
VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie mléka
Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

A

KOORDINAČNÍ MÍSTO PRO VĚDECKOU A TECHNICKOU
SPOLUPRÁCI S EFSA V ČR, MINISTERSTVO ZEMĚDĚLSTVÍ



XVII. KONFERENCE MLADÝCH
VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ
S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VFU Brno, 27. 5. 2015

Brno 2015

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

ISBN 978-80-7305-758-9

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Vehikula epidemií salmonelóz v České republice v roce 2014 Auerová M., Myšková P., Karpíšková R.	7
Charakteristika patogenních izolátů <i>Escherichia coli</i> z jatečně upravených prasat Křepelová S., Skočková A., Koláčková I., Karpíšková R.	10
Charakteristika kmenů <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA a MSSA) izolovaných z potravinového řetězce v České Republice Koukalová K., Koláčková I., Karpíšková R.	14
Porovnání výsledků izolace bakteriální DNA z faeces drůbeže Jurčeková A., Nesvadbová M., Bořilová G.	17
Stanovenie citlivosti laktobacilov na antimikrobiálne látky významné v humánnej a veterinárnej medicíne Fečkaninová A., Popelka P., Koščová J., Mudroňová D., Jevinová P.	20
Enterotoxin production by <i>Staphylococcus aureus</i> strains isolated from goat colostrum in the Czech Republic Bogdanovičová K., Dušková M., Karpíšková R.	23
Antimicrobial susceptibility of <i>Weissella</i> spp. isolated from cooked ham and manufacturing area Lačanin I., Dušková M., Kameník J., Karpíšková R.	26
Occurrence of <i>Helicobacter</i> spp. in the gastrointestinal tract of broiler chickens in the Czech Republic Przybylová R., Svobodová I., Bořilová G.	29
Qualitative and quantitative properties of chicken's wings from organic and classic production system Abdullah F.A.A., Buchtová H.	32
Nutritional profile and microbiological quality of nigiri sushi meal prepared with different seafood Đorđević Đ., Buchtová H.	35
Porovnanie rozkladných zmien tukov v mäsových výrobkoch počas skladovania Reitznerová A., Nagy J., Turek P., Marciničák S., Mačanga J., Poláková Z.	38
Detekcia prítomnosti rezíduí antimikrobiálnych látok v hydinovom mäse a tkanivách pomocou troch mikrobiálnych inhibičných testov Poláková Z., Kožárová I.	41
Stanovení relativní hodnoty zaplísnění povrchu sýra Osičková R., Bartoň S., Kumbál V.	44
Vplyv selénových doplnkov krmiva na akostné vlastnosti vajec Fašiangová M., Bořilová G., Kumprechtová D., Steinhäuserová I.	47
Detekce porušení medu přehřátím Zábrodská B., Dluhošová S., Borkovcová I., Vorlová L.	50

Senzorická a instrumentální analýza vybraných texturních parametrů rajčatových kečupů	
Tauferová A., Tremlová B.	53
Hodnotenie rizika prieniku potravinového nebezpečenstva do potravín na rozhraní systémov HACCP	
Toropilová J., Bystrický P.	56
SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ	
Využití rakytníkových výlisků (<i>Hippophae rhamnoides</i>) v dietách u užitkových nosnic a jejich vliv na zbarvení vaječného žloutku	
Krejcarová J., Straková E., Suchý P.	61
Změny aminokyselinového spektra pastevních porostů v průběhu vegetačního období	
Vopálenský J., Krejcarová J.	64
SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE	
Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in municipal wastewater treatment plant in Brno	
Oravcová V., Žáková J., Masaříková M., Čížek A., Literák I.	69
Comparative analysis of <i>Escherichia coli</i> sequence type 131 isolates from humans, animals, and the environment	
Jamborová I., Johnson J.R., Dolejská M., Johnston B., Kachlíková K., Clabots C., Mícenková L., Literák I.	72
Characterization of IncX plasmids carrying quinolone and beta-lactam resistance genes in <i>Enterobacteriaceae</i> from various sources and geographic areas	
Dobiasová H., Vojtech J., Dolejska M.	75
Effect of long-term exposure to 17β-estradiol on feedback of important antixodidant and transport mechanisms of <i>Eisenia fetida</i>	
Heger Z., Cernei N., Nemcova B., Beklova M., Adam V., Kizek R.	78
Environmental implications of fluoroquinolone exposure on aquatic ecosystems	
Janecko N., Blahova J., Pokludova L., Svobodova Z., Literak I.	81
Vliv nízkých dávek γ-záření na kachní vejce	
Rulík V.	84
Průkaz vztekliny a přítomnosti těžkých kovů u střeoevropských netopýrů	
Mikšíková M., Bandouchová H., Brichta J., Havelková B., Hrubá H., Kováčová V., Pikula J.	87
What we know about tortoise ticks – are they potential danger?	
Kautman M., Dvořáková N., Široký P.	89
Rickettsial infections in ticks from reptiles, birds and humans in Honduras	
Nováková M., Literák I., Chevez L., Martins T.F., Ogrzewalska M., Labruna M.B.	92

SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA**Sledování koncentrace stopových prvků (Cu, Zn, Se) v srsti lam**

Holasová M., Pechová A., Vyskočilová V. 97

SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT**Vybrané projevy chování telat do 2 hodin po narození**

Vomočilová V., Voslářová E., Bedáňová, I., Večerek V. 103

SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN**Assessment of the hygienic quality of canned fish from the perspective of mercury**

