

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav hygieny a technologie mléka

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

Koordináční místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA v ČR,

Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

XX. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

konaná v roce 100. výročí založení

Vysoké školy zvěrolékařské

Sborník příspěvků

VFU Brno, 30. 5. 2018



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

ISBN 978-80-7305-799-2

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

Slovo úvodem

Letošní, již XX. ročník konference, se koná v roce 100. výročí založení Vysoké školy zvěrolékařské. Tak, jak si postupně tato instituce upevňovala své postavení v rámci vysokého školství střední Evropy, tak si i tato konference během dvaceti let svého pořádání upevnila své místo v postgraduálním univerzitním vzdělávání. S postupujícím časem a vývojem společnosti se do popředí zájmu dostává, kromě schopnosti komunikovat a umět prezentovat své výsledky, i vzájemný vztah školitele a studenta DSP. Posilování schopnosti předávat zkušenosti a dovednosti mladým lidem je nedílnou a nezbytnou součástí dovedností akademického pracovníka a současně hnacím motorem posunu vědění.

Přejme si tedy do další dvacítky konaných ročníků konference mnoho nadšených a iniciativních studentů, motivovaných erudovanými školiteli s cílem posilování dobrého jména naší Alma mater kvalitními vědeckými výsledky.

prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Sledování hygienické úrovně prostředí v průběhu přípravy pokrmů v provozovnách závodního stravování	
Strejček J., Bogdanovičová K., Dušková M., Kameník J.	9
Charakteristika Shiga toxin produkujejících kmenů <i>Escherichia coli</i> izolovaných od zvířat	
Kučerová D., Koláčková I., Karpíšková R.	14
Plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu: hrozba i pro Českou republiku?	
Baráková A., Gelbíčová T., Pospíšilová L., Karpíšková R.	17
Prevalence a epidemiologická charakteristika <i>Listeria monocytogenes</i> v syrovém baleném mase z tržní sítě	
Pospíšilová L., Gelbíčová T., Tomáščíková Z., Karpíšková R.	20
Detection and characterization of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> isolated from milk samples of cows, sheep, and goats in the Czech Republic	
Tegegne H. A., Koláčková I., Karpíšková R.	23
Mikrobiálne screeningové metódy v analýze reziduí antimikrobiálnych látok v potravinách živočíšneho pôvodu – súčasný prehľad	
Juščíaková D., Kožárová I.	26
Význam enzymů v mede	
Tkáč M., Vorlová L., Kaniová L., Dluhošová S., Steinhauserová I.	30
Využitie viacnásobnej faktorovej analýzy pre hodnotenie bryndze	
Semjon B., Král M., Pospiech M., Reitznerová A, Maľová J., Tremlová B., Dudriková E., Mačanga J., Maľa P.	33
Hodnocení enologických parametrů moravských vín v závislosti na skladovacích podmínkách	
Javorský J., Král M., Tremlová B.	36
Vliv kyseliny askorbové na intenzitu zbarvení karagenanů	
Bartlová M., Pospiech M., Javůrková Z., Luňáková L., Běhalová H., Tremlová B.	38
Účinnost vybraných desinfekčních prostředků na kyselinu mléčnou v extraktoru	
Horák R., Ošťádalová M., Tremlová B.	41
Using flaxseed dietary meal in the manufacture of process cheese spreads	
Troshchynska Y., Filipová T., Štětina J.	44
Detection of allergens in food samples using conjugated quantum dots as a labelling tool	
Luňáková L., Tremlová B., Pospiech M., Javůrková Z., Bartlová M.	47
Possible methods of processing durable fermented meat product for SEM	
Běhalová H., Plšková M., Pospiech M., Tremlová B.	50

SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ

Vliv náhrady sójového šrotu šrotem z lupinových semen v krmných směsích na produkční ukazatele vykrmovaných kuřat a kachen Jeřábek M., Suchý P., Straková E.	55
---	----

SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE

<i>Enterobacteriaceae</i> isolates resistant to beta-lactam antibiotics from chicken farms in Paraguay Nešporová K., Literák I., Dolejská M.	61
Development of new method for detecting rare tick-borne diseases Balážová A., Baláž V., Široký P.	64
Development of methods for <i>Dermacentor reticulatus</i> population structure analysis Bilbija B., Papoušek I., Široký P.	67
The possible use of brine shrimp <i>Artemia franciscana</i> in processing water samples for the diagnosis of <i>Cryptosporidium</i> spp. Hatalová E., Valenčáková A., Špalková M.	71

SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA

Porovnání digitálního vyhodnocení alternativního biotestu na <i>Artemia franciscana</i> se stávající metodou Kovářík L.	77
--	----

SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT

Analýza stresové zátěže laboratorních králíků, užívaných pro výuku předmětu Farmakologie II na VFU Brno Kramářová E., Chloupek J., Urbanová M., Najmanová M.	83
Morbidita psů v útulku Vitulová S., Voslářová E., Volfová M., Večerek V.	86
Trends in transport-related mortality rates in turkeys transported for slaughter Machovcová Z., Večerek V., Voslářová E.	89
Behavioral changes in Black-and-white ruffed Lemurs (<i>Varecia variegata</i>) in response to their transport Volfová M., Voslářová E., Večerek V.	92
Příčiny úhynu a eutanazie psů v útulku (nesoutěžní příspěvek) Vitulová S., Voslářová E., Volfová M., Večerek V.	95

SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN

Detekcia DNA poškodenia využitím kométovej analýzy pro expozicii tiaklopridom Koleničová S., Holečková B., Galdíková M., Dražovská M., Šivíková K., Dianovský J. .	101
Ekotoxicita platinových nanočástic pro vodní organismy Hlávková D., Havelková B., Beklová M.	104

Toxické účinky stříbrných nanočástic a iontů na embrya dánia pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	
Čaloudová J., Hodkovicová N., Berlinská J., Maršálek P., Panáček A., Svobodová Z. ...	107
Vliv antidepressiva venlafaxine na genovou expresi biotransformačních enzymů embryí <i>Danio rerio</i>	
Hodkovicová N., Sehonová P., Blahová J., Faldyna M., Dobšíková R., Svobodová Z. ...	110
The effect of sulfamethoxazole on oxidative stress indices in zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	
Tokanová N., Doubková V., Svobodová Z., Blahová J., Maršálek P., Dobšíková R.	113
Vliv léčebných koupelí v roztoku formaldehydu na vybrané parametry u ryb	
Chmelová L., Svobodová Z., Tichý F.	116
SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD	
Optimalizace testu blastické transformace lymfocytů u lososovitých ryb	
Minářová H., Ondráčková P., Palíková M., Syrová E., Mareš J., Faldyna M.	121
Vývoj postupu tlumení nálezů ryb podle aktuálně platné legislativy	
Filášová L., Palíková M.	124
Different susceptibilities of salmonid fish to proliferative kidney disease	
Syrová E., Kováčová V., Papežiková I., Minářová H., Palíková M.	127
Monitoring of infectious diseases in zoo animals with use of non-invasive blood sampling methods	
Kvapil P., Harej M., Račnik J., Kastelic M., Bártová E.	130
Direct detection of <i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i> and <i>Encephalitozoon</i> spp. in vespertilionid bats from Central Europe	
Marková J., Pittermannová P., Bártová E., Sedláčková J., Bandouchová H.	133
Výskyt parazitárních mikrosporidií <i>Encephalitozoon</i> spp. u volně žijících hlodavců v ZOO Brno	
Pittermannová P., Marková J., Žákovská A., Bártová E.	136
Semen cryopreservation in captive birds of prey	
Piaček V., Kováčová V., Heger T., Pikula J.	139
Krvné parazity jašteric <i>Lacerta schreiberi</i>	
Zechmeisterová K., Papoušek I., Široký P.	142

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Sledování hygienické úrovně prostředí v průběhu přípravy pokrmů v provozovnách závodního stravování

Monitoring of the hygiene standards environment during the preparation of meals in the catering establishments

¹Strejček Jan, ¹Bogdanovičová Kateřina, ^{2,3}Dušková Marta, ¹Kameník Jozef

¹Ústav gastronomie, ²Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

³Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Summary

The study focuses on the identification of microbiological hazards as a risk factor for professionally prepared meals in canteens (closed units). There were six public canteens. In the period of time from Spring 2016 to Winter 2017, 206 samples were taken, 136 of them being from the catering premises and 70 samples were obtained from the hands of food handlers. The smears were taken by a sterile abrasive sponge at the catering premises and using a Glove-juice method to get samples from the hands. The results were monitored by food-borne agents, *Staphylococcus aureus* (11.7 %), *Bacillus cereus* (36.9 %) and *Listeria monocytogenes* (0.5 %). In addition, the presence of *Escherichia coli* (17.0 %), as well as the most frequent diseases of foodborne agents *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp., which were not detected, were investigated. Microbial condition of catering facilities in the Czech Republic can be accounted at least risky, considering the presence of foodborne agents. Due to possible danger of alimentary intoxication, monitoring of potentially pathogenic bacteria in catering facilities is the first step to ensure quality and safety of the meals being served.

Keywords: canteen; food safety; foodborne pathogen; good hygiene practices; *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*; *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli*

Úvod

K otravě z jídla dochází především z důvodu konzumace potravy kontaminované mikroorganismy nebo jejími toxiny. Kontaminace potravin či pokrmů je spojována s neadekvátními metodami uchovávání potravin, nehygienickou manipulací s potravinami, křížovou kontaminací z ploch přicházející do přímého styku s potravinami nebo přímo z pracovníků provozu stravovacích služeb (Barrie, 1996). Nežádoucí kontaminace potravin během vaření, která vede k vypuknutí onemocnění z potravin, může představovat nebezpečí pro zdraví spotřebitelů a nežádoucí ekonomické důsledky pro společnost (Annor et al., 2011).

Cílem studie byla identifikace mikrobiologického nebezpečí jako rizikového faktoru při přípravě pokrmů ve vybraných provozovnách závodního stravování.

Materiál a metodika

V časovém horizontu duben 2016 až prosinec 2017 byly odebírány stěry z povrchu gastronomického zařízení a stěry z rukou pracovníků v 6-ti provozovnách stravovacích služeb uzavřeného typu (závodní jídelny, kantýny). Provozovny se nacházely v kraji Vysočina a na území Jihomoravského kraje. Celkem bylo odebráno 206 vzorků. Stěry z gastronomického zařízení (n=136) byly odebrány především z madel konvektomatů, chladicího a mrazicího zařízení, pracovních ploch určených pro přímý styk s potravinami, z technologického zařízení (varné kotle, pánve, sporák apod.), z šokérů, z nástrojů a pomůcek využívaných při výrobě pokrmů a při jejich servírování konečnému spotřebiteli. Stěry z rukou (n=70) byly odebrány pracovníkům v průběhu výroby a výdeje (servírování) pokrmů konečným spotřebitelům. Jako odběrový materiál byly použity sterilní abrazivní houbičky s 10 ml sterilní pufrované vody. Pro stěry z rukou pracovníků byla použita technika tzv. Glove-juice testu (Waterman et al.,

2006) za použití sterilních chirurgických rukavic a sterilní pufrované peptonové vody.

V rámci studie docházelo ke sledování přítomnosti bakterií *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. a *Listeria monocytogenes*. Detekce *E. coli* byla prováděna referenční metodou dle ČSN EN ISO 16649 – 2. K detekci genů kódujících vybrané faktory virulence (*ea*e, *hly*, *stx*₁ a *stx*₂) byla použita multiplex polymerázová řetězová reakce (PCR) dle autorů Fagan et al. (1999). Přítomnost bakterie *S. aureus* byla prováděna podle ČSN EN ISO 6888 – 1. Izolované kmeny byly následně potvrzovány pomocí PCR, a to detekcí specifického úseku SA442 (Martineau et al., 1998). U izolátů byly detekovány geny kódující tvorbu enterotoxinů (*sea* – *sej*) pomocí multiplex PCR dle autorů Monday et al. (1999). *Bacillus cereus* byl detekován podle ČSN EN ISO 7932. Konfirmace izolovaných kmenů byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (Yamada et al., 1999). Pro detekci *Salmonella* spp. byla použita metoda dle ČSN EN ISO 6579. K detekci *Campylobacter* spp. bylo využito metody ČSN EN ISO 10272 – 1. Přítomnost bakterií *Listeria monocytogenes* byla stanovena podle ČSN EN ISO 11290 – 1. U kmene *L. monocytogenes* byl stanoven makrorestrikční profil pomocí pulzní gelové elektroforézy. Pulzní gelová elektroforéza byla prováděna dle protokolu PluseNet Europe použitím kombinace restrikčních endonukleáz *Ascl* a *Apal* (Graves a Swaminathan, 2001).

Výsledky

V rámci prováděné studie bylo celkem analyzováno 206 vzorků. Nejvyšší záchyty vykazovala bakterie *B. cereus*, a to až v 36,9 % případů. Přítomnost této bakterie byla ve velkém měřítku (n = 59; 28,6 %) zjištěna na povrchu technologického zařízení (konvektomaty, sporáky, šokéry atd.), pracovních ploch přicházející do přímého styku s potravinami, madla chladicího či mrazicího zařízení a pomocných nástrojů používaných při výrobě pokrmů. Řada gastronomického vybavení byla situována ve finálních fázích procesu, tedy v místech, kdy dochází k tepelné úpravě pokrmů a zároveň i k finální kompletaci před podáváním pokrmů konzumentům. Významný záchyt *B. cereus* byl i na ruce pracovníků podílejících se na výrobě či výdeji pokrmů (n = 17; 8,3 %). K významnému záchytu došlo zároveň i u bakterie *S. aureus* (n = 24; 11,7 %). Stejně jako bakterie *B. cereus*, se i bakterie *S. aureus* nacházela na povrchu technologického zařízení (n = 14; 6,8 %) a na ruce pracovníků v průběhu výroby a výdeje pokrmů (n = 10; 4,9 %). U izolovaných kmenů byla ve 12-ti případech potvrzena přítomnost genů pro produkci stafylokokových enterotoxinů (A, B, G, I, J), což představovalo až 10,3 % pozitivních vzorků. Bakterie *Escherichia coli* byla detekována v 35 případech (17,0 %). U izolovaných kmenů *E. coli* byly dále sledovány geny kódující faktory virulence. Studie byla zaměřena na tzv. Shiga-like toxigenní *Escherichia coli* (označovány dle faktorů virulence jako STEC). Ani v jednom případě nedošlo k potvrzení STEC. *L. monocytogenes* byla detekována pouze v jednom případě (0,5 %). Místem detekce byla krájecí plocha pro přípravu syrového masa. Dle pulzní gelové elektroforézy byl u detekovaného kmene potvrzen serotyp 1/2a, který se nejčastěji podílí na vypuknutí alimentárního onemocnění. *Salmonella* spp. a *Campylobacter* spp., jako nejčastější původci gastroenteritid, nebyli detekováni.

Diskuze

Světová zdravotnická organizace (World Health Organization) informovala, že na celém světě je každým rokem nakaženo přibližně 600 miliónů lidí konzumací zdravotně závadné potraviny. Alimentární onemocnění si ročně vyžádají na 420 000 životů (WHO, 2017). Podobná situace je sledována i na území České republiky. Za rok 2017 bylo sledováno celkem 11 779 případů salmonelóz a 24 508 případů kampylobakterióz (EPIDAT, 2017). Dle nejnovější zprávy Evropského úřadu pro bezpečnost potravin mají dominující roli ve vzniku a šíření hromadných onemocnění z potravin provozovny společného stravování. Ty zahrnují restaurace, kantýny, školní jídelny a další zařízení podobného typu. Hned druhý největší podíl

na vypuknutí ohnisek alimentárních nákaz má, po bakteriálních původcích, skupina bakteriálních toxinů, která zahrnuje také enterotoxiny produkované bakterií *Staphylococcus aureus* nebo *Bacillus cereus* (EFSA, 2017). V Itálii byla v letech 1996-2000 prováděna studie, která popisuje až 31 případů alimentárního onemocnění v závodním stravování (Faustini et al., 2003). Námi zjištěné výsledky potvrzují schopnost především bakterií *B. cereus* a *S. aureus*, uplatnit se jako původce alimentárních nákaz v provozovnách veřejného stravování. *B. cereus* především díky vlastnosti tvořit endospory přežívá řadu nepříznivých podmínek. Velmi významná je schopnost produkce toxinů (termostabilní se označuje emetický a termolabilní jako diarhogenní) (Granum a Lund, 1997). Emetický toxin je spojován velmi často s konzumací vařené rýže, těstovin a ostatních pokrmů obsahující velké množství škrobu. Diarhogenní syndrom je spíše spojován s konzumací zeleninových, mléčných výrobků a masa. Nejvíce případů je pak spojováno s pomalým procesem zchlazování a uskladnění finálních či rozpracovaných výrobků při neodpovídající teplotě (Pexara a Govaris, 2010). Italská studie uvádí, že je *B. cereus* majoritní původce alimentárních nákaz v provozovnách společného stravování. Potvrzuje to i studie v Německu, která uvádí, že v letech 1985 až 2000, byl *B. cereus* odpovědný přibližně za 30 % případů alimentárních nákaz v provozovnách společného stravování (Kleer et al., 2001). *B. cereus* je také spojován s vypuknutím alimentárního onemocnění v Rakousku v roce 20007 (Much et al., 2009) a v roce 2012 v jihovýchodní Anglii (Nicholls et al., 2016). *S. aureus* se velmi často nachází na sliznici dutiny ústní a nosohltanu, zároveň i na rukou, což představuje značné potencionální riziko v rámci potravinářské výroby (Todd et al., 2010). Námi zjištěné výsledky tuto skutečnost potvrzují. Svoji rizikovost si nese i díky schopnosti produkce termostabilních toxinů (SEs), jak popisuje řada studií (Hennekinne et al., 2012). V Austrálii jsou SEs odpovědné za přibližně 30 % případů alimentárních nákaz od roku 2000, které jsou spojené s komerčním stravováním (Pillsbury et al., 2013). V roce 2012 byl v Austrálii zaznamenán případ, kdy onemocnělo 22 konzumentů po požití smažené rýže, která byla připravena s jednodenním předstihem (Pillsbury et al., 2013). Mikrobiologickou kontaminací ve stravování se v letech 2003 – 2008 zabývali také v Rumunsku. Ve studii docházelo k detekování především bakterie *S. aureus* s produkcí stafylokokového enterotoxinu A (Ivana et al., 2009). *S. aureus* se v potravinářství uplatňuje mimo jiné i díky schopnosti tvořit biofilm (Hennekinne et al., 2012), což má velký význam při dodržování optimálních čistících a dezinfekčních procesů. *L. monocytogenes* je ubikvitární mikroorganismus vyznačující se svou vysokou mortalitou (až 30 %) (Silk et al., 2012) a schopností přežít i nízké teploty (0 – 4 °C) (Gillespie et al., 2006). Onemocnění zvané listerióza je riziková především pro skupiny osob s oslabenou imunitou (malé, děti, senioři, imunosupresivní jedinci), což také popisuje řada studií (Todd a Notermans, 2011). V potravinářské výrobě se bakterii *L. monocytogenes* věnuje neustálá patřičná pozornost i díky schopnosti tvořit biofilm (Stessl et al., 2014). Svou roli tedy hraje i podmínkách závodního stravování, kdy může být vhodným původcem alimentárního onemocnění (např. pokrmů studené kuchyně) (Little et al., 2008).

Závěr

I přes celou řadu známých doporučení správné výrobní a hygienické praxe, právních požadavků a implementace principů založených na HACCP poukazují námi získané výsledky na poměrně vysoký výskyt původců alimentárního onemocnění v provozovnách závodního stravování. Výsledky napomohly zároveň dotčeným subjektům získat reálný pohled na mikrobiologické nebezpečí, jako rizikového faktoru při přípravě pokrmů, a zároveň tak určit i vhodná nápravná opatření. Je zapotřebí neustále dbát na řádný proces čištění a dezinfekce, dodržovat klíčové požadavky osobní hygieny (správné mytí rukou) a dodržovat teplotní řetězec. Nutno je věnovat také patřičnou pozornost edukaci pracovníků na všech úrovních výroby, verifikovat procesy sanitace a systému HACCP.

Literatura

- Annor, G. A., Baiden E. A. Evaluation of food hygiene knowledge attitudes and practices of food handlers in food businesses in Acra, Ghana. *Food and Nutrition Sciences*. 2011, vol. 2, 830.
- Barrie, D. The provision of food and catering services in hospital. *Journal of Hospital Infection*. 1996, vol. 33, 13 – 33.
- ČNS EN ISO 10272-1 (560126) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp. – Část 1: Metoda průkazu. ČNI Praha, 2006.
- ČNS EN ISO 11290-1 (560093) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* – Část 1: Metoda průkazu. ČNI Praha, 1999.
- ČNS EN ISO 6579 (560088) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Salmonella*. ČNI Praha, 2003.
- ČSN EN ISO 16649-2 (560079) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu beta-glukoronidázapozitivních *Escherichia coli* – Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glukoronidu. ČNI Praha, 2003.
- ČSN EN ISO 6888-1 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázapozitivních stafylokoků (*Staphylococcus aureus* a další druhy) – Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera. ČNI Praha, 1999.
- EPIDAT (2017). Infekce v ČR (online). [cit. 2018-04-16]. Dostupný na: <http://www.szu.cz/publikace/data/kumulativni-nemocnost-vybranych-hlasenych-infekci-v-ceske-republice>.
- Fagan, P. K., Hornitzky, M. A., Bettelheim, K. A., Djordjevic, S. P. Detection of Shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, 869 – 872.
- Fausitini, A., Rossi, P. G., Perucci, C. A. Outbreaks of food borne disease in the Lazio region, Italy: The results of epidemiological field investigations. *European Journal of Epidemiology*. 2003, vol. 18, 699 – 702.
- Gillespie, I. A., McLauchlin, J., Grant, K. A., Little, C. L., Mithani, V., Penman, C. Lane, C., Regan, M. Changing pattern of human listeriosis, England and Wales, 2001 – 2004, *Emerging Infectious Diseases*. 2006, vol. 12, 1361 – 1366.
- Granum, P. E., Lund, T. *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Letters*. 1997, vol. 157, 223 – 228.
- Graves, L. M., Swaminathan, B. PulsNet standardized protocol for subtyping *Listeria monocytogenes* by microrestriction and pulsed-field gel electrophoresis. *International Journal of Food Microbiology*. 2001, vol. 65, 55 – 62.
- Hennekinne, JA, De Buyser, ML, Dragacci, S. *Staphylococcus aureus* and its food poisoning toxins: characterization and outbreak investigation. *FESM Microbiology Reviews*. 2012, vol. 36, 815 – 836.
- Ivana S., Bogdan, A., Judith, I., Tudor, L., Stelian, B., Tanase, A., Popescu, A. N., Caplan, D. M., Danes, M. Food microbial contamination – the main danger in the catering type food industry in Romania. *Romanian Biotechnological Letters*. 2009, vol. 14, 4260 – 4266.
- Kleer, J., Bartholoma, a., Levezow, R., Reiche, T., Sinell, HJ, Teufel, P. Foodborne bacterial infections nad intoxications in German catering systém from 1985 to 2000. *Archiv fur lebensmittelhygiene*. 2001, vol. 52, 76 – 79.
- Little, C. L., Barrett, N. J., Grant, K., Mclauchlin, J. Microbiological Safety of Sandwiches from Hospitals and Other Health Care Establishments in the United Kingdom with a Focus on *Listeria monocytogenes* and Other *Listeria* Species. *Journal of Food Protection*. 2008, vol. 71, 309-318.
- Monday, S. R., Bohach, G. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol. 37, 3411 – 3414.
- Much, P., Pichler, J., Kasper, S. S., Allerberger, F. Foodborne outbreaks, Austria 2007. *Wiener klinische wochenschrift*. 2009, vol. 121, 77 – 85.

Nicholls, M., Purcell, B., Willis, C. Amar, C. F. L., Kanagarajah, S., Chamberlain, D., Wooldridge, D., Morgan, J., Mclauchlin, J., Grant, K. A. Investigation of an outbreak of vomiting in nurseries in South West England, May 2012. *Epidemiology and Infection*. 2016, vol. 144, 582 – 590.

Pexara, A., Govaris, A. *Bacillus cereus*: an important foodborne pathogen. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 2010, vol. 61, 127 – 133.

Pillsbury, A., Chiew, M., Bates, J., Sheppard, V. An outbreak of staphylococcal food poisoning in a commercially catered buffet. *Communicable Diseases Intelligence quarterly report*. 2013, vol. 37, E 144 – 148.

Scallan, E. Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M. Foodborne illness acquired in the United States – major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*. 2011, vol. 17, 7 – 15.

Silk, B. J., Date, K. A., Jackson, K. A., Pouillot, R., Holt, K. G., Graves, L. M., Ong, K. L., Hurd, S., Meyer, R., Marcus, R. Invasive listeriosis in the Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), 2004 – 2009: further targeted prevention needed for higher-risk groups, *Clinical Infectious Diseases*. 2012, vol. 54, S396-S404.

Stressl, B., Fricker, M., Fox, E., Karpiskova, R., Demnerova, K., Jordan, K. et al. Collaborative survey on the colonization of different types of cheese-processing facilities with *Listeria monocytogenes*. *Foodborne Pathogen and Disease*. 2014, vol. 11, 8 – 14.

Todd, E. C. D., Michaels, B. S., Greig, J. D. Smith, D., Bartleson, C. A. Outbreaks Where Food Workers Have Been Implicated in the Spread of Foodborne Disease. Part 8. Gloves as Barriers To Prevent Contamination of Food by Workers. *Journal of Food Protection*. 2010, vol. 73, 1762 – 1773.

Todd, E., Notermans, S. (2011). Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 22, 1484 – 1490.

Waterman, T. R., Smeak, D. D., Kowalski, J., Hade, E. M. Comparison of bacterial counts in glove juice of surgeons wearing smooth band rings versus those without rings. *American Journal of Infection Control*. 2006, vol. 34, 421-425.

WHO (20017). Food safety and foodborne illness. World Health Organization, Geneva, Switzerland.

Yamada, S., Ohashi, E., Agata, N., Venkateswaran, K. Cloning and nucleotide sequence analysis of *gyrB* of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, and *B. anthracis* and their application to the detection of *B. cereus* in rice. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999, vol. 65, 1483 – 1490.

Kontakní adresa: Jan Strejček, Mgr., Ústav gastronomie, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, jan.strejcek@hygcons.cz.

Charakteristika Shiga toxin produkujících kmenů *Escherichia coli* izolovaných od zvířat

Characteristics of Shiga toxin producing strains of *Escherichia coli* isolated from animals

^{1,2}Kučerová Dana, ¹Kolářková Ivana, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

²Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The strains capable of producing Shiga toxin (STEC) belong to the most studied group of bacteria of the species *Escherichia coli*. They occur in cattle, pigs, and rarely in poultry. Their reservoir is mainly ruminants, including wildlife. In humans, this group of strains can cause serious illnesses such as hemorrhagic enterocolitis and hemolytic-uremic syndrome. In the human population, the strains of *stx*₁ subtype 1a and *stx*₂ subtype 2a are the most commonly involved in the infection, and are reported to cause a more serious clinical course of the disease. The aim of the study was to characterise the Shiga-toxins producing *E. coli* strains obtained from animals and based on results to evaluate the occurrence of potentially risky strains.

Altogether 145 strains with Shiga toxin production were examined. In total, 51 (35%) of potentially enterohemorrhagic strains were detected. Most of them were of bovine origine. A total of 25 isolates (49%) belonged to serogroups of high epidemiological concern O26, O103, O111 and O157. However in 16 strains (31%), equipped with these virulence factors, the serogroup was not determined. Surprising was the high incidence of STEC subtypes 2a in isolates from pigs.

Keywords: STEC; EHEC; cattle; pig

Úvod

Shiga toxin produkující kmeny *Escherichia coli* (STEC) jsou významnými patogeny lidí. Průběh onemocnění, které STEC působí, může mít širokou škálu projevů od asymptomatického průběhu přes nekomplikovaný průjem, krvavý průjem nebo dokonce HUS (hemolyticko-uremický syndrom) (Bielaszewska a kol., 2006). Kmeny, které se na vzniku takových komplikovaných stavů podílejí, jsou vybaveny nejen schopností produkovat toxiny, ale také adhezenčními faktory, z nichž nejznámější je protein intimin kódovaný genem *eae* (Bielaszewska a kol., 2006). *E. coli* se schopností produkovat Shiga toxiny náleží k různým séroskupinám, ale z hlediska bezpečnosti potravin a lidského zdraví se za nejvýznamnější považují kmeny náležející k séroskupinám O26, O103, O111, O145, O157 a od roku 2011 v návaznosti na epidemii v Německu i k séroskupině O104 (Feng a kol., 2013). Shiga toxiny obecně můžeme rozdělit na dva hlavní typy - typ Stx1 a Stx2, které se dále dělí do jednotlivých subtypů (1a, 1c, 1d), (2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f, 2g) (Melton-Celsa, 2014). Některé subtypy STEC byly dosud izolovány pouze z prostředí nebo ze zvířat, jiné jsou popisovány v souvislosti se vznikem závažných klinických stavů u lidí. Jedná se zejména subtypy Stx2a, Stx2c, Stx2d a Stx1a (Feng a kol., 2013).

Cílem naší studie bylo sledovat vlastnosti Shiga toxin produkujících kmenů *E. coli* získaných od zvířat s ohledem na příslušnost k séroskupině, typ a subtyp Shiga toxinu a adhezenční faktor intimin. Na základě výsledků vyhodnotit výskyt potenciálně nebezpečných kmenů schopných vyvolat onemocnění u lidí.

Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto 145 kmenů STEC získaných v letech 2000-2017 od hospodářských zvířat (skot, kozy, prasata) pocházejících z různých farem České republiky. Kmeny byly uchovány ve sbírce NRL pro oblast *E. coli* Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i., Brno. U všech izolátů byla provedena typizace somatického O-antigeny aglutinací s řadou 70 různých O-antisér (Salajka a kol., 1992), metodou PCR testována schopnost produkce Shiga toxinu 1, 2 a adhezenčního faktoru intiminu (Panton a Panton, 1998). Detekované geny pro produkci Shiga toxinů byly dále metodou PCR rozlišeny do jednotlivých subtypů s využitím metodiky autorů Scheutz a kol. (2012).

Výsledky

Z celkového počtu 145 testovaných kmenů pocházelo 91 vzorků od skotu (45 farem), 51 od prasat (40 farem) a 3 kmeny od koz (2 farmy).

U skotu byl nejčastěji zjištěn gen *stx1* (41; 45 %) a subtyp 1a, v jednom případě pak subtyp 1d. Gen *stx2* byl potvrzen u 33 kmenů (36 %) s dominantními subtypy 2a, 2c. V 17 případech (19 %) byly detekovány oba geny současně s nejčastější kombinací subtypů 1a, 2a, 2c. Adhezenční faktor intimin byl prokázán u 48 kmenů (52,7 %). Jejich jednotlivé patotypy a příslušnost k séroskupinám uvádí tabulka 1.

U kmenů od prasat byl detekován gen *stx1* pouze dvakrát (4 %). Jednalo se o subtypy 1a a 1c. Gen *stx2* byl prokázán u 47 kmenů (92 %) s dominantním zastoupením kombinace subtypů 2a a 2c. Oba geny současně byly potvrzeny u 2 kmenů s patotypem *stx1a*, *stx2a*, *stx2c*. U jednoho z těchto kmenů byl zjištěn i gen *eae* (tabulka 1).

U koz byl dvakrát detekován gen *stx1* (1a, 1c) a jedenkrát patotyp *stx1c*, *stx2b*.

Tabulka 1: Charakteristika potenciálně enterohemoragických kmenů v závislosti na jejich původu a příslušnosti k séroskupině.

Zvíře	Patotyp	Séroskupina (počet izolátů)									
		O26	O27	O71	O111	O103	O115	O128	O156	O157	O?
Skot	<i>stx1a</i> , <i>eae</i>	8	1	3	1	6	1	2	0	0	12
	<i>stx2a</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	<i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>stx2e</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	<i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	<i>stx1b</i> , <i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>eae</i>	4	0	1	0	0	0	0	0	2	0
	<i>stx1a</i> , <i>stx2d</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Koza	<i>stx1a</i> , <i>stx2c</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	<i>stx1a</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Prase	<i>stx1b</i> , <i>stx2b</i> , <i>stx2c</i> , <i>eae</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0

stx1a, *stx2a*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* – subtypy Shiga toxinů, *eae* – gen pro adhezenční faktor intimin, zvýrazněny jsou epidemiologicky významné séroskupiny O?- kmeny nenáleží k žádnému ze 70 testovaných O-antigenů

Diskuze

Za hlavní zdroj nákazy Shiga toxin produkujícími *E. coli* jsou považovány tepelně neopracované potraviny živočišného původu, nedostatečná hygiena při kulinární úpravě nebo kontakt se zvířaty. Posuzování závažnosti nálezu STEC se v současné době provádí na základě zjištěných faktorů virulence a příslušnosti k séroskupině (ISO TS 13136, 2012).

Významné je ale i stanovení jednotlivých subtypů, protože některé se vyskytují zejména u zvířat, v souvislosti s onemocněním v humánní populaci nebyly popsány vůbec nebo pouze

ojediněle (Feng a kol., 2013). Příkladem toho je toxin Stx2e, který způsobuje edémovou chorobu prasat, ale pro člověka nepředstavuje velké zdravotní riziko. V naší studii se ale tento subtyp vyskytoval velmi často v kombinaci se subtypem 2a, který bývá naopak izolován od lidí v souvislosti se závažným průběhem onemocnění. I přesto, že nebyl u těchto kmenů prokázán adhezenční faktor intimin, není riziko případného onemocnění člověka zanedbatelné. Na patogenezi se mohou podílet i méně časté druhy adhezenčních faktorů (Newton a kol., 2009).

Závěr

V naší studii bylo detekováno 51 (35 %) potenciálně enterohemoragických kmenů, z nichž naprostá většina pocházela ze skotu. Celkem 25 izolátů (49 %) náleželo k séroskupinám O26, O103, O111 a O157. U 16 kmenů (31 %) vybavených těmito závažnými faktory virulence ale nebyla séroskupina dourčena. Vzniká tak riziko, že takovéto kmeny nebudou v současnosti rutinně používanými metodami detekovány. Překvapivý byl vysoký výskyt STEC s kombinací subtypů 2a, 2e izolovaných z prasat. Jejich podíl na možném onemocnění člověka je v současné době nejasný.

Literatura

BIELASZEWSKA M, FRIEDRICH AW, ALDICK T, SCHURK-BULGRIN R, KARCH H. Shiga toxin activatable by intestinal mucus in *Escherichia coli* isolated from humans: predictor for a severe clinical outcome. *Clin Infect Dis*. 2006, vol. 43, s. 1160–1167.

FENG, C. H. P., REDDY, A.S. Prevalences of shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce, *Applied and Environmental Microbiology*, 2013, vol. 79, s. 6917–6923.

ISO TS 13136:2012. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) belonging to O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups – Qualitative real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method. Geneva: International Organization for Standardization, 2012.

KOLÁČKOVÁ, I., HÁZOVÁ, K., SKOČKOVÁ, A., KARPÍŠKOVÁ, R. Výskyt shigatoxigenických kmenů *Escherichia coli* u prasat a skotu na jatkách v ČR v roce 2013, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2014, vol. 20, s. 36-39.

MELTON-CELSA, R. A. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function, *Microbiol Spectr*. 2014, vol. 2, doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.

NEWTON HJ, SLOAN J, BULACH DM, SEEMANN T, ALLISON CC, TAUSCHEK M, ROBINS-BROWNE RM, PATON JC, WHITTAM TS, PATON AW, HARTLAND EL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains negative for locus of enterocyte effacement. *Emerg. Infect. Dis*, 2009, vol. 15, s. 372–380.

PATON AW, PATON JC. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohemorrhagic *E. coli hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *J Clin Microbiol*. 1998, vol. 36, s. 598–602.

SALAJKA, E, SALAJKOVA, Z, ALEXA, P, HORNICH, M. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P2 in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pigs. *Veterinary Microbiology*. 1992, vol. 32, s. 163–175.

SCHEUTZ, F, TEEL, LD, BEUTIN L, PIÉRARD, D, BUVENS, G, KARCH, H, MELLMANN, A, CAPRIOLI, A, TOZZOLI, R, MORABITO, S, STROCKBINE, NA, MELTON-CELSA, AR, SANCHEZ, M, PERSSON, S, O'BRIEN, AD. Multicenter evaluation of a sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *J Clin Microbiol*. 2012, vol. 50, s. 2951–2963.

Kontaktní adresa: Dana Kučerová, MVDr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, H17010@vfu.cz.

Plazmidově vázaná rezistence ke kolistinu: hrozba i pro Českou republiku? Plasmid-mediated colistin resistance: a threat for the Czech Republic?

^{1,2}Baráková Alžběta, ¹Gelbíčová Tereza, ^{1,3}Pospíšilová Lucie, ^{1,3}Karpíšková Renáta

¹Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

²Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Colistin belongs to the polymyxin class of antibiotics and is active against most of Gram-negative bacteria. In veterinary medicine it is used to treat infections caused by bacteria from Enterobacteriaceae family. Currently, the importance of colistin is returning in treating human infections caused by multidrug-resistant bacteria. The mechanisms of resistance to colistin are encoded chromosomally but the main threat represents recently discovered resistance carried on mobile genetic elements. Plasmids are spread by horizontal transfer inside species but also in between them. The *mcr-1* gene was first identified in 2015 in animals in China and since then other cases of bacteria carrying *mcr-1* gene and others (*mcr-2* to *mcr-5*) were described throughout the world. The international market with animals and food can be a source of spreading this type of resistance. The occurrence of *mcr* genes was not yet fully studied in the food chain or in humans in the Czech Republic. In this study the incidence of *mcr* genes in selected food from retail of the Czech Republic was observed.

Keywords: antimicrobial resistance; colistin; *mcr*; plasmid

Úvod

Kolistin se kvůli své nefrotoxicitě dříve používal v humánní medicíně zřídka a byl využíván zejména ve veterinární medicíně. V souvislosti s rostoucí rezistencí bakterií k antimikrobiálním látkám začal být kolistin využíván k terapii infekcí vyvolaných multirezistentními bakteriemi i v humánní medicíně. Existují rody bakterií přirozeně rezistentní ke kolistinu (např. *Proteus*, *Providencia*, *Morganella*, nebo *Serratia*), ale i druhy s rezistencí získanou. Mechanismy rezistence ke kolistinu mohou být kódovány chromozomálně, kdy dochází k modifikacím lipopolysacharidu (konkrétně lipidu A), produkci kapsuly, nebo k pozměněné aktivitě effluxních pump (Olaitan *et al.*, 2014). Tento typ rezistence není přenášen horizontálně na rozdíl od genů nesených na mobilních genetických elementech, např. plazmidech, které se mohou šířit mezi kmeny daného druhu či rodu, ale i dalšími rody, což představuje závažný problém v šíření antibiotické rezistence (Caniaux *et al.*, 2017).

Materiál a metody

V rámci studie bylo analyzováno 25 vzorků baleného masa a 24 vzorků rostlinného původu. Země původu vzorků jsou uvedeny v Tabulce 1. K 25 g vzorku bylo přidáno 225 ml PPV (pufrovaná peptonová voda; Oxoid, Anglie) a po homogenizaci na stomacheru byla směs inkubována při 37 °C do druhého dne. Vzorky masa byly rozděleny do pěti podjednotek, aby se zvýšila pravděpodobnost záchytu. U vzorků koření činila navážka vzorku 10 g vzorku a 90 ml PPV. Pomocí kitu Blood and Tissue (Qiagen, Německo) byla izolována celková DNA a dále byla pomocí PCR u vzorků stanovena ne/přítomnost genů *mcr-1* až *mcr-5* (podle Liu *et al.*, 2015; Xavier *et al.*, 2016; Yin *et al.*, 2017; Carattoli *et al.*, 2017; Borowiak *et al.*, 2017). Pozitivní vzorky z PPV byly vyočkovány na médium Brilliance UTI clarity agar (Oxoid, Anglie) s přidavkem kolistinu (3,5 mg/L) a po inkubaci byly izolovány kolonie různé

morfologie. Metodou MALDI-TOF MS (Bruker Daltonik GmbH, Německo) byl určen druh bakterie, který nesl některý ze sledovaných genů.

Tabulka 1: Jednotlivé země původu testovaných vzorků.

Typ potravin	Specifikace	Země původu
Potraviny živočišného původu	vepřové maso	Polsko, Nizozemí, Německo, ČR, Belgie
	hovězí maso	ČR, Polsko
	králičí maso	Čína, ČR, Maďarsko
	krůtí maso	Polsko, Německo, Maďarsko, ČR, Brazílie
Potraviny rostlinného původu	čerstvé smoothie	neuvedeno
	koření a suché plody	Čína, Vietnam, nebo neuvedeno
	čerstvé bobulové ovoce	Španělsko

Výsledky

Z testovaných 49 vzorků bylo z 8 vzorků získáno 10 izolátů bakterií nesoucích gen *mcr-1*. Jednalo se o *Escherichia coli* (n=8), *Citrobacter braakii* (n=1) a *Klebsiella pneumoniae* (n=1). U šesti vzorků byl identifikován gen *mcr-3*, ale pouze z PPV, nepodařilo se však vykultivovat příslušný bakteriální izolát. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Výsledky testování výskytu genů *mcr* u testovaných vzorků.

Typ potravin	Specifikace	Počet vyšetřených vzorků	Počet pozitivních vzorků					Identifikace MALDI
			<i>mcr-1</i>	<i>mcr-2</i>	<i>mcr-3</i>	<i>mcr-4</i>	<i>mcr-5</i>	
Potraviny živočišného původu	vepřové maso	5	0	0	2*	0	0	-
	hovězí maso	5	0	0	2*	0	0	-
	králičí maso	5	2	0	0	0	0	<i>E. coli</i> a <i>C. braakii</i>
	krůtí maso	10	6	0	2*	0	0	<i>E. coli</i> a <i>K. pneumoniae</i>
Potraviny rostlinného původu	čerstvé smoothie	12	0	0	0	0	0	-
	koření a suché plody	10	0	0	0	0	0	-
	bobulové ovoce	2	0	0	0	0	0	-

* - Vzorky pozitivní pouze z PPV, nebyl získán izolát.

Diskuse

Přestože byly geny *mcr* popsány až po roce 2015, je pravděpodobné, že existovaly již dříve a v současnosti jsou rozšířeny po celém světě. Problém představuje import zvířat a potravin, které se mohou podílet na šíření genů rezistence. Výskyt bakterií s geny *mcr* a jejich druhové zastoupení v České republice v potravinách není sledováno, přestože mohou být šířeny potravinovým řetězcem ke spotřebiteli.

Pozitivní nálezy se vyskytovaly jen v potravinách živočišného původu z tržní sítě, jednalo se o importované vzorky mas, ale i masa pocházejících z ČR. V této studii byly všechny testované vzorky rostlinného původu negativní na výskyt *mcr* genů, to však neplatí ve zbytku světa (např. ve Švýcarsku: Zurfuh *et al.*, 2016).

Závěr

Gram-negativní bakterie s geny *mcr* v potravinách ČR představují možný způsob přenosu a cestu šíření těchto bakterií ke spotřebitelům. Tato studie poukazuje na to, že bakterie s geny *mcr* nepocházejí pouze z importovaných potravin, ale i těch tuzemských. Pozitivní je fakt, že prozatím nebyly geny *mcr* identifikovány v potravinách rostlinného původu z tržní sítě ČR.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem MŠMT (LO1218 NPU) a MZe (RVO 2018).

Literatura

- BOROWIAK, M.; FISCHER, J.; HAMMERL, J., A., HENDRIKSEN, R., S.; SZABO, I.; MALORNY, B. Identification of a novel transposon-associated phosphoethanolamine transferase gene, *mcr-5*, conferring colistin resistance in d-tartrate fermenting *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi B. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2017, vol. 72, no. 12, s. 3317–3324. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx327
- CANIAUX, I., VAN BELKUM, A.; ZAMBARDI, G.; POIREL L.; GROS. M. F. MCR: modern colistin resistance. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* [online]. 2017, vol. 36, no. 3, s. 415–420. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-016-2846-y
- CARATTOLI, A.; VILLA, L.; FEUDI, C.; CURCIO, L.; ORSINI, S.; LUPPI, A.; PEZZOTTI, G., MAGISTRALI, C., F. Novel plasmid-mediated colistin resistance *mcr-4* gene in *Salmonella* and *Escherichia coli*, Italy 2013, Spain and Belgium, 2015 to 2016. *Eurosurveillance*. 2017, vol. 22, no. 31. Dostupné z doi: <http://dx.doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.31.30584>
- LIU, Y.-Y., WANG, Y.; WALSH, T., R.; YI, L.-X.; ZHANG, R.; SPENCER, J.; DOI, Y.; TIAN, G.; DONG, B.; HUANG, X. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*. 2016, vol. 16, no. 2, s. 161–168.
- OLAITAN, A., O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2014, vol. 5, no. 643. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2014.00643
- XAVIER, B., B.; LAMMENS, Ch.; RUHAL, R.; KUMAR-SINGH, S.; BUTAYE, P.; GOOSSENS, H.; MALHOTRA-KUMAR, S. Identification of a novel plasmid-mediated colistin-resistance gene, *mcr-2*, in *Escherichia coli*, Belgium, June 2016. *Eurosurveillance* [online]. 2016, vol. 21, no. 27. Dostupné z: doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.27.30280
- YIN, W.; LI, H.; SHEN, Y.; LIU, Z.; WANG, S.; SHEN, Z.; ZHANG, R.; WALSH, T. R.; SHEN, J.; WANG, Y. Novel plasmid-mediated colistin resistance gene *mcr-3* in *Escherichia coli*. *MBio*. 2017, vol. 8, no. 3, e00543–17.
- ZURFUH, K.; POIREL L.; NORDMANN, P.; NÜESCH-INDERBINEN, M.; HÄCHLER, H.; STEPHAN, R. Occurrence of the Plasmid-Borne *mcr-1* Colistin Resistance Gene in Extended-Spectrum-β-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in River Water and Imported Vegetable Samples in Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, vol. 60, no. 4, s. 2594-2595. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00066-16.

Kontaktní adresa: Alžběta Baráková, Mgr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 62100 Brno, barakova@vri.cz.

Prevalence a epidemiologická charakteristika *Listeria monocytogenes* v syrovém baleném mase z tržní sítě

Prevalence and epidemiological characteristics of *Listeria monocytogenes* in raw packed meat from retail

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

¹Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

²Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Listeria monocytogenes is a bacterium with ubiquitous occurrence and a significant intracellular pathogen causing listeriosis, which is a food-borne illness posing a danger especially for risk groups of the populations (immunocompromised people, elderly people, pregnant women and newborns). Danger for human mainly represents food for direct consumption. The aim of the study was to determine the prevalence and characteristics of *L. monocytogenes* in packed raw meat from retail of the Czech Republic during 2017-2018. The obtained isolates of *L. monocytogenes* were typed by serotyping and macrorestriction analysis. *L. monocytogenes* was found in 30,7% of samples (20/65) of various types of meat, especially pork and beef. The most frequent strains were serotype 1/2a and 1/2c. While serotype 1/2a strains exhibited high heterogeneity, all strains of serotype 1/2c isolated from meat of different origin belonged to the same pulsotype.

Keywords: *Listeria monocytogenes*; raw packed meat; serotyping; PFGE

Úvod

Listeria monocytogenes je bakterie s ubikvitárním výskytem a významný intracelulární patogen způsobující listeriózu. Listeriόza je alimentární onemocnění, které představuje nebezpečí především pro rizikové skupiny obyvatelstva (imunokompromitované osoby, starší lidé, těhotné ženy a novorozenci). Smrtnost v těchto případech dosahuje 20-30 % (Jevaletchumi a kol., 2010). Vehikulem listeriόz jsou zejména potraviny k přímé spotřebě (Vázquez – Boland, 2001). Jedná se např. o zrající sýry, krájené masné výrobky, játrovky, zabijačkové speciality, nakládané a uzené ryby. Cílem této studie byla detekce *L. monocytogenes* ve vzorcích baleného syrového masa z tržní sítě České republiky a charakterizace získaných izolátů typizačními metodami.

Materiál a metody

V rámci studie bylo vyšetřeno 65 vzorků balených syrových mas různých druhů a s různou zemí původu, získaných z maloobchodní sítě České republiky v průběhu let 2017–2018. Každý vzorek masa byl rozdělen do pěti dílčích podjednotek po 25 g, z důvodu zvýšení zachytu v testovaném vzorku, a následně vyšetřen na průkaz *Listeria monocytogenes* dle normy ČSN EN ISO 11290-1:2004 a u vzorků určených k přímé spotřebě i ČSN EN ISO 11290-2:2004. Z média ALOA (Oxoid), na kterém byl prokázán růst *L. monocytogenes*, byly odebrány 2 typické kolonie a následně typizovány sklíčkovou aglutinací komerčními antiséry (Denka Seiken, Japonsko) v kombinaci s multiplex PCR typizací (Doumith a kol., 2004). Dále byla provedena makrorestrikční analýza následovaná pulzní gelovou elektroforézou (PFGE) v souladu s Pulse-Net-Europe protokolem (2002) s využitím restrikčního enzymu AscI (New EnglandBioLabs, USA). Získané profily byly analyzovány programem BioNumerics 4.6 (AppliedMaths, Belgie) a posouzeny dle kritérií Tenover a kol. (1995).

Výsledky a diskuze

L. monocytogenes v syrovém baleném masu z tržní sítě ČR v období let 2017–2018 byla prokázána u 20 (30,7 %) z 65 otestovaných vzorků různých druhů mas. U dvou vzorků (10,5 %) byla *L. monocytogenes* zachycena ve všech 5 dílčích podjednotkách, u ostatních vzorků byla zachycena pouze u 1 až 4 podjednotek. Tím se potvrdilo, že testování více podjednotek zvyšuje záchyt *L. monocytogenes* u jednoho vzorku. Nejčastěji byla *L. monocytogenes* detekována u masa pocházejícího z Polska (35,0 %) a z ČR (31,6 %). Nejvyšší prevalence byla zjištěna u vzorků mixu hovězího/vepřového mletého masa, kdy ve 3 z 5 vyšetřovaných vzorků (60,0 %) byla izolována *L. monocytogenes*. U hovězího mletého masa bylo pozitivních 7 z 12 vzorků (58,3 %) a u vepřového mletého masa 5 pozitivních z 9 vzorků (55,6 %), (Tabulka 1). Nejnižší prevalence byla zjištěna u drůbežního masa, kdy z 33 vyšetřovaných vzorků byly 4 pozitivní (12,1 %), podobně jako ve studii Indrawattana a kol. (2011), kde uvádí u drůbežního masa pět pozitivních ze 48 vyšetřovaných vzorků (10,4 %), u hovězího masa 3 pozitivní z 26 vzorků (11,5 %) a u vepřového 8 pozitivních z 30 (26,7 %).

