivem unikátního složení krmiva ke zvýšení kvality živočišného produktu. Dieta, využívající krmné komponenty bohaté na zdroj n-3 a n-6 MK, příznivě ovlivní produkční potenciál při zachování dobrého zdravotního stavu nosnic.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Uplatnění výsledků projektu lze očekávat v oblasti vědecké, pedagogické, konzultační a poradenské. Výsledky projektu budou publikovány v časopisech s IF, některé již byly (viz výše uvedené příspěvky na mezinárodní a tuzemské konferenci) a další budou prezentovány na odborných konferencích.

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

Hostovský, M., Pešková, L. Transport and pre-slaughter handling stress and its effect on plasma biochemical parameters and parameters of oxidative stress in domestic chicken. *Poultry Science (Q1) / British Poultry Science (Q2)*

Hostovský, M., Dobšíková, R., Pešková, L., Zentrichová, V. The effect of pre-slaughter transport and handling stress on haematological and biochemical parameters and indices of oxidative stress in chicken. Poultry Science (Q1) / British Poultry Science (Q2)

Straková, E., Všeticková, L., Kutlvašr, M., Timová, I., Suchý P. Beneficial effects of substituting soybean meal for white lupin (*Lupinus albus*, cv. *Zulika*) meal on the biochemical blood parameters of laying hens. Italian Journal of Animal Science, Q1, IF 1,805 (r. 2019) – rukopis v recenzním řízení.

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční Prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	434.500,-	434.500,-
Služby	44.000,-	38.349,-
Cestovné	42.000,-	6.329,-
Další provozní náklady	593.402,-	634.724,-
Doplňkové náklady	167.085,-	167.085,-
Celkem	1,280.987,-	1,280.987,-

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

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

Osobní náklady:

Osobní náklady (434.500,- Kč) byly ve výši 334.500,- Kč (včetně odvodů) použity na mzdové náklady akademickým pracovníkům (doc. Dobšíková, prof. Straková, MVDr. Hostovský, doc. Pechová, Ing. Všeticková) a ve výši 100.000,- Kč na stipendia pro studenty doktorského studijního programu (Mgr. Pešková, MVDr. Zentrichová, Ing. Timová, Ing. Kutlvašr), kteří se podíleli na řešení projektu ITA.

Služby:

Náklady na služby, na projekt přidělené ve výši 44.000,- Kč, nebyly zcela vyčerpány (38.349,- Kč). Zbylé finanční prostředky (5.651,- Kč) byly přesunuty do kapitoly Další provozní náklady. V rámci nákladů na služby byly finanční prostředky čerpány na publikační aktivity, překladatelskou činnost, servis biochemického analyzátoru Indiko a servis a údržbu kopírky.

Cestovné:

Finanční prostředky z kapitoly Cestovné, na projekt přidělené ve výši 42.000,- Kč, nebyly z důvodu epidemiologické situace v souvislosti s COVID-19 a v souladu s vládními opatřeními z větší části vyčerpány (6.329,- Kč). Nevyužité finanční prostředky (35.671,- Kč) byly přesunuty do kapitoly Další provozní náklady. Cestovné bylo využito na realizované služební cesty, plánované v rámci projektu ITA 2020, a to:

- 05/2020: ÚKZÚZ Lípa u Havlíčkova Brodu: konzultace k lupině bílé jako bezpečné krmné komponentě pro výživu hospodářských zvířat, konzultace související s živinovým složením pokusných krmných směsí,

- 06/2020: Vědecký výbor výživy zvířat, VÚŽV Uhřetěves: jednání k organizačnímu zajištění konference „Aktuální poznatky ve výživě a zdraví zvířat a bezpečnosti produktů 2020“, propagace dílčích výsledků ITA

- 08/2020: Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích: jednání o využití výsledků ITA 2020 a jejich zavedení do praxe se zástupci JU ČB a předsedou ČAZV, jednání se zástupci společnosti Agrokomplex Šumava, jednání ve Strunkovicích nad Blanicí (ZEFA Nová Pec s.r.o., provoz chovu monogastrických zvířat)

Další provozní náklady:

Další provozní náklady, na projekt přidělené ve výši 593.402,- Kč, byly v souvislosti s přesunem finančních prostředků z kapitoly Služby a Cestovné (celkem 41.298,- Kč) navýšeny na 634.700,- Kč.