Král T., Blahová J., Sedláčková L., Svobodová Z. 109

Stanovení antikoagulačních roenticidů dvourozměrnou kapalinovou chromatografií

Doubková V., Maršálek P., Modrá H. 112

Vliv T-2 toxinu na vznik oxidačního stresu a hematologické a biochemické ukazatele u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Vakula J., Modrá H., Hostovský M., Šišperová E., Blahová J. 115

Effect of the T-2 toxin on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Matejova I., Palikova M., Faldyna M., Modra H., Svobodova Z. 118

SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD**Parasitosis fish ponds aquaculture lowland areas and possibilities for treatment and prevention**

Madžunkov M. 123

Changes of hematological and immune parameters during proliferative kidney disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Marková Z., Palíková M., Papežíková I., Vojtek L. 126

Effect of the genetic origin on the presence of skeletal deformities and swimbladder anomaly in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L)

Cutáková Z., García-Celdrán M., Armero E. 129

Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Czech Republic

Slezáková R., Bártová E., Nágl I., Sedlák K. 132

Toxoplasmosis and neosporosis in exotic ruminants in the Czech Republic

Kobédová K., Bártová E., Sedlák K., Lamka J. 135

Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera) of hummingbirds

Valan M., Sychra O., Literák I. 138

Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from wild birds in Vietnam

Najer T., Kounek F., Hung N.M., Literák I., Sychra O. 141

Prevalence of antibodies to <i>Encephalitozoon cuniculi</i> in European hares (<i>Lepus europaeus</i>)	
Marková J., Bártová E., Sedlák K.	143
Bacterial skin colonization associated with bats in Europe	
Kovacova V., Bandouchova H., Garcia-Fraile P., Kohoutova E., Kolarik M., Martinkova N., Zukal J., Pikula J.	146
Pseudogymnoascus destructans: evidence of virulent skin invasion for bats under natural conditions, Europe	
Brichta J., Bandouchova H., Bartonicka T., Berkova H., Cerny J., Kovacova V., Kolařík M., Kollner B., Kulich P., Martinkova N., Rehak Z., Turner G.G., Zukal J., Pikula J.	150
Vplyv bioklimatologických faktorov na zdravotný stav hibernujúcich netopierov	
Benkő Z., Ondrejková A., Ondrejka R., Prokeš M., Korytár Ľ.	153
Výskyt vybraných zoonotických bakterií u plazů, drobných savců a ptáků	
Tomáščíková Z., Barazorda Romero S., Knotek Z., Karpíšková R.	156
Klíšť lužní (<i>Haemaphysalis concinna</i>) – podceňovaný vektor?	
Rybářová M., Široký P.	159

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Vehikula epidemií salmonelóz v České republice v roce 2014

Vehicles of *Salmonella* outbreaks in the Czech Republic in 2014

^{1,2}Auerová Markéta, ^{1,3}Myšková Petra, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno

²Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

³Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Summary

Thirty-five *Salmonella* outbreaks were reported in the year 2014. However, only in two outbreaks the vehicles were confirmed and in 15 outbreaks were described as a suspect. The onset of infections arose after eating ready-made meals that contained animal products. One hundred-fifteen human isolates from 12 of outbreaks, which is approximately 15 % of the total number of patients in reported outbreaks, were sent to serotyping and phage typing to the bacteriological laboratory of Veterinary Research Institute in Brno. The most frequent etiological agent of outbreak's cases belonged to *S. Enteritidis* PT8 (8 outbreaks) and PT13 (3 outbreaks). One outbreak caused by *S. Enteritidis* PT14b, which is related to international outbreaks caused by consumption of eggs from Germany, was also reported.

Keywords: *Salmonella*; outbreak; typing; food-stuff

Úvod

Salmonely jsou druhým nejčastějším bakteriálním původcem onemocnění s alimentární cestou přenosu. Po zavedení ozdravných programů v chovech drůbeže a prasat od roku 2003 počet vykazovaných salmonelóz v zemích EU mírně klesá (EFSA, 2015).

Dle statistik je každoročně v zemích EU zaznamenáváno více než 90 000 případů salmonelóz (EFSA, 2014). V ČR se počty hlášených případů salmonelózy od roku 2010 opět zvyšují, a to sice z 8622 v roce 2010 na 13 633 v roce 2014 (EPIDAT, 2014). Baktérie rodu *Salmonella* bývají izolovány ze širokého spektra různých potravinových surovin a hotových pokrmů. Salmonelóza je nejčastěji spojována s konzumací kontaminovaných vajec a vejce obsahujících pokrmů, drůbežího, vepřového a hovězího masa (EFSA, 2014).

V současné době je známo více než 2500 sérotypů salmonel, přičemž v humánní populaci jsou epidemiologicky nejvýznamnějšími sérotypy *Salmonella* Enteritidis a *Salmonella* Typhimurium, které způsobují více než 80 % salmonelóz. Mezi další časté sérotypy salmonel patří *S. Infantis*, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Heidelberg* a *S. Paratyphi* B, které zaujímají cca 3 % z celkově zaznamenaných nálezů (Malorny *et al.*, 2009).

Materiál a metody

V roce 2014 získalo oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství celkem 115 humánních izolátů z 12 epidemických výskytů a 4 izoláty z potravin. Jednotlivé izoláty byly z transportních médií (Amies) vyočkovány na Brilliant green agar (BGA, Oxoid, UK), popřípadě Xylose lysine deoxycholate (XLD, Oxoid, UK) agar a Rambach agar (Merck, Německo).

Ke zjištění daného sérotypu salmonel byla použita metoda sérotypizace sklíčkovou aglutinací s využitím komerčních antisér (BioRad, Francie nebo DenkaSeiken, Japonsko). Reakce byly vyhodnoceny dle Kauffmann-White schématu (Grimont a Weill, 2007). Izoláty náležející k sérotypům *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium a monofazická *Salmonella* Typhimurium byly dále fagotypizovány (Ward *et al.*, Anderson *et al.*, 1977).