Tabulka 1: Výsledky prevalence *L. monocytogenes* u jednotlivých druhů masa.

Druh masa		Počet vyšetřených vzorků	Počet pozitivních vzorků (%)
mleté maso	hovězí/vepřové	5	3 (60,0 %)
	hovězí	12	7 (58,3 %)
	vepřové	9	5 (55,6 %)
drůbeží maso a droby		33	4 (12,1 %)
králičí maso		5	1 (20,0 %)

V komoditě mleté hovězí maso byly dva vzorky hovězího tataráku (potravina k přímé spotřebě). Oba vzorky tataráku byly pozitivní na přítomnost *L. monocytogenes*, avšak počty *L. monocytogenes* nepřekročily legislativní limit pro potraviny v tržní síti 100 KTJ/g uvedený v Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny.

Celkem bylo z 20 pozitivních vzorků získáno 28 izolátů *L. monocytogenes* (1-3 izoláty v rámci jednoho vzorku). Nejčastěji byl detekován sérotyp 1/2a (53,6 %) a 1/2c (30 %). Na základě typizace byl u některých vzorků masa prokázán výskyt *L. monocytogenes* patřící k různým sérotypům a pulzotypům (Tabulka 2).

Tabulka 2: Charakteristika získaných izolátů *L. monocytogenes*.

Druh masa	Sérotyp	Počet izolátů	Pulzotypy (počet izolátů)	
mleté maso	hovězí/vepřové	1/2a	3	755(1), 757(1), 762(1)
		1/2c	1	1(1)
		4b	1	203(1)
	hovězí	1/2a	6	732(1), 742(1), 843(1), 722/784(2), 716/733(1)
		1/2b	1	527(1)
		1/2c	3	1(3)
		4b	1	211(1)
	vepřové	1/2a	1	754a(1)
		1/2c	4	1(4)
drůbeží maso a droby	1/2a	4	701(1), 711(1), 731(1), 735(1)	
	4b	2	204(1)	
králičí maso	1/2a	1	735(1)	

opakující se pulzotypy jsou zvýrazněny tučně

Zatímco kmeny sérotypu 1/2a vykazovaly vysokou heterogenitu, všechny kmeny sérotypu 1/2c izolované z masa různého původu patřily ke shodnému pulzotypu, což je dáno vysokou genetickou homogenitou sérotypu 1/2c. Dominance sérotypu 1/2a a 1/2c v syrovém masu byla popsána i ve studii Wu a kol. (2015), ve které je uvedeno 46,9 % v zastoupení sérotypu 1/2a a 28,6 % sérotypu 1/2c. Opakovaný výskyt pulzotypů 1 a 735 poukazuje na čtenější výskyt těchto subtypů *L. monocytogenes* v syrovém masu.

Závěr

V této studii bylo potvrzeno, že syrové balené maso patří mezi potraviny s častým výskytem bakterií *Listeria monocytogenes*. Tato komodita bývá obvykle dobře tepelně opracována, což je dostatečné k eliminaci životaschopných buněk *L. monocytogenes*. Nedokonalé tepelné opracování výrobků z mletého masa (např. hamburgery, karbanátky, čevabčiči), ale zejména maso určené k přípravě tataráku může představovat zdravotní riziko pro spotřebitele.

Poděkování

Studie vznikla za finanční podpory projektu Ministerstva zdravotnictví AZV 16-31488A.

Literatura

DOUMITH, M.; BUCHRIESER, C.; GLASER, P.; JACQUET, CH.; MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2004, vol. 42, no. 8, s. 3819 – 3822.

INDRAWATTANA, N.; NIBADDHASOBON, T.; SOOKRUNG, N.; CHONGSA-NGUAN, M.; TUNGTRONGCHITR, A.; MAKINO, S.; TUNGYONG, W.; CHAICUMPA, W. Prevalence of *Listeria monocytogenes* in Raw Meats Marketed in Bangkok and Characterization of the Isolates by Phenotypic and Molecular Methods. *Journal of Health, Population, and Nutrition*. 2011, vol. 29, no. 1, s. 26–38.

JEYALETCHUMI, P.; TUNUNG, R.; MARGARET, S. P.; SON, R.; GHAZALI, F. M.; CHEAH, Y. K. Review: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *International Food Research Journal*. 2010, vol. 17, s. 1–11.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *Journal of clinical microbiology*. 1995, vol. 33, no. 9, s. 2233 – 2239.

VÁZQUEZ-BOLAND, J. A.; KUHN, M.; BERCHE, P.; CHAKRABORTY, T.; DOMINIGUEZ-BERNAL, G.; GOEBEL, W.; GONZALEZ-ZORN, B.; WEHLAND, J. AND KREFT, J. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, vol. 14, s. 584-640.

WU, S.; WU, Q.; ZHANG, J.; CHEN, M.; YAN, Z.; HU, H. *Listeria monocytogenes* Prevalence and Characteristics in Retail Raw Foods in China. *PLoS ONE*. 2015, vol. 10, no. 8, DOI:10.1371/journal.pone.0136682

Kontaktní adresa: Lucie Pospíšilová, Ing., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70, Brno 621 00, pospisilova.l@vri.cz.

Detection and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from milk samples of cows, sheep, and goats in the Czech Republic

^{1,2}Tegegne Henok Ayalew, ²Koláčková Ivana, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Department of Milk Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

²Department of Bacteriology, Veterinary Research Institute, Brno

Summary

This study aimed to detect and characterize methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) from bulk tank milk samples of cows, sheep, and goats collected from 49 dairy farms in the Czech Republic. Out of 52 samples, 15 were positive for MRSA. All MRSA isolates were identified using PCR, detection of the species-specific fragment SA442 and *mecA* gene. *SCCmec*, *spa* type, MLST, staphylococcal enterotoxins (SEs), and virulence genes were characterized. Three sequence types (ST) containing seven *spa* types were identified. Thirteen isolates belonged to ST398 (t011/IV_{NT} and V, t034/V, t1456/IVa, t1255/V, t2346/IVa and V). Other two isolates belonged to ST5/t3598/V (cow's milk) and ST8/t064/V (goat's milk). In six isolates, one or more SEs (*seb*, *sed*, *seg*, *sei*, *sej*) have been confirmed. All isolates were negative for the tested virulence genes except one isolate (ST398/t034/V, cow's milk) which harboured the toxic shock syndrome toxin gene. The major clone, ST398 in different herds, among all MRSA positive animal species were confirmed. This result evidence wide geographical spread of ST398 across the regions in the Czech Republic and no host preference among the animal species.

Keywords: chromosomal cassette; dairy farm; MLST; *spa* type; ST398

Introduction

Staphylococcus aureus is a major pathogen responsible for both clinical and subclinical mastitis, which is a primary therapeutical reason for the antibiotics use in dairy animals. The emergence of methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) in dairy production can be responsible for the colonization or infection of personnel on farms and veterinarians as well as a source of contamination for the consumer *via* the food chain (Butaye *et al.*, 2016). In the Czech Republic, the prevalence of MRSA from food-producing animals was low and predominantly belonged to clonal complex (CC) CC398 (Bardoň *et al.*, 2012). However, in recent years, the diversity and detection rate of MRSA in farm animals is growing (Tegegne *et al.*, 2017). This study aimed to detect and characterize MRSA from milk samples of cow, sheep, and goat in the Czech Republic.

Materials and Methods

A total of 52 bulk milk samples of cow, sheep, and goat collected from 49 dairy farms in the Czech Republic. Strains were obtained in accordance with the Commission Decision 2008/55/EC. MRSA was confirmed by detection of the species-specific fragment SA442 and *mecA* gene using the PCR method (Oliveira & de Lencastre, 2002). Staphylococcal chromosomal cassette *mec* (*SCCmec*) typing was carried out as described by Milheiro *et al.* (2007). *Spa* typing was performed following the methodology published on the website SeqNet.org and primers were used as mentioned by Stegger *et al.* (2012). For MLST, seven housekeeping genes were used according to Enright *et al.* (2000). Detection of epidemiologically important staphylococcal enterotoxins (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *sej* and *seh*) and virulence factors encoding genes [Panton-Valentine leukocidin (*pvl*), exfoliative toxins A, B (*eta*, *etb*) and toxic shock syndrome toxin (*tsst*)] were performed by PCR method according to Monday & Bohach (1999) and Hososaka *et al.* (2007), respectively.

Results and Discussion

From a total of 52 milk samples, 15 were positive for *mecA* gene. Twelve of them originated from cow's milk and 3 isolates were from goat's milk. Samples from ewe's milk were negative for *mecA* gene. Among the typed MRSA isolates, seven different *spa* types under three different sequence types (ST) were confirmed. Most of the *spa* types associated with CC/ST398 (13/15) such as t011/SCC*mec* IV_{NT} and V, t034/SCC*mec* V, t1456/SCC*mec* IVa, t1255/SCC*mec* V, and t2346/SCC*mec* IVa and V. In this study, CC/ST398 showed the higher variability of *spa* types (t011, t034, t1255, t1456, t2346). All results are shown in Table 1. Our results differ from the report from the Netherlands in which only *spa* types t011, t108, and t889 were detected out of 38,000 bulk milk samples. The variability of the *spa* types among countries was described in the European Food Safety Authority (EFSA) surveillance (EFSA, 2009). The *spa* types t011, t034, and t1255 are widely distributed in most of Europe countries. However, *spa* type t2346 principally prevalent in central Europe such as Germany, Czech Republic, and Austria. *Spa* type t2123 is rarely identified and only reported from Germany and Netherlands (EFSA, 2009). In different countries, specific *spa* types constitute most of the isolates; that possibly indicate the local circulation of certain clones. Regional variability is also related to the international trade in food and food-producing animals (Butaye *et al.*, 2016). In this study, other sequence types such as ST5/t3598/SCC*mec* IVa (cow's milk) and ST8/t064/SCC*mec* IV_{NT} (goat's milk) were also detected. These strains are rare HA- and CA-MRSA and from animals have been reported from the Czech Republic (Tegegne *et al.*, 2017) and Sweden (MSSA) (<http://spa.ridom.de/spa-t3598.shtml>). Detection of those rare *spa* types in the food chain indicates the potential introduction of a new lineage into the human population. Six isolates carried one or more of the tested genes encoding enterotoxins (*seb*, *sed*, *seg*, *sei* & *sej*). Two isolates harboured the classical toxin genes (goat's milk - *seb*, and cow's milk - *sed*). Despite the few reported cases on the involvement of MRSA in the foodborne outbreak, the risk of infections caused by enterotoxigenic MRSA cannot be excluded (K  rouanton *et al.*, 2007). In this study, none of the virulence factors encoding genes were detected except the toxic shock syndrom encoding gene in one isolate (ST398/t034/SCC*mec* V) from cow's milk.

Table 1: Molecular characteristics of MRSA isolated from the bulk tank milk samples.

Sample origin	No of farms	No of samples	MRSA detected	MLST	<i>Spa</i> type	SCC <i>mec</i>	SEs genes	<i>lukF-PV/lukS-PV</i>	<i>eta</i>	<i>etb</i>	<i>tsst</i>
Cow	29	31	12 (39%)	ST5	t3598	IVa	<i>d, g, i,</i>	-	-	-	-
				ST398	t011	V	<i>j g,i</i>	-	-	-	-
				ST398	t011	V	-	-	-	-	
				ST398	t011	V	-	-	-	-	
				ST398	t011	V	<i>g,i</i>	-	-	-	
				ST398	t034	V	-	-	-	-	
				ST398	t034	V	-	-	-	-	
				ST398	t034	V	-	-	-	-	
				ST398	t034	V	<i>g,i</i>	-	-	-	+
				ST398	t1255	V	<i>g,i</i>	-	-	-	-
				ST398	t1456	IVa	-	-	-	-	
				ST398	t2346	V	-	-	-	-	
				Sheep	11	12	-	-	-	-	-
Goat	9	9	3 (33%)	ST8	t064	IV _{NT}	<i>b</i>	-	-	-	-
				ST398	t011	IVa	-	-	-	-	
				ST398	t2346	V	-	-	-	-	

Conclusion

These results evidenced that wide geographical spread of MRSA predominantly ST398 across the Czech Republic dairy farms. ST398 has no host preference among the animal species. The presence of ST398 in milk sample indicates the potential introduction of the livestock-associated MRSA lineage into the food chain. Other sequence types such as ST5 and ST8 were also detected. In general, the presence of MRSA in milk poses a potential risk of infection and/or colonization of humans, both through contact with dairy animals and milk consumption. Therefore, the evaluation of the occupational and foodborne risks for MRSA carriage and infection should be considered carefully.

Acknowledgement

The study was supported by projects of the Ministry of Agriculture of the CR, NAZV KUS QJ1210284, and QJ1510216.

References

- BARDON, J.; KOLÁŘ, M.; KARPÍŠKOVÁ, R.; ŽEMLIČKOVÁ, H.; FRIDRICHOVÁ, M.; SAUER, P.; ŠTÁSTKOVÁ, Z.; HANULÍK, V. Occurrence and characteristic of MRSA on pig farms in the Czech Republic. *Acta Veterinaria Brno*. 2013. vol. 81, no. 3, s. 219-223.
- BUTAYE, P.; ARGUDÍN, M. A.; SMITH, T. C. Livestock-associated MRSA and its current evolution. *Current Clinical Microbiology Reports*. 2016. vol. 3, no. 1, s.19-31.
- ENRIGHT, M. C.; ROBINSON, D. A.; RANDLE, G.; FEIL, E. J.; GRUNDMANN, H.; SPRATT, B. G. The evolutionary history of MRSA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002. vol. 99, no. 11, s. 7687–92.
- European food safety authority (EFSA). Analysis of the baseline survey on the prevalence of MRSA in holdings with breeding pigs in the EU, 2008. Part A: MRSA prevalence estimates; on request from the European Commission. *EFSA Journal*. 2009. vol. 7, no. 11, s. 1376.
- HOSOSAKA, Y.; HANAKI, H.; ENDO, H.; SUZUKI, Y.; NAGASAWA, Z.; OTSUKA, Y.; OTSUKA, Y.; SUNAKAWA, K. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *S. aureus*: A new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2007. vol. 13, no. 2, s. 79–86.
- KÉROUANTON, A.; HENNEKINNE, J.A.; LETERTRE, C.; PETIT, L.; CHESNEAU, O.; BRISABOIS, A.; DE BUYSER, M.L. Characterization of *S. aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *International Journal of Food Microbiology*. 2007. vol. 115, no. 3, s. 369–375.
- MILHEIRIÇO, C.; OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H.. Update to the multiplex PCR strategy for assignment of *mec* element types in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007. vol. 51, no. 9.
- MONDAY, S. R.; BOHACH, G. A. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in Staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999. vol. 37, no. 10, s. 3411–3414.
- OLIVEIRA, D. C.; DE LENCASTRE, H. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the *mec* element in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002. vol. 46, no. 7, s. 2155–2161.
- STEGGER, M.; ANDERSEN, P. S.; KEARNS, A.; PICHON, B.; HOLMES, M. A.; EDWARDS, G.; LAURENT, F.; TEALE, C.; SKOV, R.; LARSEN, A. R. Rapid detection, differentiation and typing of MRSA harbouring either *mecA* or the new *mecA* homologue *mecA* LGA251. *Clinical Microbiology and Infection*. 2012. vol. 18, no. 4.
- TEGEGNE, H.A.; KOLACKOVA, I.; KARPISKOVA, R. Diversity of livestock associated MRSA. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*. 2017. vol. 10, no. 9, 929–931.

Contact address: Henok Ayalew Tegegne, DVM, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70. Brno 621 00, H16016@vfu.cz.

Mikrobiálne screeningové metódy v analýze rezíduí antimikrobiálnych látok v potravinách živočíšneho pôvodu – súčasný prehľad

Microbial screening methods for the analysis of antimicrobial residues in food of animal origin – current overview

Juščáková Daniela, Kožárová Ivona

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Summary

Undesirable substances penetrate into the body of the animals by animal feed, water for drinking or through the usage of veterinary drugs and so their residues get into the products of animal origin. Their extensive use in food producing animals has brought many health and technological risks including the current threat to public health, i.e. antibiotic resistance. Microbial inhibition methods currently present the multiresidue screening methods intended for the detection of the presence of antibiotic and chemotherapeutic residues in live animals and animal products. These methods are qualitative, simple, fast, large-scale and cost-effective which have undergone a historical progress from the 70s of the 20th century conditioned by the concept for routine and reference methods currently replaced with the criteria-based approach established for the screening methods. This article provides an overview of the microbiological screening methods currently used for the analysis of antimicrobial residues in food of animal origin.

Keywords: *antibiotics; residues; screening*

Úvod

Používanie antibiotík pri liečbe hospodárskych zvierat určených na produkciu potravín môže mať za následok prítomnosť týchto látok v produktoch živočíšneho pôvodu (DRAČKOVÁ a kol., 2009). Prítomnosť rezíduí antibiotík v potravinách predstavuje riziko nežiaducich účinkov na zdravie spotrebiteľa kvôli riziku otravy, alergických reakcií, zmenách spotrebiteľského vnímania výrobku a vývoja mechanizmov bakteriálnej rezistencie, čo spôsobuje vážnu hrozbu pre zdravie ľudí a zvierat (TOMÁŠKA a kol., 2010). Keďže v potravinách sa nesmú vyskytovať reziduá antibiotík, vzhľadom na ich nepriaznivý dosah na zdravie konzumentov je vývoj spoľahlivých screeningových metód na ich odhalenie veľmi podstatný.

V súčasnej dobe je prístupných mnoho screeningových metód, ktoré sa odlišujú nielen druhom použitého testovacieho kmeňa, časovou náročnosťou stanovenia, ale tiež citlivosťou k jednotlivým látkam alebo skupinám antibiotík (POLÁKOVÁ a KOŽÁROVÁ, 2014). V záujme ochrany zdravia spotrebiteľa a výroby bezpečných potravín definuje európska legislatíva maximálny limit rezíduí ako maximálnu koncentráciu rezíduí farmakologicky účinnej látky, ktorú možno povoliť v potravinách živočíšneho pôvodu (NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU a RADY (ES) č. 470/2009).

Screeningové metódy

Screening potravín živočíšneho pôvodu na prítomnosť rezíduí antimikrobiálnych látok sa začal krátko po zavedení antibakteriálnej liečby vo veterinárnej medicíne. Spočiatku to boli hlavne monitorovacie procesy v mliekarenskom priemysle, aby sa predišlo problémom pri produkcii fermentačných mliečnych výrobkov. Od začiatku sedemdesiatych rokov 20. storočia bolo zavedené aj pravidelné vyšetrenie rezíduí u jatočných zvierat (PIKKEMAAT a kol. 2009). "Rezíduum" znamená rezíduum látok, ktoré majú farmakologický účinok, produktov ich metabolizmu a ostatných látok prenesených do živočíšnych produktov, a ktoré je pravdepodobne škodlivé pre ľudské zdravie (SMERNICA RADY 96/23/ES).

V dôsledku pokroku analytickej chémie, ku ktorému prišlo od prijatia smernice 96/23/ES, bola koncepcia rutinných metód a referenčných metód nahradená kritériovým prístupom, v rámci ktorého sa vytvárajú pracovné kritériá a postupy validácie screeningových a konfirmačných metód. Screeningová metóda znamená metódy, ktoré sa používajú na detekciu prítomnosti látky alebo skupiny látok na príslušnej úrovni. Tieto metódy majú schopnosť vysokej priepustnosti vzoriek a používajú sa na roztriedenie veľkého počtu vzoriek podľa potenciálne nezhodných výsledkov. Sú vytvorené osobitne kvôli tomu, aby sa zabránilo falošným zhodným výsledkom. Na účely screeningu sa v súlade so smernicou 96/23/ES používajú len tie analytické metódy, u ktorých je možné dokumentovaným sledovateľným spôsobom preukázať, že sú validované a pri príslušnej hodnote majú mieru falošných zhodných výsledkov (chybu β) < 5 %. V prípade podozrenia na nezhodný výsledok sa tento výsledok potvrdí konfirmačnou metódou. Pracovné kritériá sú požiadavky na pracovné charakteristiky, t.j. funkčné vlastnosti, ktoré sa môžu prisúdiť analytickej metóde. Môže to byť napríklad špecifickosť, správnosť, pravdivosť, presnosť, opakovateľnosť, reprodukovateľnosť, výťažnosť, detekčná schopnosť a robustnosť. Podľa týchto pracovných kritérií možno usúdiť, či je daná analytická metóda vhodná na daný účel a prináša hodnoverné výsledky (ROZHODNUTIE KOMISIE 2002/657/ES).

Mikrobiálne inhibičné testy

Mikrobiálne inhibičné testy (MIT) predstavujú multireziduálne screeningové metódy určené na stanovenie prítomnosti rezíduí antibiotík a chemoterapeutík u živých zvierat, v mäse, mlieku a iných živočíšnych produktoch. Sú to jednoduché, kvalitatívne, rýchle metódy (ŠNIRC a kol., 2007). V priebehu krátkeho časového obdobia poskytujú výsledok o prítomnosti alebo neprítomnosti pozorovanej látky vo vyšetrovaných vzorkách. Testy fungujú na princípe inhibície rastu príslušného testovacieho kmeňa v prítomnosti antibiotík a ďalších farmakologicky aktívnych látok. Inhibícia rastu testovacieho kmeňa sa v agarovom médiu prejavuje tvorbou inhibičných zón alebo farebnou zmenou indikátora. Poznáme dve formy MIT: skúmavková forma a difúzna platňová forma.

Jedným z prvých oficiálnych metód bol test *Sarcina lutea* obličkový test vyvinutý van Schothorst, ktorý sa stal zákonom stanovenou metódou v Holandsku v roku 1973. Približne v rovnakom čase Nemecko zaviedlo test *Bacillus subtilis* BGA a iné krajiny prijali podobné testovacie metódy. V roku 1980 navrhla skupina Vedeckej veterinárnej komisie Európskej komisie štandardizovanú metódu detekcie antibakteriálnych látok. Tento štvorplatňový test (Four-plate test) vyvinutý v roku 1980 Bogaertsom a Wolfom na detekciu rezíduí v mäse a bol považovaný za menej vhodný na analýzu obličiek, pretože s touto maticou dosiahol príliš veľa falošne pozitívnych výsledkov. Predtým, ako je veterinárny liek povolený na trh, musí prejsť kontrolou a vyhodnotením rezíduí, po ktorých možno stanoviť maximálne limity rezíduí (MRL). Tento proces sa začal v roku 1992 a v súčasnosti obsahuje zoznam antibakteriálnych látok, pre ktoré sa stanovili MRL, viac ako 50 antimikrobiálnych látok (PIKKEMAAT, 2009).

Mikrobiálne inhibičné testy – súčasný stav

Medzi skúmavkové metódy patria PREMI[®]TEST (R-Biopharm AG, Germany), Hemmstofftest EXP (Packhaus Rockmann GmbH, Germany), Explorer[®] / Explorer[®] 2.0 test (Zeu-Inmunotec, Saragossa, Spain), MILCHTEST (Packhaus Rockmann GmbH, Germany), Total antibiotics (EuroClone S.p.A.), Delvotest SP (DSM), Kalidos TB/MP (EuroClone S.p.A.), Eclipse 50 (ZEU-INMUNOTEC S.L.). K platňovým metódam patrí metóda STAR (Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov) vyvinutý Referenčným laboratóriom Spoločenstva pre rezíduá veterinárnych liekov (Foureges, Francúzsko) a metóda štvorplatňová.

PREMI®TEST – metóda je vhodná pre stanovenie rezíduí inhibičných látok v mäse (hovädzie, bravčové, hydinové, rybacie) a mäsových výrobkov pre sledovanie antibiotík vyskytujúcich sa v mäsovej šťave, svaľe, obličkách, pečeni, vo vajciach a v moči prasiat liečených na antibiotiká (<https://food.r-biopharm.com/products/premitest-25/>, http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2026%20PREMi%20test.pdf).

ECLIPSE 50 – metóda popisuje postup na stanovenie rezíduí a látok inhibujúcich rast kultúr v mlieku a mliečnych výrobkoch. Metóda je vhodná pre surové, pasterizované a sušené kravské, ovčie alebo kozie mlieko. (http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2024%20ECLIPSE.pdf).

Kalidos TB/MP – metóda popisuje postup na stanovenie rezíduí a látok inhibujúcich rast kultúr v mlieku a mliečnych výrobkoch metódou KALIDOS TB (formát tuby), MP (formát mikroplatničky). Metóda je vhodná pre surové, pasterizované a sušené kravské, ovčie alebo kozie mlieko. KALIDOS TB, MP nie je vhodný na skúšanie kyslého mlieka alebo mlieka inak kontaminovaného (http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2023%20KALIDOS.pdf).

Total antibiotics – test vyvinutý na stanovenie rezíduí antibiotík v mäse a v mlieku potravinových zvierat. Vzhľadom na jeho jednoduchosť, širokospektrálnosť a krátky čas stanovenia je tento kvalitatívny screeningový test vhodný nielen na použitie v laboratóriách schválených na úradnú kontrolu prítomnosti rezíduí, ale aj v celom potravinovom reťazci. (http://peramed.com/peramed/docs/A20111_ed0_0109_355.pdf)

Delvotest SP – metóda popisuje stanovenie rezíduí a látok inhibujúcich rast mliekarenských kultúr v mlieku a mliečnych výrobkoch metódou DELVOTEST SP, ktorá je určená STN 57 0531. Metóda je vhodná pre surové mlieko a sušené mlieko po obnovení. Štandardný difúzny test Delvotest SP je zvlášť citlivý na penicilíny a sulfónamidy (http://www.svssr.sk/dokumenty/legislativa/vest13_2006.pdf).

MILCHTEST - používa sa na stanovenie rezíduí antibiotík v kravskom, ovčom a kozom mlieku a tiež v surovom a tepelne ošetrovanom mlieku, ako aj v sušenom mlieku (<http://www.milchtest.de/product/>).

Hemmstofftest EXP – komerčný test na detekciu inhibičných látok v surovom mäse, pečeni, obličkách, krmivách a vo vajciach dodávaný spoločnosťou Packhaus Rockmann GmbH (Nemecko) podobný Explorer® testu.

Explorer® / Explorer® 2.0 test – je jednoduchá a rýchla metóda na detekciu inhibičných látok v surovom mäse, vo svaloch rôznych druhov zvierat (ošípaných, hovädzieho dobytká, oviec, hydiny), krmivách a vajciach. umožňuje detekciu väčšiny antimikrobiálnych skupín (penicilíny, cefalosporíny, tetracyklíny, sulfónamidy a makrolidy) (<http://www.zeulab.com/products.html/veterinary-residues/142-explorer-2-0.html>).

Metóda STAR – táto platňová metóda sa využíva na stanovenie rezíduí inhibičných látok v potravinách a surovinách živočíšneho pôvodu (okrem potravín technologicky opracovaných s použitím prídavných a technologických pomocných látok) s použitím citlivých bakteriálnych kmeňov (http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2025%20STAR%20test.pdf).

Metóda štvorplatňová – táto platňová metóda sa využíva na stanovenie rezíduí inhibičných látok v potravinách a surovinách živočíšneho pôvodu, okrem potravín technologicky opracovaných s použitím prídavných a technologických pomocných látok, štvorplatňovou metódou s kmeňmi *Bacillus subtilis* BGA a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 (http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2022%20stvorplatnova%20metoda%20RIL%20B.subtilis%20a%20M.luteus.pdf).

Záver

Rozšírené používanie antibiotík u potravinových zvierat kladie dôraz na stanovenie prítomnosti ich rezíduí v produktoch živočíšneho pôvodu. Screening veterinárnych liekov v produktoch živočíšneho pôvodu a tiež vývoj nových metód na ich detekciu je veľmi dôležitý pre zdravie ľudí, zaistenie kvality a bezpečnosti potravín. Analýza rezíduí u zvierat produkujúcich mäso zaznamenala obrovský vývoj počas posledných 35-40 rokov. V budúcnosti možno predpokladať, že tento vývoj bude pokračovať smerom k používaniu čoraz sofistikovanejších metód a drahších prístrojov. Tieto prístroje vyžadujúce ľudské zdroje zastrešujúce vykonávanie analýz budú dostupné len pre laboratória s dostatočnými finančnými zdrojmi a so zárukou dostatočného množstva vzoriek.

PodĎakovanie

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

Lieratúra

DRAČKOVÁ, M. a kol. Determination Residues of Penicillin G and Cloxacillin in Raw Cow Milk Using. In *Acta Veterinaria Brno*, ISSN 0001-7213, 2009, vol. 48, p. 685-690.

TOMÁŠKA, M.; HOFERICOVÁ, M.; KOLOŠTA, M. Kvalita surového mlieka z pohľadu skúšobného laboratória Examinála. In *Zborník prednášok a posterov z medzinárodnej vedeckej konferencie "Hygiena Alimentorum XXXI"*, Košice: UVLF, 2010, s. 63 – 67. ISBN 978-80-8077-186-7.

POLÁKOVÁ, Z.; KOŽÁROVÁ, I. História vývoja skriningových metód. In *Hygiena a technologie potravín XLIV. Lenfeldovy a Höklovy dny*, Brno: Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno. 2014, s. 43, ISBN 978-80-7305-728-2.

NARIADENIE EURÓPSKEHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 470/2009 Dostupné na internete:<http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32009R0470&qid=1485276872083&from=SK>

PIKKEMAAT, M. G. Microbial screening methods for detection of antibiotic residues in slaughter animals. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2009, ISSN 1618-2650, vol. 395, no. 4, p. 893-905.

SMERNICA RADY 96/23/ES z 29. apríla 1996 o opatreniach na monitorovanie určitých látok a ich rezíduí v živých zvieratách a živočíšnych produktoch a o zrušení smerníc 85/358/EHS a 86/469/EHS a rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/. Dostupné na internete: <https://eurlex.europa.eu/legalcontent/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:31996L0023&qid=1524228445%20397%20&from=SK>

ROZHODNUTIE KOMISIE zo 14. augusta 2002, ktorým sa vykonáva smernica Rady 96/23/ES týkajúca sa vykonávania analytických metód a interpretácie výsledkov (oznámené pod číslom dokumentu C(2002) 3044)Text s významom pre EHP (2002/657/ES). Dostupné na internete: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/SK/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&qid=1524380656607&from=SK>

ŠNIRC, J. a kol. *Klinická veterinárna farmakológia*. 2007 1. Vyd. Martin: Neografia, ISBN 978-80-88892-75-5, 1184 s.

<https://food.r-biopharm.com/products/premitest-25/>

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

http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2024%20ECLIPSE.pdf

http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2023%20KALIDOS.pdf

http://peramed.com/peramed/docs/A20111_ed0_0109_355.pdf

http://www.svssr.sk/dokumenty/legislativa/vest13_2006.pdf

<http://www.milchtest.de/product/>

<http://www.zeulab.com/products.html/veterinary-residues/142-explorer-2-0.html>

http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2025%20STAR%20test.pdf

http://www.svssr.sk/dokumenty/zakladne_info/Diagnostika/R%2022%20stvorplatnova%20metoda%20RIL%20B.subtilis%20a%20M.luteus.pdf

Kontaktná adresa: Daniela Juščáková, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Daniela.Juscakova@student.uvlf.sk.

Význam enzymů v mede Role of enzymes in honey

¹Tkáč Matej, ¹Vorlová Lenka, ¹Kaniová Lenka, ¹Dluhošová Sandra, ²Steinhauserová Iva

¹Ústav hygieny a technologie mléka, ²Ústav hygieny a technologie masa,
Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Our study is focused on the analysis of diastase activity, hydroxymethylfurfural (HMF), moisture content and electrical conductivity in the honey samples from markets in Brno. We collected and analyzed 34 honey samples, while 3 blossom honey samples were labeled as "Czech honey". Among the parameters analyzed only diastase activity was detected to be in non-compliance with the value of minimal diastase activity established by the Decree No. 76/2003 Coll. and the Council Directive 2001/110/EC. All analyzed samples fulfilled the HMF concentration, moisture content and electrical conductivity according to legislative values, except for one "Czech honey" sample with moisture content and concentration of HMF exceeding the limit value according to the quality standard for Czech honey No. 1/1999.

Keywords: diastase activity; hydroxymethylfurfural; moisture content; electrical conductivity

Úvod

Med obsahuje viacero enzymů. Enzymi tvoria v mede minoritný podiel. Dôležitá je miera ich aktivity, ktorá indikuje čerstvosť medu, dodržanie správnej výrobnjej praxe, kvalitu a autenticitu medu.

Enzymy prítomné v mede môžeme rozdeliť na enzymy medu vlastné a medu cudzie (Kundříková-Burešová a Bartošová, 2018). Enzymy medu vlastné sú rastlinného pôvodu (kataláza a kyselá fosfatáza) pochádzajúce z nektáru rastlín (Persano Oddo et al., 1999) a včelám vlastné, vylučované exokrinnymi žľazami včiel. Exokrínne žľazy - slinné a hypofaryngeálne, obohacujú nektár o invertázu, glukózooxidázu a diastázu (Al-Sherif et al., 2017). Množstvo včelami pridaných enzymů k nektáru závisí na viacerých faktoroch ako sú fáza života včiel, celkový stav včelej kolónie, výživa včiel, teplotné podmienky a ďalšie (Persano Oddo et al., 1999). Enzymy medu cudzie sa v mede prirodzene nevyskytujú a do medu sa dostávajú nepovoleným prídavkom priemyselne vyrábaných sirupov (ryžových, kukuričných či pšeničných). Medzi enzymy medu cudzie patrí β -fruktofuranozidáza, β -amyláza a γ -amyláza (Kundříková-Burešová a Bartošová, 2018).

Napriek prítomnosti viacerých pre med špecifických enzymů je európskou (Smernica Rady 2001/110/ES, v znení neskorších predpisov) a národnou legislatívou (Vyhláška č. 76/2003, Sb., v znení neskorších predpisov) vyžadovaná kontrola aktivity len u diastázy. Na aktivitu diastázy v mede má vplyv botanický pôvod medu, čerstvosť medu, skladovacie podmienky, zohrev medu či nepovolený prídavok cukorných sirupov. Napriek tomu je nutné zohľadniť prirodzený pokles aktivity diastázy v priebehu skladovania v procese starnutia medu.

Vzhľadom na fakt, že med je najfalshovanejšou potravinou na trhu a prihliadnuc na často zisťovanú podlimitnú aktivitu diastázy zo strany Státní zemědělské a potravinářské inspekce (SZPI) sme si dali za cieľ posúdiť kvalitu medov aktuálne dostupných v tržnej sieti a stanoviť tak aktivitu diastázy, obsah 5-hydroxymetyl-furfuralu (HMF), obsah vody a elektrickú vodivosť.

Materiál a metódy











Analýze vybraných fyzikálne-chemických parametrov sme podrobili celkom 34 vzoriek medov, z toho 28 vzoriek medov kvetových jednodruhových aj zmiešaných a 6 vzoriek medov medovicových. Vzorky medov boli odobrané v januári 2018, prevažne v obchodných reťazcoch v Brne, s výnimkou 3 medov priamo od včelára odobraných v špecializovanej včelárskej predajni, rovnako v Brne. Analyzované vzorky medov pochádzali z Českej republiky (10), z Európskej únie (EÚ) a mimo EÚ (18), mimo EÚ (1), Talianska (1), Turecka (1), Španielska (1), Mexika (1) a Slovenska (1). Tri vzorky medov boli na obale označené ako „český med“. Vzorky medov boli až do doby analýzy skladované za izbovej teploty do +25 °C, v pôvodnom spotrebiteľskom balení.



U všetkých odobraných vzoriek medov sme stanovovali obsah vody, elektrickú vodivosť, množstvo 5-hydroxymetylfurfuralu (HMF) a aktivitu diastázy. Pri stanovení obsahu vody, elektrickej vodivosti, obsahu HMF sme postupovali podľa „*Harmonised Methods of the International Honey Commission*“ (Bogdanov, 2009). Aktivitu diastázy sme stanovili spektrofotometricky s použitím štandardného substrátu T-AMZHY pre stanovenie aktivity diastázy (α -amylázy) v mede, vo forme tabliet komerčne dodávaných firmou Megazyme Inc, IE. Pri stanovení aktivity diastázy sme postupovali podľa oficiálnej metodiky výrobcu „*Diastase Activity (α -amylase) in Honey, Assay Procedure*“ (Megazyme, 2013).

Výsledky a diskusia

Nami namerané hodnoty aktivity diastázy, HMF, obsahu vody a elektrickej vodivosti sme porovnali s limitnými hodnotami uvedenými vo vyhláske č. 76/2003 Sb. v znení neskorších predpisov a Smernici Rady 2001/110/ES v znení neskorších predpisov. V prípade, že med bol na obale deklarovaný ako „český med“ navyše s limitnými hodnotami uvedenými v Svazovej norme ČESKÝ MED č. 1/1999.

Tabuľka 1: Hodnoty aktivity diastázy, obsahu HMF, vody a el. vodivosti podľa pôvodu medu.

Sledovaný parameter		Pôvod medu					Druh medu	
		ČR <i>n</i> =10	Mimo ČR <i>n</i> =24	„Český med“ <i>n</i> =3				
		min-max			\bar{x}			\bar{x}
Aktivita diastázy	[DN]	5,2-16,4	5,5-22,4	9,2	9,8	16,4	11,0	16,9
\bar{x}		9,2	13,2	11,8				
HMF	[mg/kg]	5,0-31,6	8,4-37,9	5,0	11,0	26,6	18,3	14,0
\bar{x}		16,5	18,0	14,2				
Voda	[%]	15,3-18,6	15,5-18,7	16,7	17,5	18,6	17,2	16,2
\bar{x}		16,9	17,1	17,6				
Vodivosť	[mS/m]	 14-55 (<i>n</i> =9)	 14-69 (<i>n</i> =19)	55	14	25	33	109
		 84 (<i>n</i> =1)	 82-151 (<i>n</i> =5)	31				
		 33	 34					
\bar{x}		 84	 113					

Vysvetlivky k tab. 1:  – kvetový med,  – medovicový med, \bar{x} – priemer, ČR – Česká republika, HMF – hydroxymetylfurfural

Z celkového počtu analyzovaných vzoriek medu (*n*=34) sme u 7 vzoriek kvetových medov (21 %) zistili aktivitu diastázy nižšiu ako 8 DN. V dvoch prípadoch sa jednalo o medy pôvodom z ČR, med kvetový s aktivitou 6,1 DN a med medovicový s aktivitou 5,2 DN; odobrané v špecializovanej včelárskej predajni. SZPI uvádza, že v rámci kontrolnej akcie vykonanej v roku 2017, počas ktorej analyzovali spolu 22 vzoriek medov z tržnej siete

stanovili takmer totožnú priemernú aktivitu diastázy 11,8 DN, v porovnaní s nami zistenou priemernou aktivitou 12 DN. SZPI tiež uvádza, že zistili podlimitnú aktivitu diastázy u 14 % analyzovaných vzoriek medov.

Všetky nami analyzované vzorky medov splnili legislatívny limit obsahu HMF (40 mg/kg). Svazová norma ČESKÝ MED vyžaduje, aby „český med“ obsahoval HMF v množstve maximálne 20 mg/kg. U jednej vzorky „českého medu“ na obale deklarovanej ako „český kvetovo lúčny med“ sme zistili prekročenie tohto limitu o 6,6 mg/kg. Priemerná hodnota HMF u medov z ČR 16,5 mg/kg je porovnateľná s priemerným obsahom HMF v medoch mimo ČR 17,1 mg/kg. Rovnako SZPI v rámci ústredne riadenej kontrolnej akcie nezistila u medov z tržnej siete prekročenie povoleného obsahu HMF s rozdielom, že SZPI u analyzovaných vzoriek medov stanovila nižší priemerný obsah HMF 11,5 mg/kg v porovnaní s nami zistenou hodnotou 17,6 mg/kg. Obsah HMF spolu s aktivitou diastázy predstavujú významné ukazovatele kvality, čerstvosti a autenticity medu.

Legislatívny limit obsahu vody 20 % neprekročila ani jedna vzorka medu. Rovnako aj SZPI nezistila prekročenie povoleného obsahu vody v mede. Svazová norma ČESKÝ MED je na obsah vody v mede prísnejšia a požaduje, aby „český med“ mal obsah vody max. 18 %, pričom u jednej vzorky sme zaznamenali prekročenie tohto limitu obsahom vody 18,6 %. Priemerný obsah vody v medoch z ČR 16,9 % je takmer totožný s obsahom vody v medoch pôvodom mimo ČR 17,1 %. Elektrická vodivosť je jedným z determinantov medovicového medu, u ktorého je požadovaná vodivosť min. 80 mS/m. Limit elektrickej vodivosti splnili všetky vzorky medov.

Záver

Zhodne zo zisteniami kontrolného orgánu možno konštatovať, že aktivita diastázy je najčastejšie porušovaný kvalitatívny parameter medu, nedodržený u 21 % analyzovaných medov. Nižšia aktivita diastázy môže byť dôsledkom neadekvátneho záhrevu pri stekutovaní medu, skladovaním pri vyššej teplote či nepovoleným prídavkom cukorných sirupov.

Literatúra

AL-SHERIF, A., NAFEA, E., HAGAG, E., KAMEL, A., MAZEED, A., EWIS, M. 2017. Activity of salivary glands in secreting honey-elaborating enzymes in two subspecies of honeybee (*Apis mellifera* L). *Physiological Entomology*, vol. 42, no. 4, p. 397-403.

BOGDANOV, S. 2009. Harmonized methods of the International Honey Commission [online cit. 8.4.2018]. Dostupné z: <http://www.ihc-platform.net/ihc-methods2009.pdf>.

ČESKÝ SVAZ VČELÁŘŮ, 1999. Svazová norma ČESKÝ MED, Norma jakosti ČSV 1/1999 [online cit. 10.4.2018]. Dostupné z: <http://www.vcelarstvi.cz/dokumenty-cms/smernicemed.pdf>.

KUNDRÍKOVÁ-BUREŠOVÁ, P. a BARTOŠOVÁ, L. 2018. SZPI a kontroly medu. *Moderní včelař*, č. 3, s. 32-41. ISSN:1214-5793

MEGAZYME INTERNATIONAL IRELAND, 2013. Diastase Activity (α -amylase) in Honey, Assay Procedure [online cit. 7.4.2018]. Dostupné z: https://www.megazyme.com/docs/default-source/analytical-applications-downloads/t-amzhy_0413_data.pdf?sfvrsn=2.

PERSANO ODDO, L., PIAZZA, M., PULCINI, P. 1999. Invertase activity in honey. *Apidologie*, vol. 30, no. 1, p. 57-65. ISSN: 00448435.

SMERNICA RADY 2001/110/ES z 20. decembra 2001 o mede, In Úradný vestník Európskej únie, L 10, 2002.

VYHLÁŠKA č. 76/2003 Sb. ze dne 6. března 2003, kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony, In Sbíрка zákonů České republiky. 2003, částka 32, s. 2470-2487.

Kontaktná adresa: Matej Tkáč, Mgr., Ústav hygieny a technológie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H17009@vfu.cz.

Využitie viacnásobnej faktorovej analýzy pre hodnotenie bryndze

Application of multiple factor analysis for bryndza cheese evaluation

¹Semjon Boris, ²Král Martin, ²Pospiech Matej, ¹Reitznerová Anna, ¹Maľová Jana,
²Tremlová Bohuslava, ¹Dudriková Eva, ¹Mačanga Ján, ¹Maľa Pavel

¹Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach,
Slovenská republika

²Ústav hygieny a technológie potravín rastlinného pôvodu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika

Summary

Multiple Factor Analysis was used for the examination of bryndza cheese varieties. Sensory, textural, colour and physicochemical properties were evaluated during storage. The results showed differences in bryndza cheese varieties before and after storage. The analysis extracted five dimensions, which explain 88,99% of total variation for sensory, physicochemical and instrumental parameters of texture and colorimetry. The statistical method used in the study is a suitable tool for assessing differences in food quality and provides an opportunity to visualize and categorize the results with regard to shelf life of bryndza cheese.

Keywords: statistical analyses; sheep cheese; quality; dairy products

Úvod

„Slovenská bryndza“ je prírodný biely, jemne roztierateľný zrejúci syr s ojedinelými krupičkami, vyrobený tradičným spôsobom - mletím vyzretého ovčieho hrudkového syra alebo zmesi ovčieho a kravského hrudkového syra (Úradný vestník Európskej únie C 232/17). Bryndza je najčastejšie vyrábaná z nepasterizovaného mlieka a je charakterizovaná ako pasta, jemne roztierateľnej krémovej konzistencie a bielej farby. Tento syr je tiež vyrábaný v niektorých Európskych krajinách - Poľsko a Rumunsko (Koreňovská a Suhaj, 2007). Syr bryndza pozostáva z niekoľkých predominantných baktérií mliečneho kvasenia (LAB) patriacich do rodov *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Lactococcus* spp. a *Streptococcus* spp. (Belicová, Mikulášová a Dušínský, 2013). Výsledky výskumov ukázali nato, že bryndza je najvýraznejšou funkčnou potravinou mliečneho typu, je mikrobiálnym fenoménom Slovenska a z toho dôvodu významnou biodiverzifikovanou živou potravinou (Václaviková, 2012; Herian, 2011).

Materiál a metodika

Pre štúdium kvality bryndze sme hodnotili tri jednotlivé po sebe vyrobené výrobné dávky vzoriek bryndze: BN (bryndza vyrobená zo 100% ovčieho hrudkového syra vyrobeného z nepasterizovaného ovčieho mlieka), BP (bryndza vyrobená zo 100% ovčieho hrudkového syra vyrobeného z pasterizovaného ovčieho mlieka) a BM (bryndza vyrobená zmiešaním v pomere 50:50 ovčieho hrudkového syra s kravským hrudkovým syrom z pasterizovaného mlieka. Všetky variety bryndze boli vyrobené podľa tradičných metód výroby syru bryndza v spolupráci s mliekarňou ktorá bola držiteľom certifikátu pre výrobu syra „Slovenská bryndza“ s chráneným zemepisným označením. Tri tradičné spôsoby výroby bryndze sú podrobne opísané v žiadosti o registráciu pre chránené zemepisné označenie do systému Politiky kvality Európskej Únie pre poľnohospodárske výrobky a potraviny. V tejto práci sme analyzovali celkovo 108 vzoriek bryndze, ktoré sme náhodne vybrali v iniciačný deň výroby z variet bryndze (BN, BP a BM). Každá varieta bryndze pozostávala z 18 vzoriek analyzovaných pred skladovaním (PS) a z 18 vzoriek po skladovaní (NB). Vzorky určené na skladovanie boli umiestnené do plastových vrecúšok (polyetylén, hrúbka 70 µm, G-PACK,

LLC., Slovenská republika) pre zabránenie nežiadúceho vysušovania vzoriek a skladované 14 dní pri teplote $4 \pm 2^\circ\text{C}$.

Chemické zloženie vzoriek bryndze sme stanovili použitím štandardných metód stanovením pH, sušiny (ISO 5534, 2004), tuku (ISO 3433, 2008), bielkovín podľa Kjeldahla (Popelka a kol., 2009), obsahu soli argentometrickou titráciou podľa Mohra (STN 570107, 2001). Pre objektívne hodnotenie fyzikálnochemických parametrov vyjadrujeme tieto výsledky ako bielkoviny v sušine, tuk v sušine a soľ vo vode. Stanovenie fyzikálnochemických parametrov boli vykonané tri krát.

Objektívne meranie kolorimetrických parametrov vzoriek syrov sme vykonali v kolorimetrickom priestore CIELab, podľa McLaren (1976). Meranie bolo vykonané prístrojom Chroma meter CR-410 (meracia plocha \varnothing 50 mm, osvetlenie D65, štandardný pozorovací uhol 2° , Konica Minolta, Sensing, Inc., Japan). Výsledky kolorimetrických meraní boli spracované v programe Color Data Software CM-S100w SpectraMagic™ NX (Konica Minolta Sensing Inc., Osaka, Japan, 2014). Texturálne parametre sme stanovili použitím prístroja TA-XT Plus Texture Analyzer (Stable Micro System, Surrey, Spojené kráľovstvo) modifikovanými metódami podľa autorov Šnirc et al. (2017). Meranie sme vykonali pomocou Stable Micro Systems Type (version 9.0) softvéru. Z každej vzorky sme vykonali šesť meraní kolorimetrických a texturálnych parametrov a získané výsledky sme vyhodnotili.

Senzorické vlastnosti vzoriek bryndze sme hodnotili v senzorickom laboratóriu vybudovaného podľa všeobecného návodu na usporiadanie senzorických pracovísk (ISO 8589, 2007) v Inštitúte vzdelávania veterinárnych lekárov, Košice, Slovenská republika. Vzorky syrov sme predkladali hodnotiteľom porciované v rozmeroch 25 x 25 x 25 mm, ktoré boli uložené na bielych plastových tanieroch. Pred predkladaním na posudzovanie boli vzorky temperované na teplotu 18°C , aby v čase organoleptického hodnotenia mali $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Posudzovatelia vyplňali protokol pre hedonické senzorické hodnotenie, ktorý bol zostavený podľa Lawless a Heymann (2010) a Svensson (2012). Protokol hodnotenie obsahoval jednotlivé organoleptické vlastnosti typické pre bryndzu. Hodnotitelia v protokole mali každú predloženú vzorku posúdiť na deväť bodovej hedonickej stupnici (1 - veľmi zlý/á, 2 - zlý/á, 3 - menej chutný/á, 4 - neuspokojivý/á, 5 - priemerný/á, 6 - uspokojivý/á, 7 - chutný/á, 8 - dobrý/á, 9 - veľmi dobrý/á). Posúdili pritom vzhľad, vôňu, konzistenciu, chuť a celkovú prijateľnosť predkladaných vzoriek.