Další provozní náklady byly použity na pořízení níže uvedených položek:

- komerční kity pro biochemické vyšetření krve, chemikálie pro stanovení ukazatelů oxidativního stresu, chemikálie pro stanovení hematologických parametrů,
- laboratorní pipety,
- spotřební materiál (odběrové zkumavky, Eppendorf zkumavky, špičky, mikrotitrační destičky, analytické sáčky pro stanovení vlákniny, kruhové síto pro homogenizaci vzorků, patrony pro Soxhlet stanovení, sáčky s rychlouzávěrem, laboratorní stojany na zkumavky, stojan k sušení laboratorního skla, buničitá vata, časoměřič, izolační chňapka, navažovací lopatka apod.),
- kancelářské potřeby (papír, tonery do tiskárny, šanony, eurofolie, rychlovazače apod.).

Doplňkové náklady:

Jedná se o režijní náklady projektu ITA, které byly čerpány v přidělené výši (167.085,- Kč).

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu:

14. ledna 2021

doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

14. ledna 2021

doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.

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

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

Datum, jméno a podpis 14. ledna 2021 doc. MVDr. Radka Dobšíková, Ph.D.
přednosta ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Datum, jméno a podpis
správce rozpočtu: 15. ledna 2021 Ing. Jiří Rotrekl

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

Datum, jméno, podpis 15. ledna 2021 doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.
děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště:

Razítko

Závěrečná zpráva Projektu ITA VFU Brno na rok 2020

(vyplní řešitel)

1. Identifikační číslo projektu: FVHE/Vorlová /ITA2020

2. Název projektu:

Vliv potravinářských technologií a kulinárních úprav na kvalitu a bezpečnost potravin včetně pokrmů

3. Řešitel projektu:

Titul, jméno a příjmení: Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

Fakulta/celoškolské pracoviště: Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie VFU Brno

E-mail: vorloval@vfu.cz

Telefon: 541562715, 602116930

4. Řešitelský kolektiv:

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

Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D., profesor, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - koncepce a koordinace projektu a dílčích aktivit, kontrola plnění požadavků schváleného návrhu projektu, podíl na analýze získaných výsledků, podíl na realizaci publikací, vypracování Závěrečné zprávy projektu o řešení projektu a účast na obhajobě projektu v rámci obhajob projektů ITA VFU Brno.

Doc. MVDr. Hana Buchtová, Ph.D., docent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - koncepce a koordinace Aktivita 1, zajištění vzorků, kulinární příprava vzorků, senzorické a chemické laboratorní vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací.

Ing. Fouad Ali Abdullah ABDULLAH, Ph.D., akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - zajištění vzorků, kulinární příprava vzorků, senzorické a chemické laboratorní vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 1).

Doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D., docent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - příprava rešeršního (mikrobiologicko-biochemického) zázemí pro sepsání publikace, mikrobiologické vyšetření, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 1), molekulárně-biologické analýzy (Aktivita 4).

Ing. Klára Bartáková, Ph.D., akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – koordinace sběru a zpracování vzorků a průběhu analýz jednotlivých parametrů, analýza získaných výsledků, majoritní podíl na realizaci publikace (Aktivita 2); vyšetření spektra mastných kyselin, analýza a statistické hodnocení získaných výsledků, příprava publikací (Aktivita 1).

doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D., akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – analýza obsahu tuku, podíl na plánu sběru vzorků a na realizaci publikace (Aktivita 2).

RNDr. Ivana Borkovcová, Ph.D., akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – analýza a vyhodnocení většiny parametrů (hydrofilní složka mléka – sacharidy, hydrofilní vitamíny, proteiny) (Aktivita 2); majoritní podíl na analyticko-hodnotících pracích (Aktivita 3).

MVDr. Sandra Dluhošová, Ph.D., akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – příprava vzorků k jednotlivým analýzám, analýza a vyhodnocení lipofilní složky mléka, podíl na realizaci publikace (Aktivita 2).

Mgr. Jan Pospíšil, akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – příprava vzorků k jednotlivým analýzám (Aktivita 2); podíl na analyticko-hodnotících pracích spojených s laboratorním vyšetřením spektra mastných kyselin, zapracování příslušné stati do publikace (Aktivita 1).

Ing. Zuzana Škraňková, akademický pracovník Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie – sběr a příprava vzorků k jednotlivým analýzám, příprava podkladů pro sepsání publikace (Aktivita 2).

MVDr. Navrátilová P. Ph.D., asistent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - koordinace Aktivita 3, podíl na praktické realizaci projektové metodiky, analýza získaných výsledků, majoritní podíl na realizaci publikace.

MVDr. Šťástková Zora, Ph.D., asistent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - podíl na praktické realizaci projektové metodiky, na analýze získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3).

MVDr. Bednářová Ivana, Ph.D., asistent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - podíl na praktické realizaci projektové metodiky, na analýze získaných výsledků, podíl na realizaci publikace (Aktivita 3).