Výsledky

V roce 2014 bylo získáno 115 humánních izolátů salmonel. Výsledky typizace salmonel jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Přehled hlášených epidemií v roce 2014, počty humánních případů, počty vyšetřených kmenů a výsledky fágové typizace (EPIDAT, 2014)

Název epidemie	Měsíc	Počet případů/počet vyšetřených kmenů	Vehikulum	Sérotyp	Fágový typ
BIOMEDICA	1	16/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
JN MŠENO	1	42/35	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
DOZP	1	5/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
MIKES	1	8/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
MŠ STÍNADLA	1	27/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
FIALKA14 UH	2	15/13	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
TATARÁK	2	5/2	vejce ^(**)	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
UO-ZDISLAVA	2	30/0	masová pomazánka ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
ZŠ MŠENO	3	84/6	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
ZDIBY	5	25/0	špagety Carbonara ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
OVAR	5	9/0	ovar ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
DUSNI	5/6	11/2	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
ZŠ KOBYLÍ	6	23/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
UL MLÉČNÝ BAR	6	6/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
THALIE	6	12/2	knedlík ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	PT13
OLBRAMOVICE	6	23/0	hotové jídlo ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
FN PEKAŘSKÁ	6	24/16	knedlík ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	PT13
DUKÁT	6	14/3	hotové jídlo ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
CR-PASICKÁ	6	12/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
DS MIROVICKÁ	7	10/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
TU-CERMNA	7	19/2	kuřecí placičky ^(**)	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
VENUŠE ZAJEČÍ	7	18/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
KRŮTA	8	11/0	krůta ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
DD ALŽBĚTINKY	8	10/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
BROUCI	9	12/0	vejce ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
HODY	9	16/0	kančí řízek	<i>S. Enteritidis</i>	
PODOLEC	9	113/6	guláš s těstovinami ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	PT14b
ŠKOLA	9	19/0	hotové jídlo ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
UL DPS V KLIDU	9	18/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
VETR14 UH	9	99/17	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	PT8
VOLF	9	8/0	hotové jídlo ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
EPIDEMIE STATEK	10	8/0	hotové jídlo ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	
MŠ LOUCKÁ	10	20/0	nezjištěno	<i>S. Enteritidis</i>	
MŠ	10	16/11	knedlík ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	PT13
TROSKOTOVICE	10	25/0	svatební koláčky ^(*)	<i>S. Enteritidis</i>	

(*) suspektní vehikulum, (**) potvrzené vehikulum

Diskuze

Laboratoř Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně získala čtyři izoláty z potravin, a to sice tři izoláty ze stěrů z povrchu vajec a jeden izolát z kuřecích placiček. Z celkového počtu 35 epidemií bylo zkoumáno pouze 12, jejichž izoláty náležely k sérotypu *Salmonella* Enteritidis. Epidemie salmonelózy byly ve většině případů způsobeny konzumací hotových pokrmů, které obsahovaly vejce, ale i různé druhy masa. V jednom případě byla epidemie způsobena konzumací cukrářských výrobků. Ve většině případů hromadných výskytů v roce 2014 se vehikulum nákazy nepodařilo dohledat. Suspektní vehikula byla stanovena v 15 případech, přičemž pouze ve dvou z nich se podařilo je potvrdit. Fágovou typizací bylo prokázáno, že 8 epidemií bylo způsobeno bakteriemi *S. Enteritidis* PT8, který je úzce vázaný na populaci drůbeže a v ČR patří mezi nejfrekventovanější fágový typ. V případě epidemie TATARÁK byly získány izoláty přímo ze suroviny použité k přípravě pokrmu, a to sice ze stěrů z povrchu čerstvých vajec. Izolát z potravin byl získán i v případě epidemie TU-

CERMNA. Jednalo se o izolát z kuřecích placiček, ze kterých byl fágovou typizací prokázán fágový typ PT8. Dále byla u tří epidemií prokázána jako původce *S. Enteritidis* PT13, ve všech případech byl jako vehikulum infekce určen knedlík, k jehož přípravě byla použita vaječná melanž. Tento fágový typ vykazoval typickou rezistenci k ampicilinu.

V ČR se rovněž v roce 2014 objevily případy způsobené *S. Enteritidis* PT14b, které pravděpodobně souvisely s nadnárodní epidemií, kde byla zdrojem vejce z Německa. *Salmonella* Enteritidis PT14b způsobila epidemii v 6 zemích EU. Potravinové izoláty byly získané pouze z Francie a z Rakouska. Epidemie byla spojena s konzumací pokrmů připravených z vajec zakoupených v obchodech stejného řetězce. Jednalo se o tiramisu, zmrzlinu, majonézu a čokoládovou pěnu. Vejce pocházela podle epidemiologického šetření z chovu nosnic v Bavorsku (EFSA, 2014).

Závěr

Salmonelóza patří v ČR k druhému nejrozšířenějšímu onemocnění z potravin, a to především z hotových pokrmů, které obsahují nedostatečně tepelně opracovaná vejce nebo různé druhy masa. Manipulace s rizikovými surovinami při přípravě pokrmů, případně jejich skladování za nevhodných teplotních podmínek může vést k nákaze salmonelózou.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem LO1218, MŠMT v rámci programu NPU I.

Literatura

ANDERSON, E. S.; WARD, L. R.; DE SAXE, M. J.; DE SA, J. D. H. Bacteriophage-typing designations of *Salmonella* Typhimurium. *J. Hyg.* 1977. vol.78, no.2, p. 297–300.