Pre vyhodnotenie vzájomných vzťahov na senzorické a inštrumentálne parametre vo vzorkách troch variet bryndze pred a po skladovaní sme použili metódu viacnásobnej faktorovej analýzy (Multiple factor analysis - MFA) s použitím doplnkového balíka R - statistics software „FactomineR“ (Sebastien, Josse a Husson, 2008) a “balíka “factoextra” (Kassambara a Mundt, 2007).

Výsledky a diskusia

V tejto práci sme použili MFA metódu so vstupnými dátami výsledkov senzorickej deskriptívnej analýzy, inštrumentálnych meraní farby a textúry, a fyzikálnochemických a mikrobiologických parametrov rôznych variet bryndze. Použili sme Kaiserovo kritérium na stanovenie počtu finálnych dimenzií s premennými podľa autorov Chapman, Lawless a Boor (2001). Z dosiahnutých výsledkov MFA metódy sme extrahovali päť dimenzií, ktoré objasňujú vzťahy z celkovej variácie premenných na 88,99%. Prvá dimenzia (Dim1) vysvetľuje 44,79% variácie premenných, druhá (Dim2) 15,66%, tretia (Dim3) 14,13%, štvrtá (Dim4) 7,43% a piata (Dim5) 6,94%.

Počas zrenia syrov dochádza k mnohým biochemickým a chemickým zmenám, ktoré sa podieľajú na tvorbe charakteristických chutí a aróm syrov (Eroglu, Toker a Dogan, 2015).

Podiel analyzovaných dát v Dim1 bol vzhľad vzoriek (12,98%; $r = 0,96$), celková prijateľnosť (12,58%; $r = 0,97$), vôňa (12,54%; $r = 0,95$), chuť (11,10%; $r = 0,91$), konzistencia (10,27%; $r = 0,90$) a kolorimetrické parametre (9,90%; $r = 0,86$). Na formovaní Dim2 sa podieľali fyzikálnochemické parametre vzoriek (17,31%; $r = 0,69$). V Dim3 to boli hlavne parametre textúry (16,50%; $r = 0,62$) s vplyvom variety vzoriek bryndze (33,85%; $r = 0,89$). V Dim4 sa podieľali parametre textúry spolu s hodnotením konzistencie vzoriek a v Dim5 to bol vplyv skladovania (82,39%; $r = 0,97$). Koreláciu hodnôt individuálnych analyzovaných senzoricých, a inštrumentálnych parametrov na hladine štatistickej významnosti $p < 0,05$ popisuje tabuľka 1.

Tabuľka 1: Korelácia premenných v jednotlivých dimenziách na štatistickej hladine významnosti ($p < 0,05$).

Dim1	r	Dim2	r	Dim3	r	Dim4	r	Dim5	r
celková prijateľnosť	0,97	a*	0,60	tvrdosť	0,60	konzistencia	0,26	bielkoviny	0,28
vzhľad	0,96	bielkoviny	0,55	tuk	0,27	tvrdosť	0,23	pH	0,21
vôňa	0,95	pH	0,39	soľ	0,26	lepivosť	-0,26	tuk	-0,28
chuť	0,91	tvrdosť	0,25	bielkoviny	-0,28				
konzistencia	0,90	soľ	0,22	lepivosť	-0,62				
L*	0,77	lepivosť	-0,23						
lepivosť	0,66	L*	-0,34						
tvrdosť	-0,66	tuk	-0,64						
a*	-0,71								
soľ	-0,76								
sušina	-0,87								
b*	-0,92								

Záver

Pre účel vyhodnotenia jednotlivých výsledkov senzorickej analýzy vzoriek bryndze v spojení s inštrumentálnym meraním kolorimetrických a texturálnych vlastností a taktiež fyzikálnochemických parametrov sa metóda viacnásobnej faktorovej analýzy preukázala ako veľmi vhodná a užitočná. Pomocou tejto metódy je možné určiť vzájomné vzťahy jednotlivých parametrov s cieľom dosahovania požadovanej kvality počas výroby bryndze.

Podakovanie

Práca bola finančne podporená grantom KEGA 005 UVLF-4/2015 a APVV-14-0397.

Literatúra u autorov

Kontaktní adresa: Boris Semjon, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Ústav hygieny a technológie mlieka, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, boris.semjon@student.uvlf.sk.

Hodnocení enologických parametrů moravských vín v závislosti na skladovacích podmínkách

Evaluation of oenological parameters of Moravian wines depending on storage conditions

Javorský Jan, Král Martin, Tremlová Bohuslava

*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Summary

Analytical chemistry has an increasingly important role in the wine industry. Compliance with analytical parameters is necessary to ensure product safety, compliance with legislation and also to understand wine technology. The aim of this work is to evaluate the oenological parameters of Moravian wine during two different temperature storage conditions.

Keywords: wine; analytical; storage conditions

Úvod

Dodržování a sledování analytických parametrů ve víně vzhledem k legislativním a senzorickým požadavkům je při uvádění na trh nezbytnou součástí pro zachování kvalitativních a jakostních parametrů vín. Při zakoupení vín v tržní síti si spotřebitel může zakoupit vína skladovaná za teplotně optimálních podmínek v rozsahu 10 – 15 °C, ve větší míře jsou však spotřebitelům nabízena v tržní síti vína, která byla skladována za pokojové teploty. Cílem této práce je sledovat vývoj analytických parametrů moravských vín v rámci jednotlivých ročníků, kdy část vín je skladována za teploty 12 °C, a část totožných vín je skladována za pokojové teploty.

Teplota může hrát významnou roli při vývoji vína v mnoha etapách během jeho životnosti. Zvýšená teplota však představuje značné riziko pro senzorické atributy vína a jeho výslednou životnost. Vína často během přepravy a skladování zažívají obtížné podmínky prostředí, což může přímo ovlivnit barvu, vůni a chuť vína. Vyšší či kolísavá teplota může v podstatě urychlit proces stárnutí. Dané změny jsou bohužel často bez povšimnutí, dokud se víno nedostane ke spotřebiteli. Četné studie zkoumaly vliv zvýšené teploty na víno se zřetelným účinkem, jako je snížení oxidu siřičitého, vývoj barev (zejména hnědnutí bílých vín) a změny profilu těkavých sloučenin. Chemické změny, které se týkají červených vín ovlivněných teplem, jsou obecně složitější než u bílých vín, avšak je pravděpodobné, že bílá vína jsou citlivější vůči působení tepla, a proto vyžadují stejnou nebo větší míru výzkumu vzhledem k teplotním účinkům (Scrimgeour et al, 2015).

Materiál a metody

Pro první etapu měření byly použity následující moravská vína ročníku 2015:

- Veltlínské zelené – výběr z hroznů, polosuché,
- Pálava – výběr z hroznů, polosladké,
- Rulandské modré 2015 – výběr z hroznů – klaret, polosuché,
- Rulandské modré 2015 – výběr z hroznů – červené, suché,
- Veltlínské zelené - pozdní sběr, suché,
- Cabernet Sauvignon rosé – výběr z hroznů – rouge, polosladké,
- Kerner – výběr z bobulí, sladké.

U jednotlivých vín jsou dosud prováděny následující chemické analýzy:

- spektrofotometrie, absorbance při 420 nm
- měření pH pomocí přístroje GRYF 259
- měření celkového SO₂ titračně pomocí 0,02 mol/l roztoku jódu
- měření polyfenolů na spektrofotometru, absorbance při 765 nm
- stanovení veškerých titrovatelných kyselin titračně odměrným roztokem 0,1 M NaOH
- stanovení skutečného obsahu alkoholu ebulioskopicky na ebuliometru
- stanovení kyslíku.

Výsledky a diskuse

Vzhledem ke skutečnosti, že veškerá vína jsou lahvována a jsou tedy skladována v obalu určenému konečnému spotřebiteli, etapy jednotlivých měření jsou rozděleny ve větším časovém odstupu, kdy je větší pravděpodobnost sledování významnějšího rozdílu změny jednotlivých analytů. První, tedy nultá etapa měření, proběhla v měsíci červenec 2017. V současné době probíhá druhá etapa měření po skladování za dvou rozdílných teplotních podmínek. Dále je s odstupem času v plánu třetí etapa měření.

Při první, čili nulté etapě měření se pH jednotlivých vín pohybovalo v rozmezí 3,02 – 3,66. Při absorbanci 420 nm se výsledky u bílých vín (včetně klaretu) pohybovaly v rozpětí 0,10 – 0,13. U růžového vína byla naměřena absorbance v rozpětí 0,35 – 0,36. Pro změření absorbance u červeného vína došlo k naředění 1:10, po kterém se výsledky pohybovaly okolo 0,19. Při spektrofotometrickém měření polyfenolů za absorbance 765 nm byly největší hodnoty u bílých a růžových vín naměřeny u vína Veltlínské zelené polosuché, kdy naměřené hodnoty dosahovaly za dané absorbance výsledku 0,72, kdežto u ostatních vzorků bílých a růžových byly naměřeny hodnoty v rozpětí 0,49 (Kerner) – 0,63. U vzorku červeného vína došlo opět k naředění 1:10 a výsledky byly v rozmezí 1,14. Hodnoty skutečného obsahu alkoholu vesměs odpovídaly hodnotám uvedeným na etiketách jednotlivých vín. Celkový obsah oxidu siřičitého byl vyšší u vín s větším obsahem slovně deklarovaného zbytkového cukru. Nejnížší množství titrovatelných kyselin bylo naměřeno u červeného vína, nejvyšší množství pak u sladkých vín, zejména u vína Kerner.

Vzhledem k tomu, že u moravských vín ročníku 2015 vybraných pro první etapy měření dosud měření probíhá, srovnání a závěry vzhledem k rozdílným podmínkám skladování budou zpracovávány v budoucnu.

Závěr

Vědecky prokázanou a obecně známou skutečností je fakt, že rozdílné teplotní podmínky skladování mají významný vliv na senzorycké vlastnosti vín, které se mění v důsledku změn jednotlivých analytů. Cílem této práce je hodnotit změnu chemických analytů různých typů moravských vín v závislosti na teplotě a době skladování.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Ústavem hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE, VFU Brno, kterému tímto děkuji.

Literatura

SCRIMGEOUR, N.; NORDESTGAARD, S.; LLOYD, N.D.R.; WILKES, E.N. 2015: Exploring the effect of elevated storage temperature on wine composition. *AUSTRALIAN JOURNAL OF Grape and Wine Research* [online]. December 2015, Volume 21, Issue S1, Pages 713-722 [cit. 2018-13-4]. Dostupný z WWW: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ajgw.12196>>.

Kontaktní adresa: Jan Javorský, Ing., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H16006@vfu.cz.

Vliv kyseliny askorbové na intenzitu zbarvení karagenanů

Relationship between ascorbic acid content and carrageenan color intensity

**Bartlová Marie, Pospiech Matej, Javůrková Zdeňka, Luňáková Ludmila,
Běhalová Hana, Tremlová Bohuslava**

*Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Summary

Carrageenan are polysaccharides, originating from red seaweeds (Rhodophyceae). They are added to food because of gel creation as a thickener. They have also stabilizing and emulsifying properties in food. They are used to meat products, milk products and ice creams. Ascorbic acid influence color stability and increases the effect of nitrate against Clostridium botulinum in meat product.

The aim of the study is comparasion to mean intensity and hue typical of carrageenan by image analysis in histological section of model meat products. There were adected different concentration of ascorbic acid. Model samples were made in the line concentration 0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 % a 10 %.

Keywords: *lectin histochemistry; meat products; nitrate; image analysis; hue typical; mean intensity*

Úvod

Karagenany se skládají z β -D-galaktosy a 3,6-anhydro- α -D-galaktosy. Jsou to produkty červených mořských řas, které se využívají v potravinářském průmyslu (Brenner a kol, 2014). Karagenany tvoří v potravinách gel, zahušťují a mají také emulgační vlastnosti (Nečas a Bartošíková, 2013; Kozłowska a kol., 2018). Dělí se do několika skupin na základě počtu a pozice sulfátových skupin, které se označují písmeny řecké abecedy. V potravinářství se využívá zejména κ , ι a λ (Velišek a Hajšlová, 2009, Sason a Nussinovitch, 2018).

Kyselina askorbová patří spolu s dusitany k nejpoužívanějším aditivům, které se používají v potravinách. Kyselina askorbová se používá v potravinářství jako stabilizátor, chrání výrobky před autooxidací. Dusitany se používají jako konzervant, zvyšují barvu a prodlužují trvanlivost masných výrobků (Bartolome a Frago, 2017).

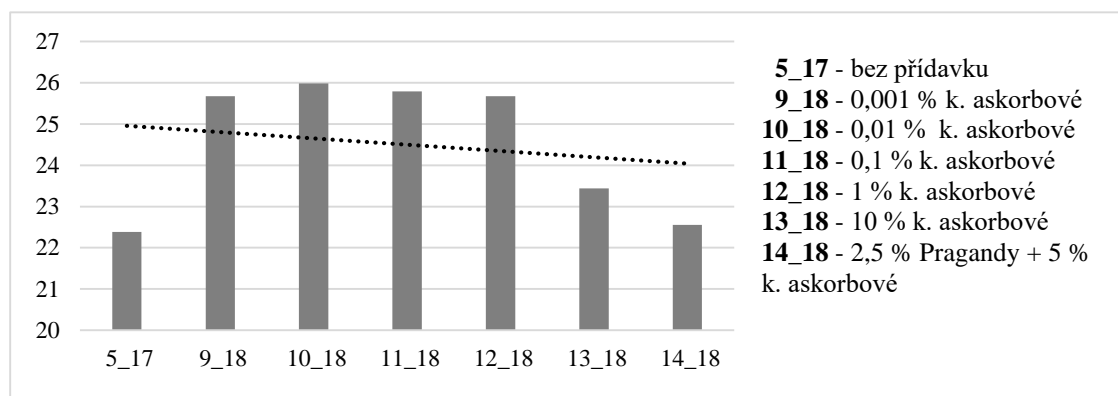
Lektiny jsou proteiny, které se váží na specifické sacharidy (Melnikova a kol., 2013). Vyskytují se v rostlinách, plísních, mikroorganismech či živočiších (Roth, 2011). K detekci vazby mezi lektiny a sacharidy se může využívat mimo jiné i světelná mikroskopie. Vazba se zviditelní použitím enzymatických nebo fluorescenčních markerů (Brooks a kol., 1997).

Materiál a metodika

Pro analýzu byly použity modelové vzorky masných výrobků s přísadkou karagenanu a kyseliny askorbové v různých koncentracích. Vzorky byly vyrobeny ze 100 g rozemletých kuřecích prsou, 1,5 g kuchyňské soli, 0,5 g polyfosfátů, 1 g κ -karageenanu, 10 ml vody a kyselina askorbová v koncentrační řadě (0,001 %, 0,01 %, 0,1 %, 1 %, 10 % a bez přísadky). Do jednoho vzorku byla přidána Pragma (HB-LAK s.r.o, Česká republika) o koncentraci 2,5 %, 1 % κ -karageenanu a 5% kyseliny askorbové. Modelové vzorky byly tepelně ošetřeny při teplotě 70 °C 10 minut v jádře výrobku. Z každého vzorku byly zhotoveny 4 parafinové bloky a z každého bloku byly nakrájeny 2 řezy o tloušťce 5 μ m. Řezy byly vyšetřeny lektinovou histochemií, kde byl použit lektin *Bandeiraea simplicifolia* (Sigma-Aldrich, Velká Británie) a poté byla provedena analýza obrazu pomocí SW NIS Element verze 4.5 (Laboratory Imagine, Česká republika). Data byla statisticky zpracována pomocí SW Unistat verze 6.0 (Unistat, Velká Británie). Ze statistických testů byl vypočítán korelační koeficient.

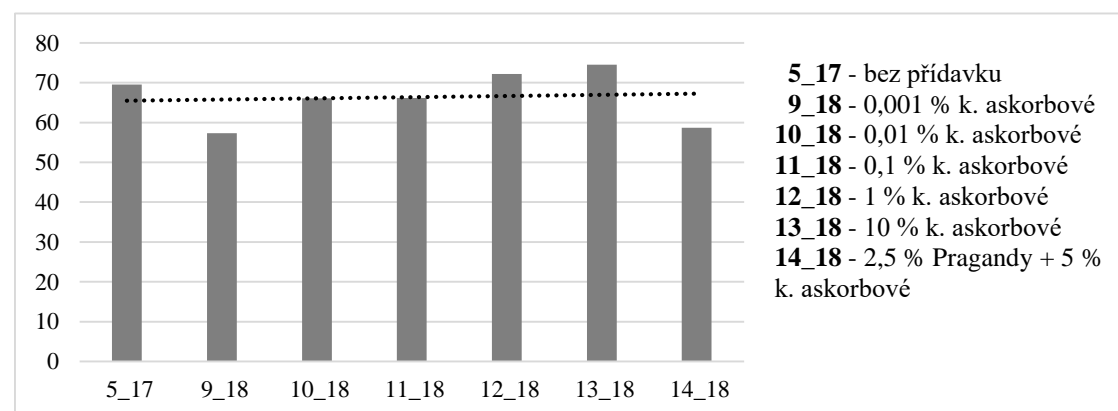
Výsledky a diskuze

V obrazové analýze byly hodnoceny parametry typický odstín a průměrná intenzita odstínu (bezrozměrné veličiny). Typický odstín je vyjádřen jako hodnota odstínu s maximální frekvencí v histogramu (NIS-Elements, 2011). Průměrné hodnoty typického odstínu jsou uvedeny v tabulce 1. Korelační koeficient je $R^2 = -0,36$ ($p < 0,01$). Nejmenší průměrnou hodnotu má vzorek 5/17, který neobsahuje přídavek kyseliny askorbové. U ostatních vzorků byly naměřeny vyšší hodnoty typického odstínu ($p < 0,05$). Hodnota vzorku 14/18, obsahující kromě kyseliny askorbové také Praguandu, se lišil od kontrolního vzorku 5/17 nejméně. Důvodem může být přídavek dusičnanové solící směsi do modelového masného výrobku.



Graf 1: Průměrné hodnoty typického odstínu ($p < 0,01$).

Průměrná intenzita odstínu je definována jako průměr hodnot intenzity pixelů (NIS-Elements, 2011). Průměrné hodnoty intenzity odstínu jsou uvedeny v tabulce 2.



Graf 2: Průměrné hodnoty intenzity odstínu ($p > 0,05$).

Korelační koeficient intenzity odstínu je $R^2 = 0,16$ ($p > 0,05$). Bylo zjištěno, že intenzita odstínu zbarvení se u jednotlivých vzorků významně nelišila. Nemenší intenzita odstínu byla naměřena u vzorku 9/18, který obsahoval 0,001 % kyseliny askorbové a 14/18. Nejvyšší hodnota byla naměřena u vzorku 13/18, který obsahoval 10% přídavek kyseliny askorbové. Průměrná intenzita odstínu byla také využita například pro měření srovnání barvy u hovězího masa, u kterého byl proveden nástřik vodou (Liu a kol., 2016).

Závěr

U modelových vzorků masných výrobků byl hodnocen vliv přídavku kyseliny askorbové na zbarvení karagenanů. Konkrétně byly hodnoceny parametry typický odstín a intenzita odstínu. Z výsledků vyplývá, že kyselina askorbová má vliv na typický odstín zbarveného karagenanu analyzovaného lektinovou histochemií. Mezi vzorky existuje negativní korelace. Mezi

vzorkem bez přídavku kyseliny askorbové a vzorky s přídavky kyseliny askorbové existují statisticky významné rozdíly. Bylo však zjištěno, že jednotlivé koncentrace přídavku kyseliny askorbové významně nekorelují s intenzitou odstínu barvy.

Literatura

Bartolome, J.P., Fragoso, A. Electrochemical detection of nitrate and ascorbic acid at glassy carbon electrodes modified with carbon nano-onions bearing electroactive moieties. *Inorganica Chimica Acta*. 2017, vol. 468, p. 223-231.

Brenner, T., Tuvikene, R., Parker, A., Matsukawa, S., Nishinari, K. Rheology and structure of mixed kappa-carrageenan/iota-carrageenan gels. *Food Hydrocolloids*. 2014, vol. 39, p. 272-279.

Brooks, S.A., Leatham, A.J.C., Schumacher, U. *Lectin histochemistry: A concise practical handbook*. 1. Vyd. BIOS Scientific Publishers Limited, 1997. ISBN 1 85996 100 2.

Kozłowska, J., Pauter, K., Sionkowska, A. Carrageenan-based hydrogels: Effect of sorbitol and glycerin on the stability, swelling and mechanical properties. *Polymer Testing*. 2018, vol. 67, p. 7-11.

Liu, J., Cao, Y., Wang, Q., Pan, W., Ma, F., Liu, C., Chen, W., Yang, J., Zheng, L. Rapid and non-destructive identification of water-injected beef samples using multispectral imaging analysis. *Food Chemistry*. 2016, vol. 190, no. 1, p. 938-943.

Melnykova, N. M., Mykhalkiv, L. M., Mamenko, P. M., Kots, S. Ya. The areas of application for plant lectins. *Biopolymers and Cell*. 2013, vol. 29, no. 5, p. 357-366.

Nečas, J., Bartošíková, L. Carrageenan: A review. *Veterinarni Medicina*. 2013, vol. 58, no. 4, p. 187-205.

NIS-Elements AR User Manual. Praha, 2011.

Roth, J. Lectins for histochemical demonstration of glycans. *Histochemistry & Cell Biology*. 2011, vol. 136, no. 2, p. 117-130

Sason, G. A Nussinovitch, A. Characterization of kappa-carrageenan gels immersed in ethanol solutions. *Food Hydrocolloids*. 2018, vol. 79, p. 136-144.

Velíšek, J., Hajšlová, J. *Chemie potravin*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. ISBN 978-80-86659-17-6.

Kontaktní adresa: Marie Bartlová, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, bartlovam@vfu.cz.

Účinnost vybraných desinfekčních prostředků na kyselinu mléčnou v extraktoru

The effectiveness of selected disinfectants of lactic acid in extractor

Horák Radek, Ošťádalová Martina, Tremlová Bohuslava

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

Summary

The article compares the effectiveness of disinfectants on the content of the lactic acid. The disinfectants used for the experimental part are formaldehyde and BetaStab®. The content lactic acid was observed and compared after processing conventional beet.

Based on the analysis of the measured data, it was found that the highest disinfecting effect on the lactic acid content had formaldehyde, the average lactic acid value was 275 mg/l. In experiment with BetaStab® disinfection the average value of the lactic acid was 350 mg/l. When the beet was processed without the use of disinfection, this average lactic acid was 371 mg/l.

Keywords: *Lactic acid; disinfection; contamination; BetaStab; formaldehyde*

Úvod

Cukrovarnictví má v České republice již dlouholetou tradici a prolíná svojí činností širokou škálu vědeckých oborů. Vývoj tohoto průmyslu se stále zdokonaluje jak z hlediska kvality svých výrobků, tak z hlediska ekonomického. Jedním z těchto aspektů cukrovarnického průmyslu je ochrana vstupních surovin před činností mikroorganismů, jejichž důsledkem dochází k vysokým ztrátám a zhoršení kvality cukru.

Působením mikroorganismů stoupá intenzita tvorby melasy a tím se snižuje výnos cukru. Důležitou a v posledních letech hojně sledovanou látkou, která vzniká vlivem mikrobiální aktivity v difuzní šťávě, je kyselina mléčná. Ta dnes slouží jako hlavní ukazatel mikrobiální kontaminace extraktoru.

V rámci kontroly kontaminace extraktoru byla v minulosti využívána tzv. resazurinová metoda. Mezi metody zjišťování kontaminace také patří metody signalizující mikrobiální kontaminaci (měření obsahu kyseliny mléčné) a metody počítající počet mikroorganismů (kultivační metody - přímé počítání mikroorganismů pod mikroskopem anebo plotnovou zředovací metodu dle Kocha). Odborná literatura popisuje možnost použití účinnějších metod. Například zjišťování kontaminace pomocí měření redoxního potenciálu, stanovení koncentrace ATP a obsahu kyslíku.

Podstatnou složkou zamezení růstu mikroorganismů v extraktoru jsou dezinfekční prostředky. Nejhojněji používanou chemikálií v oblasti dezinfekce v cukrovarnictví je formaldehyd. V posledních letech je však kladen důraz na eliminaci této látky z technologického procesu z důvodu negativního působení na lidský organismus a životní prostředí. Na základě této skutečnosti je věnována nadměrná pozornost různým přírodním alternativám formaldehydu. K přírodním alternativám formaldehydu patří např. dezinfekce BetaStab®, která je založena na bázi β -chmelových kyselin.

V práci je sledována účinnost dvou výše zmíněných dezinfekčních prostředků na obsah kyseliny mléčné, která byla měřena po vybrané období cukerné kampaně 2016/17.

Materiál a metody

Obsah kyseliny mléčné byl analyzován z difuzní šťávy extraktoru. Odběr vzorků difuzní šťávy byl prováděn každé 2 hodiny ve 4 týdenních cyklech. Následně bylo provedeno stanovení koncentrace kyseliny mléčné v odebraných vzorcích.

Ke stanovení kyseliny mléčné byl využit automatický analyzátor SUPER GL. Jedná se o zařízení, které umožňuje stanovení glukózy a laktátu na enzymaticko-amperometrickém principu s biosenzorem. Zařízení obsahuje pumpu sloužící k transportu roztoku analyzátoru, kalibračního roztoku a vzorku skrze senzor. Uvnitř senzoru se nachází elektrody, které dělí od roztoků multivrstevnatá membrána, na niž se nachází imobilizované enzymy. Vlivem chemické reakce s imobilizovaným enzymem dochází ke změně na elektrodě, jejíž signál je pak výsledkem měření.

V rámci práce jsou porovnávány účinky dezinfekce na mikrobiologickou kontaminaci při použití dvou různých dezinfekčních prostředků. Klasický dezinfekční prostředek – 30 až 40% vodný roztok formaldehydu (obchodní název Formaldehyde) a dezinfekční prostředek BetaStab® – přírodní derivát biocidů, je to vodný zásaditý roztok, který je tvořen pryskyřičnými kyselinami a přírodními pryskyřicemi.

Teplota při extrakci činila 75 °C a hodnota pH se pohybovala v rozmezí 4 až 6. Vzorek difuzní šťávy byl odebírán a měřen na příslušný parametr (obsah kyseliny mléčné) za různých technologických podmínek v extraktoru:

1. Těžení šťávy z řízků konvenční řepy za použití dezinfekce BetaStab®.
2. Těžení šťávy z řízků konvenční řepy při použití dezinfekce Formaldehyde.
3. Těžení šťávy z řízků konvenční řepy bez použití dezinfekčních prostředků.

Následné technologické podmínky byly vzájemně porovnávány v souvislosti s obsahem kyseliny mléčné. K porovnání byly využity statistické metody.

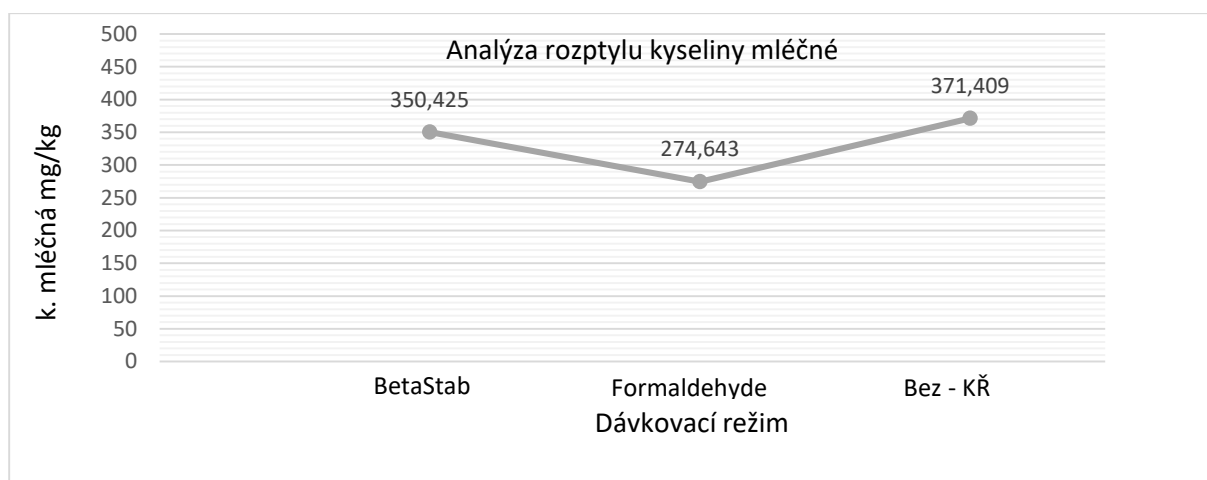
Výsledky a diskuze:

Pro vizuální znázornění obsahu kyseliny mléčné byl použit boxplot neboli krabicový graf, který graficky znázorňuje naměřená data dle jejich kvartilů. Během kampaně byly použity dva typy dezinfekčního ošetření extraktoru, které jsou zde zároveň srovnávány s extrakcí bez dezinfekčního ošetření konvenční řepy.

Grafické (Graf 1) a statistické výsledky (Tabulka 1) jasně poukazují na rozdíl mezi obsahy kyseliny mléčné při extrakci za použití dezinfekcí ve prospěch formaldehydu. Abychom ověřili pravdivost tohoto tvrzení, bylo nutné jej také prověřit pomocí analýzy rozptylu. Byly zkoumány dvě hypotézy, zda existuje statisticky významný rozdíl mezi použitím dezinfekce Formaldehyde a prostředkem BetaStab®. Analýza rozptylu byla provedena na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ při pravděpodobnosti $p < 0,05$. Kritická hodnota se stupni volnosti (1, 623) pro tento soubor dat činila $F_{krit} = 3,8$. H_0 – neexistuje statisticky významný rozdíl mezi jednotlivými dezinfekčními prostředky.

Tabulka 1: Statistické údaje-kyselina mléčná [mg/l].

	BetaStab	Formaldehyde	Konvenční řepa (bez dezinfekce)
Minimum	107,000	22,200	96,400
Maximum	1090,000	1430,000	2290,000
Průměr	350,425	274,643	371,409
Směrodatná odchylka	193,785	196,518	250,715



Graf 1 : Analýza rozptylu kyseliny mléčné.

Při srovnání dezinfikované difuzní šťávy s difuzní šťávou u konvenční řepy bez ošetření byl obsah kyseliny mléčné nejnižší při použití formaldehydu. Potvrzují se tak jeho silné baktericidní vlastnosti. Dezinfekce BetaStab®, která je založena na přírodní bázi, měla ovšem srovnatelné účinky. Obdobné výsledky testování účinnosti BetaStabu® v porovnání s formaldehydem uvádí Bennár et al. (2010), průměrný obsah kyseliny mléčné při použití formaldehydu v této studii dosahoval 206 mg/l, při BetaStabu® 346 mg/l. Obsah kyseliny mléčné v neošetřené difuzní šťávě zde činil v průměru 591 mg/l. Při experimentu byly testovány tři různé varianty dávkování pro BetaStab® a formaldehydu. Pollach et al. (2002) se zabývali nahrazením formaldehydu právě zmíněným BetaStabem®. Výsledky studie jednoznačně naznačují dostačující výsledky dezinfekce BetaStabu® ve srovnání s formaldehydem. Zmiňují také skutečnost, že některé mikroorganismy jsou více rezistentní vůči dezinfekci, a tak je nutno dezinfekci střídat.

Závěr

Formaldehyde je velice účinný dezinfekční prostředek, avšak pro jeho negativní vlastnosti na lidské zdraví je vhodné jej nahradit jinými alternativami. BetaStab® dosáhl optimálních výsledků v rámci dezinfekce extraktoru a mohl by tak být zařazen jako alternativa dezinfekčního prostředku formaldehydu. Důležité je však brát v potaz rezistenční schopnost mikroorganismů a při dezinfikování je nutno tyto prostředky střídat. V současné době jsou studovány a prokázány účinky také jiných přírodních alternativ jako např. Pilestab®, kyseliny myristové a kalafunové.

Literatura

BENNÁR, Marek, Tatiana BOJŇANSKÁ, Júlia HAMBÁLKOVÁ, Viliam LOVAS a Antonín RICHTER. Vplyv dezinfekčných činidiel na extrakciu sacharózy z cukrovej repy. *Cukrovarnické listy* [online]. 2010, 449-452 [cit. 2017-05-11]. ISSN 1805-9708.

POLLACH, Günter, Walter HEIN a David BEDDIE. *Application of hop β -acids and rosin acids in the sugar industry* [online]. 2002, , 921-930 [cit. 2017-05-11]. Dostupné z: https://betatec.com/wp-content/uploads/2015/09/Application_acids_sugar_industry.pdf

Kontaktní adresa: Radek Horák, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H16409@vfu.cz.

Using flaxseed dietary meal in the manufacture of process cheese spreads

Troshchynska Yana, Filipová Tereza, Štětina Jiří

*Department of Dairy, Fat and Cosmetics, Faculty of Food and Biochemical Technology,
University of Chemistry and Technology, Prague*

Summary

In recent years flax plant has drawn much attention mainly because of its oil and dietary fibre. Most of soluble fibre of flaxseed is a mucilaginous gum which consists of water-soluble polysaccharides - an arabinoxylan and type I rhamnogalacturonan. They have unique functional properties as hydrocolloid, which can be used in food industry as thickeners, stabilizers and emulsifiers. One of possible resource of the dietary fibre of flax is flaxseed meal remaining after the oil extraction from flaxseed.

The aim of this work is focused on the influence of flaxseed fibre on texture of process cheese spreads. Samples of spreads (25, 27.5, 30 % dry matter) with addition (0, 1, 2, 3, 4, 5 %) flaxseed meal were prepared for this experiment. Additionally, the content of emulsifying salts was different in samples (2, 2.5 and 3 %). These results were compared with cheese without flaxseed meal.

Keywords: *flaxseed meal; dietary fibre; proces cheese spreads; texture*

Introduction

Flaxseed (*Linum usitatissimum*) is a rich source of biologically active compounds with specific functional properties: polyunsaturated fatty acids (PUFA) omega-3 family, lignans secoisolariciresinol diglycoside (SDG), proteins and carbohydrates, soluble and insoluble (the mucilage gums) dietary fibres. The insoluble fraction of flaxseed fibre is represented by cellulose and lignin while the soluble fibre fractions are mostly mucilaginous carbohydrate material of seeds, or flaxseed musilage¹. It is known that flaxseed mucilage (FSM) is a complex heteropolysaccharide of high molecular weight which consist of one neutral (75 %) and two acidic fractions (25 %) identified arabinoxylan (AX) (weakly acidic), or more precisely galactoarabinoxylan (GAX), and rhamnogalacturonan type I (RG-I) that has strongly acidic characteristics².

In recent years FSM was widely used in food industry as thickeners, stabilizers and emulsifiers thanks to its unique rheological and functional properties. Thus, many authors showed that FSM has high viscous properties, exhibits good water-holding capacities, and behaves like 'weak'gel³. Moreover based on these useful properties FSM was used in the emulsion preparation and in stabilization of salad dressing and meat based food⁴⁻⁵. According to this, FSM is considered as hydrocolloid plant gum.

Flaxseed meal remaining after the oil extraction from flaxseed is largely used as livestock feed⁶. Structure of polysaccharides extracted from flaxseed meal is similar in comparison with structure of those of whole flaxseed. However there are other compounds like lignans and proteins in bigger amount than in gum from flaxseed. Rheological properties of flaxseed meal mucilage differ for various cultivars. It exhibits "weak-gel" properties for one flax variety or behaves like a typical viscoelastic fluid for other types⁷. Therefore, incorporation of flaxseed meal dietary fibre into foods are still not well characterised to develop it as a functional food with specific health advantages.

Processes cheese spreads contain ground natural cheeses of different types and degrees of maturity, emulsifying agents, other dairy and non-dairy ingredients. All of these constituents are blended under a partial vacuum wit constant agitation and heating to obtain homogeneous

mass. As a dairy product, processed cheeses spreads are a rich source of protein, calcium, and other healthful nutrients. It is a popular type of cheeses with greater durability, and therefore with high potential for innovation, including functional foods. From the nutritional point of view, processed cheeses are less valuable compared to natural cheeses. The addition of emulsifying salt worsens favorable ratio between phosphorus and calcium, but it is still a rich source of calcium and sodium⁸.

Thus, the aim of this study was to determine the influence of flaxseed dietary meal on texture of process cheese spreads with different additions of emulsifying salts.

Materials and Methods

The samples of processed cheese were prepared in Stephan UM / SK 5 by blending eidam cheese (20 % w/w fat in dry matter), water, butter, emulsifying salts (ES) Joha S9 (BK Ladenburg, Germany) and flaxseed meal obtained by screw press of Raciol flaxseed cultivar (Agritec, s. r. o, Šumperk, Czech Republic) in different concentrations. The mixture was heated to 90 ° C for 5 minutes with stirring at 1500 rpm.

A series of processed cheese samples with 27,5 % dry matter were prepared with increasing addition of flaxseed meal at rates of 0; 1; 2; 3; 4; 5% and 3% ES. For samples with 27.5 % dry matter content and 2.5% of flaxseed meal, the dosage of ES was reduced from the 3 to 2 and 2.5%. Additionally, a series of processed cheese samples with 25% dry matter, 2.5 % of flaxseed meal and different additions of ES at rates of 2; 2.5 and 3% were prepared. Two independent experiments have always been carried out.

Textural properties (hardness, cohesiveness and adhesion) of processed cheese were measured with a Universal TA.XT2 Texture Analyzer (Stable Micro System, UK) by puncture method⁹. The data were subjected to statistical analyses by one-way analysis of variance (ANOVA).

Results and Discussion

The effect of flaxseed dietary fibre (FDF) on firmness, adhesiveness and cohesiveness of the processed cheeses containing 3 % emulsifying salts are represented in Fig. 1A - C. It is clear that the texture of cheese samples differed with additives of FDF. Thus, cheese samples with 1, 2 % FDF had similar hardness as control samples without additives of FDF. However this index significantly increased for cheese samples with added of 3 % FDF ($P < 0.05$). The highest firmness was for cheese samples with 4 % FDF and addition of 5 % FDF resulted slightly decreasing of hardness (Fig. 1A).

It was found that the firmness of cheese increased ($P < 0.05$) with increasing the concentration of ES (data is not shown). The same trend was observed for cheese with 25 % dry matter. However the manufacture of processed cheese sample with 25 % dry matter and 2 % ES was failure – the product disintegrated. It should be emphasized that products with reduction of the emulsifying salts dose without the addition of FDF were similarly unstable for both cheeses with 27.5% and 25% dry matter content.

The cohesiveness of processed cheese samples has not been affected ($P > 0.05$) with the increasing of FDF concentration compared to control samples (Fig. 1B), however the adhesiveness increased with the increasing of FDF concentration (Fig. 1C).

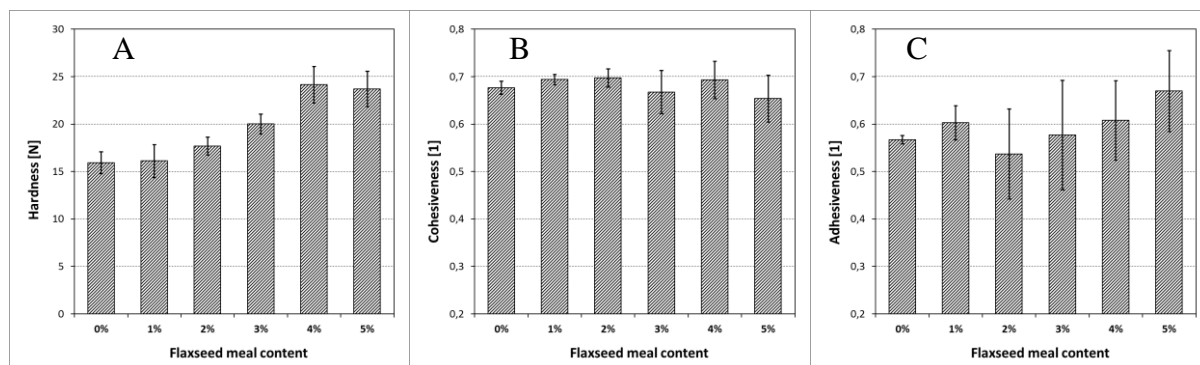


Fig. 1. Textural properties of processed cheese spreads (27,5 % dry matter, 20 % w/w fat in dry matter, 3 % emulsifying salts) containing different concentrations of flaxseed meal: (A) Firmness, (B) Cohesiveness, and (C) Adhesiveness. Error bars indicate standard deviation of independent experiments.

Conclusions

This research provides information how the textural properties of processed cheese spreads may be altered by added flaxseed dietary fibre (FDF). Thus, the concentration of added FDF had a strong effect on firmness and cohesiveness of cheeses. The firmest cheeses were with additive of 4 % FDF. Adding 2.5 % FDF can reduce the emulsifying salt content by one third in processed cheeses with a dry matter content of 27.5%.

Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project QJ1510274) and specific university research (MSMT No. 20-SVV/2016).

References

1. BERNACCHIA, R., et al. Chemical composition and health benefits of flaxseed. *Austin J Nutri Food Sci.* 2014, vol. 2, no. 8, s. 01-09.
2. CUI, W., et al. Chemical structure, molecular size distributions, and rheological properties of flaxseed gum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 1994, vol. 42, no. 9, s. 1891-1895.
3. MAZZA, G., BILIADERIS, C.G. Functional properties of flax seed mucilage. *Journal of Food Science.* 1989, vol. 54, no. 5, s. 1302–1305.
4. STEWART, S., MAZZA, G. Effect of flaxseed gum on quality and stability of a model salad dressing. *Journal of food quality.* 2000, vol. 23, no. 4, s. 373-390.
5. CHEN, H.H., et al. Interaction between flaxseed gum and meat protein. *Journal of Food Engineering.* 2007, vol. 80, no. 4, 1051-1059.
6. HO, C., et al. Extraction of lignans, proteins and carbohydrates from flaxseed meal with pressurized low polarity water. *LWT-Food Science and Technology.* 2007, vol. 40, no. 9, s. 1637-1647.
7. BHATTY, R.S. Nutrient composition of whole flaxseed and flaxseed meal. *Flaxseed in human nutrition.* 1995.
8. CARIC M., KALÁB M. Processed cheese products //Cheese: Chemistry, physics and microbiology. – Springer, Boston, MA, 1999. – s. 467-505.
9. Pons, M., & Fiszman, S. M. (1996). Instrumental texture profile analysis with particular reference to gelled systems. *Journal of Texture Studies*, 27(5), 597–624.

Contact address: Yana Troshchynska, Mgr. Ústav mléka, tuků a kosmetiky VŠCHT Praha, Technická 5, 166 28 Praha, troshchy@vscht.cz.

Detection of allergens in food samples using conjugated quantum dots as a labelling tool

Luňáková Ludmila, Tremlová Bohuslava, Pospiech Matej, Javůrková Zdeňka, Bartlová Marie

Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The use of QDs in IHF for detecting wheat, mustard and milk allergens in model samples with concentrations in the range of 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 10% was studied. The QD - IHF detection limit of 0.01 % for QDs with a wavelength of 525 nm and 0.001 % for QDs of 585 nm was established. The QD-IHF method can be used for follow-up research of other food allergens.

Keywords: *immunohistofluorescence; immunohistochemistry; fluorophore; food allergens.*

Introduction

Application of quantum dots (QDs) as a new type of fluorophores in immunological methods is a highly discussed scientific area. The great potential is particularly evident from many scientific works that experimentally use QDs in both in vivo and in vitro imaging techniques. The research area is gradually expanding from biological, biomedical and even clinical imaging (Byers et al., 2011) slowly into the field of microscopic food analysis (Bonilla et al., 2016). QDs have excellent photophysical and structural properties. In general, QDs have the three most important features - high brightness and photostability; colour tuning and narrow emission ranges; shape and size. Due to these properties, there are currently many different biocompatibilized and biofunctionalized forms of quantum dots. From the point of view of spectroscopic and microscopic analysis, many QD technologies have been developed and / or improved to illustrate the true exceptional properties for advanced biosensing (Jin, Hildebrandt, 2012). There is a wide variety of commercially available antibody-quantum dots conjugates that can be used in many applications, such as immunohistofluorescence (IHF) (Rosenthal et al., 2011). The aim of the study is to apply quantum dots to IHF detection of wheat, mustard and milk allergens in model samples (chicken ham). To check the fineness of the chosen method, the QD-IHF method was compared with the immunohistochemical methods (IHC).

Materials and Methods

Model meat products were prepared with the addition of 3 types of food allergen (wheat protein, milk protein - caseinate, mustard) for each allergen separately, for the purpose of this study. Model samples were prepared from chicken breast muscles, 1.5 % of kitchen salt and 0.5 % polyphosphates. The allergenic components were subsequently added to the meat product in an increasing concentration line: 0.001%, 0.01%, 0.1%, 1%, 10%. Samples were processed by histological technique of paraffin sections and then were subsequently examined using immunohistochemical and immunofluorescence methods. Immunohistochemical methods were performed according to standard operating procedures for detecting wheat, mustard and milk allergens that are using by the Laboratory of Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology. The modified immunofluorescence method for application to food samples was used. The modified method is based on the principles mentioned in the manual from the manufacturer of quantum dots (Invitrogen, JPN). The base of this method is an indirect two-step immunohistochemical method. Specific polyclonal primary antibodies were applied. Primary antibodies concentration of 1: 500 anti-gliadin, anti-

sin1 and anti-casein were used (Sigma-Aldrich, UK). For primary antibody labelling were used the secondary antibodies against the rabbit Fc fragment, secondary antibodies were labelled with CdSe / ZnS QDs with 525 and 585 nm emissions (ThermoFisher Scientific, GER). The examination of samples' cuts was performed in a Leica DM 3000 fluorescence microscope (Leica, GER) using fluorescence filters I3 with an emission from 510 nm (Leica, GER) and Qdot 585 filter set with an emission of 585 nm (Chroma Technology Corp., USA). Scanning the field of view was made using a camera Leica DFC 295 (Leica, GER) in conjunction with the computer program Xn View (Pierre E. Gougelet, FRA).

Results and Discussion

The results of three methods (immunohistochemical and immunofluorescence using QD at wavelengths 525 and 585 nm) were compared. The applicability of the IHF method has been verified by examining model samples of a known allergenic protein content. The result of this study was introduced an optimized QD - IHF detection method suitable for application to different types of allergens. The obtained results are shown in Table 1.

Table 1. Comparison of application of QD - IHF with IHC method in model samples.

<i>Wheat</i>			<i>Mustard</i>			<i>Milk</i>					
Koncentrace (%)	P/N		IHC	Koncentrace (%)	P/N		IHC	Koncentrace (%)	P/N		
	IHF QD 525	IHF QD 585			IHF QD 525	IHF QD 585			IHF QD 525	IHF QD 585	
0	0/4	0/4	0/4	0	0/4	0/4	0/4	0	0/4	0/4	0/4
0,001	4/0	4/0	4/0	0,001	2/2	4/0	4/0	0,001	3/1	4/0	4/0
0,01	4/0	4/0	4/0	0,01	4/0	4/0	4/0	0,01	4/0	4/0	4/0
0,1	4/0	4/0	4/0	0,1	4/0	4/0	4/0	0,1	4/0	4/0	4/0
1	4/0	4/0	4/0	1	4/0	4/0	4/0	1	4/0	4/0	4/0
10	4/0	4/0	4/0	10	4/0	4/0	4/0	10	4/0	4/0	4/0

Note: **P** = positive, **N**= negative, **Limit of detection (LOD)**

The results show that the QD - IHF method using QDs with a wavelength of 585 nm achieves the same results in the detection of wheat, mustard and milk allergens as the conventional IHC method. Comparison of the conventional IHC method with the QDs immunofluorescent histochemical method was also provided by Chen et al. (2009), which applied these techniques to the detection of caveolin - 1 and PCNA antigens, and the statistical difference between the two methods was not significant. The study showed that both methods provide the same results, although the QD-IHF signal was stronger with a lower background than those detected by the IHC. Our procedure shows the same sensitivity as IHC, this founding is opposite to Chen et al. (2009) who states that the results show that QD - IHF is a more sensitive and better method than traditional IHC. More research is needed for QD – IHF in food matrix. With quantum dots with a wavelength of 585 nm, a lower (0.001%) LOD of mustard and milk allergens was achieved than with 525 nm quantum dots. The worse detection limit for QD - IHF with QDs with a wavelength of 525 nm may be that the relative brightness of QD - green signal QD (525 nm) is lower than the intensity of another colours. For example, green signal QD (525 nm) is 17 times lower than the intensity of another colours the red QD (655 nm) and almost 32 times lower than that of near infrared QD (705 nm) (Byers et al., 2011).

Conclusions

The study compared the early validated IHC method with new IHF methods using QDs as a labelling tool. Suitability of histological labelling by QDs was confirmed for wheat, mustard and milk allergens. QDs with wavelengths of 525 and 585 nm were used as fluorophores, and

manifested as more suitable QDs with a wavelength of 585 nm. In the IHF method with 585 nm QDs the same results were achieved (LOD 0.001%) as in the traditional IHC method. However, the IHF method with QDs 585, compared to the traditional IHC method, gives a strong contrast (strong intensity of light signal) against to the background of the sample and thus making it easier for the inexperienced assessor of finding the allergen in a microscopic section and also for image analysis.

Acknowledgements

The study was supported by VFU Brno's institutional research funding.

References

- BONILLA, J. C., BOZKURT, F., ANSARI, S., SOZER, N., KOKINI, J. L. Applications of quantum dots in food science and biology. *Trends in Food Science & Technology*, 2016, vol. 53, p. 75-89.
- BYERS, R. J., HITCHMAN, E. R. Quantum dots brighten biological imaging. *Progress in histochemistry and cytochemistry*, 2011, vol. 45, no. 4, p. 201-237.
- CHEN, H., XUE, J., ZHANG, Y., ZHU, X., GAO, J., YU, B. Comparison of quantum dots immunofluorescence histochemistry and conventional immunohistochemistry for the detection of caveolin-1 and PCNA in the lung cancer tissue microarray. *Journal of molecular histology*, 2009, vol. 40, no. 4, p. 261-268.
- JIN, Z., HILDEBRANDT, N. Semiconductor quantum dots for in vitro diagnostics and cellular imaging. *Trends in biotechnology*, 2012, vol. 30, no. 7, p. 394-403.
- ROSENTHAL, S. J., CHANG, J. C., KOVTUN, O., MCBRIDE, J. R., TOMLINSON, I. D. Biocompatible quantum dots for biological applications. *Chemistry & biology*, 2011, vol. 18, no. 1, p. 10-24.