Doc. MVDr. Josef Kameník, CSc., MBA, docent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - řízení a koordinace projektu, odpovědnost za čerpání prostředků (Aktivita 4).

Mgr. Marta Dušková, Ph.D. odborný asistent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - stanovení rezistencí k AML, molekulárně-biologické analýzy (Aktivita 4).

Mgr. Kateřina Dorotíková, asistent, akademický pracovník, Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie - stanovení rezistencí k AML, molekulárně-biologické analýzy (Aktivita 4)

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

Všechny dílčí aktivity projektu byly řešeny na Ústavu hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie na Fakultě veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno.

6. Obsah projektu

Začlenění projektu do rámce výzkumu VFU Brno:

Předmětem řešení je problematika bezpečnosti, zdravotní nezávadnosti a kvality potravin živočišného původu, která je vysoce aktuálním tématem spojeným nejen se změnami životního stylu obyvatel, změnami ve stravovacích návycích a způsobech stravování, ale i s globalizací potravinového řetězce. Projekt naplňuje stanovené priority soutěže - problematika zdravotní nezávadnosti, hygieny a kvality potravin a je v souladu s podporovanými směry výzkumu na Fakultě veterinární hygieny a ekologie VFU Brno.

Cíle projektu (max. 5 řádků):

Cílem projektu (členěného do čtyř dílčích cílů) bylo stanovit vliv vybraných technologií a kulinárních úprav na parametry zdravotní nezávadnosti a jakosti potravin živočišného původu, resp.: vliv různých úprav a druhu použitého tuku u tresky, lososa a kapra; vliv tepelného ošetření na nutrienty ESL mléka (i delaktózovaného); vliv cefalosporinových antibiotik na aktivitu jogurtových kultur; charakteristika a typizace kmenů oportunně patogenních bakterií izolovaných z provozoven stravovacích služeb a pokrmů.

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

Řešení projektu spočívalo v řešení čtyř aktivit (cílů). Aktivita 1 se zabývala vlivem kulinární úpravy vybraných druhů ryb na parametry zdravotní nezávadnosti a kvality finální potraviny. Řešení spočívalo v realizaci pokusů následujících postupně za sebou, a to aplikace koření Sumah na fileť kapra v různých koncentracích a dobách skladování; v ověření vlivu rozdílné tepelné úpravy a použitého tuku u čerstvých filetů tresky a lososa; v aplikaci a ověření vlivu studeného kouře na fileť lososa.

V rámci Aktivit 2 byla provedena kvantifikace významných nutričních látek (syrovátkové bílkoviny, sacharidy, vitamíny) v ESL mléce konvenčním a delaktózovaném, odebraném přímo z mlékárny, z jednotlivých kroků výroby (syrové, různým způsobem pasterované a po působení laktázy v případě delaktózovaného mléka) a hotového zabaleného výrobku k následnému skladování a analýzám po dobu deklarované trvanlivosti. Vybrané parametry byly stanoveny metodami kapalinové chromatografie.

V rámci Aktivit 3 byla testována citlivost 4 jogurtových kultur (Christian Hansen) k reziduíům cefalosporinů v mléce registrovaných k intramamární aplikaci u dojníc. Citlivost kultur byla sledována u uměle obohacených vzorků mléka cefalosporiny o koncentraci MRL na základě metabolické aktivity kultury. Na začátku a na konci fermentačního procesu byla stanovena, kromě dalších parametrů, koncentrace organických kyselin kapalinovou chromatografií (RP HPLC).

V rámci Aktivit 4 bylo ze 17 provozoven stravovacích služeb (prostředí, personál) a pokrmů získáno 125 izolátů *Escherichia coli*, 192 izolátů *Staphylococcus aureus* a 157 izolátů *Bacillus cereus*. Pro jejich druhovou identifikaci a detekci genů virulence bylo využito metod PCR a MALDI-ToF MS. Rezistence izolátů *E. coli* k antimikrobiálním látkám byla stanovena pomocí diskové difúzní metody.

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

Aktivita 1: Aplikace Sumah koření v závislosti na koncentraci ovlivnila pozitivně parametry filetu kapra (inhibice proteolytických procesů, zvýšení lipolytických dějů, inhibice procesů sekundární oxidace. Druhy tepelných úprav a použitého tuku ovlivnily rovněž chemické parametry ve vzorcích lososa i tresky, obsah tuku a profil mastných kyselin, proteolytické procesy a sekundární oxidační děje. Obsah PAH se zvyšoval v závislosti na prodlužující se době aplikace studeného kouře, avšak limity překročeny nebyly. V případě pokusu s cílem určení predikce růstu patogenů měla statisticky významný vliv na počet *Salmonella* spp. a *L. monocytogenes* délka uzení, doba skladování na počet bakterií vliv neměla.