EPIDAT .Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2005-2014 - absolutně. Online [cit. 3-3-2015].

Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolute>

EFSA. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany. Online [cit. 6-3-2015].

Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/doc/646e.pdf>

EFSA. *Salmonella*. Online [cit. 31-3-2015].

Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella.htm>

EFSA. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012. Online: [13-3-2015].

Dostupné z: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-zoonoses-food-borne-outbreaks-2012.pdf>

GRIMONT, P. A. D.; WEILL, F.X. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars. WHO Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur, Paris. 2007. 107 pp.

MALORNY, B.; HUEHN, S.; DIECKMANN, R.; KRAMER, N.; HELMUTH, R.; Polymerase chain reaction for the rapid detection and serovar identification in food and feed stuff. *Food analysis method.* 2009. vol. 2, no. 2, p. 81-95.

WARD, L. R.; DE SA J. D. H.; ROWE B. A phage-typing scheme for *Salmonella* Enteritidis. *Epidemiol. Infect.* vol. 99, no. 2, p. 291–294.

Kontaktní adresa: Markéta Auerová, Ing., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, auerova@vri.cz

Charakteristika patogenních izolátů *Escherichia coli* z jatečně upravených těl prasat

Characteristic of isolates pathogenic *Escherichia coli* from pig carcasses

Křepelová Simona, Skočková Alena, Kolářková Ivana, Karpíšková Renáta

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Brno

Summary

Isolates has been obtained from *E. coli* during the monitoring of pig carcasses. The monitoring was conducted by the State Veterinary Administration. Presence of genes typical for individual group – *eae* for enteropathogenic (EPEC), genes for *stx*_{1,2} shiga toxin (STEC) and *aggR*, *aaic* group enteroagregative *E. coli* (EA_{aggEC}) was monitored. Twenty-six isolates were obtained with some of the observed virulence factors. Twenty -five isolates of shiga toxin producing *E. coli* were obtained and only one strain was detected for the combination of genes potentially enterohaemorrhagic *E. coli*. One of the detected isolate has been carried genes for enteropathogenic *E. coli*. No one of the isolates carried the genes, which are characteristic for the enteroagregative group of *E.coli*. *Stx*₁ gene virulence was detected 3 times. The strains with the ability to produce toxins *Stx*₂ subtype 2e (23 times) were detected the most frequently.

Keywords: pathogenic *E. coli*; virulence factors

Úvod

Za hlavní rezervoár patogenních kmenů *E. coli* jsou považovány především potraviny živočišného původu (LEE a kol., 2009). Pro tyto kmeny je charakteristická produkce faktorů virulence, podle kterých rozlišujeme jednotlivé patoskupiny. Významnou skupinou z hlediska onemocnění lidí jsou kmeny s produkcí Shiga toxinů. Rozlišujeme dva základní typy Shiga toxinů - typ 1 a 2. Každý z nich se pak dále dělí na subtypy (*Stx*₁ – a, c, d; *Stx*₂ – a až g). Jednotlivé subtypy se liší i závažností klinických příznaků (PERSSON a kol., 2007; BIELASZEWSKA a kol., 2006). Rizikovou skupinu shigatoxigenních kmenů *E. coli* jsou enterohemoragické kmeny vyvolávající hemoragické kolitidy a hemolyticko-uremický syndrom (HUS). Průjmová onemocnění lidí způsobují i enteroagregativní a enteropatogenní kmeny *E. coli* (RILEY a kol., 1983). Kmeny s faktory virulence mohou být také producenty širokospektrých beta-laktamáz (ESBL) a podílet se tak na šíření antibiotické rezistence (MAREJKOVA a kol., 2011). Cílem této práce bylo charakterizovat detekované izoláty jak z hlediska faktorů virulence, tak i antimikrobiální rezistence.

Materiál a metodika

Odběr a zpracování vzorků

Vzorky byly získány stěrem z JUT prasat na různých porážkách v ČR v rámci monitoringu prováděného Státní veterinární správou (SVS). Základní zpracování vzorků prováděli pracovníci Státních veterinárních ústavů (SVÚ) podle metodického postupu koordinovaného NRL pro oblast *Escherichia coli*. Postup vycházel z normy ISO TS 13136 (ISO 13136, 2012). Izoláty pozitivní na přítomnost genů *stx*_{1,2} a *eae* byly zaslány do NRL pro oblast *E. coli* ke confirmaci.

Typizace izolátů

Metodou PCR byla sledována přítomnost genů pro produkci Shiga toxinů 1,2 a jejich subtypů, genu adhezenčního faktoru intimin *eae* (PATON a kol., 1998; ANONYMOUS, 2013a) a genů *aggR*, *aaic* typických pro EA_{aggEC} (BOISEN a kol., 2012).

Detekce O-sérokupin

Podle metodiky Salajka a kol. (SALAJKA a kol., 1992) byla provedena typizace somatického O-antigenů aglutinací s řadou 70 různých O-antisér. U všech kmenů, kde se nepodařilo určit séroskupinu aglutinací byla provedena sérotypizace metodou PCR (ANONYMOUS, 2013b).

Antibiotická rezistence

Diskovou difúzní metodou byla testována rezistence k 13 terapeuticky významným antimikrobiálním látkám. Stanovení bylo provedeno podle metodiky CLSI (2012), antibiotické disky byly získány od firmy Oxoid (VB). Vyhodnocení bylo provedeno dle kritérií uvedených v CLSI (2012).