Contact address: Ludmila Luňáková, Mgr., Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, FVHE UVPS Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, lunakoval@vfu.cz.

Possible methods of processing durable fermented meat product for SEM

Běhalová Hana, Plšková Michaela, Pospiech Matej, Tremlová Bohuslava

Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The aim of this work was to use four different processing methods for a "danubian sausage", as a representative of a durable fermented meat product, and compare the effects of each method on the structure of the end product. The following procedures were used: 1) glutaraldehyde-ethanol, 2) glutaraldehyde-osmiumtetroxide-ethanol, 3) glutaraldehyde-buffer-ethanol, 4) glutaraldehyde-osmiumtetroxide- buffer- ethanol. Significant differences were observed with OsO₄, where OsO₄ fixed fat in the product, while in OsO₄-free methods fat was flushed into fixation solutions and was not visible on the resulting image.

Keywords: processing effect; osmium tetroxide; fixation; fat

Introduction

Microscopy is a basic method that in the food industry serves to observe food structures. Scanning electron microscopy is the best method for observing surface of samples (Pospiech, 2011). One of the disadvantages is high cost of chemicals for the sample's preparation (Nebesářová, 2001). The aim of this work was to find out whether certain modifications in the commonly used procedure are possible.

Group of fermented durable product was chosen. The fermented durable meat product is, according to the Decree 69/2016 Sb., a processed non-heat-treated meat product intended for direct consumption where, during fermentation, ripening, drying or smoking under defined conditions, the water activity is reduced to a_w (max) = 0,93; expiration date is 21 days at temperature plus 20 ° C and possibly other storage conditions. An example of these products are „Danubian” sausage and salami „Poličan“.

Material and Methods

Ingredients of a „Danubian“ sausage: pork, pork lard, edible salt, preservative E250, spice preparation (spice, dextrose, sugar, antioxidant E300), dye mixture (E160c colorant, sunflower oil), garlic, microorganism starter culture, pork cake. 136g of meat was used to produce 100g of the product.

Sample of sausages was processed by four different procedures according to the following table:

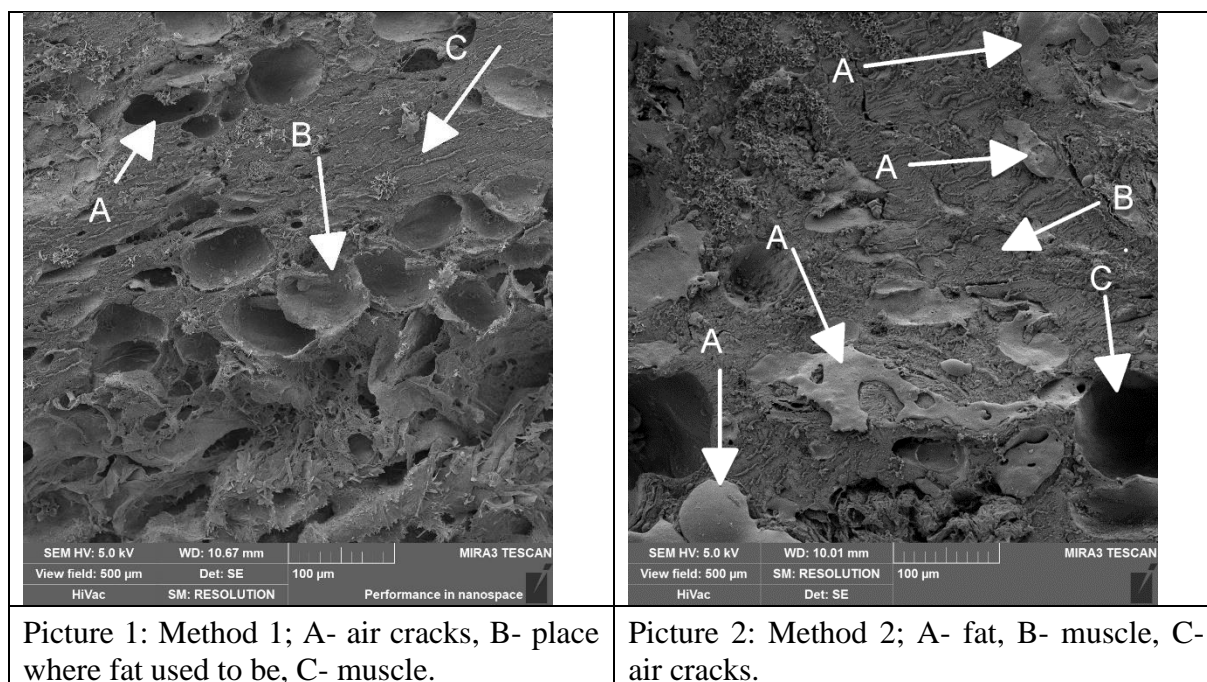
Table 1: Processing methods.

	Method 1	Method 2	Method 3	Method 4
3 % glutaraldehyde/ 24 hours	x	x	x	x
Cacodyl buffer/ 3x 15 min			x	x
1 % osmium tetroxide/ 48 hours		x		x
Cacodyl buffer/ 3x 15 min			x	x
Ethanol	x	x	x	x

Discussion

The most striking differences were observed between the methods that used osmium tetroxide and those who did not. Osmium tetroxide fixes fat, so the fat remains in the sample after

processing and is visible in the resulting photos (Bahr, 1955). There is no visible difference between the samples where we used the buffer and the ones without using the buffer.



Conclusion

Fat is an important part of meat products, so it is advisable to keep the fat in mind when studying structure of meat products. Based on our findings, using the buffer does not effect the results in any way, so there is no reason to use this specific method. We concluded that to study the product's structure including the molecules of fat, it is best to use the oxide tetroxide methods, since this is the one that yielded the best results in our experiment.

References

- BAHR, G. F. Continued studies about the fixation with osmium tetroxide: Electron stains IV. *Experimental Cell Research*, 1955, vol. 9, p. 277- 285.
- Vyhláška č. 69/2016 Sb., o požadavcích na maso, masné výrobky, produkty rybolovu a akvakultury a výrobky z nich, vejce a výrobky z nich. In: *Sbírka zákonů*, 2016, č. 69.
- NEBESÁŘOVÁ, J., VANCOVÁ, M.. *Elektronová mikroskopie pro biology* [online]. 2001 [cit. 2018-04-12]. Dostupné z: <http://triton.paru.cas.cz/old-lem/book/index.html>
- MURTEY, M. D., RAMASAMY, P. *Sample Preparations for Scanning Electron Microscopy*, 2016, s. 161-185.
- POSPIECH, M., ŘEZÁČOVÁ LUKÁŠKOVÁ, Z., TREMLOVÁ, B., RANDULOVÁ, Z., BARTL, P. Microscopic methods in food analysis. *Maso International- Journal of food science and technology*, 2011, no.1, p. 27- 34.

Kontaktní adresa: Hana Běhalová, MVDr. Bc., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, behalovah@vfu.cz.

SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat
a hygiena vegetábilí*

Vliv náhrady sójového šrotu šrotem z lupinových semen v krmných směsích na produkční ukazatele vykrmovaných kuřat a kachen

Influence of a replacement a soybean meal with a lupin bean meal in complete feed on production indicators of fattened broilers and ducks

¹Jeřábek Martin, ¹Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹Ústav zootechniky a zoohygieny, ²Ústav výživy zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

A main idea of this work was to test possibilities of a replacement (50% and 100%) a soybean meal with a lupin bean meal (variety Zulika) in complete feed for fattening of broilers and ducks. Results confirm that the most suitable is a replacement 50% a soybean meal with a lupin bean meal. Fattened animals reached similar live weights in comparison with a control group, broilers 2,440kg (control 2,391kg), ducks 3,158kg (control 3,169kg) at the end of fattening (broilers 35th day and ducks 39th day) and a difference between feed consumptions was minimal. We can evaluate less mortality as positive in groups with a lupin bean meal in feed, especially in fattening of broilers.

Keywords: broiler; duck; fattening; lupin beans; feed; production indicators

Úvod

Dlouhodobá koncepce v evropském zemědělství si klade za cíl zvyšovat produkci tuzemských proteinových komodit na úkor dovozových. Jde o to, omezovat závislost na dovozu rostlinných proteinových krmiv a zaměřit se na proteinová krmiva tuzemská. Z tohoto pohledu se jeví jako perspektivní semena kulturních plodin rodu *Lupinus* pro svůj vysoký obsah hrubého proteinu, srovnatelný s obsahem hrubého proteinu v sójových bobech. Importovaná sója a sójové produkty (šrot) jsou v současné době dominantní proteinové komponenty v krmných směsích určených pro výživu u všech hospodářských zvířat. Jejich náhrada jinou, zejména tuzemskou proteinovou komponentou, by významně přispěla k řešení výše uvedených problémů. Proto je i našim cílem ověřit možnost využití šrotu z lupinových semen jako náhrady za sójový extrahovaný šrot v krmných směsích ve výkrmu brojlerových kuřat a kachen (Geigerová et al., 2017). Závěry z těchto experimentů dokládají i výsledky realizované v provozních podmínkách ve výkrmu brojlerových kuřat (Suchý et al., 2017; Karel et al., 2017).

Materiál a metodika

Cílem předložené práce bylo ověřit produkční účinnost krmných směsí ve výkrmu brojlerových kuřat a kachen, ve kterých byla provedena částečná (50%) nebo úplná (100%) náhrada sójového extrahovaného šrotu šrotem z lupinových semen. Do experimentu byla použita lupinová semena odrůdy Zulika, která obsahují, u nás z pěstovaných odrůd bílých lupin, nejvíce hrubého proteinu. Pokusy byly realizovány v akreditované stáji Ústavu výživy zvířat s řízeným světelným a tepelným režimem, podle technologického návodu pro výkrm příslušného hybridu.

Experiment na vykrmovaných brojlerových kuřatech

Do experimentu bylo zahrnuto celkem 240 jednodenních kuřat hybridní kombinace ROSS 308, která byla rozdělena do tří skupin, a to na skupinu kontrolní K 80 kuřat (40 slepiček a 40 kohoutků), skupinu pokusnou P 50% 80 kuřat (40 slepiček a 40 kohoutků) a skupinu P 100% 80 kuřat (40 slepiček a 40 kohoutků). V průběhu výkrmu byly kuřatům zkrmovány tři typy krmných směsí BR 1 (1. – 14. den), BR 2 (15. – 29. den) a BR 3 (30. – 35. den). Krmné směsi

měly stejné komponentní složení s tím rozdílem, že u pokusných skupin byl sójový extrahovaný šrot nahrazen u skupiny P 50% a u skupiny P 100% šrotem z lupinových semen, a to z 50 % a 100 %. V průběhu výkrmu byla průběžně sledována spotřeba krmné směsi, která sloužila k výpočtu konverze krmiva. Ve 35. dnu výkrmu byla kuřata individuálně zvážena a z jejich hmotnosti vypočítána průměrná hmotnost podle jednotlivých skupin.

Experiment na vykrmovaných brojlerových kachňácích

Do experimentu bylo zahrnuto celkem 180 jednodenních kachňáců hybridní kombinace Cherry Valley, která byla rozdělena do tří skupin, a to na skupinu kontrolní K 60 kachňáců (30 kachen a 30 kačerů), skupinu pokusnou P 50% 60 kachňáců (30 kachen a 30 kačerů) a skupinu P 100% 80 kachňáců (30 kachen a 30 kačerů). V průběhu výkrmu byly zkrmovány čtyři typy krmných směsí VKCH Start (1. – 10. den), VKCH 1 (11. – 19. den), VKCH 2 (20. – 35. den) a VKCH 3 (36. – 40. den). Krmné směsi měly stejné komponentní složení s tím rozdílem, že u pokusných skupin kachňáců byl sójový extrahovaný šrot nahrazen u skupiny P 50% a u skupiny P 100% šrotem z lupinových semen, a to z 50 % a 100 %. V průběhu výkrmu byla průběžně sledována spotřeba krmné směsi, která sloužila k výpočtu konverze krmiva. Ve 39. dnu výkrmu byly kachny individuálně zváženy a z jejich hmotnosti vypočítána průměrná hmotnost podle jednotlivých skupin.

Výsledky a diskuze

Experiment na vykrmovaných brojlerových kuřatech

Jak dokumentuje tabulka 1, živá hmotnost kuřat na konci výkrmu (35. den) dosáhla u kontrolní skupiny K 2,391 kg, u pokusné skupiny P 50% 2,44 kg a u pokusné P 100% 2,323 kg. Z výsledků je zřejmé, že 50% náhrada sójového šrotu lupinovým nesnížila produkční účinnost krmných směsí, naopak u 50% náhrady dosáhla kuřata vyšší průměrné hmotnosti. Rozdíl mezi průměrnou hodnotou K a P 50% byl statisticky neprůkazný. Nejnižší průměrnou hmotnost dosáhla kuřata skupiny P 100%, která se statisticky průkazně nelišila od průměru skupiny K. Ve srovnání se skupinou P 50 % byl rozdíl průměrů mezi skupinami (P 50% - P 100%) statisticky průkazný ($P \leq 0,05$)

Tabulka 1. Průměrné hodnoty živé hmotnosti kuřat včetně statistických charakteristik.

Kuřata 35. den	K	P 50%	P 100%
x (kg)	2,391^A	2,440^A	2,323^b
Sn	± 0,254	± 0,266	± 0,320

Na základě sledování denní spotřeby krmných směsí jsme dospěli k výsledku (tabulka 2), že nejvyšší spotřeba krmné směsi na 1 kg živé hmotnosti (konverze) byla u kuřat skupiny K 1,43 kg, o něco vyšší u skupiny P 50% 1,54 kg a srovnatelná u skupiny P 100% se skupinou K. Vyšší spotřeba krmných směsí u skupiny P 50% je dána vyšší růstovou intenzitou kuřat P 50%.

Tabulka 2. Konverze krmných směsí za období výkrmu (1. - 35. den).

Skupina	K	P 50%	P 100%
Konverze (kg)	1,43	1,54	1,45

V průběhu výkrmu byl sledován i úhyn kuřat, který za období 1. - 35 den byl u skupiny K 7,5 %, u skupiny P 50% 2,50 % a u skupiny P 100% 0 %. Z výsledků je zřejmé, že se zvyšujícím se obsahem lupinového šrotu v krmných směsích klesal úhyn kuřat.

Experiment na vykrmovaných brojlerových kachnách

Jak dokumentuje tabulka 3, živá hmotnost kachen na konci výkrmu (39. den) dosáhla u kontrolní skupiny K 3,169 kg, u pokusné skupiny P 50% 3,158 kg a u pokusné P 100% 2,968 kg. Z výsledků je zřejmé, že 50% náhrada sójového šrotu lupinovým nesnížila produkční účinnost krmných směsí a průměrná hmotnost u skupiny K a P 50% byla srovnatelná. Nejnižší průměrnou hmotnost dosáhla kachňata skupiny P 100%, která byla statisticky vysoce významně nižší ($P \leq 0,01$) ve srovnání s průměrnými hodnotami skupiny K i P 50%.

Tabulka 3. Průměrné hodnoty živé hmotnosti kachen včetně statistických charakteristik.

Kachny 39. den	K	P 50%	P 100%
x (kg)	3,169 ^A	3,158 ^A	2,968
Sn	± 0,262	± 0,279	± 0,216

Z denní spotřeby krmných směsí jsme dospěli k výsledku (tabulka 4), že mezi skupinami byly minimální rozdíly v konverzi krmných směsí. U skupiny K byla konverze 1,94 kg, u skupiny P 50% 1,96 kg a u skupiny P 100% 1,96 kg.

Tabulka 4. Konverze krmných směsí za období výkrmu (1. - 39. den).

Skupina	K	P 50%	P 100%
Konverze (kg)	1,94	1,96	1,96

V průběhu výkrmu byl sledován i úhyn kachen, který za období 1. - 39 den byl u skupiny K 0 %, u skupiny P 50% 3,33 % a u skupiny P 100% 0 %.

Závěr

Závěrem lze konstatovat: za optimální lze považovat 50% náhradu sójového extrahovaného šrotu šrotem lupinovým, 50% náhrada významně neovlivnila konverzi krmných směsí, u kuřat podávání lupinového šrotu v krmných směsích významně snížilo jejich úhyn.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena grantovým projektem QJ1510136 Optimalizace proteinové výživy monogastrických zvířat na bázi odrůd semen lupiny bílé (*Lupinus albus L.*).

Literatura

GEIGEROVÁ, M., ŠVEJSTIL, R., SKŘIVANOVÁ, E., STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P. Effect of dietary lupin (*Lupinus albus*) on the gastrointestinal microbiota composition in broiler chickens and ducks. *Czech Journal of Animal Science*, 2017, vol. 62, no. 9, p. 369-376.

KAREL, K., KUBISKA, Z., SUCHÝ, P., STRAKOVÁ, E. Náhrada sójového šrotu v krmných směsích brojlerových kuřat (angličtina). *Krmivářství*, 2017, roč. 21, č. 5, s. 26-28.

SUCHÝ, P., KROUPA, L., MACHÁČEK, M., STRAKOVÁ, E. Nutriční hodnota lupinových semen v porovnání se sójovými boby (angličtina). *Krmivářství*, 2017, roč. 21, č. 4, s. 20-22.

Kontaktní adresa: Martin Jeřábek, Ing., Moravská Chrastová 65, 569 04 Brněnec, martin.jerabek@seznam.cz.

SEKCE 3

Veterinární ekologie

***Enterobacteriaceae* isolates resistant to beta-lactam antibiotics from chicken farms in Paraguay**

¹Nešporová Kristína, ^{1,2}Literák Ivan, ^{1,2}Dolejská Monika

¹*Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

²*CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

Summary

Beta-lactam antibiotics are clinically very important since they are used for treatment of various infections in humans and animals. However, resistance to these antibiotics among Enterobacteriaceae isolates is increasing as a result of dissemination of beta-lactamases that have ability to degrade beta-lactam antibiotics. Beta-lactamases are diverse group of enzymes with various activities but extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) and AmpC-type beta-lactamases (AmpC) are among the most important resistance mechanisms. We aim to evaluate the occurrence of ESBL/AmpC-producing Enterobacteriaceae isolates in twelve chicken farms in Paraguay. We cultivated 66 cloacal swabs on MacConkey agar with cefoxime (2 mg/l) to select resistant isolates. Each isolate was identified using MALDI-TOF and tested for susceptibility to selected antibiotics. Afterwards we performed polymerase chain reaction (PCR) and Sanger sequencing to detect resistance genes and to assign them to a specific variant. High prevalence of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates was found and most of them carried bla_{CTX-M-2}, bla_{CTX-M-8} and bla_{CMY-2} genes. Transfer of these genes by plasmid conjugation experiments revealed that they are carried by plasmid which means they can be easily spread among bacterial population by horizontal gene transfer.

Keywords: ESBL; AmpC; Enterobacteriaceae; Paraguay

Introduction

Beta-lactam antibiotics represent group of antimicrobials of high clinical importance for both human and veterinary medicine. Unfortunately, their efficiency is jeopardized by beta-lactamases enzymes which have the ability to hydrolyse the beta-lactam ring of the antibiotic and reduce the effect of these drugs. Many types of beta-lactamases have been described so far, however, ESBL and AmpC-type beta-lactamases are most significant since they can hydrolyse broad-spectrum beta-lactams such as third- or fourth-generation cephalosporins. Moreover, ESBL/AmpC genes are frequently spread by horizontal gene transfer as they are often carried by plasmids or transposons. The prevalence of genes encoding these enzymes is growing within members of Enterobacteriaceae which limits treatment possibilities for infections caused by bacteria of this family. [1,2]

Antibiotic resistance is one of the best examples for One Health concept which is based on idea that all living beings share one common health in some sectors. ESBL/AmpC-producing bacteria can be found in various environments, animals and humans. Their occurrence in food-producing animals can reach high level due to usage of antibiotics and selection of resistant strains which can be then transferred to humans. [3]

High prevalence of ESBL/AmpC-producing isolates in human clinical samples have been reported in South American countries, however, very limited data are available from the veterinary sector. One of the first studies evaluating antibiotic resistance in chicken and chicken meat in Paraguay found high level of resistance to nitrofurantoin and nalidixic acid in *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolates. [4] However, studies focusing on ESBL/AmpC genes in bacteria of poultry origin from Paraguay have not been published yet. Therefore, we aim to evaluate resistance to extended-spectrum beta-lactam antibiotics in broiler chicken farms in Paraguay.

Material and Methods

A total of 66 cloacal samples were taken from healthy finisher broiler chicken from 12 farms in Paraguay in 2012. Each sample was cultivated on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/l) to select resistant isolates. After selection, isolates were species identified using MALDI TOF Mass Spectrometry. Each *E. coli* and *K. pneumoniae* isolate was tested for ESBL/AmpC production using MAST® disk test (Mast Group Ltd., UK). Susceptibility to 12 antimicrobial substances was tested using disk diffusion method as well. The presence of beta-lactamase gene was determined by PCR and Sanger sequencing. Conjugation experiments were performed using filter-mating method and selection of the transconjugants was done on media with cefotaxime (2 mg/l), sodium azide (100 mg/l) and rifampicin (25 mg/l) since the recipient *E. coli* MT102 is resistant to sodium azide and rifampicin but susceptible to cefotaxime. Successful transfer of beta-lactamase genes was confirmed using PCR detection of the respective genes.

Results

A total of 46 *E. coli* and 19 *K. pneumoniae* ESBL/AmpC-producing isolates was obtained. The prevalence of ESBL/AmpC-producing isolates in the examined farms was 97% (n = 66) since we did not obtain such isolates from two samples only. Among *E. coli*, 27 isolates were ESBL producers, 21 were positive for AmpC-type beta-lactamase and 2 isolates produced both beta-lactamases. ESBL production was detected in all *K. pneumoniae* isolates. All AmpC-type beta-lactamase producing isolates carried gene *bla*_{CMY-2} (32%, n = 65). In most of the ESBL producers, *bla*_{CTX-M} gene was detected. The gene was present in two sequence variants including *bla*_{CTX-M-2} (35%, n = 65) and *bla*_{CTX-M-8} (31%, n = 65). ESBL genes of SHV family were detected in *K. pneumoniae* isolates including *bla*_{SHV-27} (11%, n = 65), *bla*_{SHV-2} (8%, n = 65) and *bla*_{SHV-28} variants.

Testing for susceptibility to 12 antimicrobials indicated that all isolates were multiresistant since they showed resistance to more than two groups of antibiotics. Among the expected resistance to ampicillin, cefalotin and other beta-lactams, the isolates were resistant to streptomycin (89%), sulphonamides (86%), tetracyclines (69%), trimetoprim-sulfamethoxazole (38%), chloramphenicol (32%) and gentamicin (14%). Moreover, resistance to first-generation quinolones and fluoroquinolones, represented by nalidixic acid (75%) and ciprofloxacin (35%) were detected.

The conjugation transfer of ESBL/AmpC genes to plasmid-free *E. coli* recipient cells was successful in 85%.

Discussion

The results suggesting beta-lactams antibiotic are frequently used in Paraguay chicken farms. However, high prevalence of ESBL/AmpC genes in chicken farms have been reported globally, including Europe. In Denmark, 22 out of 26 farms showed more than 80% prevalence of these genes in 2009. [5] Successful transfer of ESBL/AmpC genes to recipient cells proved that these genes are carried by plasmids. The location on mobile genetic elements enable their horizontal transfer within the bacterial population. Resistance of ESBL/AmpC-producing isolates to other antimicrobials suggests that these bacteria carry multiple genes encoding the resistance phenotype. We need to test for these genes in our future studies.

Conclusion

Prevalence of ESBL/AmpC type beta-lactamase-producing isolates is very high in healthy broiler chickens in Paraguay. Moreover, the isolates showed resistance to other groups of antibiotics which together with beta-lactam resistance limits treatment possibilities greatly.

Presence of these multiresistant strains in poultry farms represents potential risks for public health as they may be transferred to humans via the food chain.

Acknowledgement

This study was supported by CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund (LQ1601).

References

- [1] MADEC, J. Y et al. Extended-spectrum β -lactamase/AmpC- and carbapenemase producing Enterobacteriaceae in animals: a threat for humans? *Clinical Microbiology and Infection*. 2017, vol: 23, no. 11, p. 826–833.
- [2] COSTA, D. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*. 2009, vol. 138, p. 339-344.
- [3] NORIZUKI, C. et al. Specific *bla*CTX-M-8/IncII plasmid transfer among genetically diverse *Escherichia coli* isolates between humans and chickens. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2017, vol. 61, p. e00663-17.
- [4] WEILER, N. et al. Primeros resultados de la vigilancia integrada de la resistencia antimicrobiana de patógenos transmitidos por alimentos, *Campylobacter spp.* y *Salmonella spp.* en tres poblaciones distintas. Paraguay. 2011-2012. *Memorias del instituto de investigaciones en ciencias de la salud*. 2017, vol. 15, n. 2, p. 64-72.
- [5] DIERIKX, C. et al. Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Dutch broilers and broiler farmers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2013, vol. 68, p. 60-67.

Contact address: Kristína Nešporová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H17005@vfu.cz.

Development of new method for detecting rare tick-borne diseases

Balážová Alena, Baláž Vojtech, Široký Pavel

Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Apicomplexan protozoan of genus Babesia and intracellular bacteria Anaplasma phagocytophilum and Rickettsia sp. are tick-borne pathogens and their distribution in the Czech Republic is insufficiently known. They can cause human diseases and are particularly dangerous for patients with deficiencies in immune system. Our goal is to develop a new method of triplex qPCR able to detect all three pathogens thus giving us efficient tool for surveys. We test already published primers and probes as well as modified and newly designed ones. This new method will be used on ticks collected in years 2016 – 2018 in all parts of the Czech Republic and it will give us important data about distribution and abundance of these pathogens in their vectors.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum; Rickettsia, Babesia; tick-borne disease; qPCR; Czech Republic*

Introduction

Anaplasma phagocytophilum and *Rickettsia* spp. are Gram-negative α -Proteobacteria from order Rickettsiales. They are non-motile obligate intracellular parasites transmitted by arthropods. *A. phagocytophilum* usually resides in membrane-bound cytoplasmic vacuoles of neutrophils in the form of agglomerated morulae. It causes granulocytic anaplasmosis in various animals and humans, causing mostly influenza-like symptoms including fever and headache (Blanco & Oteo 2002). However, fatal causes were reported (Tsiodras et al. 2017). *A. phagocytophilum* is transmitted by up to 20 species of ticks (Stuen et al. 2013). In Czech Republic it was detected in questing *Ixodes ricinus* (Rybářová & Široký 2017; Venclíková et al. 2016), *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* (Rybářová & Široký 2017). Prevalence varies significantly (Venclíková et al. 2016). Anti-*A. phagocytophilum* antibodies were detected in 10,82 % of human patients with suspected Lyme disease (Heroldová Dvořáková et al. 2014).

Rickettsia spp. are distributed worldwide and divided into two main groups, Spotted Fever Group (SFG) and Typhus Group. The pathogen shows highest affinity for vascular endothelial cells (Sahni & Rydkina 2009). *Rickettsia* spp. are transmitted by arthropods and transovarial transmission is possible. The main vectors of SFG *Rickettsia* in Europe are ticks. The human-infecting *Rickettsia* found in the Czech Republic are *R. monacensis* and *R. helvetica* in *Ixodes ricinus* (Venclíková et al. 2016) and *R. helvetica* and *R. raoultii* in *Dermacentor reticulatus* (Rudolf et al. 2016). Clinical manifestations of these species vary – from non-specific symptoms including fever and rash (Faccini-Martinez et al. 2014) caused by *R. helvetica* to tick-borne lymphadenopathy (TIBOLA) by *R. raoultii* (Silva-Pinto et al. 2014).

Genus *Babesia* (phylum Apicomplexa, order Piroplasmida) contains tick-borne protozoan intraerythrocytic parasites infecting various vertebrates including humans. Human babesiosis in Europe is caused by three species - *B. microti*, *B. divergens* and *B. venatorum*. Clinical symptoms are malaria-like, can include haemolysis and in severe cases can lead to internal organ failure (Dumic et al. 2018; Haselbart et al. 2008). Two species of human-infecting *Babesia* were found in the Czech Republic so far – *B. venatorum* (Venclíková et al. 2015) and *B. microti* (Rudolf et al. 2005).

All three pathogens affect mostly immunosuppressed patients, however, many cases of these diseases probably go undetected. Traditional detection of *Anaplasma* and *Babesia* by light microscopy of blood smears is not applicable to *Rickettsia*. Immunological approaches are used for detection of all three pathogens. However, molecular diagnostic methods detecting presence of pathogen's DNA are gaining importance due to their sensitivity and robustness. Our aim is development of efficient multiplex qPCR allowing quick and reliable diagnosis of the agents of these neglected tick borne diseases.

Materials and Methods

We used questing ticks collected by flagging in years 2016-2018. Our sampling covered localities close to all bigger towns in the Czech Republic (above 15 000 inhabitants). The identification of target genes for primer and probe design was based on literature search of published PCR assays (Lempereur et al. 2017; Silaghi et al. 2017; Portillo et al. 2017). Over 30 sets of primer+probe combinations were designed with the use of sequences from several species of the pathogen genus obtained from GenBank database. Sets that showed intra-genus sequence identity (comparison among several species) and differed from outgroup (closest related genus) were chosen for later testing. Over 60 oligonucleotides were tested as potential primers and probes for the use in qPCR. Initial performance testing of the designed PCR sets used the SYBR™ green master mixes without the use of labelled probes, to address the question of cross-interaction between the primer and probe oligonucleotides aiming the 3 pathogens. We used samples of DNA isolated from ticks and previously tested for the target pathogens with standard PCR. Standard PCR with temperature gradients was used with designed primers to specify the highest annealing temperature at which all primer sets operated. Further tests contained specificity testing with samples containing target DNA, non-target DNA and no DNA. In the next step the sets showing good performance in specificity and efficient DNA amplification were selected and tested as single qPCR using FAM labelled TaqMan™ probes. The ideal annealing temperature, amplification duration and concentrations of primers and probes were tested with the hybridisation probes.

Results and Discussion

We struggled with the issue of non-target DNA amplification in case of primers designed for whole genus *Babesia* and the search for ideal primer set continues. The selected assays including the probes will be optimized and tested in duplex- and triplex-qPCR settings. Different options of quantification standards (linearized plasmids with inserted target sequence, purified and measured PCR amplicons or cDNA from known number of cells where possible) for each pathogen will be produced and tested for performance in simplex, duplex and triplex qPCR assays. Using DNA standard templates with known concentration measured by spectrophotometer the lower limit of detection will be identified for each pathogen in the reaction. Following the optimization of the developed duplex (triplex) assay we will use these in different real-time PCR systems within the laboratories at UVPS to test inter-laboratory reproducibility of results.

Acknowledgement

This work was supported by Grant Agency for Health Research of the Czech Republic (project AZV No. 16-33934A).

References

BLANCO, J.R.; OTEO, J.A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2002, 8(12), 763-772.

- DUMIC, I.; PATEL, J.; HART, M.; NIENDORF, E.R.; MARTIN, S.; RAMANAN, P. Splenic Rupture as the First Manifestation of Babesia Microti Infection: Report of a Case and Review of Literature. *American Journal of Case Reports* [online]. 2018, **19**, 335-341.
- HEROLDOVÁ DVOŘÁKOVÁ, M.; DVOŘÁČKOVÁ, M. Séroprevalence Anaplasma phagocytophilum u pacientů se suspektní lymeskou borreliózou. *Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie*. 2014, **63**(4), 297–302.
- FACCINI-MARTÍNEZ, A.A.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; HIDALGO, M.; OTEO, J.A. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *International Journal of Infectious Diseases* [online]. 2014, **28**, 126-139.
- HÄSELBARTH, K.; KURZ, M.; HUNFELD K.; KRIEGER, G. Babesiose bei einem immunsupprimierten Patienten. *Medizinische Klinik* [online]. 2008, **103**(2), 104-107.
- LEMPEREUR, L.; BECK, R.; FONSECA, I. et al. Guidelines for the Detection of Babesia and Theileria Parasites. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* [online]. 2017, **17**(1), 51-65.
- PORTILLO, A.; DE SOUSA, R.; SANTIBÁÑEZ, S. et al. Guidelines for the Detection of Rickettsia spp. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* [online]. 2017, **17**(1), 23-32.
- RUDOLF, I.; GOLOVCHENKO, M.; SIKUTOVÁ, S.; RUDENKO, N.; GRUBHOFFER, L.; HUBÁLEK, Z. Babesia microti (Piroplasmida: Babesiidae) in nymphal Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) in the Czech Republic. *Folia parasitologica*. 2005, **52**(3), 274-276.
- RUDOLF, I.; VENCLÍKOVÁ, K.; BLAŽEJOVÁ, H.; BETÁŠOVÁ, L.; MENDEL, J.; HUBÁLEK, Z.; PAROLA, P. First report of Rickettsia raoultii and Rickettsia helvetica in Dermacentor reticulatus ticks from the Czech Republic. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2016, **7**(6), 1222-1224.
- RYBÁŘOVÁ, M.; ŠIROKÝ, P. Occurrence of Anaplasma phagocytophilum in three sympatric tick species in the South Moravia, Czech Republic. *Biologia* [online]. 2017, **72**(4).
- SAHNI, S.K.; RYDKINA, E. Host-cell interactions with pathogenic Rickettsia species. *Future Microbiology* [online]. 2009, **4**(3), 323-339.
- SILAGHI, C.; SANTOS, A.S.; GOMES, J. et al. Guidelines for the Direct Detection of Anaplasma spp. in Diagnosis and Epidemiological Studies. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* [online]. 2017, **17**(1), 12-22.
- SILVA-PINTO, A.; de Lurdes SANTOS, M; SARMENTO, A. Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2014, **5**(6), 656-659.
- STUEN, S.; GRANQUIST, E.G.; SILAGHI, C. Anaplasma phagocytophilum—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*[online]. 2013, **3**.
- TSIODRAS, S.; SPANAKIS, N.; PANAKOS, G. et al. Fatal human anaplasmosis associated with macrophage activation syndrome in Greece and the Public Health response. *Journal of Infection and Public Health* [online]. 2017, **10**(6), 819-823.
- VENCLÍKOVÁ, K.; MENDEL, J.; BETÁŠOVÁ, L.; BLAŽEJOVÁ, H.; JEDLIČKOVÁ, P.; STRAKOVÁ, P.; HUBÁLEK, Z.; RUDOLF, I. Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks and Tick-borne Diseases* [online]. 2016, **7**(1), 107-112.
- VENCLIKOVA, K.; MENDEL, J.; BETASOVA, L.; HUBALEK, Z.; RUDOLF, I. First evidence of Babesia venatorum and Babesia capreoli in questing Ixodes ricinus ticks in the Czech Republic. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* [online]. 2015, **22**(2), 212-214

Contact address: Alena Balážová, Mgr., Department of biology and wildlife diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, aja.balazova@seznam.cz.

Development of methods for *Dermacentor reticulatus* population structure analysis

¹Bilbija Branka, ^{1,2}Papoušek Ivo, ^{1,2}Široký Pavel

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

²CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Dermacentor reticulatus is western Palearctic species and second most reported tick species in central Europe. The range of *D. reticulatus* is expanding and there are a number of pathogens that they can transmit or at least carry. To better understand gene flow and transmission of pathogens we designed 17 polymorphic microsatellites loci. Loci were analyzed using DNA isolated from ticks collected by standard flagging method. The number of alleles per locus ranged from 3 to 14 with length range from 78 to 318 bp. Genetic markers COI, ITS2 and 18SrDNA were analyzed as well. We recorded variation at 6 positions for COI and 18SrDNA, and at 11 positions for ITS2. In order to define population structure of *D. reticulatus*, we will expand the current analyzes on more populations collected from different and distant localities, and apply further methods.

Keywords: *Dermacentor*; Acari; Ornate cow tick; microsatellite; genetic markers

Introduction

Ornate cow tick (*Dermacentor reticulatus* (Fabricius, 1794)) is western Palearctic species (Földvári et al., 2016). It is the second most reported tick species after *Ixodes ricinus* in central Europe (Rubel et al., 2014), where its range is expanding due to changes in climatic conditions, anthropogenic impact and increasing number of available hosts (Palauskas et al., 2015; Mierzejewska et al., 2015). There are a number of pathogens that can be transmitted or at least carried by *D. reticulatus*. Therefore, it causes considerable public and veterinary health costs and it can cause losses in livestock production (Földvári et al., 2016). Since their importance in veterinary medicine and medicine is of great importance, it is necessary to develop methods which will help us to better understand gene flow and transmission of pathogens (Dharmarajan et al., 2009). In order to accomplish that, we designed 17 microsatellites loci for analysis, along with other, previous known genetic markers.

Materials and Methods

Ticks were collected from various localities in Europe, and collection is still in progress. Specimens we collected mostly by standard flagging technique, but some of them from different hosts. Morphological diagnosis was carried out using stereomicroscope Olympus SZX 16 equipped with Olympus DP 73 digital camera.

For molecular genetic analysis we were using the NucleoSpin Tissue kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) according to the manufacturer's protocol. We tested and processed following markers: COI, 18S rDNA (3 different portions), ITS2. Used primers and PCR conditions are presented in the Table 1. PCR reactions were carried out in a 25 µl volume, including 5 µl of Combi PPP MasterMix (TopBio, Vestec, Czech Republic), 0.2 µl of each primer (KRD, Praha, Czech Republic), 4.1 µl of PCR H₂O (TopBio), and 0.5 µl of DNA sample. The concentration of DNA was measured by IMPLN NanoPhotometer® P330 (Implen, Munich, Germany). DNA samples were sequenced by Macrogen (Amsterdam, the Netherlands). The obtained sequences were aligned in Geneious 11.0.3. (Kearse et al., 2012) and compared to the GenBank nucleotide database by BLAST algorithm (Altschul et al., 1990).

Table 1. Used primers and PCR conditions.

Marker	Primer Pairs	Primer sequence (5'-3')	Length of fragments	PCR conditions (°C/s)			No. of cycles	Reference
				Denaturation	Annealing	Extension		
COI	C1-N-2312	CATACAATAAAGCCTAATA	Approx. 860 bp	94/30	45/60	72/60	40	Rees et al., 2003
	TY-J-1449	AATTTACAGTTTATCGCCT						
ITS2	ITS2-F	ACATTGCGGCCTTGGGTCTT	Ranged from 1200 to 1600 bp	95/45	51/60	72/90	35	Lv et al., 2014
	ITS2-R	TCGCCTGATCTGAGGTCGAC						
18SrDNA (1)	A	AACCTGGTTGATCCTGCCA	Approx. 1814 bp	92/30	55/30	72/45	35	Mangold et al., 1998
	C	CTGAGATCCAACCTACGAGCTT						
18SrDNA (2)	D	GGCCCCGTAATTGGAATGAGTA						
	E	CACCACCCACCGAATCAAGAAA						
18SrDNA (3)	F	GCAGCTTCCGGGAAACCAAGT						
	G	TGATCCTCCCGCAGGTTACCT						

The main task of this project is based on microsatellites analyses, later to be used for population structure of species *D. reticulatus*. For each sequence, several primer pairs were designed. In total, we designed 563 markers with primers, of which 436 dinucleotide, 109 trinucleotide and 18 tetranucleotide. Of those designed, 88 loci were tested, with gradient annealing temperature, by following protocol: 94°C 5min, followed by 35 cycles of 94°C 30sec, gradient temperature from 45°C to 58°C 30s and 72°C 30s, with the final extension step at 72°C 15min. The results of the PCR were checked by horizontal electrophoresis, and the best temperature from gradient testing was selected for each sequence. Some of the primer pairs that were not amplifying were discarded at this stage of testing. Others were subjected to further testing. We chose 17 for multiplexing with labeled primers. All of them were tested at Masaryk University, Brno, Czech Republic. Testing was based on available DNA samples from tree different populations: Czech Republic, Slovakia and Poland. For microsatellite study, we used Peak Scanner software v.1 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA).

Results and Discussion

Considering molecular markers COI, 18S rDNA, and ITS2 we obtained sequences from isolated DNA from specimens collected in Czech Republic, Ukraine and Poland. The lengths of the products were 851bp for COI, 966bp for ITS2 and 1792bp for 18SrDNA. COI is widely used for phylogenetic analysis in a variety of organisms (Navajas et al., 1996). So far we sequenced and processes tick DNA from Czech Republic population, therefore we did not expect major variability at this point. Variations at six positions were recorded. Similar results we have found for 18S rDNA and ITS2, but in this case we sequenced tick DNA from all three localities. We recorded variation at six positions for 18S rDNA, and eleven positions for ITS2. Mangold et al. (1998) stated that the 18S rDNA sequence data displayed little variation and no nucleotide difference between closely related species. Kulakova et. al (2014) conducted the study of *Dermacentor nuttalli* phylogeny. They emphasize that ITS2 sequences were highly conservative, with variability 0–1.4 %, associated with point mutations and heterozygous sites. In further analysis of these markers we will conduct phylogenetic analysis by carrying out Bayesian inference in the Mr.Bayes 3.2.6 plugin in Geneious 11.0.3. (Huelsenbeck and Ronquist 2001, Kearse et al. 2012) and Maximum likelihood analysis in PHYML 3.0. (Guindon et. al, 2010).

Microsatellites were tested on samples from eight different populations (Czech Republic, Poland, Slovakia, Romania, Germany, England, Belgium, Nederland). All 17 loci are

polymorphic, and so far, all of them showed variability, within the population as well as between them. Dharmarajan et al. (2009) found twelve polymorphic loci in *Dermacentor variabilis*, with number of alleles ranging from 9 to 30. For the same species, and for *D. albipictus* and *D. andersoni*, Leo et al. (2012) developed 14 loci. Number of alleles varied from 1 to 17. Characteristics of microsatellites loci from our study are presented in Table 2.

Table 2.

	MICROSATELLITES																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Length range (bp)	161-181	222-280	143-175	71-106	158-186	186-230	167-191	78-110	145-268	147-157	299-315	180-187	159-163	139-155	306-318	221-265	130-167
Numbers of alleles	11	13	10	8	7	14	11	4	9	5	8	5	3	8	5	5	7

In further studies, standard population genetic analyses will be performed, and it will include: genetic diversity, Hardy–Weinberg equilibrium, genotypic linkage disequilibrium, genetic differentiation, gene flow, AMOVA, genetic isolation by geographic distance, microsatellite cross-amplification of *Dermacentor reticulatus* and *Dermacentor marginatus*.

Conclusion

Although COI, 18S rDNA, and ITS2 presents excellent molecular markers in phylogenetic analyses, microsatellites are more reliable and sensitive. For that reason, our study will be based mainly on microsatellite analyses in order to analyse population structure of *Dermacentor reticulatus* tick.

Acknowledgement

This work was supported by Grant Agency for Health Research of the Czech Republic (project AZV No. 16-33934A).

References

- ALTSCHUL, SF, W GISH, W MILLER, EW MYERS a DJ LIPMAN. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, vol.215, no.3, p.403-410.
- DHARMARAJAN, Guha, Jennifer A. FIKE, James C. BEASLEY a Olin E. RHODES JR. Development and characterization of 12 polymorphic microsatellite loci in the American dog tick (*Dermacentor variabilis*). *Molecular Ecology Resources*. 2009, vol. 9, p.131-133.
- FÖLDVÁRI, Gábor, Pavel ŠIROKÝ, Sándor SZEKERES, Gábor MAJOROS a Hein SPRONG. *Dermacentor reticulatus*: a vector on the rise. *Parasites & Vectors*. 2016, vol. 9, no.1, p.314-343.
- GUINDON, S, JF DUFAYARD, V LEFORT, M ANISIMOVA, W HORDIJK a O GASCUEL. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic biology*. 2010, vol.59, no.3, p.307-321.
- HUELSENBECK, JP a F. RONQUIST. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*. 2001, vol.17, no.8, p.754-755.
- KEARSE, Matthew, Richard MOIR, Amy WILSON, et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012, vol.28, no.12, p.1647–1649.
- KULAKOVA, Nina, Maxim A. KHASNATINOV, Elena A. SIDOROVA, Renat ADELISHIN a Sergei IVANOVICH BELIKOV. Molecular identification and phylogeny of *Dermacentor nuttalli* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 2014, vol.113, no.5, p.1787–1793.

LEO, Sarah, Corey S DAVIS a Felix A H SPERLING. Characterization of 14 microsatellite loci developed for *Dermacentor albipictus* and cross-species amplification in *D. andersoni* and *D. variabilis* (Acari: Ixodidae). *Conservation Genetics Resources*. 2012, vol. 4, no. 2, p.379–382.

LV, Jizhou, Shaoqiang WU, Yongning ZHANG, et al. Assessment of four DNA fragments (CO1, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). *Parasites & Vectors*. 2014, vol.7, no.1, p.93-104.

MANGOLD, Atilio José, Maria Dolores BARGUES a Santiago MAS-COMA. 18S rRNA gene sequences and phylogenetic relationships of European hard-tick species (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*. 1998, vol. 84, no.1, p.31-37.

MIERZEJEWSKA, Ewa J., Renata WELC-FALECIAK, Grzegorz KARBOWIAK, Maciej KOWALEC, Jerzy M. BEHNKE a Anna BAJER. Dominance of *Dermacentor reticulatus* over *Ixodes ricinus* (Ixodidae) on livestock, companion animals and wild ruminants in eastern and central Poland. *Experimental and Applied Acarology*. 2015, vol. 66, p. 83-101.

NAVAJAS, M, D FOURNIER, J LAGNEL, J GUTIERREZ a P BOURSOT. Mitochondrial COI sequences in mites: evidence for variations in base composition. *Insect Molecular Biology*. 1996, vol.5, no.4, p.281-285.

PAULAUSKAS, Algimantas, Jana RADZIJEVSKAJA, Dalytė MARDOSAITĖ-BUSAITIENĖ, Asta ALEKSANDRAVIČIENĖ, Matas GALDIKAS a Ričardas KRIKŠTOLAITIS. New localities of *Dermacentor reticulatus* ticks in the Baltic countries. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2015, vol.6, no. 5, p. 630-635.

REES, David John, Maurizio DIOLI a Lawrence KIRKENDALL. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2003, vol 27, no.1, no. 131-142.

RUBEL, Franz, Katharina BRUGGER, Masyar MONAZAHIAN, Birgit HABEDANK, Hans DAUTEL, Sandra LEVERENZ a Olaf KAHL. The first German map of georeferenced ixodid tick locations. *Parasites & Vectors*. 2014, vol. 7, no.1, p. 477-483.

Contact address: Branka Bilbija, Mgr., Department of Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, bilbijabranka@gmail.com; H16017@vfu.cz.

The possible use of brine shrimp *Artemia franciscana* in processing water samples for the diagnosis of *Cryptosporidium* spp.

Hatalová Elena, Valenčáková Alexandra, Špalková Michaela

Department of Biology and Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy, Košice

Summary

Brine shrimps (*Artemia franciscana*) are micro-crustaceans obtaining nutrition by water filtration. In this experiment we were focused on the capability of *Artemia metanauplii* to intake *Cryptosporidium* oocysts obtained from infected calves. The infected calves originated from the farm Zemplínska Teplica, where we have confirmed the presence of *C. parvum* over the period of four years (2013-2016), concluding the circulation of the pathogen in the local environment. A sample positive with *C. parvum* genotype IIaA17G1R1 was used for Fullerborn flotation method. Oocysts were dissolved in 5l of salty water with the addition of *Artemia metanauplii*. DNA extraction and PCR were conducted. Obtained sequences compared with sequences from GenBank using Blast and aligned with BioEdit program were identical to the original sequence of *C. parvum* from an infected calf. These findings indicate that brine shrimps can be used as biofilters in water filtration, intaking *Cryptosporidium* oocysts. This method can represent an alternative to commonly used methods of processing water samples, such as dung-water, wastewater and samples from water used for recreational purposes.

Keywords: *Cryptosporidium*; *Artemia*; water; filtration

Introduction

Cryptosporidium spp. are protozoan parasites infecting intestinal cells of various species of vertebrates, including humans. The infection caused by *C. parvum* is characteristic by watery diarrhea, which is associated with the spreading of infectious stages of the parasite in the environment through feces. The infectious stages – oocysts, produced by *Cryptosporidium* are difficult to remove from the environment, due to their hardness, resistance to chlorine disinfection and their ability to spread easily via water (Striepen, Kissinger, 2004). Due to these attributes, they can persist in the environment for an extended period of time.

Brine shrimp (*Artemia franciscana*) is a micro-crustacean naturally inhabiting hypersaline environments. From the metanauplius larval stage, brine shrimps are capable of filtering water for the purpose of catching plankton on which they feed. Méndez-Hermida et al. (2006) confirmed that metanauplii are capable of ingesting and excreting *Cryptosporidium* oocysts.

In years 2013, 2014 and 2016, we have confirmed the presence of *Cryptosporidium parvum* in calves under one month of age at the farm in Zemplínska Teplica, concluding the circulation of the pathogen in the environment of the mentioned farm. (Danišová et al., 2016; Hatalová et al., 2017).

In this study, we tried to assess the capability of brine shrimps to intake *Cryptosporidium* oocysts for the purpose of their possible use for diagnosing *Cryptosporidium* spp. from water samples.

Material and Methods

A sample from a calf positive with *C. parvum* genotype IIaA17G1R1 was used in the next experiment to assess the filtration capability of *Artemia franciscana*. Approximately 100mg of feces was used for flotation. The sample was homogenized and mixed with a small amount of water and filtered through gauze to a test tube. The sample was centrifuged at 2,500 rpm for 5 minutes and the supernatant was poured out. The sediment was mixed with Fullerborn salty

solution and was centrifuged again at 500g for 5 minutes. The oocysts located on the top of the solution were extracted and enumerated, yielding approximately 4×10^3 oocyst in 1ml.

Artemia franciscana were hatched in sea water of a composition described by Dvořák et al., 2005. The shrimps were raised to the stage of metanauplii for the following experiment.