Výsledky aktivity 2 ukázaly vliv technologie výroby ESL delaktózovaného vs. konvenčního mléka na jeho chemické složení. Významné rozdíly byly zjištěny např. v obsahu syrovátkových proteinů. ESL delaktózované mléko obsahuje pouze 372 ± 19 mg/l α -laktalbuminu a 64 ± 8 mg/l β -laktoglobulinu, zatímco ESL konvenční mléko obsahuje 1005 ± 21 mg/l α -laktalbuminu a 1397 ± 32 mg/l β -laktoglobulinu. Samotná technologie ESL má na snížení obsahu syrovátkových proteinů výraznější vliv než běžná pasterace. Významné rozdíly byly stanoveny také v zastoupení sacharidů.

V rámci aktivity 3 bylo zjištěno, že z reziduí cefalosporinů I., III. a IV. generace (cefazolin, cefalexin, ceftiofur, cefoperazon, cefchinom) nejvýznamněji ovlivňuje aktivitu jogurtových kultur ceftiofur, který v koncentraci 100 μ g/kg (MRL) působí úplnou inhibicí růstu a metabolické aktivity kultur již na začátku fermentačního procesu.

V rámci aktivity 4 byl u izolátů *S. aureus* potvrzen výskyt genů pro produkci stafylokokových enterotoxinů v 51,6 % případů (99/192). Geny kódující produkci alespoň jednoho typu sledovaných

toxinů *B. cereus* byly detekovány u 100 % (157/157) izolátů. V případě *E. coli* nebyla zjištěna přítomnost žádného z virulentních faktorů (stx1, stx2, eae, hly), nicméně 45,6 % (57/125) izolátů bylo rezistentních vůči působení jednoho nebo více z vybraných 13 antibiotik, z toho vykazoval téměř každý třetí izolát multirezistenci (28,1 %) a u jednoho byla zaznamenána polyrezistence (1,8 %).

Přínos projektu (max. 5 řádků):

Realizací projektu byly získány nové relevantní údaje: o vlivu různých úprav na vybrané parametry zdravotní nezávadnosti a jakosti tresky, lososa a kapra; o vlivu tepelného ošetření na vybrané nutrienty ESL mléka: konvenční versus delaktózané; o vlivu cefalosporinových antibiotik na aktivitu jogurtových kultur; ke zlepšení hygienické situace provozoven, k prevenci vzniku onemocnění z potravin a získání informací o rozšíření rezistentních kmenů *E. coli*.

Využití výsledků (max. 5 řádků):

Výsledky budou využity k přípravě vědeckých a odborných publikací a konferenčních příspěvků a rovněž budou sloužit k doplnění/obohacení výuky odborných hygienických předmětů studijních programů FVHE VFU Brno. Výsledky budou taktéž předány mlékárně, z níž vzorky ESL mléka pocházejí, pro možné využití např. při označování obalů. Výsledky zvýší informovanost o úrovni mikrobiální kontaminace ve stravovacích službách a dále budou využity k inovaci postupů HACCP.

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

Časopisy s IF:

- Vliv různých úprav na vybrané parametry zdravotní nezávadnosti a jakosti tresky a lososa. *Foods* (Q1)
 - Vliv koření Sumah na antioxidační kapacitu a další vybrané chemické a mikrobiologické parametry filetu kapra. *Foods* (Q1)
 - Vliv kulinární úpravy na profil mastných kyselin lososa a tresky po tepelné úpravě. *LWT – Food Science and Technology* (Q1)
 - Vliv tepelného ošetření na vybrané nutrienty ESL mléka: konvenční versus delaktózané. *LWT – Food Science and Technology* (Q1)
 - Vliv cefalosporinových antibiotik na aktivitu jogurtových kultur. (*Foods* nebo *International Dairy Journal*) (Q1)
 - Properties of *Staphylococcus aureus* strains from food service facilities. *Journal of Food Safety* (Q3)

Časopisy odborné:

- Vliv délky uzení studeným kouřem na počet *Salmonella* spp. a *Listeria monocytogenes*. *Maso*

8. Náklady na řešení projektu (v Kč)

Položka	Finanční prostředky	
	Přidělené (v Kč)	Čerpané (v Kč)
Osobní náklady celkem (včetně odvodů)	1 246 981,21	1 246 981,00
Služby	187 950,00	194 774,01
Cestovné	75 546,00	0
Další provozní náklady	1 050 216,00	1 118 937,99
Doplňkové náklady	384 103,00	384 103,00
Celkem	2 944 796,00	2 944 796,00