Výsledky a diskuze

Z celkově 115 kmenů zaslaných ke confirmaci byla u 26 izolátů potvrzena přítomnost některého ze sledovaných faktorů virulence. Detailní výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1: Charakteristika patogenních izolátů

Patotyp	Detekované geny faktorů virulence	Subtyp	Počet izolátů	Séroskupina	Počet a % izolátů rezistentních k AML	
					Rezistence min. k 1 AML	Multirezistence
STEC	<i>stx₁</i>	1a	1	O146	6 (27 %)	4 (18 %)
		1d	1	O91		
	<i>stx₂</i>	2e	17	O?		
			3	O8		
			1	O112		
			1	O156		
EHEC	<i>eae+stx₁+stx₂</i>	1a,2c,2e	1	O157	0	0
EPEC	<i>eae</i>	-	1	O?	0	1 (100 %)

Poznámka: n=počet rezistentních izolátů, AML = antimikrobiální látka, O? = izolát nepatří k žádné ze 70 sledovaných séroskupin, multirezistence = rezistence k 3 nebo více AML

Z hlediska alimentárních onemocnění jsou velmi významné nálezy shigatoxigenních kmenů. V případě, že tyto kmeny nesou další faktory virulence umožňující adherenci k enterocytům, jako membránový protein intimin (*eae*) nebo další dosud nepříliš dobře popsané, mohou způsobit až život ohrožující onemocnění. Závažnost onemocnění je spojena i se subtypem Shiga toxinu. Uvádí se, že závažnější průběh onemocnění vyvolávají kmeny s produkcí Shiga toxinu 2, konkrétně subtypy Stx2a a Stx2d, ale také subtyp Shiga toxinu 1 – 1a (MATTHEWS a kol., 2013; FENG, REDDY, 2013). Kmeny s geny virulence *stx_{2e}* jsou primárně spojovány s onemocněním prasat (Edémová choroba) a z hlediska zdraví lidí nejsou považovány za rizikové (DEBROY a kol., 2005). Nezbytnou součástí charakterizace kmenů je určení séroskupin. Alimentární onemocnění bylo ve většině případů spojováno s kmeny séroskupiny O157, ale mezi epidemiologicky vysoce významné séroskupiny se dále řadí i O26, O103, O111 a O145 (SMITH a kol., 2015). V souladu s nejnovějšími poznatky se k hodnocení závažnosti nálezů STEC přistupuje na základě přítomnosti specifických subtypů Shiga toxinů a případně faktorů adherence. Z 26 izolátů shigatoxigenních *E. coli* byl v 1 případě detekován kmen se schopností produkce obou Shiga toxinů i s faktory adherence a dále 1 kmen nesoucí vysoce významný subtyp Shiga toxinu (Stx1a), jejichž přítomnost v potravině může způsobit závažné onemocnění člověka. Jedenkrát byl dále detekován izolát

Stx1d. Tyto kmeny ale obvykle vyvolávají pouze lehké průjmy bez závažnějších komplikací. Ve zbývajících 85 % shigatoxigenních kmenů se jednalo o subtyp Stx2e způsobující onemocnění zvířat a jen velmi vzácně onemocnění člověka.

Velmi významným poznatkem je, že JUT prasat jsou rezervoáry rezistentních kmenů *E. coli*. Sledování antimikrobiální rezistence ukázalo, že 15 izolátů (58 %) bylo citlivých ke všem testovaným antimikrobiálním látkám. Rezistence k tetracyklinu i ampicilinu byla stanovena u u tří (11,5 %) izolátů. Rezistenci k více než jedné antimikrobiální látce vykazovalo celkem 5 (19 %) izolátů a fenotypy rezistence byly následující: AMP-SXT-TMP-TET; AMP-STR-SXT-TMP-TET; CMP-STR-KAN-GEN-SXT-TMP-TET; AMP-SXT-TMP-TET-NAL; AMP-AMC-STR-TET.

Závěr

Výskyt shigatoxigenních (STEC) kmenů *E. coli* byl u JUT prasat prokázán, ale většina izolátů nepředstavuje zdravotní riziko pro člověka. U izolovaných kmenů byla potvrzena i přítomnost potenciálně enterohemoragických kmenů *E. coli*. Přestože byl výskyt EHEC velmi nízký, je potřeba při manipulaci se syrovým masem dodržovat základní hygienická pravidla.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem LO1218, MŠMT v rámci programu NPU I.

Literatura

ANONYMUS. Identification and characterization of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by PCR amplification of the main virulence genes. 2013a. Available from: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_01_Rev_0.pdf.

ANONYMUS. Identification of the VTEC serogroups mainly associated with human infections by conventional PCR amplification of O-associated genes. 2013b. Available from: http://www.iss.it/binary/vtec/cont/EU_RL_VTEC_Method_03_Rev_1.pdf.

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. *Clinical Infectious Diseases*. 2006, vol. 43, p. 1160–1167.

BOISEN, N.; SCHEUTZ, F.; RASKO, DA.; REDMAN, JC.; PERSSON, S.; SIMON, J.; KOTLOFF, KL.; LEVINE, MM.; SOW, S.; TAMBOURA, B.; TOURE, A.; MALLE, D.; PANCHLALINGAM, S.; KROGFELT, KA.; NATARO, JP. Genomic characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* form children in Mali. *The Journal of infectious diseases*. 2012, vol. 205, p. 431–444.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S22. 2012, Clinical and Laboratory Standards Institute, USA.

DEBROY, C.; FRATAMICO, PM.; ROBERTS, E.; DAVIS, MA.; LIU, Y. Development of PCR assays targeting genes in O-antigen gene clusters for detection and identification of *Escherichia coli* O45 and O55 serogroups. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, vol. 71, p. 4919–4924.