Oocysts gathered from 1ml of Fullerborn solution ($4 \times 10^3 \cdot \text{ml}^{-1}$) were added to 5l of 4% NaCl solution, with the addition of 2,500 metanauplii (± 200), respectively. The solution was stored in a thermostat at a constant temperature of 24°C. After 24 hours, metanauplii were collected, washed repeatedly in distilled water to assure no oocysts remained on the surface of metanauplii. Genomic DNA was extracted from metanauplii using DNA Sorb-AM Nucleic acid Extraction kit (AmpliSence, Russia) according to the manufacturer's instructions. Before DNA extraction, the metanauplii were homogenized at 6,500 rpm for 90 seconds with the addition of 0.5 mm glass beads, 1.0 mm zircon beads and 300 μl of lysis solution in homogenizer Precellys 24 (Bertin Technologies). After DNA isolation, samples were run on nested PCR. For the reaction, primers amplifying the gene of the 60kDa glycoprotein (GP60) used for genotyping *C. parvum* were used - GP60 F1 (5'-ATG AGA TTG TCG CTC ATT ATC-3')/GP60R1 (TTA CAA CAC GAA TAA GGC TGC-3') for the first reaction (980-1000 bp) and primers GP60 F2 (5'-GCC GTT CAA CTC AGA GGA AC-3')/GP60 R2 (5'-CCA CAT TAC AAA TGA AGT GCC GC-3') for the second reaction (450 bp, Iqbal et al., 2012). The PCR protocol was set accordingly: initial denaturation of 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 95°C for 1 min, annealing at 55/58°C for 20 sec and elongation at 72°C for 1 min/30 sec. A final elongation step of 72°C for 7 minutes was included. Secondary PCR products were analyzed by electrophoresis in 1.5% agarose gel and visualized by UV light at a wavelength of 312 nm, subsequently, PCR product were sent for sequencing. Final sequences were compared with homologous sequences from GenBank using Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Results

Obtained sequences were compared with sequences from GenBank using Blast, which confirmed the presence of *C. parvum* genotype IIAA17G1R1. Sequences were also aligned using BioEdit program. The sequences obtained from the samples from the infected calves diagnosed with genotype IIAA17G1R1 and the sequence obtained from the experiment with *Artemia* metanauplii were identical, confirming the filtration capability of *Artemia* metanauplii even in larger amounts of water.

Discussion

To this day, only two experiments of *Cryptosporidium* spp. oocyst intake by *Artemia* were conducted (Méndez-Hermida et al., 2006; Méndez-Hermida et al., 2007). In both experiments a large number of oocysts was used (1×10^4 and $1 \times 10^6/\text{ml}$). In this experiment we have concluded the capability of *Artemia* metanauplii to intake smaller amounts of oocysts. In comparison with the study of Méndez-Hermida et al., which used formalin-fixed oocysts or oocysts prepared with Percoll gradient and repeated washing in phosphate buffer, we have concluded that metanauplii are capable of intaking oocysts acquired by simpler methods, such as Fullerborn flotation method. We have also concluded that brine shrimps are capable of the filtration of larger volumes of water with as much as 1ml of concentrated oocysts. These findings are supported by the study conducted at our department, where brine shrimps were used as biofilters in filtering water samples from rivers, lakes and water reservoirs in Košice region, in which *C. parvum* and *C. hominis* were found by this method (unpublished results). These findings indicate that brine shrimps can be used as biofilters not only in water filtration, but it can also be possible for these crustaceans to intake *Cryptosporidium* oocysts from

various other water samples, such as dung-water, wastewater and samples from water used for recreational purposes. This method can possibly represent an alternative to commonly used methods of processing water samples.

Conclusion

In this study we have confirmed the ability of brine shrimp (*Artemia franciscana*) metanauplii to effectively intake *Cryptosporidium* oocysts by water filtration. Our findings are also backed up by the finding of various genotypes of *C. parvum* and *C. hominis* in water samples from rivers, lakes and water reservoirs in Košice region (unpublished results). This method can possibly represent an alternative to commonly used methods of processing other water samples, such as dung-water, wastewater and samples from water used for recreational purposes, although further research on this topic is needed.

Acknowledgement

This study was supported by APVV project no. 15/0134 and VEGA no. 1/0084/18.

References

- DANIŠOVÁ, O.; VALENČÁKOVÁ, A.; PETRINCOVÁ, A. Detection and identification of six *Cryptosporidium* species in livestock in Slovakia by amplification of SSU and GP60 genes with the use of PCR analysis. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2016, vol. 23, no. 2, p. 254-258.
- DVOŘÁK, P.; ŠUCMAN, E.; BEŇOVÁ, K. The development of a ten dy biotest using *Artemia salina* nauplii. *Biologia (Bratislava)*. 2005, vol. 60, p. 593-597.
- HATALOVÁ, E.; VALENČÁKOVÁ, A.; DANIŠOVÁ, O.; KALINOVÁ, J.; LUPTÁKOVÁ, L.; HÚSKA, M. Comparison of PCR primers for the identification of *Cryptosporidium* species and genotypes in calves. *Proceedings of scientific contributions and abstracts, International scientific conference on The impact of global change on the environment, human and animal health*. Košice, 2-6 May 2017, p. 80-84
- IQBAL, A.; LIM, Y. A.; SURIN, J.; SIM, B. L. High diversity of *Cryptosporidium* subgenotypes identified in Malaysian HIV/AIDS individuals targeting gp60 gene. *PLoS One*. 2012, vol. 7, no. 2, e31139.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E. *Artemia* is capable of spreading oocysts of *Cryptosporidium* and the cysts of *Giardia*. *Journal of Eukaryotic Microbiology*. 2006, vol. 53, no. 6, p. 432-434.
- MÉNDEZ-HERMIDA, F.; GÓMEZ-COUSO, H.; ARES-MAZÁS, E. Possible involvement of *Artemia* as live diet in the transmission of cryptosporidiosis in cultured fish. *Parasitology Research*. 2007, vol. 101, no. 3, p. 823-827.
- STRIEPEN, B.; KISSINGER, J.C. Genomics meets transgenics in search of the elusive *Cryptosporidium* drug target. *Trends in Parasitology*. 2004, vol. 20, no. 8, p. 355-358.

Contact address: Elena Hatalová, DVM., Department of biology and genetics, UVMP Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, elena.hatalova@student.uvlf.sk.

SEKCE 4

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

**Porovnání digitálního vyhodnocení alternativního biotestu
na *Artemia franciscana* se stávající metodou
Comparison of the alternative bioassay evaluation on *Artemia franciscana*
by current method and digital recording**

Kovářík Ladislav

Ústav gastronomie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

This paper deals with the comparison of the alternative bioassay evaluation methods using the standard visual reading and digital recording. Contrary to current method of determination the lethality of Artemia Franciscana crustaceans in Petri dishes, automatic storage of digital recordings simplifies archiving and enables evaluation of the bioassay results independently of the time of reading. In addition, this method facilitates the evaluation of a bioassay performed on a large number of individuals. The optimal number of 50 individuals proved to be optimal for the evaluation of this bioassay using digital recording method, compared to number of 10 individuals using the current method.

Keywords: *Artemia franciscana; experiment data storage; digital recording; offline evaluation*

Úvod

Naše životní prostředí je zatěžováno vlivem stále se zvyšující globální produkce a jejími nežádoucími efekty. V každém z odvětví této produkce se do půdy, povrchových vod a ovzduší dostávají nežádoucí produkty s různou mírou toxicity. Jejich působení na živé organismy je potřeba zkoumat, aby se předešlo a zabránilo škodám vzniklým z jejich možného nežádoucího vlivu. K tomu se používají také alternativní biotesty na živých organismech např. na korýších *Artemia franciscana*.

Stávající metoda se provádí tak, že se do Petriho misky s uměle připravenou mořskou vodou vloží 10 kusů čerstvě vylíhlých naupliových stádií. K nim se do misky přidá roztok sledované látky. Po určité časové období je pak zaznamenána interakce s testovanými jedinci. Vliv chemické látky se projeví postupným snižováním pohyblivosti a ve většině případů nakonec letalitou jedinců. Počet jedinců je limitován možností pozorovatele, odečítá se vizuálně pomocí lupy. Proto je maximální počet jedinců v Petriho misce omezen na 10. Tento příspěvek porovnává počítání jedinců *Artemia franciscana* stávající metodou s novým vyhodnocením digitálního záznamu pořízeného fotoaparátem.

Materiál a metody

V testu byla použita čerstvě vylíhlá nauplia *Artemia franciscana*. Použité prostředí – mořská voda uměle připravená podle složení uvedené Dvořákem (1999). K porovnání byl zvolen test subakutní toxicity chloridu kadmnatého ($\text{CdCl}_2 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$) na naupliová stadia *Artemia franciscana* v koncentracích kadmia 0,050; 0,100; 0,125; 0,250; 0,500 a 1,000 $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Roztok CdCl_2 byl připraven v desetinásobné použité maximální koncentrace a do misek byl následně přidán v objemu jedné desetiny objemu misky. Koncentrace Cd^{2+} je vyjádřena v $\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. Jednalo se o prolongovaný test toxicity. Jako zdroj energie pro korýše byl použit 3% roztok čisté glukózy (Dvořák, 1999). Teplota okolního prostředí misek se pohybovala od 19,7 °C do 21,5 °C, průměrně 20,5 °C. Hodnotícím kritériem testu byla doba přežití jedince oproti kontrolní skupině – letalita. Vizuální odečítání stavu jedinců v miskách i focení bylo provedeno každých 24 hodin po přidání Cd^{2+} .

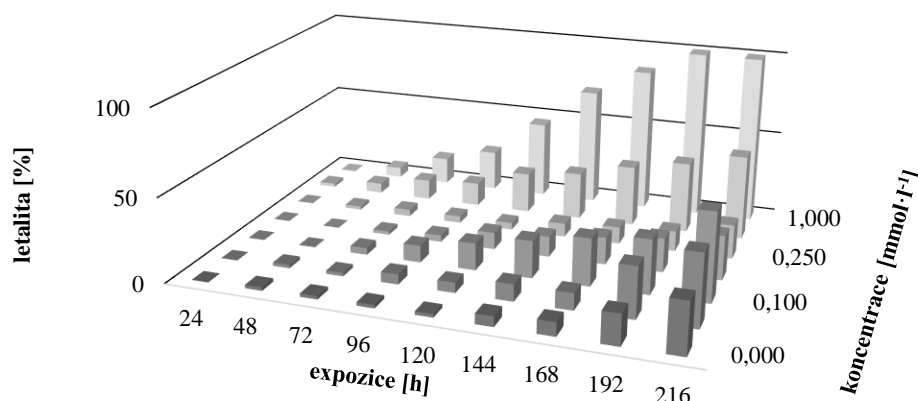
Vyhodnocení experimentu 1 bylo vizuální. U experimentů 2 a 3 byly pořízeny digitální záznamy fotoaparátem Nikon D7200 s objektivem Nikon 18 – 140 mm při maximálním rozlišení 6000 × 4000 pixelů. Pro zlepšení kvality obrazu probíhalo pořizování fotografií misek bez víček. Odpařená voda byla denně doplňována na požadovaný objem.

Uspořádání misek v experimentu bylo následující:

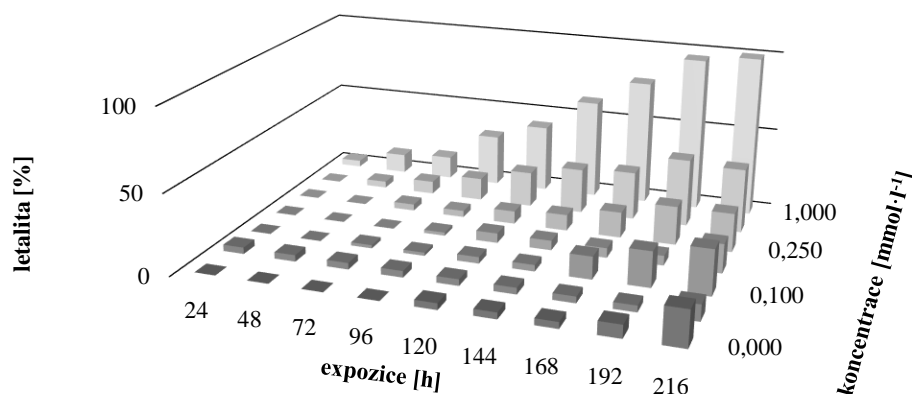
1. Klasické uspořádání, je složeno ze 7 skupin Petriho misek, každá skupina pro jednu koncentraci. Ve skupině je 5 misek o průměru 50 mm a v každé z nich je 10 ml mořské vody s příslušnou koncentrací chloridu kademnatého a glukózou. Do každé misky bylo umístěno 10 jedinců.
2. Část druhá, obsahuje 7 Petriho misek o velikosti 120 × 120 mm a v každé z nich je 50 ml mořské vody s příslušnou koncentrací chloridu kademnatého a glukózou. Do každé misky bylo umístěno 50 jedinců.
3. Část třetí, obsahuje 7 Petriho misek o velikosti 120 × 120 mm a v každé z nich je 100 ml mořské vody s příslušnou koncentrací chloridu kademnatého a glukózou. Do každé misky bylo umístěno 100 jedinců.

Výsledky

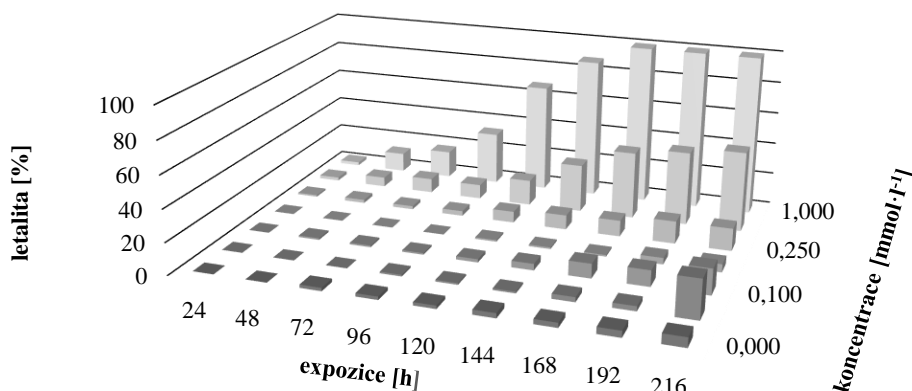
Z následujících grafů 1 – 3 je patrné, že si výsledky vzájemně odpovídají. Odchytky mezi experimenty jsou způsobeny přirozenou variabilitou testu. V případě 100 jedinců v misce je u nejvyšších koncentrací chloridu kademnatého od 120 h expozice patrná poněkud vyšší letalita.



Graf 1: Letalita [%] v závislosti na čase a koncentraci vyhodnocena stávající metodou.



Graf 2: Letalita [%] v závislosti na čase a koncentraci vyhodnocena digitálně pro 50 jedinců.



Graf 3: Letalita [%] v závislosti na čase a koncentraci vyhodnocena digitálně pro 100 jedinců.

Diskuse

Pro snímání byly záměrně zvoleny fotografie místo pořízení videozáznamu z důvodu podstatně vyššího rozlišení pořízených snímků. Délka expozice testované látky byla zvolena tak, aby se projevil maximální rozdíl hodnot mezi skupinou experimentální a kontrolní. Z důvodu validace by bylo optimální, aby letalita kontrolní skupiny nepřesáhla 20 % hodnoty u prolouvaného testu (Dvořák, 1999).

S prodlužující se dobou experimentu (nad 120 h) se zhoršuje rozlišitelnost jedinců na pořízeném záznamu, světlejší zbarvení nauplií. Narůstá také organické znečištění obsahu misky, pravděpodobně vzhledem k přítomnosti bakterií, případně plísní. Projevuje se to v miskách, kde uhynulo nejvíce jedinců. Toto znečištění také komplikuje odečítání pomocí softwaru na PC. Proto, v zájmu optimalizace experimentu, bude vhodné uhynulé jedince z misek postupně odstraňovat.

Závěr

Pořízený digitální záznam umožňuje vyhodnocovat výsledky experimentu v Petriho miskách s optimálním počtem 50 jedinců oproti současným 10. U prolouvaných testů je nutné co nejvíce omezit organické znečištění misek odstraněním uhynulých jedinců.

Literatura

DVOŘÁK, P. Sledování interakcí nízkých expozic ionizujícího záření a cizorodých látek pomocí biotestu s *Artemia salina*. Brno, 1999, 194 s. Habilitační práce. Fakulta veterinární hygieny a ekologie Veterinární a farmaceutická univerzita Brno.

Kontaktní adresa: Ladislav Kovářik, Mgr., FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1 612 42 Brno, H16404@vfu.cz.

SEKCE 5

Veřejné veterinářství a ochrana zvířat

Analýza stresové zátěže laboratorních králíků, užívaných pro výuku předmětu Farmakologie II na VFU Brno

Stress analysis of laboratory rabbits used for practical lessons Pharmacology II VFU Brno

¹Kramářová Eva, ¹Chloupek Jan, ²Urbanová Monika, ¹Najmanová Martina

¹Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno,

²Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The aim of this study was to measure stress parameters in the laboratory rabbits that are used for teaching purposes. We did not want to use the classic stress models but standard activities that affect laboratory rabbits during pharmacological practical lessons for students at the University of Veterinary and Pharmaceutical Science Brno. Similar scientific facts about stress influence on laboratory animals during practical training did not known now. We have determined hematological and some biochemical parameters and glucocorticoids hormones as corticosterone and cortisol.

Keywords: laboratory rabbit; teaching purposes; students; stress

Úvod

Laboratorní králík patří, díky své velikosti a nenáročnému chovu, mezi hojně využívaná laboratorní zvířata a je též vhodným modelem pro účely výuky. Pro hodnocení stresové zátěže není stanoven konkrétní parametr. Studie probíhala celý zimní semestr 2017, cílem bylo zjištění vlivu opakované stresové zátěže, která vzniká během cvičebních zásahů a jejich dlouhodobý dopad na organismus. Byl proveden hematologický rozbor, stanoveny některé biochemické parametry a glukokortikoidní hormony- kortizol a kortikosteron.

Materiál a metody

Do studie bylo zařazeno 20 ks laboratorních králíků (*Oryctolagus cuniculus*), kteří byli převezeni od chovatele do certifikovaného zvířetníku Ústavu farmakologie a farmacie.

Králíci byli rozděleni na 2 skupiny po 10 kusech. Pokusná skupina byla, stejně jako další králíci určeni pro výuku, pravidelně zařazována do praktických cvičení dle harmonogramu. Zde na nich byly standardně prováděny postupy v souladu s platným kurikulem. Kontrolní skupina byla chovaná v kotcích bez zákroků. V průběhu studie byl u obou skupin celkem 3x proveden odběr krve. První odběr vzorků od všech králíků zařazených do experimentu byl proveden ve 2. týdnu semestru tj. po deseti dnech aklimatizace ve zvířetníku. Praktická výuka s použitím laboratorních zvířat začala až od 3. týdne. Druhý odběr byl proveden společně v 7. týdnu semestru a třetí v 13. týdnu. Odběr vzorků byl proveden punkcí vena auricularis marginalis. Maximum krve, které může být bezpečně odebráno v jediném vzorku, je přibližně 1% tělesné hmotnosti zvířete. Tento objem si zvíře nahradí nejvýše do 24 h., ačkoli návrat k normální úrovni všech složek může trvat až 2 týdny (Mary Anna Thrall ... [et al.], 2006). Vzorky byly odebrány do dvou zkumavek: s EDTA a s heparinem. Tzv. krevní obraz a diferenciál byly stanoveny na hematologickém analyzátoru Celltac alpha MEK 6318 – Nihon Kohden a diferenciální rozpočet leukocytů byl proveden manuálně.

Stres může měnit mnoho různých hematologických parametrů. U králíků bylo prokázáno, že zvýšení adrenalinu (akutní stres) indukuje lymfocytózu, zatímco zvýšené hladiny kortizolu (chronický stres) vedou k lymfopenii (Mellilo, 2007). Prodloužený stres, jako je doprava, neznámé zvuky, vůně, chronická bolest a špatné prostředí, mohou vyvolat heterofilii,

lymfopenii a leukocytózu. Dalším indikátorem stresové zátěže je poměr neutrofilů k lymfocytům, který je přibližně 1:1 u dospělých zdravých králíků, ale stresová reakce může poměr pozměnit. Stresory jako transport, čekání v místnosti plné neznámých zvuků a pachů nebo dokonce omezení během klinického vyšetření, může změnit poměr (Mellilo, 2007).

Vybrané biochemické parametry byly stanoveny fotometricky, analyzátozem DPC Konelab 20i– Thermo Scientific. Nevyužitá plazma byla zamrazena a uchována pro stanovení hormonů. Nejpoužívanějším parametrem stresové zátěže je glukóza, její koncentrace je ovlivněna mnoha faktory, včetně výživy, hormonů, hibernace, omezování a anestezie (Suckow, 2012). Postupy, při kterých je zvíře omezováno elevuje enzymy, jako laktátdehydrogenáza (LDH), aspartátaminotransferáza (AST), creatinin kináza a další enzymy v příčně pruhované a srdeční svalovině. Enzymy vyscerálního původu jako např. alalnintransferáza (ALT) jsou těmito procesy ovlivněny méně (Manning, 1994).

Stres je reakce organismu na podnět, jehož důsledkem je řada fyziologických pochodů, které tělu umožní vyrovnat se se situací. Stresory je aktivována tzv. hypotalamo-pituitárně-adrenální osa (HPA), což je fyziologický mechanismus, na jehož konci dochází k vyplavení glukokortikoidních hormonů. U králíků je nejvyšší exkrece kortikosteronu (Szeto, 2003), v menší míře kortizolu. Analýza kortikosteronu byla provedena pomocí kitu Corticosterone StressXpress EIA Kit (Biovendor). Stanovení kortizolu v krevní plazmě bylo měřeno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie spojené s tandemovou hmotnostní spektrometrií (LC/MS/MS). Příprava vzorku spočívala v extrakci na pevné fázi (SPE). Pro SPE byly použity kolonky SPEC C₁₈ AR (Sigma-Aldrich).

Výsledky

Statistické zpracování vzorků bylo provedeno pomocí statistického programu UNISTAT.

Hematologickým vyšetřením bylo zjištěno, že u pokusné skupiny došlo ke statisticky významnému snížení množství erytrocytů společně i s hemoglobinem (Hg) a hematokritem (Ht) viz. Tabulka 1. Při porovnání s referenčními hodnotami králíků (Knotek, 2017) se nedá tento pokles považovat za anemii, hodnoty se pohybují ve středních hladinách referenčního rozmezí. Tzv. stresový leukogram ani změny poměru N: L nebyly prokázány.

Tabulka: 1. Změněné hodnoty hematologického vyšetření po 2. a 3. odběru.

Parametr	2. odběr pokus	2. odběr kontrola	Hladina významnosti	3. odběr pokus	3. odběr kontrola	Hladina významnosti
Ery (10 ¹² /l)	6,02	6,62	p<0.05	5,88	6,45	p<0.05
Hg (g/l)	-	-	-	127,89	136,20	p<0.05
Ht (l/l)	0,37	0,41	p<0.05	0,4	0,43	p<0.01

Při stanovení biochemických parametrů byly změny v celkové bílkovině a to při 2. (58,89 g/l) a 3. (60,544) odběru, kde došlo ke statisticky významnému snížení na hranici s hypoproteinemií (Knotek et al. 2017) oproti kontrole (63,52 a 63,72). Tato změna se může objevovat u jinak zdravých zvířat s vyváženou krmnou dávkou při sníženém příjmu cektrofií (Suckow, 2012), což může být změna chování v důsledku stresové zátěže. Ke statisticky vysoce významné elevaci glukózy došlo při 2. odběru, zde ale u kontrolní skupiny (7,75 mmol/l) v porovnání s pokusnou (7,19). Obdobná situace se opakovala i při následujícím odběru, ale statistická významnost nebyla prokázána. Zvýšení glykémie je jeden s prvních efektů reakce na stresovou zátěž. Zde zřejmě došlo k reakci některých králíků na nezvyklý ruch, manipulaci a fixaci. AST při 2. odběru (0,357 μ kat/l) bylo u pokusné skupiny statisticky zvýšené oproti kontrole (0,265). Také u LDH při 2. odběru u pokusné skupiny došlo ke zvýšení (3,4 μ kat/l), které bylo statisticky významné, oproti kontrole (1,892).

Naměřené hodnoty kortikosteronu byly nízké (nejvyšší hodnota 1,48 ng/ml) a při jejich porovnání rozdíly statisticky nevýznamné. Hodnoty kortizolu v plazmě byli pod detekčním limitem pro kortizol, méně než 2 ng/ml.

Diskuse a závěr

Cílem bylo zjištění specifických markerů stresové zátěže, vznikajících během výuky. Domnívám se, že k poklesu červené krevní řady docházelo spíše v důsledku opakovaných odběrů krve studenty. Prokázali jsme, že glukóza, celková bílkovina a enzymy AST a LDH mohou být považovány za markery stresu u zvířat používaných pro účely výuky. Změny u biochemických parametrů byly prokázány na hladině významnosti $p < 0.05$, pouze u glukózy byla hladina významnosti $p < 0.01$. Změny byly významné hlavně při 2. odběru. Elevaci dlouhodobého zvýšení glukokortikoidních hormonů se nám nepodařilo prokázat. Stresovou zátěž považuji za mírnou. Množství zvířat použitých pro výuku umožňuje jejich střídání a čas na zotavení. Využití řady pokusných králíků není ideální, ale tento fakt vyvažuje významný přínos pro studenty, kteří nabyté znalosti a dovednosti zúročí v navazujících disciplínách. Abychom jejich přínos nebrali jako samozřejmost, jejich welfare by mohl být zlepšen obohacením prostředí klecí ve zvířetníku.

Poděkování

Tato studie byla financovaná grantem IGA VFU Brno 31/2017/FVL.

Literatura

KNOTEK, Zdeněk, Karel HAUPTMAN, Petr CHLOUPEK, Vladimír JEKL, Zora KNOTKOVÁ, Silvia KOHUTOVÁ, Andrea MINÁRIKOVÁ a Ladislav STEHLÍK, 2017. *Nemoci zvířat zájmových chovů: drobní savci*. Praha: Profi Press. Veterinářství. ISBN 978-80-86726-81-6.

MANNING, Patrick J., Christian E. NEWCOMER a Daniel H. RINGLER. 1994. *The Biology of the Laboratory Rabbit*. 2nd ed. Burlington: Elsevier Science. ISBN 9781483288826 SUCKOW, Mark A., Karla A. STEVENS a Ronald P. WILSON. 2012. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Waltham, MA: Academic Press/Elsevier. American College of Laboratory Animal Medicine series. ISBN 978-0-12-380920-9.

MARY ANNA THRALL ... [ET AL.]. 2006. *Veterinary hematology and clinical chemistry*. Ames, Iowa: Blackwell Publishing. ISBN 978-078-1768-504.

MELILLO, Alessandro. 2007. Rabbit Clinical Pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*. **16**(3): 135-145. DOI: 10.1053/j.jepm.2007.06.002. ISSN 15575063.

SUCKOW, Mark A., Karla A. STEVENS a Ronald P. WILSON. 2012. *The laboratory rabbit, guinea pig, hamster, and other rodents*. Waltham, MA: Academic Press/Elsevier. American College of Laboratory Animal Medicine series. ISBN 978-0-12-380920-9.

SZETO, A, J.A GONZALES, S.B SPITZER, J.E LEVINE, J ZAIAS, P.G SAAB, N SCHNEIDERMAN a P.M MCCABE. 2003. Circulating levels of glucocorticoid hormones in WHHL and NZW rabbits: circadian cycle and response to repeated social encounter. *Psychoneuroendocrinology*. Elsevier, : 861–866. DOI: 10.1016/S0306-4530(03)00153-7. ISBN 10.1016/S0306-4530(03)00153-7.

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

Morbidita psů v útulku

Morbidity of shelter dogs

Vitulová Svatava, Voslářová Eva, Volfová Martina, Večerek Vladimír

*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

Summary

Out of 1500 shelter dogs, 63.4% were clinically healthy and 36.6% were showing clinical signs of disease. The majority of dogs with impaired health showed multiple signs of disease. Gastrointestinal diseases and respiratory diseases were the most frequent health problems followed by wide scale of injuries, from bites and minor abrasions to major trauma often resulting from collision with a car.

Keywords: *disease; health; canine*

Úvod

Welfare zvířat je významně ovlivněno zdravotním stavem zvířete. Svoboda od bolesti, poranění a nemoci je jednou z „pěti svobod“ zvířete formulovaných Brambellovou komisí již v 70. letech (Brambell, 1965). Prevence a rychlá diagnostika s následnou léčbou je proto zásadní. Mezi faktory, které evidentně přispívají k nákazám a rozvoji infekcí patří transport, stres (imunosuprese), zvýšený kontakt mezi zvířaty, výživa, přítomnost různých druhů zvířat, současně probíhající nemoci, vysoká obrátkovost zvířat a nadměrné používání antibiotik (Pesavento and Murphy, 2014). Nejčastějšími klinickými příznaky vyskytujícími se u útulkových zvířat jsou průjem a kašel (Wells and Hepper, 1999). Zdravotně rizikovou skupinou bývají obvykle nejmladší zvířata v útulku. Litster et al. (2011) potvrdili, že štěňata mají signifikantně vyšší výskyt respiračních onemocnění než starší jedinci. Nedávná studie, která testovala psy mimo útulek, tedy v domácnostech nebo kotcích, zaznamenala 66 % výskyt infekčních respiračních onemocnění (Mitchell et al., 2017). Velmi časté jsou gastroenteritidy způsobené patogeny, prostředím nebo provozními záležitostmi (Grellet et al., 2014). Studie, které by exaktně mapovaly morbiditu v psích útulcích, nejsou k dispozici, nejčastěji kvůli nedostatku dostupných zdravotních záznamů, které by umožnily analýzu morbidity útulkové populace provést.

Materiál a metodika

Analyzovány byly zdravotní záznamy o psech přijatých do vybraného městského útulku v krajském městě na Moravě (počet obyvatel 75 000) v období let 2007 až 2016. Útulek má kapacitu 80 psů a slouží převážně pro potřeby města. Na základě záznamů o zdravotním stavu a poskytnutém ošetření, příp. medikaci bylo definováno 14 kategorií zdravotních problémů: kardiovaskulární onemocnění, ušní infekce, endokrinní poruchy, onemocnění očí, gastroenteritidy, neurologické poruchy, onkologická onemocnění, ortopedické diagnózy, parazitární onemocnění, reprodukční onemocnění, respirační onemocnění, onemocnění kůže, uropoetické poruchy a poranění. Psi, u kterých nebyly žádné záznamy o narušeném zdravotním stavu nebo poskytnuté léčbě, byli považováni za zdravé, tedy bez klinických příznaků onemocnění. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat v. 6.5. (Unistat Ltd., GB). Srovnání četností mezi jednotlivými kategoriemi bylo provedeno na základě χ^2 testu v rámci analýzy kontingenčních tabulek $k \times m$ a 2×2 (Zar, 1999).

Výsledky a diskuze

Z celkového počtu 1500 psů přijatých do útulku v letech 2007-2016 bylo 950 (63,5 %) psů bez klinických příznaků onemocnění a 550 (36,5 %) psů s jedním nebo více manifestovanými

příznaky narušeného zdraví. Analýza četností jednotlivých druhů onemocnění je uvedena v tabulce č. 1. Výsledky ukazují, že v útulku bylo statisticky vysoce významně více psů bez klinických příznaků onemocnění ($P < 0,001$), než psů nemocných. Při srovnání počtu psů s příznaky jednoho onemocnění se skupinou psů s multifaktoriálními příznaky bylo v útulku statisticky významně ($P < 0,001$) více psů s manifestací více symptomů onemocnění, než psů jen s jedním symptomem. Pokud jde o kategorie diagnóz, v populaci útulku bylo zaznamenáno signifikantně významně více ($P < 0,001$) gastrointestinálních onemocnění (12,5 %) než jakýchkoliv jiných onemocnění. Tyto závěry korespondují se závěry zahraničních studií (Wells and Hepper, 1999; Grellet et al., 2014). Druhým nejčastějším zdravotním problémem psů v útulku byla respirační onemocnění (4,6 %), poranění (1,3 %) a kožní problémy (1 %).

Tabulka 1: Morbidita psů v útulku.

Počet psů	Počet	%
Bez klinických příznaků onemocnění	951	63,4
S klinickými příznaky onemocnění	549	36,6
Kardiovaskulární onemocnění	2	0,1
Ušní infekce	1	0,1
Oční onemocnění	6	0,4
Gastrointestinální onemocnění	187	12,5
Neurologická onemocnění	4	0,3
Onkologická onemocnění	2	0,1
Ortopedická onemocnění	11	0,7
Parazitózy	3	0,2
Reprodukční onemocnění	1	0,1
Respirační onemocnění	69	4,6
Kožní onemocnění	15	1
Uropoetická onemocnění	6	0,4
Poranění	20	1,3
Multifaktoriální klinické příznaky	223	14,9

Závěr

Při analýze zdravotních záznamů 1500 psů umístěných ve vybraném útulku během desetiletého období byly zjištěny příznaky minimálně jednoho onemocnění u 36,6 % jedinců, zatímco 63,4 % psů neprojevovalo žádné známky nemoci. Nejčastějším zdravotním problémem byly gastroenteritidy následované respiračními onemocněními a poraněními.

Literatura

BRAMBELL, F.W.R. Report of The Technical Committee to Stock Husbandry Systems. Her Majesty's Stationery Office. 1965, London.

GRELLET, A., S. CHASTANT-MAILLARD, C. ROBIN, A. FEUGIER, C. BOOGAERTS, C. BOUCRAUT-BARALON, D. GRANDJEAN, B. POLACK. Risk factors of weaning diarrhea in puppies housed in breeding kennels. *Preventive Veterinary Medicine*. 2014, **117**(1), 260-265.

LITSTER, A., J. ALLEN, A. MOHAMED, S. HE. Risk factors for delays between intake and veterinary approval for adoption on medical grounds in shelter puppies and kittens. *Preventive Veterinary Medicine*. 2011, **101**(1-2), 107-112.

MITCHELL, J.A., J.M. CARDWELL, H. LEACH, et al. European surveillance of emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease. *Veterinary Microbiology*. 2017, **212**, 31-38.

PESAVENTO, P.A., B.G. MURPHY. Common and emerging infectious diseases in the animal shelter. *Veterinary Pathology*. 2014, **51**(2), 478-491.

WELLS, D. L., P.G. HEPPER. Prevalence of disease in dogs purchased from an animal rescue shelter. *Veterinary Record*. 1999, **144**(2), 35-38.

ZAR, J.H. Biostatistical Analysis. 4 th ed Prentice-Hall. (1999), 663

Kontaktní adresa: Svatava Vitulová, Ing., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H16414@vfu.cz.

Trends in transport-related mortality rates in turkeys transported for slaughter

Machovcová Zuzana, Večerek Vladimír, Voslářová Eva

Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

This study focused on the mortality among turkeys transported for slaughter in the Czech Republic from 2009 to 2016. For the purposes of the study the monitored period was divided in two periods: Period I (2009-2012) and Period II (2013-2016). Significantly higher mortality was found in the first period in comparison with the second period. From the welfare point of view the finding is positive as the number of dead birds on arrival was found to have a decreasing tendency.

Keywords: death on arrival; welfare; transport distance

Introduction

Turkeys are very sensitive to stress stimuli, e.g. catching, crating, transport, handling. Nonobservance of the welfare rules in the process of transport can cause negative stress effects and increase the mortality of birds during their transport (Nijdam *et al.*, 2004). Mortality is countable indicator of the level of welfare during transport. Transport-related mortality in poultry species other than broiler chickens has been studied little so far. In the Czech Republic, Voslářová *et al.* (2006, 2007) and Machovcová *et al.* (2017) observed the mortality of turkeys related to their transport for slaughter. Petracci *et al.* (2006) reported the incidence of death on arrival (DOA) in turkeys transported to processing plants in Italy. The aim of the present study was to assess mortality related to the commercial transport of turkeys for slaughter in the Czech Republic, and to determine the tendency in number of DOA birds in the monitored period.

Materials and Methods

The welfare of turkeys transported to processing plants in the Czech Republic was monitored in the period from 2009 to 2016. The whole period was divided in the two periods: the first period was from 2009 to 2012 and the second period included years from 2013 to 2016. In cooperation with the State Veterinary Administration of the Czech Republic the number of turkeys transported to the slaughterhouse and the number of turkeys DOA was recorded. The data were analyzed using the programme Unistat v. 6.5.. Statistical comparisons between the first and the second part were performed using the 2×2 contingency table procedure (Zar, 1999). A *P*-value of 0.05 in tests was considered significant.

Results and Discussion

A total of 996 702 turkeys were transported for slaughter in the Czech Republic in monitored period, of which 1279 died from causes connected with transport. Overall mortality among turkeys transported for slaughter from 2009 to 2016 was 0.128%. This is about half of the turkey transport-related mortality rates found in earlier studies (Petracci *et al.*, 2006; Voslářová *et al.*, 2006, 2007).

Significantly higher mortality (0.185%) was found in turkeys transported in the first period compared with the second period (0.052%). The trend in number of turkeys dying during transport to processing plants in relation to transport distances is shown in Figure 1.

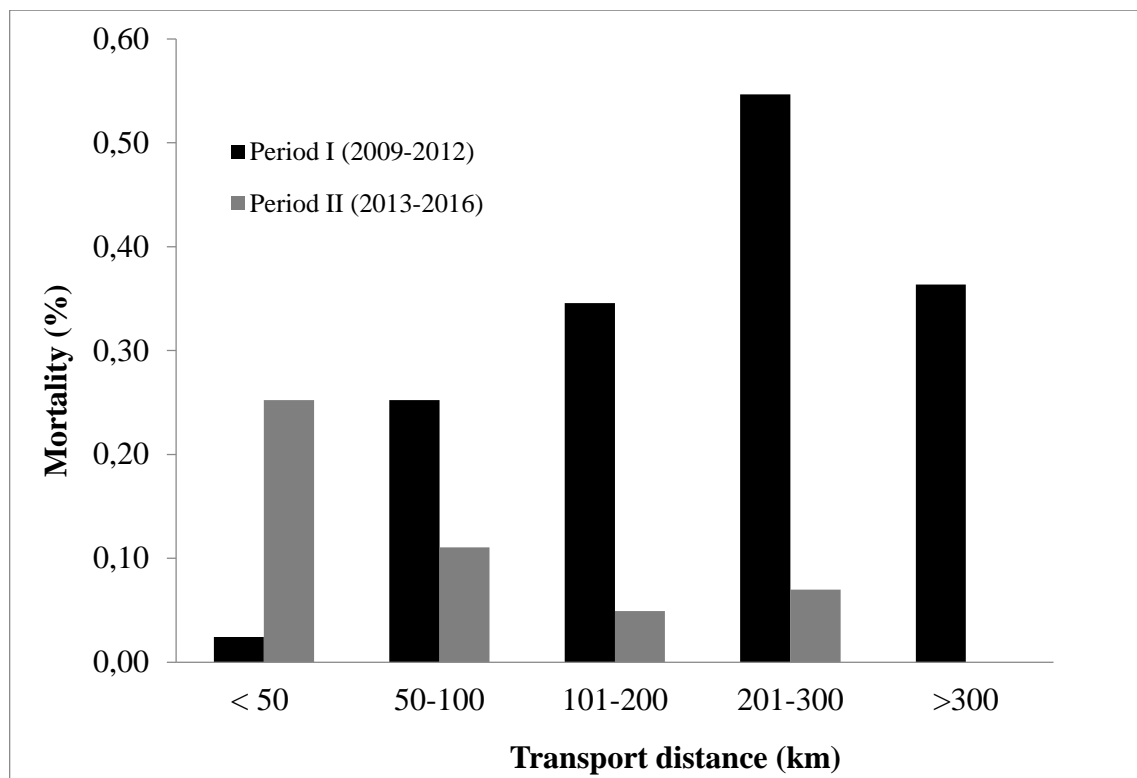


Figure 1: Trends in the numbers of turkeys dying during transport to processing plants in relation to transport distances

A significant ($P < 0.01$) decrease in mortality was seen in the second period for the distances exceeding 50 km. This might be caused by better conditions under which turkeys are transported for slaughter and by tightening of requirements for animal transportation by means of the relevant legislation. Furthermore, a positive finding is that no turkeys were transported for distances over 300 km in the second period. From the welfare point of view, shortening the transport duration often leads to reducing the number of birds dying during transport for slaughter. Voslářová *et al.* (2006, 2007) found the lowest mortality rates for the shortest transport distances and highest mortality rates for transport distances over 200 km. However, for the distances of less than 50 km, no significant ($P > 0.05$) difference was found between the two periods. Considering the fact that most turkeys were transported for this distance, it has significant welfare consequences. It means that despite the general decreasing trend in transport-related mortality rates, no welfare improvement was found for the majority of birds transported within the monitored period. Similarly, Machovcová *et al.* (2017) reported the decrease in the total numbers of birds transported for the slaughter from 2009 to 2014, but the numbers of birds dying as a result of their transport to processing plants varied widely.

Conclusion

Pre-slaughter handling is stressful for poultry and exposure to stress factors can even result in death of the birds. Over the years, attempts have been made to reduce the stress and improve transport conditions of birds. The welfare of turkeys during transport may also be influenced by transport distance and duration of transport. The results show a general decrease in transport-related mortality rates in the monitored period but such a decrease was not found for all transport distances. Particularly short distances up to 50 km can be of welfare concern. Conditions under which turkeys are transported can be further improved by e.g. keeping

favorable microclimatic conditions, proper style of driving, education of the staff, planning the transport according to the season of the year or external air temperature etc.

References

MACHOVCOVÁ, Z.; VEČEREK, V.; VOŠLÁŘOVÁ, E.; MALENA, M.; CONTE, F.; BEDÁŇOVÁ, I.; VEČERKOVÁ, L. Pre-slaughter mortality among turkeys related to their transport. *Animal Science Journal*. 2017, vol. 88, s. 705-711.

NIJDAM, E.; ARENS, P.; LAMBOOIJ, E.; DECUYPERE, E.; STEFEMAN, J.A. Factors Influencing Bruises and Mortality of Broilers During Catching Transport and Lairage. *Poultry Science*. 2004, vol. 83, s. 1610-1615.

PETRACCI, M.; BIANCHI, M.; CAVANI C.; GASPARI, P.; LAVAZZA, A. Preslaughter Mortality in Broiler Chickens, Turkeys, and Spent Hens Under Commercial Slaughtering. *Poultry Science*. 2006, vol. 85, s. 1660-1664.

VOŠLÁŘOVÁ, E.; RUBEŠOVÁ, L.; VEČEREK, V.; PIŠTĚKOVÁ, V., MALENA, M. Variation in the mortality rate of turkeys during transport to the slaughterhouse with travel distance and month. *Berl. Münch. Tierarztl. Wochenschr.* 2006, vol. 119, no. 9, s. 386-390.

VOŠLÁŘOVÁ, E.; JANAČKOVÁ, B.; RUBEŠOVÁ, L.; KOZÁK, A.; BEDÁŇOVÁ, I.; STEINHAUSER, L.; VEČEREK, V. Mortality Rates in Poultry Species and Categories during Transport for Slaughter. *Acta vet. Brno*. 2007, vol. 76, s. 101-108.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. Upper Saddle River, NJ, Prentice Hall, 1999, 4th ed., pp. 663.

Contact address: Zuzana Machovcová, MVDr., Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, FVHE VFU Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, machovcovaz@vfu.cz.

Behavioral changes in Black-and-white ruffed Lemurs (*Varecia variegata*) in response to their transport

Volfová Martina, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Behaviour changes were observed in two Black-and-white ruffed Lemurs prior and after their transport between two zoos in the Czech Republic. The aim of the study was to assess the stress response related to their transport and to determine the time needed for them to adjust to the new environmental conditions. Significant behavior changes were found in response to transport and new environment, namely in the frequency of defecation, frustration and stereotypical behaviors. The pronounced stress response was observed within two days after transport. Afterwards, animals seemed to be adjusted.

Keywords: *conservation; zoo; ethograms; stress; stereotypical behavior*

Introduction

Black-and-white ruffed Lemurs (*Varecia variegata*) are listed as Critically Endangered species and their population is still decreasing. The IUCN Red List of Threatened Species reported the population decline of 80% and more over a period of 21 years (IUCN, 2018). The major threats are habitat loss and hunting. Therefore, their ex-situ conservation is needed together with the habitat protection. Zoos play the main role in ex-situ conservation and the breeding program for *Varecia variegata* was set up. However, in captivity, animals can be exposed to many stress factors such as manipulation, transport, veterinary interventions, changes in their social group and visitors. Since primates are very sensitive to inappropriate environmental conditions, it is very important to monitor their welfare and to eliminate the effects of various stress factors as much as possible.

The stress can be measured by various methods, but the non-invasive assessment of adrenocortical activity come to the fore in last two decades. Many studies focused on methods, which are suited for evaluation of animal welfare in zoos (Hämäläinen et al., 2014; Rangel-Negrín et al., 2014; Sheriff et al., 2011; Schwarzenberger and Brown, 2013; Whitten et al., 1998).

Material and Methods

Two Black-and-white ruffed Lemur females were observed prior and after their transport between two zoos in the Czech Republic during October 2016 in this study. Female 1 and 2 were siblings and they were born on 13 May 2015. Originally, they were housed together with their parents.

The ethological observation started 3 days prior to the transport and continued 4 days after it. The observed behavior elements were recorded into pre-prepared ethogram sheets every 2 minutes for 2 hours within one day (one hour in the morning and one hour in the afternoon). During the transport, the females were placed separately in pet transport boxes with visual, olfactory and auditory contact and the transport took approx. 3 hours. Observed behavior elements were counted in total and the frequency was compared prior and after the transport. The results were analysed using the statistical package Unistat 5.6. (Unistat Ltd., London, England) and checked using the Mann-Whitney test. A P-value < 0.05 was considered significant.

Results and Discussion

Significant behavior changes were found in two Black-and-white ruffed Lemurs in response to transport and new environment. The frequency of observed behavior elements is summarized in Table 1. The first two days following transport, the females were scared, hid in the corner, were shy to take the food and also the frequency of defecation increased significantly ($P < 0.05$). As stated by Campbell et al. (2000), *Varecia variegata* exhibits an extremely short transit time in digesta passage (2-4 hours) thus the speed of defecation depends on food intake and faster and more frequent defecation is connected with stressful situations. During the observation, one of the two siblings was dominant. In some specific situations as feeding or new interesting stimulus she was first at the place and if the submissive one was in the way the aggressive behavior was recorded. In captivity, common aggressive repertoire includes the stare, charge, lunge, cuff, feint-to-cuff, bipedal hop, pounce on, push down and bite (Pereira et al., 1988). In this study, just the lunge was monitored. In captive and free-ranging ruffed lemurs, females are almost always dominant to males (Gron, 2007). After two days, exploratory behavior was seen more frequently than prior to the transport. A significant ($P < 0.01$) decrease was found in frustration and stereotypical behaviors that were more frequent before the transport and change of the environment. Also another abnormal behavior (coprophagy) was observed in the dominant female in the original environment. This behavior can point out to the frustration.

Table 1: Observed behavior elements and their frequency.

Behavior elements Observation time*	Hair care		Sunning		Stretching		Scratching		Rest		Sleep		Allogrooming	
	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After
Mean	6.3	4.5	2.0	0.6	4.3	1.8	3.7	1.8	23.8	23.8	0.0	0.0	5.3	2.1
Median	6.0	4.5	2.0	0.0	4.0	2.0	4.0	2.0	24.0	24.0	0.0	0.0	5.5	2.0
Behavior elements Observation time*	Drinking		Feeding		Food gathering		Defecation		Urination		Coprophagy		Vocalization	
	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After
Mean	1.7	0.8	10.0	9.1	5.3	5.3	2.2	3.6	1.3	0.9	1.3	0.0	1.3	2.8
Median	2.0	1.0	9.5	8.5	5.0	4.5	2.0	3.5	1.0	1.0	1.0	0.0	1.0	2.5
Behavior elements Observation time*	Exploration		Rush		Jump a branch		Dominance		Fear		Frustration		Stereotype	
	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After	Prior	After
Mean	27.5	34.9	5.7	2.6	10.5	5.6	0.5	0.6	0.0	6.9	4.5	0.4	1.3	0.1
Median	28.0	39.0	5.0	1.5	11.0	4.0	0.0	0.0	0.0	1.5	4.0	0.0	1.0	0.0

* *Observation time: Prior to the transport and after the transport*

Animals housed in captivity have been observed to perform a variety of stereotypic behaviors, including locomotor behaviors, appetitive behaviors and self-injurious behaviors (Lawrence and Rushen, 1993; Tarou et al., 2005). Because stereotypic behavior is rarely observed in wild animals, it has often been considered to be reflective of an abnormal animal-environment interaction (Carlstead, 1998; Tarou et al. 2005). Bollen and Novak (2000) have found that great apes exhibited more often stereotypic behavior than prosimians and just approximately 7% of zoo-housed prosimians exhibited some form of stereotypies (Tarou et al., 2005). To ensure appropriate environmental conditions and the well-being of captive animals an enrichment is needed to stimulate a wide variety of behaviors and improve the health and welfare (Hosey et al., 2009; Young, 2003).

Conclusion

Generally, the stereotypic behavior arise from the frustration, thus changes in the environment are beneficial. To provide the best environmental conditions enrichment programs suitable for a given species are necessary. Despite transport and transition to a new environment might be temporarily stressful, it may also be beneficial from the long-time welfare perspective (namely reduction of stereotypies) as shown by our results.