Zdůvodnění nákladů: (max ½ strany)

Osobní náklady: Osobní náklady v plánované výši 1 246 981 (včetně odvodů), resp. 931 974,-Kč (bez odvodů) byly využity na odměnu řešiteli a spoluřešitelům (akademičtí pracovníci ústavu 2360), za podíl na realizaci projektu: za řešení dílčích experimentů a zajištění vzorků, laboratorních analýz, zpracování a hodnocení výsledků, za kontrolu řešení projektu, za vypracování podkladů k závěrečné zprávě, za přípravu publikací. **Služby:** Finanční prostředky přidělené na služby byly čerpány v částce 194 774,01 Kč. Přidělená částka byla navýšena o částku 6 824,01 Kč z položky „Cestovné“. Konkrétní použití prostředků bylo na: zaplacení analýz indikátorových PAH SVÚ Jihlava, na provedení celkové údržby a servisních služeb na analyzátoch používaných v rámci projektu k analýzám vzorků, na zaškolení pro práci se systémem Empower, který je využíván při práci s HPLC a na jazykovou korekturu textu článku v anglickém jazyce. **Cestovné:** Prostředky plánované na cestovné ve výši 75 546,- Kč nemohly být z důvodu epidemiologické situace spojené s Covid-19, díky které byly zrušeny tradiční konference i plánované odborné stáže pro studenty DSP, uskutečněny. Prostředky byly ve výši 68 721,99 Kč převedeny a čerpány v položce „Další provozní náklady“ a dále ve zbývající výši 6 824,01 Kč převedeny a čerpány v položce „Služby“. **Další provozní náklady:** Z položky ve výši 1 118 937, 99, - Kč (navýšení viz výše) byl financován nákup vzorků potravin, mlékařenských kultur, gastro potřeb (hrnců, obalů, misek, pilin k uzení a filtračních sít), filtračních papírů a celulózových patron, tlakové lahve s héliem, standardů stanovovaných látek a dalšího materiálu pro GC, HPLC, chromatografických kolon, spotřebního laboratorního materiálu pro chromatografickou analýzu, spotřebního laboratorního materiálu pro mikrobiologickou analýzu (buničitá vata, Petriho misky, špičky, kličky, krabičky na archivační zkumavky), konfirmačních testů, dezinfekce, kultivačních médií, sbírkových kmenů, PCR komponent (PPP Master Mix, PCR voda, primery, marker) a ATB disků; dále rozpouštědel a chemikálií, laboratorního skla, elektrod, jednorázového plastového spotřebního materiálu, ostatního drobného materiálu, kancelářských potřeb, tonerů a pohonných hmot pro dopravu vzorků. **Doplňkové náklady:** Byly čerpány v předepsané výši 15 % z celkových nákladů, v částce 384 103, 00,- Kč.

Přehled čerpání přidělených finančních prostředků – Výpis z IFIS.

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

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

Řešitel projektu prohlašuje, že údaje uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé a potvrzuje, že 1) získané výsledky budou neprodleně uplatněny jako výsledek uznatelný v registru informací o výzkumu (RIV), že 2) publikaci zašle do časopisu tak, aby byla přijata k zveřejnění **do 18 měsíců** od ukončení řešení projektu, že 3) publikace bude obsahovat odkaz na podporu ITA VFU Brno bez odkazů na podporu dalších grantů, projektů a ji, podobným finančním zdrojům, a že 5) doručí kopii této publikace po jejím zveřejnění ITA VFU Brno.

Datum, jméno a podpis

řešitele projektu: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

Člen řešitelského týmu – akademický pracovník – odpovědný za čerpání prostředků prohlašuje, že údaje týkající se finančních prostředků uvedené v této závěrečné zprávě Projektu ITA VFU Brno pro rok 2020 jsou pravdivé, a že prostředky na řešení projektu byly čerpány v souladu

s Pravidly pro poskytování účelové podpory na institucionální výzkum VFU Brno, podle dalších pokynů ITA VFU Brno a podle rozhodnutí o přijetí projektu.

Datum, jméno a podpis

člena řešitelského týmu **odpovědného za čerpání prostředků**: prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

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

Datum, jméno a podpis

přednosty ústavu nebo kliniky nebo vedoucího celoškolského pracoviště: doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

Datum, jméno a podpis

správce rozpočtu: Ing. Jiří Rotrekl

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

Datum, jméno, podpis

děkana fakulty nebo vedoucího celoškolského pracoviště: doc. MVDr. Bohuslava Tremlová, Ph.D.

Razítko