FENG, PCH.; REDDY, S. Prevalences of Shiga toxin subtypes and selected other virulence factors among shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains isolated from fresh produce. *Division of Microbiology*. 2013, vol. 79, no. 22, p. 6917–6923.

ISO TS 13136. 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. 2012, Geneva: International Organisation for Standardization.

LEE, GY.; JANG, HI.; HWANG, IG.; RHEE, MS. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. *International Journal of Food Microbiology*. 2009, vol. 134, p. 196 – 200.

MAREJKOVÁ, M.; ROHÁČOVÁ, H.; REISINGEROVÁ, M.; PETRÁŠ, PA. Large outbreak caused by a Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain in Germany and one imported case in the Czech Republic. *Zprávy centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)*. 2011, vol. 20, no. 5, p. 4.

PATON, AW.; PATON, JC. Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, vol. 36, p. 598–602.

PERSSON, S.; OLSEN, KEP.; ETHELBERG, S.; SCHEUTZ, F. Subtyping method for *Escherichia coli* Shiga toxin (verocytotoxin) 2 variants and correlations to clinical manifestations. *Journal of Clinical Microbiology*. 2007, vol. 45, p. 2020–2024.

RILEY, LW.; REMIS, RS.; HELGERSON, SD.; MCGEE, HB.; WELLS, JG.; DAVIS, BR.; HEBERT, RJ.; OLCOTT, ES.; JOHNSON, LM. & OTHER AUTHORS. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*. 1983, vol. 308, p. 681–685.

SALAJKA, E.; SALAJKOVÁ, Z.; ALEXA, P.; HORNICH, M. Colonization factor different from K88, K99, F41 and 987P2 in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from postweaning diarrhea in pig. *Veterinary Microbiology*. 1992, vol. 32, p. 163-175.

SMITH, JL.; FRATAMICO, PM.; LAUNICHI, NR. Update on non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* as a foodborne pathogen: analysis and control. *Advances in Microbial Food Safety*. 2015, vol. 2, p. 3–32.

Kontaktní adresa: Simona Křepelová, Ing. Mgr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 296/70 621 00 Brno Czech Republic, email: krepelova@vri.cz

Charakteristika kmenů *Staphylococcus aureus* (MRSA a MSSA) izolovaných z potravinového řetězce v České republice

Characterization of *Staphylococcus aureus* (MRSA and MSSA) isolated from the food chain in the Czech Republic

^{1,2}Koukalová Kateřina, ²Kolářková Ivana, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Summary

Staphylococcus aureus is an important human and animal pathogen. The aim of this study was to investigate the properties of strains of *Staphylococcus aureus* (methicillin resistant *S. aureus* - MRSA and methicillin-sensitive *S. aureus* - MSSA) isolated from the food chain of Czech Republic. For all isolates was investigated antimicrobial resistance by disk diffusion method and the ability of production staphylococcal enterotoxins by PCR. Within the file MRSA characteristics were monitored separately for sequence type 398 (ST398), which is a typical representative of MRSA in food animals. The study included 61 strains of MRSA and 433 MSSA strains. By comparing the two groups was found that MRSA strains are characterized by multiple resistance and MRSA ST398 absence of genes responsible for the production of staphylococcal enterotoxins.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; resistance; enterotoxins

Úvod

Staphylococcus aureus je významným patogenem lidí i zvířat. Aby bylo možné minimalizovat kontaminaci a šíření *S. aureus* v potravinovém řetězci je důležité charakterizovat izolované kmeny. Mezi základní charakteristiky *S. aureus* patří přítomnost genů rezistence k antimikrobiálním látkám a potencionální schopnost produkce stafylokokových enterotoxinů (SE). Stále větší pozornost je věnována výskytu meticilin rezistentních kmenů *S. aureus* v potravinovém řetězci, které se vyznačují častou rezistencí k více antimikrobiálním látkám. Většina těchto kmenů patří ke klonálnímu komplexu ST398. Cílem této studie bylo sledování rozdílů ve vlastnostech izolátů MSSA, MRSA ST398 a MRSA jiných sekvenčních typů a stanovení různé míry nebezpečí při kontaminaci potravin.

Materiál a metody

Celkem bylo srovnáno 61 kmenů MRSA (43 MRSA ST398 a 18 MRSA jiných sekvenčních typů) a 433 MSSA. Kmeny pochází ze sbírky VFU Brno a VÚVeL Brno a byly izolovány ze vzorků odebraných v potravinovém řetězci ČR. *S. aureus* byl ze vzorků izolován postupem doporučeným v rozhodnutí Evropské komise 2008/55/EC. Typické kolonie byly ze selektivních agarů vyočkovány na půdu s přidavkem 5 % ovčí krve (Labmediaservis, CZ) a uchovány pro následnou charakterizaci. Suspektní kolonie byly potvrzeny metodou PCR, kterou byla detekována přítomnost specifických fragmentů *S. aureus* (Martineau *et al.*, 1998), MRSA (Oliveira and de Lencastre, 2002) a MRSA sekvenčního typu 398 (van Wamel, 2010). U každého kmene *S. aureus* bylo provedeno stanovení přítomnosti genů *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei*, *sej* metodou multiplex PCR (Monday *et al.*, 1999 a Løvseth *et al.* 2004) a testování rezistence ke 12 antimikrobiálním látkám (tabulka 1) diskovou difúzní metodou, výsledky byly interpretovány dle kritérií Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Výsledky a diskuse