References

- BOLLEN, K.S.; NOVAK, M.A. A survey of abnormal behavior in captive zoo Primates. *American Journal of Primatology*. 2000, **51**, 47.
- CAMPBELL, J.L.; EISEMANN, J.H.; WILLIAMS, C.V.; GLENN, K.M. Description of the gastrointestinal tract of five lemur species: *Propithecus tattersalli*, *Propithecus verreauxicoquereli*, *Varecia variegata*, *Hapalemur griseus*, and *Lemur catta*. *American Journal of Primatology*. 2000, **52**, 133-142.
- CARLSTEAD, K. Determining the causes of stereotypic behaviors in zoo Carnivores: toward appropriate enrichment strategies. In: SHEPERDSON, D.J.; MELLEN, J.D.; HUTCHINS, M.; editors. *Second nature: environmental enrichment for captive animals*. Washington, DC: Smithsonian Institution Press. 1998, 172-183
- GRON, K.J. Primate Factsheets: Ruffed lemur (*Varecia*) Behavior. 2007. [online]. [vid. 13. 04. 2018]. Dostupné z: [http://pin.primate.wisc.edu/factsheets/entry/ruffed_lemur/behav].
- HÄMÄLÄINEN, A.; HEISTERMANN, M.; FENOSO, Z.S.E.; KRAUS, C. Evaluating capture stress in wild gray mouse lemurs via repeated fecal sampling: method validation and the influence of prior experience and handling protocols on stress responses. *General and Comparative Endocrinology*. 2014, **195**, 68-79.
- HOSEY, G., MELFI, V., PANKHURST, S. Zoo Animals: Behaviour, Management, and Welfare. Oxford University Press, New York. 2009. ISBN 978-0-19-923306-9.
- IUCN. 2018. *Varecia variegata*. [online]. [vid. 12. 04. 2018]. Dostupné z: [<http://www.iucnredlist.org/details/22918/0>].
- LAWRENCE, A.B.; RUSHEN, J. Introduction. In: LAWRENCE, A.B.; RUSHEN, J.; editors. *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare*. Wallingford: Cab International. 1993, 1-5.
- PEREIRA, M.E.; SEELIGSON, M.L.; MACEDONIA, J.M. The behavioral repertoire of the black-and-white ruffed lemur, *Varecia variegata variegata* (Primates: Lemuridae). *Folia Primatologica*. 1988, **51**, 1-32.
- RANGEL-NEGRÍN, A.; FLORES-ESCOBAR, E.; CHAVIRA, R.; CANALES-ESPINOSA, D.; DIAS, P.A.D. Physiological and analytical validations of fecal steroid hormone measures in black howler monkeys. *Primates*. 2014, **55**, 459-465.
- SHERIFF, M.J.; DANTZER, B.; DELEHANTY, B.; PALME, R.; BOONSTRA, R. Measuring stress in wildlife: techniques for quantifying glucocorticoids. *Oecologia*. 2011, **166**, 869-887.
- SCHWARZENBERGER, F., BROWN, J.L. Hormone monitoring: An important tool for the breeding management of wildlife species. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 2013, **100**, 209-225.
- TAROU, L.R.; BLOOMSMITH, M.A.; MAPLE, T.L. Survey of stereotypic behavior in Prosimians. *American journal of Primatology*. 2005, **65**, 181-196.
- YOUNG, R.J. Environmental enrichment for captive animals. Universities Federation for Animal Welfare (UFAW), Blackwell Science Ltd. 2003. ISBN 0-632-06407-2.
- WHITTEN, P.L.; STAVISKY, R.; AURELI, F.; RUSSEL, E. Response of fecal cortisol to stress in captive chimpanzees (*Pan troglodytes*). *American Journal of Primatology*. 1998, **44**, 57-69.

Contact address: Martina Volfová, MVDr., Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, FVHE VFU Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, H17343@vfu.cz.

NESOUTĚŽNÍ PŘÍSPĚVEK

Příčiny úhynu a eutanazie psů v útulku
Causes of death and euthanasia in shelter dogs

Vitulová Svatava, Voslářová Eva, Volfová Martina, Večerek Vladimír

*Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno***Summary**

The goal of our study was to analyse shelter records on dead and euthanised dogs in a selected dog shelter in the period from 2007 to 2016. In the shelter, 43 (2%) of abandoned dogs died and 52 (3%) of dogs had to be euthanised due to health reasons. The most frequent reasons of unassisted death were gastrointestinal diseases, euthanasia was mostly executed due to a total failure of organism.

Keywords: abandoned dogs; health; fatality; disease

Úvod

Navzdory veškeré péči, která je psům věnována, v útulcích dochází k úhynům a eutanaziím. Příčiny úhynů a provedených eutanazií jsou různorodé a liší se významně v jednotlivých zemích. Většina studií týkajících se mortality pochází z USA, kde je v útulcích eutanazie prováděna i u zdravých psů a dosahuje až 40 % (Bartlett et al., 2005). Výsledky studie jednoho amerického „no-kill“ útulku ukazují výrazně nižší mortalitu - pouze 2 % psů musela být utracena a necelé jedno procento psů uhynulo (Svoboda et al., 2015). V Austrálii byl v útulku, kde eutanazie není prováděna u zdravých jedinců, celkový počet uhynulých zvířat jednoprocentní, s vyšší mortalitou ve šteněcím věku (Hemy et al., 2017). Fleming et al. (2011) uvedli jako nejčastější příčinu úhynu u mladých psů gastroenteritidy, kdežto u starších jedinců to jsou neurologická a neoplastická onemocnění. Mezi nejčastěji se vyskytující onemocnění v útulcích i obecně u populace psů patří gastroenteritidy (Hubbard et al., 2007; Litster et al., 2017). Obvyklé důvody pro provedení eutanazie jsou vysoký věk psa spojený s mnoha zdravotními problémy, nemoc a nežádoucí chování (Kass et al., 2001).

Materiál a metodika

Na základě zdravotních záznamů o psech, kteří uhynuli nebo byli utraceni ve vybraném městském útulku v krajském městě v období let 2007 až 2016, byly analyzovány příčiny, které k úhynu či eutanazii psů vedly. Pro účely určení vlivu věku byli psi, kteří uhynuli nebo byli utraceni ze zdravotních důvodů v útulku, rozděleni do následujících věkových kategorií: méně než 6 měsíců, 6 měsíců až méně než 1 rok, 1 rok až méně než 3 roky, 3 roky až méně než 6 let, 6 let až méně než 9 let, 9 let a více. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat v. 6.5. (Unistat Ltd., GB). Srovnání četností mezi jednotlivými kategoriemi bylo provedeno na základě χ^2 testu v rámci analýzy kontingenčních tabulek $k \times m$ a 2×2 (Zar, 1999).

Výsledky a diskuze

Z celkového počtu 1500 psů přijatých do útulku ve sledovaném období 43 (2 %) opuštěných psů uhynulo a 52 (3 %) psů muselo být utraceno ze zdravotních důvodů. Rozdíl mezi počtem uhynulých a utracených zvířat nebyl statisticky významný ($P = 0,41$). Zjištěná úroveň mortality je srovnatelná s dostupnými údaji v „no – kill“ útulcích v zahraničí (Svoboda et al., 2015; Hemy et al., 2017). Příčiny mortality v závislosti na věku útlkových psů jsou

znázorněny v tabulkách č. 1 a 2. Mezi jednotlivými příčinami úhynu i eutanazie byl zaznamenán statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,001$). Byl prokázán také vliv věku. Úroveň úhynů u šňekat se statisticky vysoce významně lišila ($P < 0,001$) od jiných věkových kategorií. Nejčastější příčinou úhynů byla gastrointestinální infekce. Tento údaj koresponduje s výsledky Litster et al. (2011) a Fleming et al. (2011), kteří potvrdili gastroenteritidy jako nejčastější důvod úhynu u juvenilních jedinců do 1 roku věku. Staří psi byli statisticky vysoce významně častěji utráceni než jiné věkové kategorie ($P < 0,001$). Nejčastější indikací pro provedení eutanazie bylo totální selhání organismu. K podobným výsledkům dospěli také Kass et al. (2011).

Tabulka 1: Příčiny úhynu psů v útulku v závislosti na věku.

Příčina úhynu	Příčina uhynulých psů dle věku (roky)					
	0 až < 0,5	0,5 až < 1	1 až < 3	3 až < 6	6 až < 9	9 <
Následky autonehody	1					
Gastrointestinální infekce	10		5	3		
Respirační onemocnění	1		1			
Torze žaludku						1
Neurologické a kardiiovaskulární on.						3
Onkologické onemocnění				1		1
Totální selhání organismu	5		1		1	3
Neznámé důvody	2		2	1		1
Celkem	19	0	9	5	1	9

Tabulka 2: Příčiny eutanazie psů v útulku v závislosti na věku.

Příčina eutanazie	Příčina utrácených psů dle věku (roky)					
	0 až < 0,5	0,5 až < 1	1 až < 3	3 až < 6	6 až < 9	9 <
Následky autonehody			1			3
Gastrointestinální infekce	3					1
Neurologické a kardiiovaskulární onemocnění				2	1	5
Onkologické onemocnění				1	4	5
Totální selhání organismu	1			1	3	11
Selhání ledvin						3
Pooperační komplikace						1
Agresivita			1	1	1	
Neznámé důvody					1	2
Celkem	4	0	2	5	10	31

Závěr

Analýzou dat ve vybraném útulku v období let 2007-2016 byla zjištěna 2% morbidita a 3% mortalita psů. Nejvíce uhynulých psů bylo v nejmladší věkové kategorii do 0,5 roku, nejfrekventovanějším důvodem úhynů byly gastroenteritidy. Naopak eutanazie byly provedeny nejčastěji u nejstarší věkové skupiny nad 9 let věku. Nejpočetnější skupinou indikací pro eutanazii bylo multifaktoriální selhání organismu.

Literatura

BARTLETT, P.C., A. BARTLETT, S. WALSHAW, S. HALSTEAD. Rates of euthanasia and adoption for dogs and cats in Michigan animal shelters. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2005, **8**(2), 97-104.

FLEMING, J.M., K.E. CREEVY, D.E.L. PROMISLOW. Mortality in North American dogs from 1984 to 2004: An investigation into age-, size-, and breed-related causes of death. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2011, **25**(2), 187-198.

HEMY, M., J. RAND, J. MORTON, M. PATERSON. Characteristics and outcomes of dogs admitted into Queensland RSPCA shelters. *Animals*. 2017, **7**(67), 1-2.

HUBBARD, K., B. J. SKELLY, J. MCKELVIE, J. L. N. WOOD. Risk of vomiting and diarrhoea in dogs. *Veterinary Record*. 2007, **161**(22), 755-757.

KASS, P.H., J.C. NEW, J.M. SCARLETT, M.D. SALMAN. Understanding animal companion surplus in the United States: Relinquishment of nonadoptables to animal shelters for euthanasia. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2001, **4**(4), 237-248.

LITSTER, A., J. ALLEN, A. MOHAMED, S. HE. Risk factors for delays between intake and veterinary approval for adoption on medical grounds in shelter puppies and kittens. *Preventive Veterinary Medicine*. 2011, **101**(1-2), 107-112.

SVOBODA, H.J., C.L. HOFFMAN. Investigating the role of coat colour, age, sex, and breed on outcomes for dogs at two animal shelters in the United States. *Animal Welfare*. 2015, **24**, 497-506.

ZAR, J.H. *Biostatistical Analysis*. 4 th ed Prentice-Hall. (1999), 663

Kontaktní adresa: Svatava Vitulová, Ing., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H16414@vfu.cz.

SEKCE 6

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

Detekcia DNA poškodenia využitím kométovej analýzy po expozícii tiaklopridom

Detection of DNA damage using the comet assay after exposure to thiacloprid

Koleničová Simona, Holečková Beáta, Galdíková Martina, Drážovská Monika, Šiviková Katarína, Dianovský Ján

Ústav genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

Summary

Pesticides present in the environment may have negative effects on human and animal health. One of the most important properties of some groups of pesticides is their ability to induce damage to the genetic material of the cell. The most suitable biomarkers for the overall genotoxicity of the environment are the herds of grazing livestock as they are exposed to environmental genotoxic substances through grazing. In our work, the potential genotoxic effects of the selected thiacloprid pesticide on peripheral blood lymphocyte lymphocytes were investigated by means of alkaline single cell gel electrophoresis (Comet Test - SCGE). Comet analysis is a simple method to detect DNA breakdowns in eukaryotic cells. As a result of this method, comets are observed by a fluorescence microscope, where comet tail intensity reflects the value of DNA damage.

Keywords: comet assay; genotoxicity; DNA damage

Úvod

Približne 90% aplikácie pesticídov v poľnohospodárstve nikdy nedosiahne cieľové organizmy, ale sú rozptýlené do vzduchu, pôdy a vody. V dôsledku toho sú rutinne detegované vo vzduchu, na zemskom povrchu a spodnej vode, sedimente, pôde, zelenine a niektorých odvetviach výroby potravín (Hussaini a kol., 2013).

Tiakloprid je jedným zo siedmich neonikotínoidov, ktoré boli vyvinuté za účelom neurotoxického účinku na nikotínový acetylcholínový receptor (nAChRs) hmyzu (Simon-Delso a kol., 2015). Aktívna látka tiakloprid sa spomedzi širokej rady neonikotínových insekticídov nachádza v komerčnom prípravku Calypso 480SC. Je to chloronikotínyl neonikotínový insekticíd, prvýkrát registrovaný v roku 2000, pod obchodným názvom Calypso 480SC. Neonikotínoidy sú triedou chemických látok využívaných ako insekticídy vďaka ich neurotoxickému účinku na nikotínový acetylcholínový receptor (nAChRs) hmyzu. Patria medzi systémové insekticídy určené na prenos do všetkých častí ošetrovaných rastlín vrátane peľu, nektáru, guttačných tekutín a potravín vyrobených z takto vypestovaných rastlín (Chen a kol., 2014).

Výhodou objavu metódy kométovej analýzy (SCGE) je, že bunky z rôznych tkanív sa môžu študovať v širokej škále eukaryotických organizmov (Gaivão a Sierra, 2014). Alkalická kométovej analýza je najrozšírenejšou metódou na meranie poškodenia DNA v eukaryotických bunkách (Neri a kol., 2015). Deteguje jednoreťazcové (*single-strand breaks* – SSBs) a/alebo dvojreťazcové zlomy na vláknach DNA (*double strand breaks* – DSBs) a alkali-labilné miesta.

Materiál a metodika

Pri alkalickkej kométovej analýze boli lymfocyty periférnej krvi hovädzieho dobytku izolované pomocou separačného média Histopaque 1077. Lymfocyty boli inkubované v kultivačnom médiu a boli vystavené pôsobeniu insekticídu tiaklopridu a Calypsu 480SC (koncentrácie 120, 240 a 480 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), destilovanej vode (negatívna kontrola) a H_2O_2 (pozitívna kontrola) počas

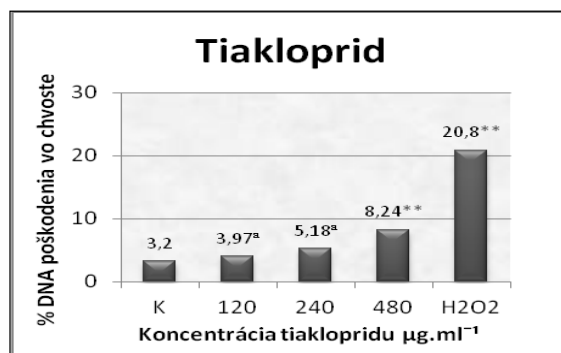
doby 2 hodín. Pred lýzou sa bunky zmiešali s agarózou s nízkou teplotou topenia (LMP) na mikroskopickom sklíčku. Pomocou Trypanovej modrej bola určená relatívna životaschopnosť buniek. Bolo analyzovaných celkovo 100 komét pomocou fluorescenčného mikroskopu NIKON Labophot 2A, vybaveného filtrom Texas Red. Percento poškodenia DNA vo chvoste bolo u vzniknutých komét analyzované pomocou softvéru CASP. Výsledky boli vyhodnotené štatistickou metódou Studentovým t-testom.

Výsledky

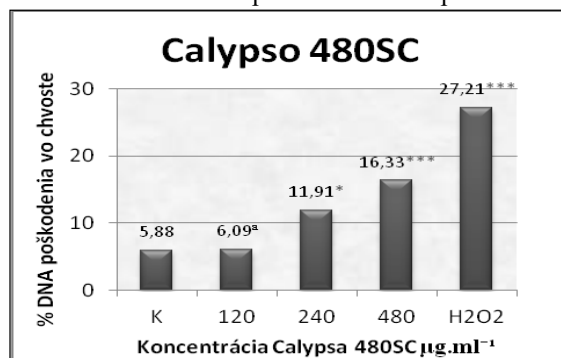
Výsledky poškodenia DNA v neproliferujúcich lymfocytoch periférnej krvi u hovädzieho dobytky po expozícii tiaklopridom (koncentrácie 120, 240 a 480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) a komerčného prípravku Calypsa 480SC (koncentrácie 120, 240 a 480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$) sú zhrnuté v Tab.1. a na Obr. 1 a 2. Po 2 hodinovej expozícii tiaklopridom došlo k zvýšeniu poškodenia DNA so štatistickou významnosťou pri koncentrácii 480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ** p <0,01) a u komerčného prípravku Calypsa 480SC pri koncentráciách 240 a 480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ (240 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ * p <0,05 a 480 $\mu\text{g.ml}^{-1}$ ***p <0,001, Studentov t-test). Životaschopnosť buniek u tiaklopridu bola vyššia ako 85,71% a u Calypsa 92,68%.

Tab.1: Rozsah poškodenia DNA (% DNA vo chvoste) a životaschopnosti (%) neproliferujúcich bovinných lymfocytov periférnej krvi po vystavení pôsobeniu tiaklopridu a komerčného prípravku Calypsa 480 SC v priebehu 2 hodín

Dávka	% Životaschopnosti	DNA poškodenie (% DNA vo chvoste)
H ₂ O	100	3.20 ± 1.34
Tiakloprid ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		
120	85,71	3.97 ± 1.29 ^a
240	88,89	5.18 ± 1.24 ^a
480	87,5	8.24 ± 0.83 ^{**}
H ₂ O ₂ (300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	-	20.80 ± 7,37 ^{**}
Calypso 480SC ($\mu\text{g.ml}^{-1}$)		
H ₂ O	97,67	5.88 ± 0.55
120	93,75	6.09 ± 0.57 ^a
240	93,47	11.91 ± 2.94 [*]
480	92,68	16.33 ± 0.33 ^{***}
H ₂ O ₂ (300 $\mu\text{g.ml}^{-1}$)	-	27.21 ± 2.51 ^{***}



Obr.1: Percento DNA poškodenia tiaklopridom



Obr.2: Percento DNA poškodenia Calypsom

Diskusia

Samotné vyhodnocovanie komét je možné vykonávať buď vizuálne (tzv. “visual scoring“), alebo špeciálnym počítačovým softvérom. Pre počítačové hodnotenie existuje celá rada aplikácií, ako komerčných, tak freeware programov ako napríklad nami použitý softvér CASP. Pri hodnotení komét sa využíva množstvo parametrov (markerov). Mezi najpoužívanejší patrí dĺžka chvosta („tail length“), percentuálne zastúpenie DNA vo chvoste („% tail DNA“) a „tail moment“(Collins, 2004a; Olive, 2002). Tento parameter je zo všetkých

najmenej ovplyvniteľný mnohými vonkajšími faktormi a má najširší možný rozsah (teoreticky 0-100 % DNA vo chvoste). Pri sledovaní účinku neonikotínového insekticídu tiaklopridu a komerčného prípravku Calypsa 480SC na neproliferujúce bovinné lymfocyty alkalickou kométovou analýzou sme po 2h expozícii detegovali poškodenie DNA v súvislosti s najvyššími koncentraciami. Alkalická kométová analýza sa primárne používa k detekcii jednoreťazcových zlomov, ale poskytuje tiež informácie o dvojvláknových zlomoch a alkalicky labilných miestach. Existuje taktiež neutrálna modifikácia kométového testu, ktorou sa hodnotia dvojvláknové zlomy (Olive a Banáth, 2006). Hodnotenie môže byť ovplyvnené aj tým, v akom bode bunkového cyklu sa bunka nachádza a aký typ metódy je pre kométoú analýzu použitý. Bunky v S-fáze obsahujú replikačné štruktúry, ktorých odpoveď na agens je iná, než u nereplikujúcej sa DNA. Pri alkalickej SCGE sa tieto štruktúry chovajú ako SSB a zvyšujú migráciu. Naopak pri neutrálnej SCGE replikačné štruktúry migrácii DNA bránia (Olive, 2002). V našom prípade dosiahnuté výsledky detegovali poškodenie DNA a tvorbu zlomov prejavujúcich sa typickými obrazmi komét, čím sa potvrdil negatívny účinok insekticídu tiaklopridu a jeho komerčnej formy v najvyšších koncentraciách.

Záver

Po hodnotení percentuálneho zastúpenia DNA vo chvoste (% tail DNA) softvérom CASP v kultúrach lymfocytov hovädzieho dobytku ovplyvnených neonikotínoidmi sme v súvislosti so stúpajúcimi koncentraciami tiaklopridu a komerčnej formy Calypso 480SC zaznamenali štatisticky významné zvýšenie poškodenia DNA a tvorbu zlomov pri najvyšších aplikovaných koncentraciách. Na potvrdenie genotoxického potenciálu testovaných insekticídov je potrebné doplniť ďalšie cytogenetické metódy (CA, MN, SCE, FISH) odporúčané OECD, prípadne štúdium expresie vybraných génov.

Podakovanie

Štúdia bola finančne podporená projektmi VEGA 1/076/16 a IGA 09/2017.

Literatúra

- COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair. Principles, applications, and limitations. *Molecular Biotechnology*. 2004a, vol.26, p.249-261.
- GAIVAO, I., SIERRA, L.M. Drosophila comet assay: insights, uses, and future perspectives. *Frontiers in Genetics*. 2014, vol.5, p.304.
- HUSSAINI, S.Z., SHAKER, M. , IQBAL, M.A. Isolation of Bacterial for Degradation of Selected Pesticides. *Advanced Biomedical Research*. 2013, vol.4 (3), p.82-85.
- CHEN, M., TAO, L., McLEAN, J., a kol. Quantitative analysis of neonicotinoid insecticide residues in foods: implication for dietary exposures. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2014, vol. 62(26), p.6082–6090.
- NERI, M., MILAZZO, D., UGOLINI, D., a kol. Worldwide interest in the comet assay: a bibliometric study. *Mutagenesis*. 2015, vol.30, p.155–163.
- OLIVE, P. L. The comet assay. An overview of techniques. In Didenko, V. V. (Ed.): *In Situ Detection of DNA Damage. Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology*. 2002, vol. 203, p.179-194
- OLIVE, P. L.; BANÁTH, J. P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*. 2006, vol.1, p.23-29.
- SIMÓN-DELISO, N., AMARAL-ROGERS, V., BELZUNCES, L.P., a kol. Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*. 2015, vol. 22(1), p.5-34.

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

Ekotoxicita platinových nanočástic pro vodní organismy Ecotoxicity of platinum nanoparticles for the aquatic organisms

Hlávková Daniela, Havelková Barbora, Beklová Miroslava

Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

In recent years several nanoparticles types have been studied intensively, but only very few studies have focused on the toxic effect of platinum nanoparticles (PtNPs) to aquatic organisms. PtNPs have many industrial and biomedical applications. Due to this extensive use, emission of PtNPs into aquatic environment must be expected and the investigation of their ecotoxicity is very important.

*The aim of the study is to evaluate the acute toxicity of three PtNPs of nominal size (3.1–24.4 nm) on organisms representing all trophic levels of the aquatic ecosystem: Duckweed *Lemna minor*, water crustacean *Daphnia magna* and marine bacteria *Vibrio fischeri*. The experiments were carried out on the basis of OECD 221 (ČSN EN ISO 20079); OECD 202 guideline (ČSN EN ISO 6341 and ISO 11348–2 (ČSN EN ISO 11348-3)). The ecotoxicity of platinum nanoparticles varies considerably according to the test organisms and particle size. The lowest toxicity of all tested samples was observed in bacteria while the highest toxicity was in *Daphnia*.*

Keywords: *Lemna minor; Daphnia magna; Vibrio fischeri; platinum*

Úvod

Rostoucí využívání nanočástic v široké škále produktů vedlo k jejich uvolňování do vodního prostředí. Vzhledem k tomu, že neznáme spolehlivou odpověď na otázku, zda nanočástice nepředstavují zvýšené nebezpečí pro jednotlivé složky životního prostředí, je pochopení jejich toxického účinku velmi důležité (Ksiazek et al., 2015). Nanočástice jsou charakteristické svou velikostí, která se pohybuje v řádech nanometrů 1–100 nm. Díky této velikosti se zvětšuje jejich povrch a menší nanočástice bývají více toxické než částice větších rozměrů (Bhattacharya and Murkherjee, 2008).

Nanočástice platiny přitahují pozornost pro průmyslové aplikace díky jejich pozoruhodným katalytickým vlastnostem. Používají se v automobilových výfukových konvertorech, v biomedicinské aplikaci nebo jako biosenzory (Bhattacharya and Murkherjee, 2008), (Luo et al., 2006). Toxicita nanočástic platiny byla zkoumána pro lidské buňky, ale pouze několik málo studií zkoumalo účinky nanoplatiny na vodní organismy (Elder et al., 2007). Informace o chování nanočástic platiny ve vodním prostředí jsou sporadické. Je proto otázkou, zda si nanoplatina uchová svoje vlastnosti i po vstupu do vodního prostředí, zda její reaktivitu neovlivní fyzikální, chemické a biologické faktory. Odpovědi nejen na tyto otázky, ale i informace o toxicitě nanočástic platiny pro zástupce vodní biocenózy jsou klíčové pro zavádění regulačních mechanismů pro bezpečnou produkci a aplikaci.

Cílem práce je objasnit vliv platinových nanočástic pro organismy vodního prostředí a na základě hodnot EC_{50} (EC_5) vyhodnotit jejich toxický účinek z hlediska velikosti částic.

Materiál a metody

Pro posouzení vlivu platiny na vodní organismy byly zvoleny testy akutní toxicity na okřehku menším *Lemna minor*, na sladkovodních korýších *Daphnia magna* a na mořských světélkujících bakteriích *Vibrio fischeri*. Testy byly vybrány tak, aby byla zastoupena trofická úroveň producenta (*Lemna minor*), konzumenta (*Daphnia magna*) i destruenta (*Vibrio fischeri*). Metodicky se postupovalo dle příslušných norem (ČSN EN ISO 20079, ČSN EN ISO

6341 a ČSN EN ISO 11348). K potvrzení velikostní hypotézy jsme vyrobili a otestovali tři různé velikosti nanočástic platiny – Pt1 (3,1–10 nm), Pt2 (4,2–21 nm) a Pt3 (8,7–24,4 nm). Koncentrační řadu jsme zvolili pro všechny tři vodní organismy stejnou, tj. 50, 75, 100, 150 a 250 $\mu\text{g.l}^{-1}$ ve třech opakováních pro každou koncentraci i kontrolu.

Rostliny okřešku menšího (*Lemna minor*) se nechají růst po dobu 7 dní v různých koncentracích testované látky rozpuštěné ve standardně připraveném živném roztoku SIS (Swedish Standard Medium). Současně se nasadí testovací rostliny do živného roztoku bez testované látky – kontrola. V intervalu 24 hodin jsme kontrolovali a zaznamenávali stav rostlin a růst lístků a po 7 dnech stanovili počet lístků a hmotnost biomasy pro jednotlivé koncentrace a kontrolu. Pomocí komerčně dostupného softwaru TOXICITA 3.1 (VÚV Ostrava, Česká republika) jsme na základě získaných inhibičních hodnot vyhodnotili 168hEC₅₀.

Akutní test na perloočkách *Daphnia magna* spočívá ve sledování jejich imobilizace ve zvoleném rozsahu koncentrací testované látky a v kontrole. Následně byla v 24hodinovém intervalu sledována inhibice pohybu perlooček a zaznamenání jak uhynulí, tak imobilizovaní jedinci. Ze získaných hodnot byla stanovena 24h a 48hEC₅₀ probitovou analýzou pomocí počítačového programu (PROBITY VÚRH Vodňany).

Principem bakteriálního bioluminiscenčního testu toxicity je změna luminiscence mořských světélkujících bakterií *Vibrio fischeri* vyvolaná negativním působením toxického vzorku. Pomocí přístroje LUMISTox 300 byla změřena intenzita jejich světla a vypočtena hodnota EC₂₀ nebo EC₅₀. Měření bylo prováděno ve zkušebních kyvetách s různými koncentracemi testované látky. Intenzita luminiscence bakterií byla měřena po 15 a 30 minutách.

Na základě hodnot EC₅₀ jsme vyhodnotili toxický účinek nanočástic platiny z hlediska jejich velikosti.

Výsledky a diskuse

Výsledné hodnoty EC pro hodnocené nanočástice platiny jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Hodnoty 48hEC₅₀ pro dafnie; 168hEC₅ (růstová rychlost) a 168hEC₅₀ (biomasa) pro okřehek a 30' EC₅₀ pro bakterie.

Testovací organismus	Nanočástice platiny – velikost nm		
	3,1–10	4,2–21	8,7–24,4
<i>Daphnia magna</i>	405,74 $\mu\text{g.l}^{-1}$	413,24 $\mu\text{g.l}^{-1}$	775,32 $\mu\text{g.l}^{-1}$
<i>Lemna minor</i>	10,67 $\mu\text{g.l}^{-1}$	50 $\mu\text{g.l}^{-1}$	a
<i>L. minor</i> (biomasa)	140,77 $\mu\text{g.l}^{-1}$	247,81 $\mu\text{g.l}^{-1}$	249,37 $\mu\text{g.l}^{-1}$
<i>Vibrio fischeri</i>	135,47 $\mu\text{g.l}^{-1}$	167,94 $\mu\text{g.l}^{-1}$	254,64 $\mu\text{g.l}^{-1}$

a – nestanoveno

Účinky platinových nanočástic na vegetativní růst okřešku menšího se projevily inhibicí růstu porovnáním konečné biomasy a morfologickými změnami lístků (nekróza, chloróza). Biomasa u okřešku se prokázala jako lepší bioindikátor v porovnání s růstovou rychlostí. Testy akutní toxicity pro testované vzorky platiny prokázaly nejvyšší citlivost pro bakterie *Vibrio fischeri*. Akutní toxicita nejmenší částice platiny pro bakterie činila 135,47 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Naopak nejméně toxické byly nanočástice pro perloočky *Daphnia magna*. Snížení imobilizace o 50% jsme zaznamenali až u koncentrace 405,74 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Výsledky ekotoxikologických testů se liší v závislosti na druhu organismu a podmínkách testu.

Závěr

Z ekotoxikologického zhodnocení vlivu tří platinových nanočástic na organismy vodního ekosystému bylo zjištěno, že nejvyšší toxicitu vykazovala Pt1 a nejnižší Pt3 (Pt1 > Pt2 > Pt3). Na základě dosažených výsledků lze potvrdit hypotézu, že čím menší částice platiny, tím je vyšší jejich toxicita a naopak. Z hlediska posouzení potenciálního nebezpečí pro vodní ekosystém, nanočástice platiny nejvíce ovlivnily zástupce trofických úrovní v tomto pořadí: *Vibrio fischeri* > *Lemna minor* > *Daphnia magna*.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 222/2017/FVHE.

Literatura

KSIAŹYK, M.; ASZTEMBORSKA, M.; STĘBOROWSKI, R.; BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G. Toxic Effect of Silver and Platinum Nanoparticles Toward the Freshwater Microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2015, vol. 94, no. 5, s. 554-558.

BHATTACHARYA, R.; MURKHERJEE, P. Biological properties of “naked” metal nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2008, vol. 60, no. 11, s. 1289–1306.

LUO, X., MORRIN, A.; KILLARD A. J.; SMYTH M. R. Application of nanoparticles in electrochemical sensors and biosensors. *Electroanalysis*. 2006, vol. 18, no. 4, s. 319–326.

ELDER, A.; YANG, H.; GWIAZDA, R.; TENG, X.; THURSTON, S.; HE, H.; OBERDORSTER, G. Testing nanomaterials of unknown toxicity: an example based on platinum nanoparticles of different shapes. *Advanced Materials*. 2007, vol. 19, no. 20, s. 3124–3129.

Kontaktní adresa: Daniela Hlávková, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvířecí, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H16002@vfu.cz.

Toxické účinky stříbrných nanočástic a iontů na embrya dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Toxic effects of silver nanoparticles and ions on zebrafish embryos (*Danio rerio*)

¹Čaloudová Hana, ¹Hodkovicová Nikola, ¹Berlinská Jana, ²Maršálek Blahoslav, ³Panáček Aleš, ¹Svobodová Zdeňka

¹Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Botanický ústav AV ČR, pracoviště Brno

³Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů, Univerzita Palackého v Olomouci

Summary

Silver nanoparticles are widely used in different fields, thanks to their characteristics, such as antibacterial, antiviral and antifungal activity. As their production and consumption rises, it is to be expected, that their concentrations in the environment will rise as well. Thus, they can pose a risk for non-target species, such as fish. There is still lack of knowledge about toxicity of silver nanoparticles. Therefore, we conducted fish embryo toxicity tests according to the modified OECD 236 guideline, using two species of silver nanoparticles and silver nitrate. LC50 values were recorded, as well as other sublethal effects, such as presence of oedemas and deformations, lags in development and delayed hatching.

Keywords: fish; silver nitrate; LC 50; OECD 236

Úvod

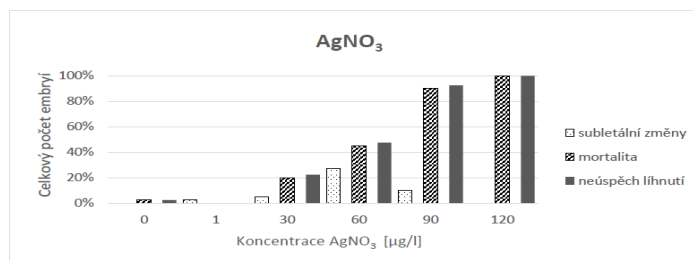
Stříbrné nanočástice (AgNP) patří mezi nejčastěji používané nanočástice, jejich produkce je celosvětově odhadována na 320 tun za rok. Vděčí za to svým vlastnostem, jakými jsou vysoká elektrická a tepelná vodivost, nelineární optické chování a zejména antibakteriální, antivirová a antimykotická aktivita (Nowack et al., 2011). S jejich vzrůstající výrobou a spotřebou lze očekávat i jejich zvýšený výskyt v životním prostředí, kde mohou představovat riziko pro necílové druhy, mezi které patří ryby. Odhadované koncentrace AgNP v evropských řekách se pohybují v rozmezí 0,03-0,08 µg/l (Mueller et al., 2008). Na rozdíl od stříbrných iontů, u kterých je znám mechanismus toxického účinku pro ryby, o AgNP stále chybí dostatek informací. Proto byly provedeny testy embryonální toxicity dle modifikované metodiky OECD 236 se dvěma druhy AgNP a AgNO₃, který představuje zdroj iontů stříbra.

Materiál a metody

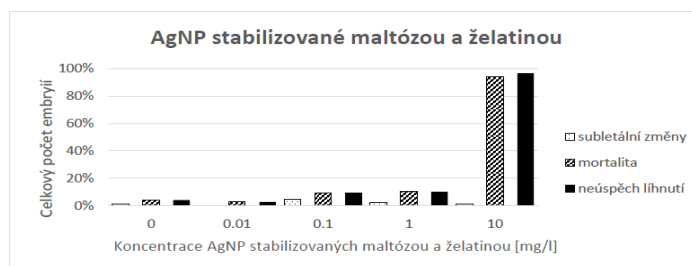
Nejprve byla provedena selekce oplozených, správně se vyvíjejících embryí ve stádiu blastuly 4 hodiny po fertilizaci. Testy byly prováděny v mikrotitračních deskách semistatickou metodou, s výměnou lázně každých 24 hodin. Embrya byla inkubována 96 hodin při teplotě 26 °C s využitím světelného cyklu 12 hodin světlo, 12 hodin tma. Mortalita a subletální změny byly zaznamenávány každých 24 hodin. Test byl proveden v triplicátu, v každé kontrolní i expoziční skupině bylo použito 12 embryí. K expozičním byl použit AgNO₃ v koncentracích 1-120 µg/l a dva druhy AgNP. Prvním z nich byly AgNP syntetizované Regionálním centrem pokročilých technologií a materiálů s velikostní distribucí 30,7 ± 0,6 nm stabilizované 0,01% roztokem maltózy a želatiny v koncentracích 0,01–10 mg/l. Druhé AgNP byly zakoupeny od společnosti Sigma-Aldrich, jejich deklarovaná velikost byla < 100 nm, ke stabilizaci byl použit polyvinylpyrrolidon (PVP). Testovány byly v koncentracích 1–100 mg/l.

Výsledky

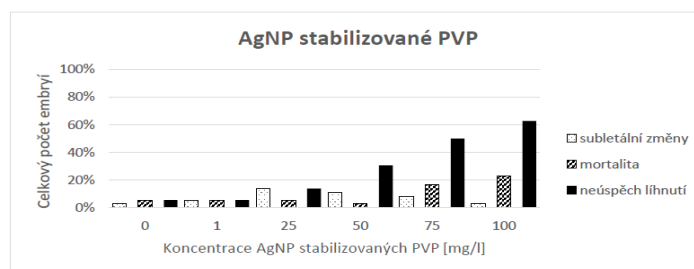
Výsledkem testů bylo stanovení hodnot LC_{50} . Pro $AgNO_3$ byla stanovena hodnota $96hLC_{50}$ $56,50 \mu g/l$, pro $AgNP$ stabilizované maltózou a želatinou hodnota $96hLC_{50}$ téměř stonásobně vyšší, $5,16 mg/l$. Nejméně toxické byly $AgNP$ stabilizované PVP, jejich $96hLC_{50}$ byla vyšší než $100 mg/l$. $AgNO_3$ navíc kromě významně nižší hodnoty LC_{50} vyvolal také nejvíce subletálních změn. Přítomny byly edémy srdce a žloutkového vřívku a deformace páteře. Expozice $AgNO_3$ vedla ve větší míře také k zaostávání ve vývoji, kdy namísto fyziologického hrudního postavení ve vodním sloupci a únikové reakce na podnět (jemný dotyk jehlou) embryo leželo na boku a neprojevovalo žádnou reakci.



Graf č. 1: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných $AgNO_3$.



Graf č. 2: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných $AgNP$ stabilizovaným maltózou a želatinou.



Graf č. 3: Četnost výskytu subletálních změn, mortalita a neúspěšnost líhnutí embryí exponovaných $AgNP$ stabilizovaným PVP.

Neúspěšnost líhnutí ve skupinách exponovaných $AgNO_3$ a $AgNP$ stabilizovaných maltózou a želatinou korelovala s mortalitou embryí, ve skupině exponované $AgNP$ stabilizovaným PVP míra neúspěšnosti líhnutí převyšovala mortalitu.

Diskuse

Získané výsledky jsou v souladu s dostupnou literaturou, podle které je toxicita iontů zpravidla vyšší než toxicita nanočástic (Griffitt et al., 2008). Hodnoty LC_{50} pro $AgNP$ se v literatuře pohybují v širokém rozmezí hodnot – od desítek mikrogramů po desítkymiligramů (Bilberg et al., 2012; Katuli et al., 2014). Na $AgNP$ nelze nahlížet jako na jedinou chemickou

látku, ale spíše jako na celou skupinu látek. Výrazný vliv na toxicitu nanočástic má velikost, tvar, rychlost a míra agregace, aglomerace, nebo ionizace. Dalším kritériem je přítomnost nebo nepřítomnost povrchové úpravy – coatingu a reakce s dalšími ionty a ligandy obsaženými v roztoku.

Závěr

Ze získaných výsledků vyplývá, že AgNP jsou pro ryby méně toxické než AgNO₃ a při zohlednění environmentálních koncentrací v současné době nepředstavují akutní riziko narušení zdraví ryb.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU 203/2017/FVHE.

Literatura

BILBERG, K.; HOVGAARD, M. B.; BESENBACHER, F.; BAATRUP, E. In vivo toxicity of silver nanoparticles and silver ions in zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Toxicology*. 2012, vol. 2012, s. 1-9.

GRIFFITT, R.J.; LUO, J.; GAO, J.; BONZONGO, J.C.; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, vol. 27, no. 9, s.1972-1978.

KATULI, K. K.; MASSARSKY, A.; HADADI, A.; POURMEHRAN, Z. Silver nanoparticles inhibit the gill Na⁺/K⁺-ATPase and erythrocyte AChE activities and induce the stress response in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2014, vol. 106, 173-180.

MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environmental Science and Technology*. 2008, vol. 42, no. 12, s.4447-4453.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 years of nanosilver history: implications for policy makers. *Environmental Science & Technology*. 2011, vol. 45, no. 4, s. 1177-1183.

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

Vliv antidepresiva venlafaxine na genovou expresi biotransformačních enzymů embryí *Danio rerio*

The effect of antidepressant venlafaxine on gene expression of biotransformation enzymes in *Danio rerio* embryos

^{1,2}Hodkovicová Nikola, ¹Sehonová Pavla, ¹Blahová Jana, ²Faldyna Martin,
¹Dobšíková Radka, ¹Svobodová Zdeňka

¹ Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

² Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Summary

Zebrafish (*Danio rerio*) embryos in different stages of development were used for assessment of venlafaxine antidepressant impact on non-target organisms. Two different concentrations of venlafaxine were chosen, the 300 ng/l representing the environmental concentrations (low) and the 30 µg/l as 100x higher (high) concentration for evaluation of dose depending effect. For the gene expression, genes *CYP1A*, *CYP3A65*, *GST* and *PXR* gene and two multidrug resistance proteins coded by genes *ABCC1* and *ABCB4* gene were selected, each of them representing one of the phase zero to III of biotransformation. The results of assay showed that the impact of venlafaxine on the zebrafish embryos is the most evident in the time of hatching (96 hours post fertilization). In this time, the results of gene expression showed increase in mRNA amount of *ABCB4* and *GST* in both concentrations of venlafaxine. The *CYP1A*, *CYP3A65*, *ABCC1* and *PXR* gene revealed increase in high concentration of venlafaxine; in contrast, the low concentration for these genes revealed the decrease in mRNA amount. The second increase in gene expression was observed in 144 hours post fertilization for both concentrations of venlafaxine and all genes. The study showed that venlafaxine can affect the gene expression of biotransformation enzymes of *Danio rerio* embryos already in environmental concentration.

Keywords: *ABCB4*; *CYP1A*; *GST*; *ABCC1*; *PXR*; *CYP3A65*; fish

Úvod

Narůstající spotřeba antidepresiv ve světě a jejich nedostatečné přečištění na čističkách odpadních vod vede k nárůstu jejich koncentrací v povrchových vodách, které se poté pohybují v rozmezí ng - µg/l (Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013). I tato malá množství mohou mít negativní dopad na necílové organismy ve vodách. Jako modelový organismus pro naši studii jsme zvolili zástupce čeledi kaprovitých *Danio rerio*. Použita byla embrya tohoto organismu, která byla sledována ve třech časových intervalech – 24, 96 a 144 hodin po fertilizaci (hpf). Látkou, jejíž dopad na embrya se testoval, bylo antidepresivum venlafaxine, kterému byla embrya vystavena ve dvou koncentracích. První koncentrace 300 ng/l (low) byla stanovena podle výsledků zahraničních studií jako odpovídající průměrným environmentálním koncentracím v povrchových vodách (Santos et al., 2010; Baker and Kasprzyk-Hordern, 2013). Druhá koncentrace (high) byla stanovena jako 100x vyšší, tedy 30 µg/l, pro zhodnocení vlivu dávky venlafaxinu na genovou expresi embryí.

Venlafaxine je duální antidepresivum patřící mezi inhibitory zpětného vychytávání serotoninu a norepinefrinu (serotonin norepinephrine reuptake inhibitors, SNRI). V humánní medicíně je využíván k léčbě depresí, generalizovaných úzkostných poruch, sociálních fobií, posttraumatických stresových poruch a dalších nemocí (Olver et al., 2004).

Cílem našeho pokusu bylo zhodnocení vlivu tohoto antidepresiva na činnost biotransformačních enzymů organismu *Danio rerio*. Jako vhodný ukazatel pro posouzení této činnosti byla vybrána metoda genové exprese stanovená za pomoci real-time kvantitativní

PCR analýzy (RT qPCR). Geny, které byly vybrány pro tuto studii, představují vždy zástupce pro jednu z fází biotransformace xenobiotik (0 – III. fáze).

Materiál a metody

Pokus byl proveden v souladu s metodikou OECD 236 (OECD, 2013). Celkový počet 1200 ks embryí byl rozdělen do tří skupin. První testovaná skupina (400 ks) byla vystavena low koncentraci, druhá high koncentraci venlafaxinu a třetí sloužila jako skupina kontrolní a byla vystavena pouze vodě připravené dle ISO 7346 (ISO, 1996). Po 24 hpf bylo z embryí vystavených stejné koncentraci naváženo celkem 8 vzorků (každý 10 mg embryí). Tento postup byl opakován v čase 96 hpf a 144 hpf a vždy pro všechny tři sledované koncentrace (včetně kontroly). Takto vzniklo osm replikátů pro každý čas a každou koncentraci. Pro ověření, že koncentrace venlafaxinu ve vodě během pokusu neklesla, byla použita metoda vysoce účinné kapalinové chromatografie v kombinaci s tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Vzorky embryí byly zhomogenizovány a byla provedena RNA extrakce za použití RNeasy Mini kit dle metodiky výrobce (Qiagen, Německo). Jako negativní kontrola případné kontaminace vzorků byla použita DNase/RNase free voda s master mixem. Následně byla provedena reverzní transkripce vzorků do cDNA (při 37°C po dobu 1,5 hodiny). Jako house-keeping gen byl vybrán EF1A1, vůči kterému se stanovovala relativní genová exprese genů ABCB4, CYP1A a CYP3A65, GST a ABCC1. Efektivita použitých primerů se pohybovala mezi 90 a 110 %. Jako master mix pro RT qPCR byl použit SYBR Green Master (Qiagen, Německo); analýza dat byla provedena na přístroji LightCycler® 480 (Roche, Německo).

Statická analýza výsledků byla vyhodnocena za pomoci programu Unistat 5.6 Excel s použitím Shapiro-Wilkova testu normality. Následně bylo provedeno mnohonásobné porovnání koncentrací (kontrola, low, high) a časů (24, 96 a 144 hpf) za použití testu ANOVA; rozdíl výsledků byl označen jako signifikantní při $p < 0,05$.

Výsledky

Výsledky pro fázi 0 biotransformace xenobiotik (gen ABCB4) poukázaly na signifikantní nárůst množství mRNA v čase 96 hpf u všech koncentrací včetně kontroly. Pro biotransformační fázi I byly vybrány dva geny (gen CYP1A a CYP3A65) zastupující cytochrom P450. Pro gen CYP1A byl sledován nárůst v high koncentraci pro čas 144 hpf; pro gen CYP3A65 byl pozorován nárůst mRNA v čase 96 a 144 hpf pro kontrolní a high koncentraci. U low koncentrace byl naopak pozorován pokles mRNA v čase 96 hpf a poté nárůst mRNA v čase 144 hpf. Fáze II (gen GST) vykazala nárůst pro kontrolu v množství mRNA v čase 96 hpf a naopak pokles mRNA v 144 hpf; pro low a high koncentraci byl pozorován nárůst mRNA v čase 96 hpf a znovu v čase 144 hpf. Fáze III (gen ABCC1) ukázala nárůst genové exprese v čase 96 hpf pro kontrolní skupinu.

Diskuse

Vodní organismy jsou v průběhu svého života vystavovány vlivu různých xenobiotik, které se vyskytují v povrchových vodách a mohou pronikat do buněk těchto organismů a negativně ovlivnit činnost jejich vnitřních systémů. Jakmile dojde k průniku xenobiotika do organismu, nastartuje se biotransformační mechanismus s cílem zamezit nežádoucím účinkům této látky (van der Oost et al., 2003).

Shrnutím výsledků genové exprese biotransformačních enzymů jsme objevili určité podobnosti. Bez ohledu na významnost výsledků, v čase 96 hpf jsme zjistili nárůst mRNA pro všechny kontrolní a high skupiny, pro low koncentraci byl tento nárůst pozorován jen u genů ABCB4 a GST, naopak u ostatních genů byl pozorován pokles v množství mRNA. Čas 96 hpf

je, podle vývoje embryí *Danio rerio*, časem tzv. hatchingu (vykulení) – tedy čas, kdy se embryo poprvé setkává s okolním prostředím, a tak i s xenobiotiky. To je pravděpodobně důvodem, proč sledujeme nárůst množství mRNA – činnost biotransformačních enzymů je v tomto čase pravděpodobně nejvyšší s cílem zabránit průnikům xenobiotik do buňky.

Také v čase 144 hpf byl pozorován podobný trend. V kontrolních skupinách všech genů (kromě CYP3A65) došlo k poklesu množství mRNA v porovnání s časem 96 hpf. Naopak, pro low a high koncentraci došlo u všech genů k nárůstu mRNA. Čas 144 hpf je časem, kdy je embryo plně vystaveno okolnímu prostředí, ale stále je vyživováno ze žloutkového vajíčka. V čase 144 hpf je však tento vajíček vstřebán a embryo začíná přijímat potravu z okolí, jedná se tedy o druhé nejvíce rizikové období života embrya.

Environmentální koncentrace venlafaxinu způsobuje stres pro embrya a tak dochází k inhibici funkce biotransformačních enzymů v čase 96 hpf u všech testovaných genů (kromě ABCB4 a GST). V čase 144 hpf je tato činnost obnovena a genová exprese opět vzrůstá pro low koncentraci. Naopak, pokud jsou embrya vystavena koncentraci 100x vyšší než je environmentální, dochází k nárůstu genové exprese v čase 96 hpf a poté znovu 144 hpf. To pravděpodobně znamená, že činnost enzymů je touto vysokou koncentrací stimulována.

Závěr

Výsledky tohoto pokusu reportují vliv antidepresiva venlafaxine na embrya *Danio rerio*. Dopad na činnost biotransformačních enzymů tohoto organismu je evidentní již při environmentálních koncentracích. Největší efekt je viditelný v čase 96 hpf a 144 hpf; nárůst genové exprese, a tak i zvýšená činnost biotransformačních enzymů, koreluje s dávkou testovaného antidepresiva.

Poděkování

Tato studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU 202/2017/FVHE.

Literatura

BAKER, D. R., KASPRZYK-HORDERN, B. Spatial and temporal occurrence of pharmaceuticals and illicit drugs in the aqueous environment and during wastewater treatment: New developments. *Sci. Total Environ.*, 2013, vol. 454-455, 442 – 456.

ISO, (1996). ISO 7346 – Water Quality –Determination of the Acute Lethal Toxicity of Substances to a Freshwater Fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (*Teleostei, Cyprinidae*)] – Part 1: Static method; Part 2 – Semi-Static Method. 11.

OECD, 2015. *Health at a Glance 2015: OECD Indicators*, OECD Publishing, Paris. http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2015-en

OLVER, J. S., BURROWS, G. D., NORMAN, T. R. The treatment of depression with different formulations of venlafaxine: a comparative analysis. *Human. Psychopharmacol.*, 2004, vol. 19, 9 – 16.

SANTOS, L. H. M. L. M., ARAÚJO, A. N., FACHINI, A., PENA, A., DELERUE-MATOS, C., MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *J. Hazard. Mater.*, 2010, vol. 175, 45 – 95.

Kontaktní adresa: Nikola Hodkovicová, MVDr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1. 612 42 Brno, H16015@vfu.cz.

The effect of sulfamethoxazole on oxidative stress indices in zebrafish (*Danio rerio*)

**Tokanová Nina, Doubková Veronika, Svobodová Zdeňka, Blahová Jana, Maršálek Petr,
Dobšíková Radka**

*Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

Summary

*The aim of our study was to assess the impact of sulfamethoxazole (SMX) on oxidative stress indices in zebrafish (*Danio rerio*). The test was completed after 14 days. The tested concentrations were 50, 100, and 500 µg/L of SMX. SMX, belonging to the group of sulfonamides, is currently the most used (in combination with trimethoprim) sulfonamide chemotherapeutics. Glutathione peroxidase, glutathione reductase, glutathione S-transferase, and lipid peroxidation were investigated to determine the effects of SMX on oxidative stress in zebrafish.*

The results of our study showed that lipid peroxidation slightly gradually (but nonsignificantly) increased in all tested concentrations compared to control during the test. The gradual increase in lipid peroxidation in the test groups after 3 and 14 days exposition compared to the control group indicates increasing cell membrane damage. The evaluation of oxidative stress biomarkers showed no significant changes in the activity of antioxidant enzymes in any experimental group exposed to SMX compared to the control.

Keywords: *fish; antioxidant enzymes; TBARS; antibiotics*

Introduction

Sulfamethoxazole (SMX), belonging to the group of sulfonamides, is currently prescribed to treat urinary infections in human medicine, and is also used in veterinary practice, aquaculture and livestock breeding for treating diseases (Drillia et al., 2005). Many recent studies have reported the ubiquitous occurrence of antibiotics in aqueous matrices, including water at wastewater treatment plants (WWTPs), groundwater, surface water and sediment (Gao et al., 2012; Managaki et al., 2007; Poirier-Larabie et al., 2016). Monitoring study has shown that sulfonamides have been frequently detected in surface water and wastewater at concentrations ranging from 8.4 ng/L to 211 µg/L in China (Zhao et al., 2015). However, knowledge of their fate and ecotoxicological effects on aquatic organisms have not yet been understood.

The aim of our study was to assess potential impacts of SMX on biotransformation and oxidative stress in order to determine the potential risk of SMX for fish in surface waters. Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST) and lipid peroxidation were investigated to determine the effects of SMX on oxidative stress in *Danio rerio*.

Material and Methods

Adult zebrafish (*Danio rerio*) at the age of 3 months were obtained from a commercial fish farm (Mendel University in Brno; Department of Zoology, Fisheries, Hydrobiology and Apiculture). The total number of fish used in the experiment was 144. The fish were divided into 4 groups of 36 individuals. Each of the groups was then further split into two separate aquariums (volume 30 L) in order to create duplicates. The fish were exposed to SMX (Sigma–Aldrich, Czech Republic; analytical standard at concentrations of 50, 100 and 500 µg/L for a period of 14 days. A stock solution of SMX was prepared every second day by dissolving SMX in distilled water and stored at 4 °C. Because of the low solubility of SMX in water, dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma–Aldrich, Czech Republic) was used as a solvent

when preparing the target concentrations. The concentration of solvent was 0.05% in both control and experimental groups. The experiment was conducted in a flow-through system where the test solutions in stock aquaria were changed twice a day. Samples for oxidative stress indices evaluation were taken on day 3 and day 14, ten samples from each exposed group and from the control. Fish were euthanized with the approved anesthetic MS-222 (250 mg/L; tricaine methanesulfonate, Sigma–Aldrich, Czech Republic). The whole wet body weight and the total body length of each fish were recorded. Samples taken for the evaluation of oxidative stress indices were immediately frozen and stored at $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

Determination of individual parameters of oxidative stress was performed in whole-body homogenate. The catalytic concentration of antioxidant enzymes is determined spectrophotometrically. The TBARS test (thiobarbituric acid reactive substances) is used to determine lipid peroxidation. The method is based on the determination of color adducts produced by reactions of lipid peroxidation products with thiobarbituric acid, which are measured spectrophotometrically (Livingstone et al., 1990).

Results and Discussion

The fish mortality was found to be less than 4% in all experiment groups. In the control group, mortality did not exceed 1% which is in agreement with the validation criteria of the juvenile growth test. At the end of the subchronic toxicity test, the fish were weighed and their length was measured. Zebrafish weight and length were not affected by two-week exposure to SMX in any experimental groups as compared to the control $P < 0.05$. No significant changes in the catalytic activity of GR, GST and GPx were found in any experimental group exposed to SMX as compared to the control. On the first and second sampling days, we found a gradual increase in lipid peroxidation in each experimental group exposed to SMX. A gradual non-significant increase in lipid peroxidation showed that SMX can cause lipid peroxidation. The lipid peroxidation increased slightly with the increasing concentration of the test substance. The content of TBARS increased slightly at all tested concentrations as compared to the control. No significant shift was determined in the TBARS parameter (Fig. 1).

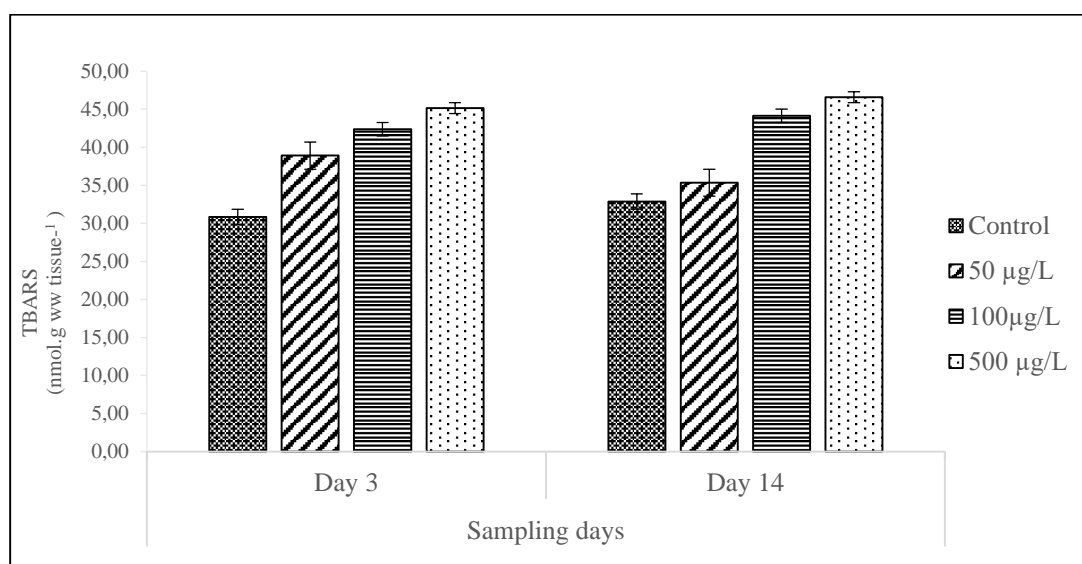


Fig. 1: Concentration of TBARS in zebrafish exposed to SMX (mean \pm SEM).

Conclusion

SMX is a ubiquitous contaminant of surface waters and has no acute toxicity in fish. We did not notice changes in the catalytic concentration of selected antioxidant enzymes in any experimental group exposed to SMX as compared to the control in the results of our study. However, this study found that SMX, at environmentally relevant concentrations, can affect the lipid peroxidation of adult zebrafish in a moderate manner demonstrating a potentially adverse effect of SMX during subchronic exposure in fish.

References

- DRILLIA, P.; DOKIANAKIS, S. N.; FOUNTOULAKIS, M. S.; KORNAROS, M.; STAMATELATOU, K.; LYBERATOS, G. On the occasional biodegradation of pharmaceuticals in the activated sludge process: The example of the antibiotic sulfamethoxazole. *Journal of Hazardous Materials*, 2005, 122(3), 259-265.
- GAO, L.; SHI, Y.; LI, W., LIU, J.; & CAI, Y. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Haihe River in China. *Journal of Environmental Monitoring*, 2012, 14(4), 1247-1254.
- LIVINGSTONE, D.; MARTINEZ, P.G.; MICHEL, X.; NARBONNE, J.F.; O'HARA, S.; RIBERA, D.; WINSTON, G.W. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology*. 1990, s.415-424.
- MANAGAKI, S.; MURATA, A.; TAKADA, H.; TUYEN, B. C.; & CHIEM, N. H. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(23), 8004-8010.
- POIRIER-LARABIE, S.; SEGURA, P. A.; & GAGNON, C. Degradation of the pharmaceuticals diclofenac and sulfamethoxazole and their transformation products under controlled environmental conditions. *Science of the Total Environment*, 2016, 557, 257-267.
- ZHAO, H.; LIU, S.; CHEN, J.; JIANG, J.; XIE, Q.; & QUAN, X.. Biological uptake and depuration of sulfadiazine and sulfamethoxazole in common carp (*Cyprinus carpio*). *Chemosphere*, 2015, 120, 592-597.

Contact address: Nina Tokanová, MVDr., Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic, H14393@vfu.cz.

Vliv léčebných koupelí v roztoku formaldehydu na vybrané parametry u ryb

Effects of therapeutic baths in a formalin solution on selected indices in fish

¹Chmelová Lívia, ¹Svobodová Zdeňka, ²Tichý František

¹Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

² Ústav anatomie, histologie a embryologie, Fakulta veterinárního lékařství,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

OBJECTIVES: The aim of this study is to assess the effects of a treatment bath in a formalin solution on fish, focusing on haematological, biochemical and histopathological profiles.

METHODS: A total of 96 common carps (*Cyprinus carpio*) were randomly assigned to eight groups. Four experimental groups were placed in the test solution for 60 minutes. The concentration of the formalin bath was 0.17 ml/l (38% formaldehyde), with the water temperature of 20 °C. The effects of the bath were monitored immediately (E0) and 24 hours (E24h), 48 hours (E48h) and 10 days (E10d) after the bath. There was a control group (C0, C24h, C48h, C10d) for each of the experimental groups.

RESULTS: Histopathological indices were strongly affected. Extensive changes were found on gill and skin in each experimental group. Changes were also found in haematological and biochemical indices.

CONCLUSIONS: It can be concluded that after applying the treatment bath in the formalin solution, the monitored profiles were affected immediately after the bath and also after 10 days. Such significant impact of therapeutic formalin bath should be considered in treatment of fish.

Keywords: haematological profile; biochemical profile; histopathological profile; *Cyprinus carpio*

Úvod

Formalín (36-38% roztok formaldehydu) je jedna z nejúčinnějších a nejčastěji používaných látek v chovu ryb pro profylaxi a léčbu houbových infekcí a odstranění vnějších parazitů ryb a jiker. Je účinný proti většině prvoků a taky proti větším parazitům. Účinně zabíjí parazity na žábrech, kůži a ploutvích (Noga 2000). Používá se v koncentraci od 0,17 do 0,25 ml / l, v závislosti na teplotě vody. Doba koupele je 30-60 minut (Svobodová et al. 2007).

Formaldehyd byl klasifikován jako karcinogen. Testy na zvířatech ukázaly potenciální neurotoxicitu (Pitten et al., 2000). Smith a Piper (1972) pozorovali hematologické a histopatologické změny u pstruha duhového po vystavení formalínu, při 8 týdenním testu na kaprovi obecném redukoval formalín růst plůdku kapra obecného (Chinabut et al. 1988).

Cílem této studie bylo zhodnotit účinky léčebné koupele v roztoku formaldehydu na hematologické, biochemické a histopatologické ukazatele u ryb. Při pokusu byl použit kapr obecný (*C. carpio*), jako vhodný modelový organismus pro zkoumání bezpečnosti léčiv.

Materiál a metody

K experimentu byl použit dvouletý kapr obecný z komerčního chovu, aklimatizován 14 dnů. Kontrola okysličení, pH a teploty probíhala každých 12 hodin. Po aklimatizaci bylo 96 kaprů náhodně rozděleno do 8 skupin. Koupel byla provedena ve vodě s přidáním formalínu (38% formaldehyd) v koncentraci 0,17ml/l a trvala 60 minut. Teplota vody byla 20°C.

První skupina byla testována ihned po koupeli (E0), další skupiny byly testovány 24 hodin (E24h), 48 hodin (E48h) and 10 dní (E10d) po koupeli. Ke každé experimentální skupině byla

přiřazena kontrolní skupina bez vystavení testované látky (C0, C24h, C48h, C10d). Po koupeli byly ryby přeloženy do semi-statického systému nádrží s dechlorovanou vodou o teplotě 19-22 °C; pH bylo mezi 7.9 až 8.4 a obsah kyslíku byl nad 60% saturace.

Ryby byly usmrceny tupým úderem do hlavy. Biometrické ukazatele (váha těla a jater) byly použity pro výpočet HSI indexu. Parazitologické vyšetření bylo zaměřeno primárně na žábry a kůži, před koupelí i po ní (ihned, 24 h, 48 h a 10 dní). Pro histopatologické vyšetření byly odebrány vzorky žaber, jater, kraniální a kaudální ledviny šesti ryb z každé skupiny. Krevní vzorky byly odebrány punkcí srdce. Heparinizované krevní vzorky byly použity na stanovení hematologických ukazatelů: RBC, Hb, PCV, MCV, (MCH), (WBC) a leukogram; vzorky plazmy byly použity pro vybrané biochemické ukazatele: ALB, TP, GLU, NH₃, TG, LACT, CHOL, ALP, ALT, AST, LDH, PHOS a vápníku.

Statistická analýza byla provedena pomocí statistického programu R. Hodnocení bylo provedeno mezi experimentální a kontrolní skupinou ve stejném čase. Rozdíly byly považovány za statisticky významné při $p < 0.05$.

Výsledky

Nebyl významný rozdíl u HSI mezi kontrolní a experimentální skupinou. Parazitologické vyšetření před koupelí ukázalo ojedinělý výskyt *Trichodina epizootica* na kůži a *Gyrodactylus sprostonae* na žábrech. Experimentální skupiny po koupeli měly ojedinělý výskyt parazitů, ale v kontrolních skupinách byl zaznamenán vzrůstající trend parazitární manifestace.

Hematologické vyšetření neukázalo významné rozdíly mezi kontrolními a experimentálními skupinami, začali se objevovat až po 10 dnech (E_{10d}) od léčby jako statisticky významné zvýšení RBC ($p < 0.01$), Hb a PCV ($p < 0.05$) a významný pokles bazofilů u bílých krvinek.

Biochemické vyšetření ukázalo významné snížení ($p < 0.001$) aktivity ALT a zvýšení ($p < 0.01$) amoniaku v experimentální skupině E_{48h}, glukózy ($p < 0.001$) a vápníku ($p < 0.001$) v experimentální skupině E_{10d} a rovněž zde byl trend ve zvýšení hladin laktátu ($p = 0.07$).

Histopatologické změny na žábrech a kůži byly výrazné, všechny experimentální skupiny měly na kůži početné mucinózní buňky. Ve skupinách E₀ a E₂₄ se vyskytla u žaber zánětlivě-nekrotická masa. U ostatních orgánů nebyl rozdíl mezi experimentální a kontrolní skupinou.

Diskuse

Po léčebné koupeli byl pozorován nižší výskyt parazitů. Efektivita této léčby byla prokázána již dříve pro *Trichodina* (Singhal et al. 1986) i *Gyrodactylus spp.* (Rahn et al 2015).

Hematologické parametry můžou být použity jako ukazatele fyziologického stresu u ryb po vystavení toxickým látkám. Wedemeyer and Yasutake (1974) a Kakuta et al (1991) zjistili, že vystavení *C. carpio*, *O. mykiss* a *O. tshawytscha* formaldehydu nezmenilo hladinu Hb, což koreluje s našimi výsledky u skupin E₀, E_{24h}, E_{48h}. Vysvětlením pro zvýšení červeného krevního obrazu u E_{10d} může být poškození žaber. Snížená hodnota bazofilů může být projevem alergické reakce na formaldehyd, jelikož jsou to buňky zodpovědné za mnoho biologických odpovědí organismu, jako jsou i alergické reakce (Huang et al. 2016).

Wedemeyer a Yasutake (1974) zjistili snížení chloridových iontů u pstruha duhového vystaveného formaldehydu, zvýšený vápník a cholesterol. V experimentální skupině E_{10d} byly zvýšené hodnoty vápníku, což může být způsobeno rozdílnou citlivostí mezi druhy. Zvýšená hodnota glukózy a stoupající trend u laktátu v této skupině je pravděpodobně výsledkem metabolických změn. V lidském organismu při hepatocelulárním poškození je ALT zvýšené, avšak s progresem fibrózy se snižuje (Kim et al. 2008). Podobný proces mohl způsobit i statisticky významné snížení ALT a zvýšení amoniaku ve skupině E_{48h}.

Naše pozorování histopatologických změn, hlavně na žábrech a kůži, koresponduje s nálezy Pahor-Filho et al. (2015) u *Mugil liza* po profylaktických koupelích s formaldehydem.

Závěr

Výsledky této studie ukazují, že léčebné koupele v roztoku formaldehydu ovlivní organismus *C. carpio* nejen ihned, ale i po 10 dnech, zejména co se týče histopatologických změn. Proto je důležité zvážit typ a použití léčebných koupelí s ohledem na zdravotní stav ryb.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno 225/2015/FVHE.

Literatura

Chinabut SC, Limsuwan C, Tonguthai K and Pungkachonboon T (1988). Toxic and sublethal effect of formalin on freshwater fishes. NACA/WP/88/73, network of Aquaculture Centres in AsiaPacific (NACA), Bangkok, Thailand, 200 p.

Huang L, Jiang P, Jianlin W, Hua Z, Jiye C, Ting L, et al. (2016): A rapid and sensitive assay based on particle analysis for cell degranulation detection in basophils and mast cells. *Pharmacological Research* 111, 374–383.

Kakuta L, Namba K, Uematsu K, Murachi S (1991). Physiological response of the formalin exposure – I. Effects of formalin on urine flow, heart rate, respiration. *Comparative Biochemistry and Physiology* 100C: 405–411.

Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM (2008). Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology* 47: 1363–1370.

Noga EJ (2000). *Fish Disease Diagnosis and Treatment*, Iowa State University Press, 563p.

Pahor-Filho E, Kleber Campos Filho M, Klosterhoff M, Romano LA, Percira J Jr. (2015). Histopathological and behaviour effects of formaldehyde treatment in juvenile mullet, *Mugil liza* (Valenciennes). *Aquaculture Research* 46: 3040–3045.

Pitten FA, Kramer A, Herrmann K, Bremer J, Koch S (2000). Formaldehyde neurotoxicity in animal experiments. *Pathology, Research and Practice* 196: 193–198.

Rahn AK, Hammer DA, Bakker TCM (2015). Experimental infection with the directly transmitted parasite *Gyrodactylus* influences shoaling behaviour in sticklebacks. *Animal Behaviour* 107: 253–261.

Singhal RN, Swam j, Davies RW (1986). Chemotherapy of six ectoparasitic diseases of cultured fish. *Aquaculture* 54: 165–171.

Smith CE, Piper RG (1972). Pathological effect in formalintreated rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29: 328–329.

Svobodová Z, Kolárová J, Navrátil S, Veselý T, Chloupek P, Tesarčík J, et al. (2007). Nemoci sladkovodních a akvariálních ryb. *Informativum*, 264 p (in Czech)

Wedemeyer G, Yasutake WT (1974). Stress of formalin treatment in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus kisutch*) and steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *Journal Fisheries Research Board of Canada* 31: 179–184.

Kontaktní adresa: Livia Chmelová, Mgr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H14394@vfu.cz.

SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat
zoologických zahrad*

Optimalizace testu blastické transformace lymfocytů u lososovitých ryb

Optimization of the lymphocyte transformation test in salmonid fish

^{1,2}Minářová Hana, ²Ondráčková Petra, ¹Palíková Miroslava, ¹Syrová Eva, ³Mareš Jan, ²Faldyna Martin

¹Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Oddělení imunologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

³ Ústav zoologie, rybářství, hydrobiologie a včelařství, Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Summary

The lymphocyte transformation test is a functional immunological assay commonly used in mammals, but in fish, there are some obstacles, making the optimization necessary (including determination of optimal samples, anticoagulants, mitogens and their concentration, serum type, temperature during incubation and its length). Samples obtained from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) included head kidney and blood collected using different anticoagulants (heparin, EDTA). The highest levels of cell proliferation were observed after 6–7 days of incubation. Peripheral blood lymphocytes showed the best results with pokeweed mitogen (50 µg/ml), while head kidney lymphocytes were most stimulated by phytohaemagglutinin (100 µg/ml). Compared with trout serum, FBS provided higher proliferation levels. Best results were obtained at 15 °C with peripheral blood lymphocytes, though only small differences were measured between different incubation temperatures with head kidney lymphocytes. Heparinized blood was proven to be an optimal sample, providing the best results. Optimization of this test improves possibilities for examining the health status of salmonid fish in trials as well as in practice.

Keywords: mitogen; thymidine; *Oncorhynchus mykiss*; lymphoblast; stimulation

Úvod

Vzhledem k celosvětovému rozvoji akvakultury a vzrůstající poptávce po rybím mase se zvyšují i požadavky na diagnostiku a prevenci chorob a chorobných stavů. Aplikovaných imunologických metod je mnoho, velice vhodné jsou však funkční testy, které nám zobrazí nejen aktuální stav složek imunitního systému, ale i jejich schopnost aktivně reagovat na podněty. Jedním z těchto testů je i test blastické transformace lymfocytů. Jeho principem je stimulace pomocí mitogenů, čímž dochází k přeměně lymfocytů na lymfoblasty (Scapigliati, 2013). Mitogeny selektivně stimulují T-buňky (PHA, ConA), B-buňky (LPS) nebo oba typy lymfocytů (PWM) (Kehrer *et al.*, 1998). Tento test může sloužit jako ukazatel reakce organismu ryb na negativní faktory (Ottinger *et al.*, 2014) či na profylaktické a terapeutické zásahy v chovu. Je tedy například možné pozorovat sníženou proliferaci lymfocytů v případě imunosuprese. Mezi jednotlivými druhy ryb (a často také mezi individuálními rybami) však nacházíme výrazné rozdíly, což je nutné během diagnostiky zohlednit. Metodika se mezi jednotlivými autory liší – je třeba zjistit optimální typ vzorku, séra, vhodné mitogeny a jejich koncentraci, délku inkubace, inkubační teplotu a další parametry.

Materiál a metody

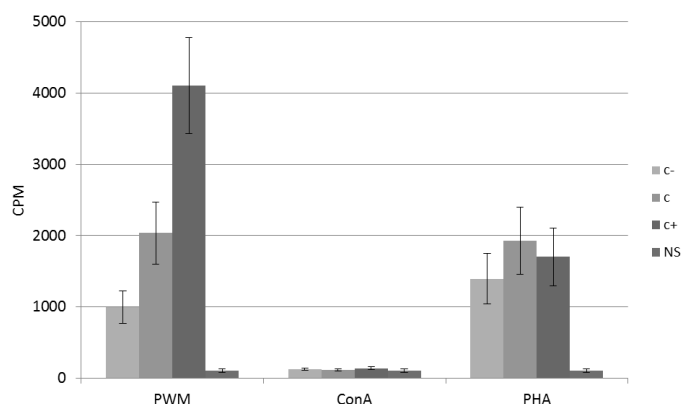
Pstruzi duhová (*Oncorhynchus mykiss*) o průměrné hmotnosti $194,77 \pm 68,44$ g a celkové délce $24,14 \pm 2,64$ cm byli odchováni ve třech nádržích o objemu 1000 litrů a jedné nádrži o objemu 1270 l (Mendelova univerzita v Brně). Voda byla nasycena kyslíkem na průměrnou hodnotu 8,11 mg/l (tj. 87,1 %), průměrná teplota byla 17,6 °C, pH 7,10, N-NH₄⁺ 0,36 mg/l a Cl⁻ 140,40 mg/l. Byl použit biofiltr Nexus 310 a UV-C lampa. Ryby byly krmeny dvakrát denně krmivem BioMar EFICO Enviro 920 (standardní extrudované krmivo pro chov lososovitých ryb).

Odebrané vzorky zahrnovaly hlavovou ledvinu a krev odebranou z ocasní žíly za použití různých antikoagulantů (heparin, EDTA). Ledviny byly nastříhány, mechanicky protlačeny sítkem (monofil) a dvakrát propláchnuty odstředěním v PBS (fosfátový pufr; 10 min, 450 g). Krev byla naředěna médiem RPMI-1640 v poměru 1:2 (s tímto ředěním byly zaznamenány nejlepší výsledky). Mononukleární buňky byly následně izolovány centrifugací na denzitním gradientu (Histopaque 1077 g/ml; 40 min, 800 g). Nad denzitním médiem se po odstředění oddělil prstenec buněk (lymfocyty a malé množství monocytů), které byly odebrány a několikrát propláchnuty dalším odstředěním v PBS (10 min, 450 g), spočítány (Mindray) a resuspendovány v kultivačním médiu (L-15) na požadovanou koncentraci (2×10^5 buněk/jamku).

Buněčná suspenze (180 μ l) byla společně s inaktivovaným sérem (20 μ l; FBS/pstruží sérum) a příslušným mitogenem (20 μ l) napipetována v triplicátech do 96-jamkové mikrotitrační destičky. Použité mitogeny zahrnovaly PWM (pokeweed mitogen; 5, 10 a 50 μ g/ml), ConA (konkanavalin A; 1, 10 a 20 μ g/ml), PHA (fytohemaglutinin; 25, 50 a 100 μ g/ml) a LPS (lipopolysacharid; 1, 50 a 100 μ g/ml). Po uplynutí inkubační doby (2–8 dnů, 10–20 °C) byl do jamek přidán thymidin značený radioaktivním izotopem vodíku (3 H), který byl zakomponován do nově vznikající DNA, a za dalších 20 h byly buňky sklizeny pomocí harvesteru (Packard) na filtrační papír. Po aplikaci scintilačního roztoku jsme pomocí přístroje pro kapalnou scintilaci (Packard) získali výsledky v podobě CPM (počty záblesků za minutu).

Výsledky

Nejvyšší hodnoty proliferace byly pozorovány po 6 dnech inkubace s lymfocyty periferní krve (= PBL) a 7 dnech inkubace s lymfocyty hlavové ledviny (= HKL). U PBL byly naměřeny nejlepší výsledky s PWM (50 μ g/ml), zatímco HKL byly lépe stimulovány PHA (100 μ g/ml) než ostatními mitogeny (rozdíly však nebyly příliš výrazné, v dalším experimentu navíc byly u HKL zjištěny nejlepší výsledky za použití PWM 10 μ g/ml). Nejnížší hodnoty byly zaznamenány s ConA (Graf 1). V důsledku nedostatečného množství izolovaných buněk bylo nutné provést experiment s LPS samostatně. Podobně jako u heparinované krve byla krev odebraná za použití EDTA dobře stimulována PWM (50 μ g/ml), stimulace PHA (100 μ g/ml) však neměla na buňky žádný efekt. Stimulaci buněk jsme zaznamenali pouze s FBS (fetální bovinní sérum). Nejlepší výsledky byly u PBL získány při teplotě 15 °C, u HKL byly naměřeny méně výrazné rozdíly mezi inkubačními teplotami. Optimálním vzorkem byla heparinovaná krev, která poskytovala nejlepší výsledky.



Graf 1: Mitogeny – standardní (c), nižší (c-) a vyšší (c+) koncentrace (PBL-heparin, 7 dnů, 15 °C, FBS; n = 8). NS = nestimulované buňky.

Diskuze

Metoda byla úspěšně optimalizována, nálezy jiných autorů se však při stimulaci různými mitogeny výrazně liší (Chilmonczyk 1978; Tillitt *et al.*, 1988; Agbede *et al.*, 2005). Navzdory opačným zkušenostem některých autorů (DeKoning *et al.*, 1991) jsme stimulaci buněk zaznamenali pouze s FBS. Inkubační doba bývá v jiných studiích kratší (Harford *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2009), při delší inkubaci jsme však pozorovali výrazně vyšší hodnoty proliferace. Tyto rozdíly mohou být způsobeny odlišnými laboratorními postupy a podmínkami.

Závěr

Optimálním vzorkem pro test blastické transformace byla v našem experimentu heparinizovaná krev. Při manipulaci s rybími buňkami je zásadní dodržování správné teploty a je také třeba vzít v úvahu přirozenou variabilitu. Tento test byl optimalizován a bude využit v dalším výzkumu i v praxi k vyšetření zdravotního stavu lososovitých ryb.

Poděkování

Tato práce byla financovaná grantem IGA VFU Brno 216/2017/FVHE. Projekt byl řešen v návaznosti na projekt MZe NAZV QJ 1510077.

Literatura

AGBEDE, S.A.; ADEDEJI, O.B.; ADEYEMO, O.K. PROLIFERATIVE RESPONSES OF TILAPIA T-LIKE LYMPHOCYTES TO STIMULATION BY CONCAVALIN A. *AFRICAN JOURNAL OF BIOMEDICAL RESEARCH*. 2005, VOL. 8, S. 151–155.

CHILMONCZYK, S. IN VITRO STIMULATION BY MITOGENS OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES FROM RAINBOW TROUT (*SALMO GAIRDNERI*). *ANNALES D'IMMUNOLOGIE*. 1978, VOL. 129, NO. 1, S. 3–12.

DEKONING, J.J.; KAATTARI, S.L. Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*. 1991, vol. 27, s. 381–386.

HARFORD, A.J.; O'HALLORAN, K.; WRIGHT, P.F.A. Effect of *in vitro* and *in vivo* exposures on the immune functions of Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*). *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2007, vol. 26, no. 8, s. 1649–1656.

KEHRER, S.R.; HANNAN, C.M.; RAISON, R.L. Identification of a subpopulation of leucocytes from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) responsive to pokeweed mitogen. *Fish & Shellfish Immunology*. 1998, vol. 8, s. 477–487.

MÜLLER, C.; RUBY, S.; BROUSSEAU, P.; CYR, D.; FOURNIER, M.; GAGNÉ, F. Immunotoxicological effects of an activated-sludge-treated effluent on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 2009, vol. 150, no. 3, s. 390–394.

OTTINGER, C.A.; HONEYFIELD, D.C.; DENSMORE, C.L.; IWANOWICZ, L.R. *In vitro* immune functions in thiamine-replete and -depleted lake trout (*Salvelinus namaycush*). *Fish & Shellfish Immunology*. 2014, vol. 38, s. 211–220.

SCAPIGLIATI, G. Functional aspects of fish lymphocytes. *Developmental and Comparative Immunology*. 2013, vol. 41, s. 200–208.

TILLITT, D.E.; GIESY, J.P.; FROMM, P.O. In vitro mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Comparative Biochemistry and Physiology*. 1988, vol. 89, no. 1, s. 25–35.

Kontaktní adresa: Hana Minářová, MVDr., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, minarova@vri.cz.

Vývoj postupu tlumení nálezů ryb podle aktuálně platné legislativy Development of process of control of diseases in fish in accordance with valid law

^{1,2}Filášová Lucie, ²Palíková Miroslava

¹ Krajská veterinární správa SVS pro Jihočeský kraj

² Ústav ekologie a chorob zvířet, ryb a včel, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Council Directive 2006/88/EC on animal health requirements for aquaculture animals and products thereof, and on the prevention and control of certain diseases in aquatic animals is basic EU law in the field of aquatic animals diseases. Other act in this field, Commission Implementing Decision (EU) 2015/1554 laying down rules for the application of Directive 2006/88/EC as regards requirements for surveillance and diagnostic methods, is valid from April 2016. EU law mentioned above was made mainly for control of listed diseases in industry ranges (large off-shore based salmon farms or small inland trout farms), ponds for the production of carp were not take into account. For this reason EU law causes serious disturbances for the extensive production of common carp in the case of outbreak of the listed diseases.

Keywords: diseases in aquatic animals; minimum preventive measures; aquaculture

Úvod

Základním právním předpisem upravujícím oblast akvakultur z hlediska nálezů ryb a jejich tlumení je směrnice Rady 2006/88/ES ze dne 24. října 2006 o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a produkty akvakultury a o prevenci a tlumení některých nálezů vodních živočichů implementovaná do české legislativy jako vyhláška č. 290/2008 Sb., o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdoávání některých nálezů vodních živočichů. Postup při podezření z výskytu nebezpečné nákazy a následně likvidaci jejich ohnisek upřesňuje prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2015/1554, kterým se stanoví prováděcí pravidla ke směrnici 2006/88/ES, pokud jde o požadavky na metody dozoru a diagnostické metody, který byl zohledněn v případech výskytu a likvidace ohnisek nebezpečných nálezů ryb od nabytí účinnosti dne 01.04.2016. Všechna opatření uvedená v těchto právních předpisech se vztahují na nález ze seznamu, který je uveden v části II přílohy č. 3 k vyhlášce č. 290/2008 Sb. Nález ze seznamu jsou rozděleny na exotické nález a neexotické nález, přičemž v souladu s platným zněním se řadí mezi exotické nález ryb epizootická nekroza krvinek (EHN) a mezi neexotické nález ryb dále virová hemoragická septikémie (VHS), infekční nekroza krvinek (IHN), herpesviróza koi (KHV) a nakažlivá chudokrevnost lososů (ISA).

Materiál a metody

Odběr vzorků se v rámci cíleného dozoru provádí v rozsahu určeném Metodikou kontroly zdraví a nařízené vakcinace, která je vydávána každoročně Ministerstvem zemědělství. Vzorky na nález VHS a IHN se odebírají dvakrát ročně ve věku kategorie plůdek až do stáří 18 měsíců (teplota vody při odběru musí být méně nebo rovna 14°C). Vzorek se skládá ze 30 kusů ryb (zasílány do laboratoře živé) nebo z ovariální tekutiny od 30 kusů generačních ryb. Při laboratorním vyšetření ryb se vyšetřují 3 směsné vzorky, kdy jeden směsný vzorek je tvořen 10 dílčími vzorky orgánů ryb nebo ovariální tekutiny. Všechny 3 směsné vzorky se dvakrát pasážují na dvou buněčných liniích. V případě pozitivního cytopatického efektu na

buněčných liniích se vzorky homogenátu zasílají ke confirmaci do NRL pro virové choroby ryb a jsou došetřeny přednostně přímým průkazem viru prostřednictvím metody PCR. KHV se vyšetřuje v době teplotního optima 15-26°C pro působení viru. Odebírá se 30 kusů ryb (zasílány do laboratoře živé), přednostně kategorie K₂, případně kategorie K₁. Při laboratorním vyšetření se vytvoří 1 směsný vzorek z 5 kusů ryb, celkem tedy 6 směsných vzorků, které jsou vyšetřeny metodou dvoukolové PCR. V případě podezření na nákazu se v souladu s legislativou podezřelé hospodářství podrobí jednomu odběru vzorků 10 ryb, jsou-li pozorovány klinické příznaky odpovídající infekci VHS/IHN nebo KHV a minimálně 30 ryb, nejsou-li pozorovány klinické příznaky (podezření na základě epizootologického šetření apod.). Nejvhodnější diagnostickou metodu v souladu s legislativou zvolí Národní referenční laboratoř pro virové choroby ryb.

K opětovnému získání statusu nedefinovanému musí být v případě potvrzení nákazy splněny minimálně následující podmínky:

1. minimální opatření pro tlumení nákazy v souladu se směrnicí 2008/66/ES a prováděcím rozhodnutím Komise (EU) 2015/1554 (příloha I),
2. vytvoření uzavřené oblasti sestávající se z ochranného pásma a pásma dozoru na základě epizootologického šetření, v úvahu se berou nejdůležitější faktory epizootologického významu,
3. provedení šetření v hospodářství s chovem vnímavých ryb v ochranném pásmu a odběr vzorků,
4. vyklizení, vyčistění, vydezinfikování a ponechání ohniska ladem.

Výsledky

V České republice došlo k potvrzení všech tří nákaz ryb KHV, VHS a IHN, ve dvou případech v roce 2014 byla zjištěna podvojná infekce VHS a IHN (viz tabulka 1).

Tabulka 1: Výskyt nebezpečných nákaz ryb (zdroj IS SVS).

Rok/nákaza	KHV	VHS	IHN
2010	1	2	1
2011	1*	2	1
2012	0	0	0
2013	1**	5	0
2014	0	12	4
2015	0	1	0
2016	2	3	0
2017	2	0	0

* = koi kapr dovezený z Thajska; ** = celkem 29 koi kaprů v soukromém zahradním jezírku

V roce 2016 byla likvidována 2 ohniska nákazy KHV a 2 ohniska nákazy VHS v souladu s prováděcím rozhodnutím Komise (EU) 2015/1554. Na počátku roku 2016 bylo v Jihočeském kraji řešeno další ohnisko nákazy VHS v režimu před platností výše zmíněného prováděcího rozhodnutí. Ohniska KHV se nacházela v Jihočeském kraji, přičemž druhé ohnisko vzniklo na základě prošetřování ochranného pásma kolem původního ohniska nákazy. Pokud jde o ohniska VHS, jedno ohnisko bylo řešeno v malém, pouze registrovaném chovu v Jihočeském kraji po manifestaci klinických příznaků nákazy (na základě epizootologického šetření sekundární ohnisko vzniklé zavlečením nemocných ryb z ohniska před platností rozhodnutí Komise), druhé ohnisko se potvrdilo v Kraji Vysočina, kdy uzavřené pásmo zasahovalo na území Jihočeského kraje. V roce 2017 byla řešena 2 ohniska KHV a 1 kontaktní hospodářství. V jednom případě ve Zlínském kraji bylo využito možnosti ponechat chov jako zamořený bez likvidace ohniska, v druhém případě v Jihočeském kraji byla jako v roce 2016 utracena

veškerá obsádka 3 rybníků, přičemž jeden z rybníků byl utracen z důvodu prohlášení za kontaktní hospodářství (nacházel na soustavě mezi 2 rybníky, kde byla potvrzena nákaza KHV). V tomto případě došlo oproti roku 2016 k podstatným změnám při určování rozsahu ochranného pásma, kdy toto pásmo bylo značně zredukováno. Naopak pásmo dozoru bylo oproti postupu v roce 2016 rozšířeno.

Diskuse

Vzhledem k tomu, že legislativa k tlumení nákaz ryb byla navržena s předpokladem tlumení nákaz v nádržích, nikoliv rybníčních systémech, problém nastává převážně u řešení ohnisek nákazy KHV. Problém již nastává při určování ohniska nákazy, jímž může být určen rybník/nádrž nebo více rybníků/nádrží jako epizootologická jednotka (hospodářství nebo pouze část hospodářství). Další diskutabilní možností je nechat ohnisko jako zamořené, což nese svá rizika a je nutné vždy provést epizootologické šetření a následně zvážit možnosti šíření nákazy především vzhledem k hustotě hospodářství v dané oblasti a možnosti uplatnění minimálních opatření k tlumení nákazy. Následně je nutné počítat s neomezeným trváním uzavřeného pásma do doby likvidace ohniska a omezením dotčených subjektů (a zákazu výlovů) v uzavřeném pásmu. Při likvidaci ohniska je důležité z hlediska možného šíření nákazy rozhodovat o nakládání s přenašeči a nevnímavými druhy ryb jako potenciálními mechanickými přenašeči. Při určování rozsahu ochranného pásma lze přistoupit k omezení na část úseku toku nebo dokonce pouze břeh rybníku v mezích legislativy (legislativně povodí nebo část). Omezením rozsahu ochranného pásma nikdy nesmí být ohrožen nákazový status ostatních chovů. Vzhledem k tomu, že pásmo dozoru je legislativně určeno pouze jako rozšířené ochranné pásmo a není legislativně určen povinný rozsah opatření v tomto pásmu, lze v případě omezení ochranného pásma rozšířit pásmo dozoru z původně definovaných úseků vodního toku na chovy a nařídít odběr vzorků a kontroly v těchto chovech. Pokud jde o vyklizení ohniska, vypouštění vody z ohniska bez možnosti dezinfekce protéká zbytkem soustavy a představuje riziko rozšíření nákazy. Možnost odbahnění celého rybníka jako forma čištění ohniska je obtížně realizovatelná z důvodu časové a finanční náročnosti. Vyklizení a dezinfekce recirkulačních systémů představuje problém z hlediska problematiky využití biologických filtrů v těchto systémech. Pokud jde o dezinfekci těchto systémů, vždy dochází k likvidaci biologických filtrů.

Závěr

Při řešení likvidace ohnisek nebezpečných nákaz ryb je vždy důležité provést pečlivě epizootologické šetření a následně na základě jeho výsledků nastavit rozsah pásem a požadovaných opatření tak, aby nedošlo k šíření nákazy. Opatření musí být v souladu s výše zmíněnou legislativou, která však umožňuje více řešení ohnisek nákaz ryb. Důležitá je vždy komunikace se všemi dotčenými subjekty a především mezi těmito subjekty a vysvětlení všech možností postupu vyplývajících z epizootologického řešení, aby došlo k co nejmenším hospodářským a ekonomickým ztrátám za dodržení opatření bránících šíření nákazy.

Literatura

Vyhláška č. 290/2008 Sb. o veterinárních požadavcích na živočichy pocházející z akvakultury a na produkty akvakultury, o opatřeních pro předcházení a zdočování některých nákaz vodních živočichů, ve znění pozdějších předpisů. In Sbírnka zákonů, částka 96/2008, s. 4388-4418.

Prováděcí rozhodnutí Komise (EU) 2015/1554, kterým se stanoví prováděcí pravidla ke směrnici 2006/88/ES, pokud jde o požadavky na metody dozoru a diagnostické metody. In Úřední věstník Evropské unie, 2015, L247, s. 7-62.

Státní veterinární správa, Informační systém státní veterinární správy 2015 – OIS, verze ze dne 25.02.2018

Kontaktní adresa: Lucie Filášová, MVDr., Odbor ochrany zdraví a pohody zvířat, KVS SVS pro Jihočeský kraj, Severní 9, 370 10 České Budějovice, l.filasova.kvsc@svscr.cz.

Different susceptibilities of salmonid fish to proliferative kidney disease

Syrová Eva, Kováčová Veronika, Papežíková Ivana, Minářová Hana,
Palíková Miroslava

Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Farmaceutical Sciences Brno

Summary

Tetracapsuloides bryosalmonae is the cause of the proliferative kidney disease (PKD) in salmonid fish. It was observed that among salmonids, there are some differences in susceptibility to the disease. The aim of this study was to quantify the cause of disease in tissues of salmonids from intensive farming in the Czech Republic using immunohistochemical (IHC) and molecular biological methods. In 2015 and 2017, a total of 100 samples of renal tissue from farmed salmonids were taken. Samples of kidney were subjected to the IHC, PCR and RT-PCR testing. The results proved differences in susceptibility to PKD among salmonids, which implies that in the terms of resistance to PKD, some salmonid species are more suitable for farming in a recirculation system, where it is necessary to use an infectious water source.

Keywords: *Tetracapsuloides bryosalmonae*; salmonids; immunohistochemical method molecular biological methods; recirculation system

Introduction

Proliferative kidney disease (PKD) is a parasitic infection of salmonid fish caused by *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea) (Feist et al., 2001; Okamura et al., 2001). PKD is characterized by nephromegaly, splenomegaly, glomerulonephritis, exophthalmia, ascites, darkened skin and pale gills (Abd-Elfattah et al., 2014). This is an economically important disease affecting salmonid fish farming in Europe and North America, potentially reaching 100% infection prevalence and high mortalities (up to 85%) in infected fish (Schmidt-Posthaus et al., 2012). It was observed that among salmonids, there are some differences in susceptibility to the disease (Kumar et al., 2013). The aim of this study was to quantify the cause of disease in tissues of salmonids from intensive farming in the Czech Republic using immunohistochemical (IHC) and molecular biological methods.

Material and Methods

Samples of salmonids

In total, 100 fish originating from intensive farming in a recirculation system (RAS) in the Czech Republic were examined. In 2015, 50 samples of renal tissue from salmonids were taken: 10 samples from *Salvelinus fontinalis* (2-year-old, reared in a recirculation system (RAS) for one year), 10 samples from the hybrid of *Salvelinus fontinalis* and *Salvelinus alpinus* (2-year-old, reared in a RAS for two years), and 30 samples from *Oncorhynchus mykiss* (10 samples – 1-year-old; 10 samples – 2-year-old, reared in a RAS for one year; 10 samples – 2-year-old, reared in a RAS for two years). In 2017, another 50 samples of renal tissue from salmonids were taken: 20 samples from *Salvelinus fontinalis* (10 samples – origin Italy; 10 samples – origin Denmark), 30 samples from *Oncorhynchus mykiss* (10 samples – origin Ireland; 10 samples – origin Denmark; 10 samples – origin Denmark, younger age group). Fish were humanely killed and subjected to pathological examination during which macroscopic changes in the internal organs were recorded and the kidney tissue was sampled from all animals.

Histology and immunohistochemistry

Samples of kidney were fixed in 10% neutral buffered formalin for histological and immunohistochemical examination. Samples of the formalin-fixed kidney were dehydrated in a series of graded ethanol, embedded in paraffin wax and 5 µm sections were prepared for haematoxylin & eosin staining. *T. bryosalmonae* monoclonal antibody AquaMAb-P01 (Aquatic Diagnostics, UK) was used according to the manufacturer’s instructions. The antibody-antigen reaction was visualized with a Dako EnVision+ System-HRP (AEC) kit (Dako Chemicals). Ten microscopic fields (magnification ×200) per slide were randomly selected and the mean number of parasites per field were counted for all samples examined.

DNA extraction, PCR and qRT-PCR

The DNA was obtained by extraction with the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) according to manufacturer’s protocol. The extracted DNA used for qualitative and quantitative parasite examination to detect the presence of *T. bryosalmonae* in samples by PCR and RT-PCR (Kent et al., 1998; Bettge et al., 2009).

Results

Complete results of IHC examination, PCR and RT-PCR are presented in Table 1 and 2.

Table 1: Pathological findings (mean values of n individuals, range 0-4: 0 no changes, 4 severe changes), IHC examination (mean number of parasites in the microscopic field, magnification 200x), qualitative PCR, quantitative RT-PCR in 2015; +/n = positive individuals/examination individuals.

	Pathol. findings (+/n)	IHC (+/n)	PCR (+/n)	RT-PCR (+/n)
<i>O. mykiss</i> 1-year-old	3,1 10/10	138,7±57,1 10/10	8/10	22,0±2,8 10/10
<i>O. mykiss</i> 2-year-old 1.year	2,0 9/10	43,4±53,9 5/10	0/8	29,2±5,3 7/10
<i>O. mykiss</i> 2-year-old 2.years	0,9 6/10	0 0/10	1/10	31,5±1,5 4/10
<i>S. fontinalis</i> 2-year-old, 1.year	0,2 1/10	0 0/10	8/10	32,6±2,5 6/10
hybrid 2-year-old, 2.years	negative	1,65±1,1 2/10	2/10	31,8±2,1 9/10

Table 2: Pathological findings (mean values of n individuals, range 0-4: 0 no changes, 4 severe changes), IHC examination (mean number of parasites in the microscopic field, magnification 200x), qualitative PCR, quantitative RT-PCR in 2017; +/n = positive individuals/examination individuals.

	Pathol. findings (+/n)	IHC (+/n)	PCR (+/n)	RT-PCR (+/n)
<i>O. mykiss</i> Ireland	0,5 7/10	0,9±0,7 3/9	10/10	31,2±2,9 8/10
<i>O. mykiss</i> Denmark	2,8 10/10	14,0±12,7 3/4	8/10	26,3±5,1 9/10
<i>O. mykiss</i> Denmark, ½ year	negative	not rated	10/10	33,5±1,6 3/10
<i>S. fontinalis</i> Italy	negative	0 0/10	8/10	30,6±2,1 8/10
<i>S. fontinalis</i> Denmark	0,15 2/10	0,4±0,2 2/10	10/10	29,6±2,9 9/10

Discussion

Obtained results proved differences in species and linear susceptibility to PKD among salmonids, which implies that in the terms of resistance to PKD, some salmonid species are more suitable for farming in RAS, where it is necessary to use an infectious water source.

Conclusion

To summarise, we proved, that exist differences in species and linear susceptibility of salmonids to PKD. PKD is a serious problem for intensive farming of salmonids and it is important to continue monitoring this situation in our salmonid farms.

Acknowledgments

This study was funded by Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (project no. 219/2017/FVHE).

References

- ABD-ELFATTAH, A. et al. Persistence of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) in chronically infected brown trout *Salmo trutta*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2014, vol. 111, p. 41-49.
- BETTGE, K. et al. Proliferative kidney disease in rainbow trout: time- and temperature-related renal pathology and parasite distribution. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2009, vol. 83, p. 67-76.
- FEIST, S.W. et al. Induction of proliferative kidney disease (PKD) in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* via the bryozoan *Fredericella sultana* infected with *Tetracapsula bryosalmonae*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2001, vol. 45, p. 61–68.
- KENT, M. L. et al. Ribosomal DNA sequence analysis of isolates of the PKX myxosporean and their relationship to members of the genus *Sphaerospora*. *Journal of Aquatic Animal Health*. 1998, vol. 10, p. 12-21.
- KUMAR, G. et al. Fate of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa) after infection of brown trout *Salmo trutta* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2013, vol. 107, p. 9-18.
- OKAMURA, B. et al. Patterns of occurrence and 18S rDNA sequence variation of PKX (*Tetracapsula bryosalmonae*), the causative agent of salmonid proliferative kidney disease. *Journal of Parasitology*. 2001, vol. 87, p. 379-385.
- SCHMIDT-POSTHAUS, H. et al. Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2012, vol. 97, p. 207-218.

Contact address: Eva Syrová, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, syrovae@vfu.cz.