První část studie byla věnována citlivosti k antimikrobiálním látkám (AML). Rezistenci vykazovaly nejen kmeny MRSA, ale i kmeny MSSA, u nichž se však četnost rezistence

k jednotlivým sledovaným látkám pohybuje pod 5 %. Mezi kmeny MRSA se často vyskytuje multirezistence (rezistence k více než 3 různým skupinám antibiotik). S výjimkou 2 kmenů jsou multirezistentní všechny testované kmeny MRSA. Přehled výsledků uvádí tabulka 1. Ve srovnání s našimi výsledky je překvapující studie z Číny (Wang *et al.*, 2015), kde lze předpokládat jinou strategii zacházení s antimikrobiálními látkami než v zemích EU. Čínská studie uvádí přítomnost multirezistentních kmenů u 73,5 % MRSA a až u 63,3 % MSSA. Je zarážející, že rozdíl v citlivosti k antimikrobiálním látkám u MRSA a MSSA je menší než v naší studii nebo v datech za celou EU (EFSA, 2012). V čínské studii je např. ke klindamycinu rezistentních 67,0 % MSSA a rezistence k ciprofloxacinu je dokonce častější u MSSA (49,2 %) než u MRSA (23,5 %).

Tabulka 1: Rezistence kmenů MRSA ST398, MRSA nonST398 a MSSA k vybraným AML

Antimikrobiální látka (skupina)	MRSA (n=61)		MSSA (n=433)
	ST398 (n=43)	non ST398 (n=18)	
OX (β -laktamy)	43 (100,0 %)	18 (100 %)	0
TE (tetracykliny)	41 (95,3 %)	10 (55,6 %)	46 (8,3 %)
E (makrolidy)	28 (65,1 %)	9 (50,0 %)	27 (4,5 %)
SXT (kotrimoxazol)	6 (14,0 %)	3 (16,7 %)	1 (0,2 %)
AMC (inhibitory β -laktamáz)	37 (86,0 %)	11 (61,1 %)	28 (4,8 %)
CN (aminoglykosidy)	7 (16,3 %)	2 (11,1 %)	7 (1,7 %)
DA (linkosamidy)	37 (86,0 %)	4 (22,2 %)	21 (3,1 %)
C (amfenikoly)	1 (2,3 %)	0	2 (0,5 %)
CTX (β -laktamy)	42 (97,7 %)	16 (88,9 %)	0
CIP (fluorochinolony)	37 (86,0 %)	1 (5,6 %)	13 (1,7 %)
FOX (β -laktamy)	22 (51,2 %)	11 (61,1 %)	1 (0,2 %)
RD (ansamyciny)	0	2 (11,1 %)	0
Minimálně 1 rezistence	43 (100 %)	18 (100 %)	95 (22 %)

Počet kmenů (n), sekvenční typ (ST), rezistence (R), oxacilin (OX), tetracyklin (TE), erytromycin (E), kotrimoxazol (SXT), amoxicilin/ klavulanová kyselina (AMC), gentamycin (CN), klindamycin (DA), chloramfenikol (C), cefotaxim (CTX), ciprofloxacín (CIP), cefoxitin (FOX), rifampicin (RD)

Ve druhé části studie byla pozornost zaměřena na přítomnost genů kódujících produkci stafylokokových enterotoxinů. Geny byly u kmenů detekovány jak jednotlivě, MRSA 3 (4,9 %) a MSSA 23 (5,3 %) tak v kombinacích, MRSA (14,7 %) a MSSA 28 (6,4 %). Nálezy shrnuje tabulka 2. Naše výsledky přítomnosti genů stafylokokových enterotoxinů odpovídají zjištěním Cai Yongwe (2007). Tato studie uvádí, že MRSA kmeny nesou častěji SE geny než MSSA, neuvádí však výskyt genů u MRSA ST398.

Tabulka 2: Počet kmenů MRSA ST398, MRSA non ST398 a MSSA nesoucích geny pro produkci stafylokokových enterotoxinů včetně zjištěných kombinací

enterotoxinový gen	MRSA (n=61)		MSSA (n=433)
	ST398 (n=43)	non ST398 (n=18)	
<i>sea</i>	0	0	1
<i>sea, seb, sed, sej</i>	0	0	1
<i>sea, seh</i>	0	0	1
<i>seb</i>	0	1	1
<i>sec</i>	0	0	2
<i>sec, seg, sei</i>	0	1	2
<i>sed, seg</i>	0	0	2
<i>seg</i>	0	0	5
<i>seg, sei</i>	0	7	22
<i>seg, sei, sej</i>	0	1	0
<i>seh</i>	1	1	3
<i>sei</i>	0	0	10
<i>sej</i>	0	0	1
Celkem	12 (19,6 %)		51 (11,7 %)

počet vzorků (n)

Závěr

Kmeny MRSA vykazovaly častěji rezistenci i multirezistenci ve srovnání s MSSA, z toho nejvyšší spektrum rezistence a její nejvyšší četnost byla zaznamenána u skupiny MRSA ST398. Geny kódující produkci stafylokokových enterotoxinů byly prokázány jak ve skupině MSSA, tak i u MRSA, ale především u kmenů non ST398. V souboru MRSA ST398 byla schopnost produkce toxinu potvrzena pouze u jednoho kmene a to schopnost produkce enterotoxinu H. Vlastnosti kmenů MRSA a MSSA se výrazně liší jak rezistencí k antimikrobiálním látkám, tak svým enterotoxigenním potenciálem.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem NAZV QJ1210284 a projektem IG 252341.

Literatura

Commission Decision of 20 December 2007 concerning a financial contribution from the Community towards a survey on the prevalence of *Salmonella* spp. and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in herds of breeding pigs to be carried out in the Member States. Official Journal of the European Union (notified under document number C (2007) 6579). 2008/55/EC.