Monitoring of infectious diseases in zoo animals with use of non-invasive blood sampling methods

^{1,3}Kvapil Pavel, ¹Harej Mojca, ²Račnik Jožko, ¹Kastelic Marjan, ³Bártová Eva

¹Zoo Ljubljana, Ljubljana, Slovenia

²Institute for Poultry, Birds, Small Mammals and Reptiles, Faculty of Veterinary Medicine, University of Ljubljana, Slovenia

³Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Infectious diseases monitoring is one of the most important pillar of preventive veterinary medicine in zoological collections. However, blood collection can be challenging, since anaesthesia is needed in most of the cases. The aim of this study was to evaluate usefulness of the blood sucking bugs (*Rhodnius prolixus*) of the family Reduviidae and medicine leeches (*Hirudo medicinalis*) from family Hirudinidae in non-invasive blood sampling in various animal species in ZOO Ljubljana. In total, 13 animal species represented by 37 animals were included in this study. Kissing bugs as well as medicine leeches were manually applied on animals, however a source of water for animals was used in case of leeches as a starting point for application. In the meantime, venopuncture of vena jugularis was used to acquire control blood samples in all animals. All samples including controls were sent for arbovirus detection using serological methods. Blood sucking bugs were able to obtain up to 0,8 ml of blood in about eight minutes. Medicine leeches were able to draw even more, up to 20 ml of blood in about 23 minutes. Time, success of withdrawal and blood volume were dependent on external conditions with temperature, light and disturbing surrounding factors being the most important. Serological results proved to be identical comparing invasive and non-invasive method of blood sampling. Blood withdrawing using blood sucking bugs and medicine leeches showed promising results and it is likely a good alternative to other more complex and invasive methods and can provide great advancement in preventive medicine in zoo animals.

Keywords: non-invasive blood sampling; blood sucking bugs; medicine leeches; zoo animals

Introduction

Animal welfare in zoological collections depends on good preventive health care. Infectious diseases monitoring is one of the most important pillar of preventive veterinary medicine in zoological collections. For many clinical, genetic and endocrinological investigations as well as for screening of infectious diseases, blood samples are indispensable. However, blood sampling can be difficult, since anaesthesia is needed in most of the cases. Usefulness of the blood sucking bugs (*Rhodnius prolixus*) of the family Reduviidae was already described in literature (KRUSZEWICZ, A.G. et al. 2009; STADLER, A. et al., 2009; VOIGT, C.C. et al., 2004, 2005, 2006) however use of medicine leeches (*Hirudo medicinalis*) from family Hirudinidae for non-invasive blood sampling has never been published yet. The aim of this study was to assess options for blood collection with help of these two species in various animal species in ZOO Ljubljana.

Materials and Methods

In total, 13 animal species (mammals and birds) represented by 37 animals from one zoological collection were included in this study. Kissing bugs were donated by University of Tours (France). For blood sampling, we used starving third or fourth larval instars (L3, L4), that were kept under laboratory conditions at 28 °C and 65 - 80% relative humidity. Bugs were manually applied on animals. Medicine leeches were purchased from commercial source (leech.com) and were kept in sterile conditions in the water with 10 °C temperature. Middle sized starving medicine leeches were manually applied on animals, however a source of water

for animals was used in case of leeches as a starting point for application in some species. Venopuncture of *vena jugularis* was used to acquire control blood samples in all animals to provide control group of samples. All samples including controls were sent for detection of antibodies to arbovirus (TBEV) by using serological method (ELISA-EIA TBEV Ig, TestLine Clinical Diagnostic, Czech republic).

Results

Blood sucking bugs were able to obtain up to 0,8 ml of blood in about eight minutes. Medicine leeches were able to draw even more, up to 20 ml of blood in about 23 minutes. External conditions as light, temperature and disturbing factors were crucial for success of blood withdrawal as well as time period necessary for obtaining sufficient volume of blood sample. Two out of 37 animals (5%) were positive for TBEV, control samples obtained by venopuncture had same serological titres as samples obtained by medicine leeches and blood sucking bugs. We obtained the same results using three different blood sampling in all 37 animals.

Discussion

Use of kissing bugs has been previously described in literature for obtaining blood as living syringes (KRUSZEWICZ, A.G. et al. 2009; STADLER, A. et al.,2009; VOIGT, C.C. et al., 2004, 2005, 2006). Blood samples were analysed for various hormone levels, genetic conditions, sexing, infectious diseases monitoring and haematological and biochemical parameters. *Dipetalogaster maxima* is the most common species used for blood sampling (KRUSZEWICZ, A.G. et al. 2009; STADLER, A. et al.,2009; VOIGT, C.C. et al., 2004, 2005, 2006) due to its big size and therefore big sample volume capacity. Nevertheless, these kissing bugs were not available at the time of study, that is why *Rhodnius prolixus* was used instead. It has smaller size, but it was sufficient for drawing appropriate amount of blood for serology and their keenness for blood sucking balanced its smaller size. The medicinal leech has been used in the treatment of many diseases for thousands of years (WHITAKER, I.S., et al., 2004). Nowadays, they are used for treatment of osteoarthritis, as well as venous congestion treatment in plastic surgery and various purposes in alternative medicine (STANGE, R. et al., 2012; WHITAKER, I.S., et al., 2004). However, their use for non-invasive blood sampling for screening of infectious diseases was never described in the literature. One of the complications, that was expected, was extensive bleeding from the sucking site after the leech extraction due to the anticoagulant factors (hirudin). In human medicine, bleeding duration time is usually between two and eight hours and one case of surgical intervention necessary for stopping the bleeding was described (ZENGIN, S. et al., 2012). Therefore this was one of our main concerns regarding possible complication after the blood sampling with medicine leeches. However, post extraction bleeding was not remarkable and diminished in 0 - 11 minutes after extraction in all 37 animals.

Conclusion

Blood sampling using blood sucking bugs or medicine leeches shows promising results. It is likely a good alternative to other more complex and invasive methods and can provide great advancement in preventive medicine in zoo animals.

Acknowledgement

We would like to thank Claudio Lazzari from Tours University, France for providing blood sucking bugs and Kamil Sedlak from SVU Prague and Pavlina Pittermanova from VFU Brno for their help with processing of samples and serological examination.

References

- KRUSZEWICZ, A.G., GROTHMANN, P., CZUJKOWSKA, A., STADLER, A., LAWRENZ, A., & SCHAUB, G. Use of kissing bugs for blood sampling of exotic animals. *Życie Weterynaryjne*. 2009, vol. 84, p. 405–407.
- STADLER, A., LAWRENZ, A., & SCHAUB, G. The blood-sucking bug *Dipetalogaster maxima* as mean to obtain blood samples of zoo animal species. *Tierärztliche Umschau*. 2009, vol. 64, no. 3, p. 147–153.
- STANGE, R., MOSER, C., HOPFENMUELLER, W., MANSMANN, U., BUEHRING, M., & UEHLEKE, B. Randomised controlled trial with medical leeches for osteoarthritis of the knee. *Complementary Therapies in Medicine*. 2012, 20.1-2: 1-7.
- VOIGT, C.C., PESCHEL, U., WIBBELT, G., & FRÖLICH, K. An alternative, less invasive blood sample collection technique for serologic studies utilizing Triatomine bugs (Heteroptera; Insecta). *Journal of Wildlife Diseases*. 2006, vol. 42, no. 2, p. 466–469.
- VOIGT, C.C., MICHENER, R., WIBBELT, G., KUNZ, T. H., & VON HELVERSEN, O. Blood-sucking bugs as a gentle method for blood-collection in water budget studies using doubly labelled water. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2005, 142.3: 318-324.
- VOIGT, C.C., FAßBENDER, M., DEHNHARD, M., WIBBELT, G., JEWGENOW, K., HOFER, H., & SCHAUB, G. A. Validation of a minimally invasive blood-sampling technique for the analysis of hormones in domestic rabbits, *Oryctolagus cuniculus* (Lagomorpha). *General and Comparative Endocrinology*, 2004, 135.1: 100-107.
- WHITAKER, I. S., IZADI, D., OLIVER, D. W., MONTEATH, G., & BUTLER, P. E. Hirudo medicinalis and the plastic surgeon. *British Journal of Plastic Surgery*, 2004, 57.4: 348-353.
- WHITAKER, I.S., RAO, J., IZADI, D., & BUTLER, P. E. Historical Article: *Hirudo medicinalis*: ancient origins of, and trends in the use of medicinal leeches throughout history. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 2004, 42.2: 133-137
- ZENGİN, S., YARBİL, P., KILIC, H., & AL, B. Prolonged bleeding due to a medicinal leech bite: another treatment method, primary suture. *BMJ Case Reports*, 2012, 2012: bcr0220125759.

Contact address: Pavel Kvapil, MVDr, ZOO Ljubljana, Večna pot 70, Ljubljana 1000, Slovenia, pavel.kvapil@gmail.com.

Direct detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon* spp. in vespertilionid bats from Central Europe

¹Marková Jiřina, ¹Pittermannová Pavlína, ¹Bártová Eva, ²Sedláčková Jana, ²Band'ouchová Hana

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, ²Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Vespertilionid bats belong to cosmopolitan family with many different species and comprise almost third of all bats in the world. There is not so many information about endoparasites in this animals from Central Europe. The aim of study was to test bats for presence of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon* spp. In total, one hundred bats from family Vespertilionidae (species *Myotis myotis*, *Nyctalus noctula* and *Vespertilio murinus*) found in the Czech Republic and Slovakia, were used. DNA was isolated from brain (*T. gondii* and *N. caninum*) or small intestine (*Encephalitozoon* spp.). *T. gondii* was found in one brain of *M. myotis* male by single PCR (TGR1E region); bats were negative for *N. caninum*. Microsporidian DNA was proved in 43% bats (31 *M. myotis*, 11 *N. noctula* and 1 *V. murinus*) using nested PCR (ITS region). This is the first endoparasite screening of bats from Central Europe showing the high prevalence of microsporidia in bats of family Vespertilionidae.

Keywords: insectivore; toxoplasmosis; microsporidiosis; molecular methods

Introduction

Family Vespertilionidae (vespertilionid bats) belong to Microchiroptera and comprise around one third of European mammalian species with almost worldwide distribution (Frank et al., 2015). Besides natural habitats, microbats could live and roost inside urban areas and come into contact with humans (Hutson et al., 2001). It opens the question about occurrence of pathogens which could be transmitted not only inside bat colony but also to their predators and to humans especially in case of synanthropic bats. The aim of our study was to detect DNA of zoonotic parasites *Encephalitozoon* spp. and *T. gondii* and also *N. caninum* in tissue of vespertilionid bats from Central Europe.

Materials and Methods

In total, we used one hundred bats (52 *Myotis myotis*, 43 *Nyctalus noctula* and 5 *Vespertilio murinus*) from family Vespertilionidae. Animals were found dead in wild or close to human residences in the Czech Republic and Slovakia in last seven years. After dissection, tissues were frozen at -20 °C until examination. The DNA was isolated from brain (*T. gondii* and *N. caninum*) or small intestine (*Encephalitozoon* spp.) with DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Before DNA isolation, pieces of tissues were homogenized in tubes with ceramic marbles using tissue homogenizer MagNA Lyser Instrument (Roche, Basel, Switzerland) at rotation speed 6500 rpm /2x 45s. Each PCR reaction was performed in 25 µl volume containing DNA, commercial premix PPP master mix (Top-Bio s.r.o., Prague, Czech Republic), PCR H₂O and specific primers. We used single PCR with primers TGR1E-I/II annealing to the TGR1E region (Cristina et al., 1991) for *T. gondii* detection and primers Np6plus/Np21plus annealing to the Nc-5 region (Muller et al., 1996) for *N. caninum* detection. In case of *Encephalitozoon* spp., we used nested PCR using two different MSP primer pairs annealing to the ITS region (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). Negative and positive controls were included in each reaction. After electrophoresis, the PCR products were analysed under UV light on 1.5% agarose gel stained with Midori Green. The molecular

weight of PCR products were 194 bp for *T. gondii*, 317 bp for *N. caninum* and 300 bp for *E. cuniculi*.

Results and Discussion

Toxoplasma gondii was proved only in one brain of *M. myotis* male from the Czech Republic and all bats were negative for *N. caninum*. Microsporidian DNA was detected in 43% bats, in 31 *M. myotis* and 11 *N. noctula* from Czech Republic and Slovakia and one *V. murinus* found in the Czech Republic.

Cabral et al. (2013) described the first detection of *T. gondii* by nested PCR in three bat species (*Molossus molossus*, *Desmodus rotundus* and *Glossophaga soricina*) found in the cities of Brazil. Sun et al. (2013) detected by nested PCR *T. gondii* in 29% of 550 insectivorous species of bats in Myanmar. Results from other world studies showed relatively low *T. gondii* positivity in bats. In Western Europe, the insectivorous species of bats (*Pipistrellus pipistrellus* and *Pipistrellus pygmeus*) were examined by nested PCR with 10% positivity (Dodd et al., 2014). Only one world study involved molecular detection of both *T. gondii* and *N. caninum* in bats with 2% positivity to *T. gondii* in nonhematophagous Seba's Short-tailed Bat (*Carollia perspicillata*) in the city of Brazil (de Jesus et al., 2017); *N. caninum* was not found. In our study, we detected *T. gondii* only in one brain of male Greater Mouse-eared Bat (*Myotis myotis*) found close to human residences in the Czech Republic; we did not prove *N. caninum* in any of examined bats.

As a microsporidium with zoonotic potential, *Encephalitozoon* spp. could infect wide spectrum of mammalian and avian species including humans. There are a lot of serological or molecular studies focussing on microsporidia in wildlife but data in bats are missing (Hinney et al., 2016). Lallo et al., (2009) detected microsporidia spores in faeces of wild hematophagous Hairy-legged Vampire bats (*Diphylla ecaudata*) from Brazil. Infective spores could be spread through excretes and secretes and thus contaminate environment. There was one case of fatal microsporidiosis caused by *E. hellem* in captive female Egyptian Fruit Bat (*Rousettus aegyptiacus*) living in New York zoo (Childs-Sanford et al., 2006). In our study, we proved *Encephalitozoon* spp. in intestine of 43% bats. As we know, this is the first screening in wild vespertilionid bats from Central Europe and also in the world showing relatively high positivity of *Encephalitozoon* spp. in bats.

The source of infection (protozoal oocyst and microsporidian spores) for wild bats is unknown. As a species living in holes or cavities, they could probably come into contact with parasites during roosting or through water or food contaminated with oocysts and spores. Because some species of vespertilionid bats have adapted to urban places and sometimes they live in old houses and churches, the risk of direct contact with definitive hosts (cats, dogs) or vectors of infection (rodents, birds) is higher comparing to other group of bats.

Conclusion

Our study completes the missing data about occurrence of *T. gondii*, *N. caninum* and *Encephalitozoon* spp. in vespertilionid bats from Central Europe. Our results show that members of family Vespertilionidae come into contact with protozoal parasites and microsporidia and thus infected bats could be the source of infection for their predators and probably also for human.

Acknowledgement

We would like to thank to Prof. MVDr. Jiří Pikula, Ph.D., Dipl. ECZM from Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees (VFU Brno) for providing the bat species and Bc. Renata Hesová and Linda Zamrazilová for helping with DNA isolation and molecular examination.

References

- CABRAL, A.D.; GAMA, A.R.; SODRÉ, M.M.; SAVANI, E.S.M.M.; GALVÃO-DIAS, M.A.; JORDÃO, L.R.; MAEDA, M.M.; YAI, L.E.O.; GENNARI, S.M.; PENA, H.F.J. First isolation and genotyping of *Toxoplasma gondii* from bats (Mammalia: Chiroptera). *Veterinary Parasitology*. 2013, vol. 193, p. 100–104.
- CHILDS-SANFORD, S.E.; GARNER, M.M.; RAYMONDY, J.T.; DIDIER, E.S.; KOLLIAS, G.V. Disseminated Microsporidiosis due to *Encephalitozoon hellem* in an Egyptian Fruit Bat (*Rousettus aegyptiacus*). *Journal of Comparative Pathology*. 2006, vol. 134, p. 370–373.
- CRISTINA, N.; OURY, B.; AMBROISE-THOMAS, P.; SANTORO, F. Restriction-fragment-length polymorphisms among *Toxoplasma gondii* strains. *Parasitology Research*. 1991, vol. 77, p. 266–268.
- DE JESUS, R.F.; RODRIGUES, G.M.; SILVA, E.M.; CARNEIRO, A.J.B.; FRANKE, C.R.; CUNHA, R.DE.M.; GONDIM, L.F.P. Toxoplasmatinae parasites in bats from Bahia state, Brazil. *Journal of Wildlife Diseases*. 2017, vol. 53, p. 144–147.
- DODD, N.S.; LORD, J.S.; JEHLE, R.; PARKER, S.; PARKER, F.; BROOKS, D.R.; HIDE, G. *Toxoplasma gondii*: Prevalence in species and genotypes of British bats (*Pipistrellus pipistrellus* and *P. pygmaeus*). *Experimental Parasitology*. 2014, vol. 139, p. 6–11.
- FRANK, R.; KUHN, T.; WERBLOW, A.; LISTON, A.; KOCHMANN, J.; KLIMPEL, S. Parasite diversity of European *Myotis* species with special emphasis on *Myotis myotis* (Microchiroptera, Vespertilionidae) from a typical nursery roost. *Parasites & Vectors*. 2015, vol. 8, p. 101.
- HINNEY, B.; SAK, B.; JOACHIM, A.; KVÁČ, M. More than a rabbit's tale - *Encephalitozoon* spp. in wild mammals and birds. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*. 2016, vol. 5, p. 76–87.
- HUTSON, A.M.; MICKLEBURGH, S.P.; RACEY, P.A. Microchiropteran bats: global status survey and conservation action plan. *Switzerland and Cambridge: IUCN*; 2001.
- KATZWINKEL-WLADARSCH, S.; LIEB, M.; HEISE, W.; LOSCHERL, T.; RINDER, H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health*. 1996, vol. 3, p. 373–378.
- LALLO, M.A.; PEREIRA, A.; ARAÚJO, R.; FAVORITO, S.A.; BERTOLLA, P.; BONDAN, E.F. Occurrence of *Giardia*, *Cryptosporidium* and microsporidia in wild animals from a deforestation area in the state of São Paulo, Brazil. *Ciência Rural, Santa Maria*. 2009, vol. 39, p. 1465–1470.
- MULLER, N.; ZIMMERMANN, V.; HENTRICH, B.; GOTTSTEIN, B. Diagnosis of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* infection by PCR and DNA hybridisation immunoassay. *Journal of Clinical Microbiology*. 1996, vol. 34, p. 2850–2852.
- SUN, H.; WANG, Y.; ZHANG, Y.; GE, W.; ZHANG, F.; HE, B.; LI, Z.; FAN, Q.; WANG, W.; TU, CH.; LI, J.; LIU, Q. Prevalence and genetic characterization of *Toxoplasma gondii* in bats in Myanmar. *Applied and Environmental Microbiology*. 2013, vol. 79, p. 3526–3528.

Contact address: Jiřina Marková, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic, H14005@vfu.cz.

Výskyt parazitárních mikrosporidií *Encephalitozoon* spp. u volně žijících hlodavců v ZOO Brno

Occurrence of parasitic microsporidia *Encephalitozoon* spp. in wild rodents in ZOO Brno

¹Pittermannová Pavlína, ¹Marková Jiřina, ^{2,3}Žáková Alena, ¹Bártová Eva

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

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³Katedra biologie, Pedagogická fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Summary

Encephalitozoon spp. belongs to obligatory intracellular microsporidia, which is responsible for systematic disease in mammals. *Encephalitozoonosis* is important in human and veterinary medicine but we know little of its occurrence in wild rodents. The aim of this study was to detect *Encephalitozoon* spp. in wild rodents in ZOO Brno. Trapping of rodents was done by using spring traps and life-hunt traps in years 2016 – 2017. In total, 49 rodents were trapped including 27 Yellow-necked Field Mouse (*Apodemus flavicollis*), 19 Long-tailed Field Mouse (*Apodemus sylvaticus*) and three Bank Vole (*Clethrionomys glareolus*). *Encephalitozoon* spp. was detected in liver of 13 (26,5 %) rodents by nested PCR using two primer pairs (inside and outside ones). Positive animals included nine Yellow-necked Field Mouse, three Long-tailed Field Mouse and one Bank Vole. Our results demonstrate that wild rodents in ZOO Brno are coming into contact with *Encephalitozoon* spp., and they can serve as source of infection for zoo animals but also for humans (zoo personnel and visitors).

Keywords: *Enterocytozoon bieneusi*; *Encephalitozoon cuniculi*; *Encephalitozoon intestinalis*; *Encephalitozoon hellem*; rodents; ZOO Brno; nested PCR

Úvod

Mikrosporidie *Encephalitozoon* spp., patří do skupiny obligátních vnitrobuněčných parazitů, které jsou kosmopolitně rozšířeny. Doposud bylo popsáno více než 1200 druhů zařazených do 150 rodů. Mikrosporidie mohou infikovat široké spektrum organizmů, hlavně hmyz, ryby, dále ptáky, savce (domácí i volně žijící druhy) včetně člověka (Lee et al., 2008). Infekce způsobená *Encephalitozoon cuniculi* probíhá u hlodavců obvykle asymptomaticky, přesto se mohou v některých případech objevit letargie, chřadnutí, neurologické příznaky, může dojít k postupnému selhání ledvin až k úhynu (Smielewska-Los et al., 2004).

Cílem naší práce je detekce *Encephalitozoon* spp. u hlodavců v areálu ZOO Brno a následná sekvenace pro bližší identifikaci druhu. Na základě dřívějších studií, předpokládáme výskyt druhů *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon intestinalis*, *Encephalitozoon hellem* a *Enterocytozoon bieneusi*.

Materiál a metody

Během let 2016-2017 probíhal, na základě schváleného projektu pokusů, odchyt hlodavců volně žijících v areálu ZOO Brno. K odchytům byly použity sklapovací a živolovné pasti, které byly umístovány ve venkovních prostorách nebo v zázemí jednotlivých pavilónů zvířat. Celkem bylo odchyceno 49 hlodavců, a to 27 myšic lesních, 19 myšic křovinných a 3 norníci rudí. U odchycených hlodavců byl určen druh, pohlaví a jejich přibližný věk. Hlodavci odchyceni do živolovných pastí byli usmrceni etherem a následně jim byla odebrána krev. Poté proběhla jejich pitva a odběr tkání. Ze vzorků jater byla izolována DNA pomocí izolační soupravy DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Německo). K detekci *Encephalitozoon* spp. byla použita nested PCR s využitím dvou párů primerů (MSP 1, 2A a

MSP 3, 4A) k amplifikaci ITS genu (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996). Výsledný PCR produkt má velikost kolem 300 pb.

Výsledky

Parazit *Encephalitozoon* spp. byl pomocí nested PCR detekován u 13 (26,5 %) hlodavců. Mezi pozitivními hlodavci bylo devět myšic lesních (*Apodemus flavicollis*), tři myšice křovinné (*Apodemus sylvaticus*) a jeden norník rudý (*Clethrionomys glareolus*). Tyto výsledky naznačují, že volně žijící hlodavci v ZOO Brno přicházejí do kontaktu s *Encephalitozoon* spp., a mohou tedy sloužit jako zdroj infekce pro zoo zvířata a lidi pohybující se v areálu zoo (ošetřovatelé a návštěvníci). Pozitivní vzorky budou zaslány na sekvenaci (Macrogen, Holandsko) k určení konkrétního druhu *Encephalitozoon* spp.

Diskuse a závěr

V této studii jsme prokázali přítomnost *Encephalitozoon* spp. u tří druhů hlodavců v ZOO Brno. V České republice byly mikrosporidie (druhy *E. hellem*, *E. cuniculi* a *E. bienersi*) detekovány pomocí PCR u 34 % myši střeoevropských (*Mus musculus musculus*) a 33 % myši západoevropských (*M. m. domesticus*) odchycených v 74 lokalitách v oblasti Bavorska a západních Čech (Sak et al., 2011). V okolních státech byly zjištěny rozdílné výsledky. Danišová et al. (2015) detekovali pomocí PCR *E. bienersi* u 1 %, *E. cuniculi* u 0,4 % a *E. intestinalis* u 0,4 % volně žijících myší v pěti lokalitách východního Slovenska. Perc-Matysiak et al. (2015) detekovali pomocí PCR *E. bienersi* u 39 % volně žijících hlodavců v Polsku. Zástupci druhů myšice temnopásá (*Apodemus agrarius*) a norník rudý (*Myodes glareolus*) měli více pozitivních jedinců na *E. bienersi* než myšice lesní (*A. flavicollis*) a myš domácí (*M. musculus*). Pokud se týká zoologických zahrad, neexistuje mnoho studií zaměřených na detekci *Encephalitozoon* spp. Ve střední Itálii (Maestrini et al., 2017) byly metodou ELISA zjištěny protilátky proti *E. cuniculi* u 100% králíků ze zoologické zahrady, což dokazuje, že zoo zvířata přichází do kontaktu s touto mikrosporidií. Oproti tomu v jižní Itálii (Bártová et al., in press) byly pomocí IFAT detekovány protilátky proti *E. cuniculi* jen u 19% zvířat ze tří tamějších zoo. Ve slovinské zoo byly protilátky proti *E. cuniculi* detekovány metodou IFAT u 55% savců a 34% ptáků (Kvapil et al., in press). Séra 39 hlodavců odchycených v areálu slovinské zoo byla negativní, z čehož vyplývá, že hlodavci nemusí vždy hrát hlavní roli v přenosu infekce. V České republice byla metodou IFAT vyšetřena séra zvířat ze sedmi zoologických zahrad, protilátky proti *E. cuniculi* byly zjištěny pouze u 3,3% zvířat (Čechová, 2017).

Poděkování

Ráda bych poděkovala Mgr. Vendule Sychrové za koordinaci odchytů hlodavců v ZOO Brno a Veronice Trávníčkové za pomoc při odchycích hlodavců a vyšetření vzorků.

Literatura

BÁRTOVÁ, E.; MACHAČOVÁ, T.; MARKOVÁ, J.; SEDLÁK, K.; BUDÍKOVÁ, M.; SILVESTRE, P.; LARICCHIUTA, P.; RUSSO, M.; VENEZIANO, V. *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in animals from captivity (Zoo and circus animals), in press.

ČECHOVÁ, K. *Encephalitozoon cuniculi* u zoo zvířat v České republice. Bakalářská práce, VFU Brno 2017.

DANIŠOVÁ, O.; VALENČÁKOVÁ, A.; STANKO, M.; LUPTÁKOVÁ, L.; HASAJOVÁ, A. First report of *Enterocytozoon bienersi* and *Encephalitozoon intestinalis* infection of wild mice in Slovakia *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2015, vol. 22, no. 2, s. 251–252.

KATZWINKEL-WLADARSCH, S.; LIEB, M.; HEISE, W.; LOSCHERL, T.; RINDER, H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health*. 1996, vol. 3, s. 373–378.

KVAPIL, P.; KASTELIC, M.; BÁRTOVÁ, E.; MARKOVÁ, J.; MURAT, J.B.; KOBÉDOVÁ, K.; BUDÍKOVÁ, M.; SEDLÁK, K. Monitoring of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, *Encephalitozoon cuniculi*, *Chlamydia abortus* and *Coxiella burnetti* in Zoo Ljubljana, Slovenia, in press.

LEE, S. C.; CORRADI, N.; BYRNES, E. J.; TORRES-MARTINEZ, S.; DIETRICH, F. S.; KEELING, P. J.; HEITMAN, J. Microsporidia evolved from ancestral sexual fungi. *Current Biology*. 2008, vol. 18, no. 21, s. 1675–1679.

MAESTRINI, G.; RICCI, E.; CANTILE, C.; MANNELLA, R.; MANCIANTI, F.; PACI, G.; D'ASCENZI, C.; PERRUCCI, S. *Encephalitozoon cuniculi* in rabbits: Serological screening and histopathological findings. *Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases*. 2017, vol. 50, s. 54–57.

PEREC-MATYSIAK, A.; BUNKOWSKA-GAWLIK, K.; KVÁČ, M.; SAK, B.; HILDEBRAND, J.; LESNIANSKA, K. Diversity of *Enterocytozoon bieneusi* genotypes among small rodents in southwestern Poland. *Veterinary Parasitology*. 2015, vol. 214, no.3–4, s. 242–246.

SAK, B.; KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; ALBRECHT, T.; PIALEK, J. The first report on natural *Enterocytozoon bieneusi* and *Encephalitozoon* spp. infections in wild East-European House Mice (*Mus musculus musculus*) and West-European House Mice (*M. m. domesticus*) in a hybrid zone across the Czech Republic–Germany border. *Veterinary Parasitology*. 2011, vol. 178, no. 3–4, s. 246–250.

SMIELEWSKA-LOS, E.; PLONECZKA, K.; KARZMARCZYK, R. Encephalitozoonosis. *Medycyna Weterynaryjna*. 2004, vol. 60, no. 3, s. 237–241.

Kontaktní adresa: Pavlína Pittermannová, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H17007@vfu.cz.

Semen cryopreservation in captive birds of prey

Piaček Vladimír, Kováčová Veronika, Heger Tomáš, Pikula Jiří

*Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

Summary

Semen cryopreservation is an important tool for the storage of male reproductive cells used for artificial insemination in birds. Artificial insemination is necessary if the female sex cycle cannot be synchronized with the male production of semen. For the semen collection and artificial insemination, use of imprinted birds is preferred. Little is known about the possibilities of freezing semen of birds of prey. The objective of this study was to optimize the methods for long-term preservation of reproductive cells of birds of prey.

Keywords: *semen freezing; artificial insemination; raptors*

Introduction

Efforts to conserve endangered birds of prey have been increasing in the last decades. Hand in hand with the development of new methods of captive breeding, the need of long-term conservation of sperm has also expanded due to the inability to synchronize the reproduction cycle. In captive breeding one has often to deal with the situation when it is possible to collect semen from males only after the females had already finished their reproduction cycle. The main goal of captive breeding of birds of prey is to reintroduce these species into their natural habitats. It is not possible to obtain a large enough number of chicks using the method of natural reproduction in pairs, while breeding of imprinted individuals combined with artificial insemination rapidly increases the number of young birds (Blesbois, 2011). The objective of this study was to evaluate options for long-term semen preservation, clinical examination of donor birds together with biochemical and hemathological analysis of blood. Another goal was the assessment of effectiveness in cryopreservation methods which are already used for mammals and their influence on the sperm quality.

Materials and Methods

Before the sperm sample collection it is necessary to clinically examine the donor birds. Birds in perfect status of health and body condition were only used for semen collection. We worked with such species as golden eagle (*Aquila chrysaetos*) and peregrine falcon (*Falco peregrinus*). We used the method of voluntary donation based on copulation and massage. The group of birds under study consisted of 4 golden eagles and 5 peregrine falcons. Two peregrine falcons could not be used because of health problems caused by *Clostridium perfringens* infection. The number of examined samples was 39. Collected from 4 golden eagles and 3 peregrine falcons. The ejaculate volume ranged from 30 to 120 μ l. All the samples were completely examined on the heating plate in a micro- and macro-scopic way immediately after the collection. We used two types of solutions for dilution of the ejaculate. First, the solution was the combination of cell medium (DMEM F12+) and cryoprotectivum (DMSO). Second, the solution consisted of cell medium (DMEM F12+) and glycerol. The dilution ratio was 1:1.5. Insemination doses (ID hereinafter in the text) were placed to 0.1 ml straws. They were permanently closed, marked and placed into a thermobox. The conditions in the thermobox were 20°C. The time of equilibration lasted 6 hours. After this period, the samples were chilled in a refrigerator (5°C) for 20 minutes. Then followed the process of gradual freezing with temperature decrease of 5°C per minute until reaching -86°C (Herrera et al., 2009). Next, ID were inserted into liquid nitrogen (-195°C). Defrosting revival was made

every 2 months using water baths (38°C). After defrosting we examined the samples for motility and using eosin-nigrosin staining to determine sperm viability after the long-term cryopreservation.

Results

The number of deep-frozen samples was 28 (16 from golden eagles and the rest from peregrine falcons). Examined native preparations collected from peregrine falcons had the average concentration of sperm $100 \times 10^6/\text{ml}$, providing the total of 3.5×10^6 sperms per ejaculate. The motility was 52.92%. On the other hand, samples collected from golden eagles showed average concentration value $330 \times 10^6/\text{ml}$, while the total ejaculate contained 16.5×10^6 sperms. Motility was 52.81%. The usage of DMSO + DMEM decreased motility of golden eagle samples to 38.87%. Peregrine falcon samples had 18.26% average motility. The second medium (DMEM + glycerol) worsened motility values to 7.41% in the golden eagle and 9.37% in the peregrine falcon. While the usual duration of equilibration used in mammals is 4 hours, we had better experience with 6 hours in birds. We also adjusted the equilibration temperature from 7°C to 20°C, managing to prolong the survival of spermatozoa. For short-term preservation is much better the temperature about 20-23°C (for mammals it is often used temperature of about 5-7°C).

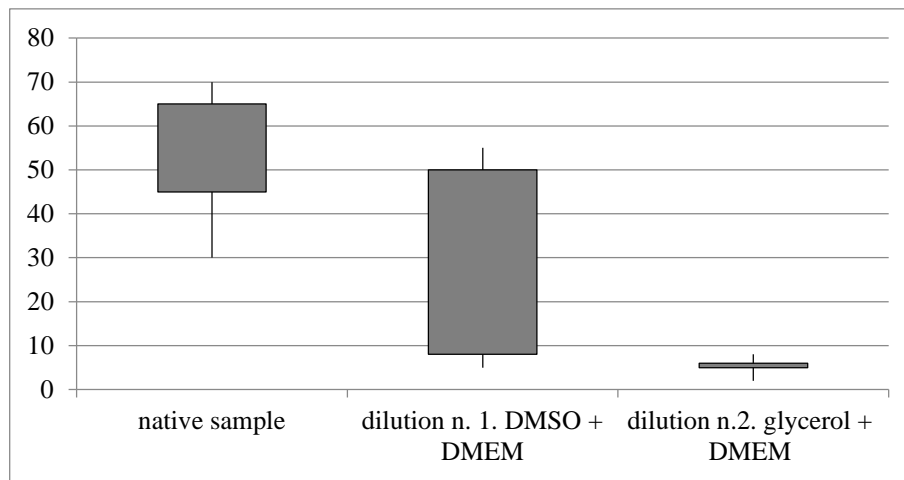


Figure 1. Motility comparison of golden eagle (*Aquila chrysaetos*) spermatozoa prior to and after cryopreservation.

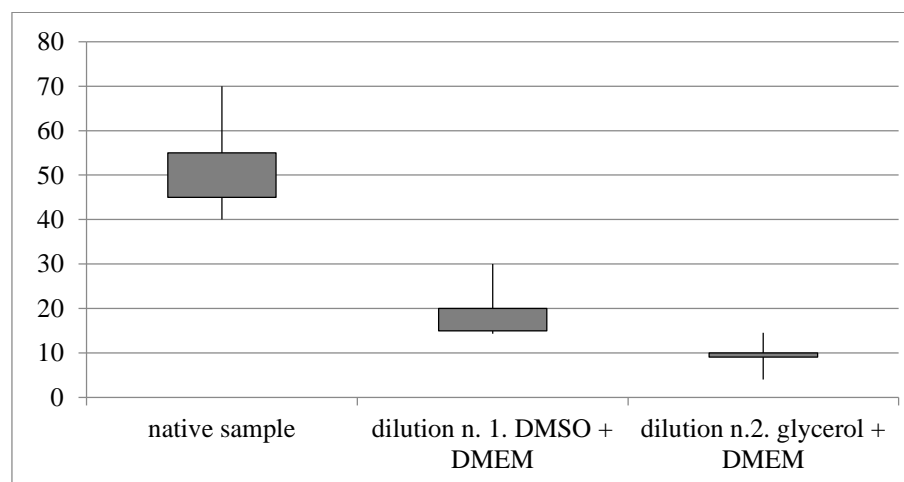


Figure 2. Motility comparison of peregrine falcon (*Falco peregrinus*) spermatozoa prior to and after cryopreservation.

Discussion

The limiting factor in long-term preservation of birds of prey semen samples is a choice of suitable dilution for cryopreservation (Blesbois et al., 2005). Effectiveness of dilution solutions used in mammals is highly limited. We had therefore to change the amount and ratio of individual components, eventually to enrich them. Our previous data clearly proved higher cryopreservation sensitivity of peregrine falcon semen. It is necessary to continue in research of the process itself (from the choice of suitable medium to suitable cryopreservation).

Conclusions

The comparison of dilutions clearly proved that dilution n.1 (DMSO + DMEM) was more suitable for long-term preservation of semen of birds of prey. In case of the golden eagle, dilution n.1 was good for semen cryopreservation, regarding the average motility value after the defrosting revival of 38.87% (fig.n.1.). It is a well-known fact that bovine ID is considered as full-featured with motility of about 35-36%. So, we can also predict that eagle's ID with comparable motility would be capable of fertilization. Dilution n.2 is not suitable. In both cases of peregrine falcon samples low motility percentage (fig.n.2.) was recorded. In case of short-term preservation and also equilibration we recommend higher temperature (20-23°C) than is usually used with mammalian reproduction cells. Only healthy individuals in full physical condition are suitable as donors of semen. Samples obtained by voluntary copulation are more efficient. The bird is not under stress, lowering thus the risk of contamination by faeces.

Acknowledgement

This research was supported by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, project No. 232/2017/FVHE.

References

- BAILEY T A, LIERZ M: Veterinary Aspects of Bird of Prey Reproduction. *Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice*, 2017, 455-483.
- BLANCO JM, LONG JA, GEE G, WILDT DE, DONOGHUE AM: Comparative cryopreservation of avian spermatozoa: Benefits of non-permeating osmoprotectants and ATP on turkey and crane sperm cryosurvival. *Animal Reproduction Science*, 2011, 242-248.
- BLANCO JM, GEE GF, WILDT DE, DONOGHUE AM: Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramaginal insemination approach. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 2002, 1-7.
- BLESBOIS E, GRASSEAU I, SEIGNEURIN F: Membrane fluidity and the ability of domestic bird spermatozoa to survive cryopreservation. *Reproduction* 2005, 371-378.
- BLESBOIS E. Freezing avian semen. *Avian Biology Research*, 2011, 52-58.
- HERRERA JA, QUINTANA JA, LÓPEZ MA, BETANCOURT M, FIERRO R: Individual cryopreservation with dimethyl sulfoxide and polyvinylpyrrolidone of ejaculates and pooled semen of three avian species. *Archives of Andrology*, 2009, 353-360.
- KOWALCZYK A, ŁUKASZEWICZ E, WICKER-THOMAS C: Simple and Effective Methods of Freezing Capercaillie (*Tetrao urogallus* L.) Semen. *PLOS ONE*, 2015, 10(1): e0116797.
- LONG J A: Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science*, 2006, 232-236.

Contact address: Vladimír Piaček, MVDr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, piacekv@vfu.cz.

Krvné parazity jašteríc *Lacerta schreiberi* Blood parasites of lizards *Lacerta schreiberi*

¹Zechmeisterová Kristína, ^{1,2}Papoušek Ivo, ^{1,2}Široký Pavel

¹ Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²CEITEC, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Detection of haemoparasites of Iberian lizards *Lacerta schreiberi* was based on both molecular and morphological features. For molecular genetic analysis, blood-sucked ticks collected from lizards were used as an alternative source of hemoparasites DNA instead blood samples. The aim of this study was to test the possibility of usage of this alternative source of genetic information. Two types of apicomplexan parasites were found: haemococcidia of the genus *Schellackia* and haemogregarines of the species *Karyolysus lacazei*.

Keywords: *Lacerta schreiberi*; *Schellackia* sp.; *Karyolysus lacazei*

Úvod

Jašterica schreiberova (*Lacerta schreiberi*) z čeľade Lacertidae je endemitom Pyrenejského polostrova. V roku 2006 prebiehal jej odchyt a zber biologického materiálu (krvné nátery a nasaté larvy a nymfy kliešťá *Ixodes ricinus* zbierané priamo z hostiteľa) v rámci etologicky zameranej štúdie (Stuart-Fox a kol., 2009). Pretože na krvných náteroch sa našli najmenej dva typy krvných parazitov, pokúsili sme sa o ich molekulárne genetickú charakteristiku. Odber vzoriek krvi pre molekulárne genetickú analýzu nebol súčasťou dizajnu pôvodnej štúdie. Ako náhradný zdroj genetickej informácie týchto parazitov sme použili krvou nasaté kliešte pred ich odobraním z infikovaného hostiteľa. Cieľom našej štúdie bolo overiť vhodnosť použitia krvou nasatých ektoparazitov ako alternatívneho zdroja deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) pre detekciu krvných parazitov v kapilárnej krvi hostiteľa.

Materiál a metodika

Celkovo bolo mikroskopicky prezretých 48 krvných náterov jašteríc. Krvné nátery boli farbené podľa Giemsa a Romanovského (riedenie 1:10 destilovanou vodou s pH 7, farbenie po dobu 15 min). Parazitémia bola odhadnutá v percentách na 10^4 prehlíadnutých erytrocytov.

Molekulárne genetickými metódami bolo vyšetrených 269 kliešťov zozbieraných z 48 jašteríc. DNA krvou nasatých kliešťov bola izolovaná alkalickou hydrolýzou (Kubelová a kol. 2011). V rámci analýzy polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) boli použité primery amplifikujúce 18S rDNA: EF/ER (Kvičerová a kol., 2008; Dvořáková a kol., 2014) a BTF1/EimRodR (Megía-Palma a kol., 2014). Pozitívne PCR produkty boli prečistené komerčným kitom a sekvenované vo firme Macrogen (Macrogen Europe, Amsterdam, Holandsko). Analýza sekvencií bola urobená v programe Geneious 9.1.5 s použitím fylogenetických analýz Mr. Bayes a Maximum Likelihood.

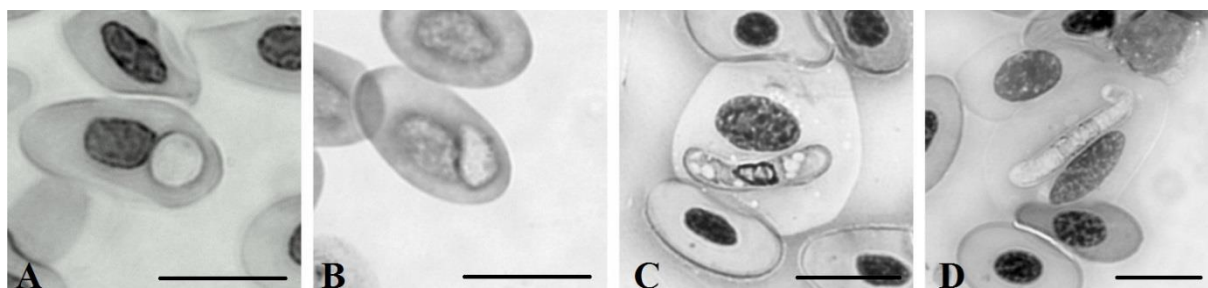
Výsledky

Mikroskopicky aj molekulárne geneticky boli nájdené dve skupiny intraerytrocytárnych parazitov patriacich do kmeňa Apicomplexa: hemokocídie rodu *Schellackia* a hemogregariny podobné druhu *Karyolysus lacazei*. Krvné parazity boli mikroskopicky nájdené u 66.4 % (31/48) jašteríc. Zmiešaná infekcia sa vyskytla u 13 jašteríc (27.1 %).

***Schellackia* sp.** Mikroskopicky bolo pozorované jediné štádium parazita - sporozoity s prevalenciou 41.7 % (20/48) a parazitémiou 0.02 % (0.01–0.05 %). Tvar mali okrúhly (Obr. 1A), oválny až pyriformný (Obr. 1B). Cytoplazma sa farbila svetloružovo a jadro tmavofialovo. Výnimočne bolo v cytoplazme parazita pozorované refraktilné teliesko. Celkovo sme získali 30 sekvencií hemokokcií pochádzajúcich z nasatých kliešťov pozbieraných z 13 jašteríc pričom krvné nátery 5 jašteríc boli na hemokokcie negatívne. Fylogenetickou analýzou sme odhalili 13 haplotypov (926 – 1446 párov bází), všetky patriace do rodu *Schellackia*, blízko príbuzných k známej sekvencii *Schellackia* sp. haplotype Ls-A (JX984674).

Karyolysus lacazei bol mikroskopicky pozorovaný s prevalenciou 50 % (24/48) a parazitémiou 0.61 % (0.01–4.24 %) a určený na základe podobnej morfológie s doteraz popísanými nálezmi (Svahn, 1975; Háková-Kočiková a kol., 2014). Rozlíšené boli dve vývojové štádiá. Trofozoity, mladšie štádiá parazita, boli oválneho, reniformného až podlhovastého tvaru s typicky vakuolizovanou cytoplazmou (Obr. 1C). Gamonty štíhleho podlhovastého tvaru mali typicky ohnutý jeden koniec a cytoplazmu bez vakuol (Obr. 1D). Obe štádiá mali svetloružovú cytoplazmu a tmavofialové jadro umiestnené centrálné v celej šírke parazita. Prítomnosť parazita v erythrocyte bola sprevádzaná charakteristickým efektom na hostiteľskú bunku. Molekulárne genetickými metódami boli získané 4 identické sekvencie (929 – 1442 párov bází). Pre fylogenetickú analýzu bola vybraná najdlhšia sekvencia, ktorá vytvorila monofyletickú skupinu spolu so známymi sekvenciami rodov *Karyolysus* (hostitelia čeľadí Lacertidae a Varanidae) a *Hepatozoon* (hostitelia čeľadí Lacertidae a Phyllodactylidae).

Kliešte, z ktorých boli sekvencie získané, pochádzali zo štyroch jašteríc, všetkých mikroskopicky pozitívnych na hemogregariny.



Obrázok 3: Fotomikrogramy. *Schellackia* sp. (A,B), *Karyolysus lacazei* (C,D), merítko 10 μ m.

Diskusia

Použitie krvou nasatých ektoparazitov ako náhradného zdroja k molekulárne genetickej detekcii krvných parazitov v periférnej krvi hostiteľa sa ukázalo ako vhodná a cenná alternatíva. Svedčí o tom získaných 13 nových haplotypov rodu *Schellackia* a jedna unikátna sekvencia hemogregariny. Z výsledkov fylogenetической analýzy nie je možné sekvenciu hemogregariny jednoznačne zaradiť do rodu *Hepatozoon* či *Karyolysus*. Nami získaná sekvencia patrí do monofyletickej skupiny, ktorá je podľa posledných štúdií prezentovaná ako „*Karyolysus* clade“ a zvažuje sa, či by druhy rodu *Hepatozoon* nachádzajúce sa v tejto skupine, nemali byť skôr druhmi rodu *Karyolysus* (Cook a kol., 2016). Vzhľadom k touto prácou získaným a doterajším poznatkom predpokladáme, že nami získaná sekvencia hemogregariny prislúcha druhu *K. lacazei*.

Výhodou nami použitého alternatívneho zdroja DNA je neinvazívnosť voči hostiteľovi, na druhej strane slabými miestami metódy sú viachostiteľský životný cyklus kliešťov a prípadný transštádiálny prenos parazitov.

Záver

Napriek použitiu izolovanej DNA z krvou nasatých ektoparazitov ako náhradného zdroja, sa podarilo získať nové výsledky. Celkovo 13 nových haplotypov doplňuje diverzitu hemokokcií rodu *Schellackia*. Rod *Karyolysus* je u jašterice schreiberovej popísaný prvý krát a získaná sekvencia (1442pb) je viac ako dvakrát dlhšia než doteraz známe sekvencie tohto rodu.

Literatura

COOK, C. A.; NETHERLANDS E. C.; SMIT N. J. Redescription, molecular characterisation and taxonomic re-evaluation of a unique African monitor lizard haemogregarine *Karyolysus paradoxa* (Dias, 1954) n. comb. (Karyolysidae). *Parasites & Vectors*. 2016, vol. 9, issue 347.

DVOŘÁKOVÁ, N.; KVIČEROVÁ, J.; PAPOUŠEK, I.; JAVANBAKHT, H.; TIAR, G.; KAMI, H.; ŠIROKÝ, P. Haemogregarines from western Palaearctic freshwater turtles (genera *Emys*; *Mauremys*) are conspecific with Danilewsky; 1885. *Parasitology*. 2014, vol. 141, issue 4, pp. 522–30.

HAKLOVÁ-KOČÍKOVÁ, B.; HIŽŇANOVÁ, A.; MAJLÁTH, I.; RAČKA, K.; HARRIS, D. J.; FÖLDVÁRI, G.; MAJLÁTHOVÁ, V. Morphological and molecular characterization of *Karyolysus* - a neglected but common parasite infecting some European lizards. *Parasites & Vectors*. 2014, vol. 7, issue 555.

KUBELOVÁ, M.; TKADLEC E.; BEDNÁŘ, M.; ROUBALOVÁ, E.; ŠIROKÝ, P. West-to-east differences of *Babesia canis canis* prevalence in *Dermacentor reticulatus* ticks in Slovakia. *Veterinary Parasitology*. 2011, vol. 180, issue 3–4, p. 191–196.

KVIČEROVÁ, J.; PAKANDL, M.; HYPŠA; V. Phylogenetic relationships among *Eimeria* spp. (Apicomplexa, Eimeriidae) infecting rabbits: evolutionary significance of biological and morphological features. *Parasitology*. 2008, vol. 135, p. 443–452.

MEGÍA-PALMA, R.; MARTÍNEZ, J.; MERINO, S. Molecular characterization of haemococcidia genus *Schellackia* (Apicomplexa) reveals the polyphyletic origin of the family Lankesterellidae. *Zoologica Scripta*. 2014, vol. 3, issue 3, p. 304–312.

STUART-FOX, D.; GODINHO, R.; DE BELLOCQ, J. G.; IRWIN, N. R.; BRITO, J. C.; MOUSSALLI, A.; BAIRD, S. J. E. Variation in phenotype, parasite load and male competitive ability across a cryptic hybrid zone. *PLoS ONE*. 2009, vol. 4, issue 5.

SVAHN, K. Blood parasites of the genus *Karyolysus* (Coccidia, Adeleidae) in Scandinavian lizards. Description and life cycle. *Nortvegian Journal of Zoology*, 1975, vol. 23, p. 277-295.

Kontaktná adresa: Kristína Zechmeisterová; MVDr.; Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat; FVHE FVU Brno; Palackého tř. 1946/1; 612 42 Brno; H17325@vfu.cz.

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	XX. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	144
Vydání:	1.
Rok vydání:	2018
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-799-2