DENGFENG, W.; ZHICAI, W.; ZUOTING, Y.; JIANYONG, W.; TARIQ, A.; JIANJUN, L.; YANLI, L.; BO, H. Bovine mastitis *Staphylococcus aureus*: Antibiotic susceptibility profile, resistance genes and molecular typing of methicillin-resistant and methicillin-sensitive strains in China. *Infection Genetics and Evolution*. 2015, vol. 31, no. 4, s. 9-16.

LØVSETH, A.; LONCAREVIC, S.; BERDAL, K.G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, vol. 42, no. 8, s. 3869-3872.

MARTINEAU, F., PICARD, F.J.; ROY, P.H.; OUELLETTE, M.; BERGERON, M.G. Species-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998, vol. 36, no. 3, s. 618-623.

MEHNDIRATTA, P.L.; BHALLA, P. Typing of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: A technical review. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 2012, vol. 30, no. 1, s. 16-23.

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*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002, vol.46, no. 7, s. 2155-2161.

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010 [online]. 2012-03-08 [cit. 2015-02-02]. Dostupný na [www: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf>](http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2597.pdf).

VAN WAMEL; W.J.B.; HANSENOVÁ MAŇÁSKOVÁ, S.; FLUIT, A.C; VERBRUGH, H.; de NEELING, A.J.; van DUIJKEREN, E.; van BELKUM, A. Short term micro evolution and PCR-detection of methicillin -resistant and susceptible *S. aureus* sequence type 398. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2010, vol. 29, no. 3, s. 119-122.

Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012, vol. 32, no. 3, M100-S22.

Kontaktní adresa: Kateřina Koukalová, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13014@vfu.cz; Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 296/70 621 00 Brno, koukalova@vri.cz.

Porovnání výsledků izolace bakteriální DNA z faeces drůbeže

Comparison of results isolation of bacterial DNA from poultry faeces

Jurčková Alena^{1,2}, Nesvadbová Michaela^{1,2}, Bořilová Gabriela^{1,2}

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²CEITEC— Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences
Brno, Palackého tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

Summary

The quality and purity of the extracted DNA has a significant influence on the success of subsequent molecular diagnostics. The aim of this study was to evaluate and compare the effectivity of bacterial DNA isolation from poultry faeces in native and diluted state. For this purpose we used 9 commercial isolation kits, isolation boiling and phenol-chloroform extraction. The most suitable extraction procedure was selected based on resulting concentration bacterial DNA, ratio of absorbance, agarose gel electrophoresis of DNA and polymerase chain reaction (PCR). The results show that for the extraction of bacterial DNA from faeces samples are preferable kits based on the principle binding DNA to columns than conventional silicate phenol-chloroform extraction or isolation boiling. The yield and quality of the bacterial DNA was in both sample types (native, diluted reces) nearly identical. Results of evaluation of monitored parameters proved as the most effective kits for isolation from feces QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU), DNeasy Blood and Tissue Kit (QIAGEN, DEU) and Power Food Microbial DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories, USA). Using of suitable DNA extraction kits or methods of isolation is important for successful and valid PCR studies from clinical, experimental and environmental samples.

Keywords: bacterial DNA; extraction DNA; purity and quantity DNA; poultry

Úvod

Izolace DNA je důležitým primárním krokem řady molekulárně genetických metod a její podstata spočívá v získání DNA v dostatečném množství a kvalitě. Získání bakteriální DNA ze vzorků faeces je problematické především díky rozmanité střevní mikroflóře, rozdílné konzistenci vzorku a složení faeces. Mimoto kvantita a kvalita extrahované DNA může být ovlivněna inhibitory ze vzorků faeces (např. hem, bilirubin, žlučové soli a sacharidy), které mohou negativně ovlivňovat následující genetické analýzy, jako je identifikace patogenů pomocí PCR (Holland *et al.*, 2000). V této studii byla porovnána relativní účinnost extrakce bakteriální DNA z faeces za použití 9 komerčních kitů, fenol-chloroformové izolace a izolace varem. Kvalita extrakce bakteriální DNA byla posouzena PCR analýzou, hodnocením koncentrace DNA, poměry absorbance (A260/A280) a vizualizací extrahované DNA na agarózovém gelu.

Materiál a metody

Jako výchozí vzorek studie byl použit sterilně odebraný obsah střev brojlerových kuřat. Část vzorků byla zpracována v nativním stavu, část byla ředěna ve fyziologickém roztoku. Oba typy vzorků byly homogenizovány za použití zirkonových kuliček o průměru 1,5 mm v BeadBlaster™ 24 Homogenizer (Benchmark, USA). Bakteriální DNA byla izolována 9 komerčními kity, kde bylo postupováno dle pokynů výrobce, izolací varem a fenol-chloroformovou extrakcí. Získané výsledné izoláty bakteriální DNA byly hodnoceny pomocí spektrofotometrického měření NanoDrop2000 (Thermo Scientific, USA), agarózovou gelovou elektroforézou a PCR. Primery a podmínky PCR byly převzaty od Eyers *et al.* (1993) a Fermér a Engvall (1999).

Výsledky a diskuze

Výsledky jednotlivých námi použitých postupů izolace DNA jsou přehledně zpracovány v tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledky poměru absorbancí (A260/A280) (Abs.), koncentrace [ng/μl] (Conc.), elektroforetické vizualizace (Elfo) a PCR u použitých izolačních postupů.

	Nativní faeces				Ředěné faeces				Způsob izolace
	Abs.	Conc.	Elfo	PCR	Abs.	Conc.	Elfo	PCR	
1	1,52	55,9	✓	✓	1,54	31,5	✓	✓	kolona
2	2,04	83,0	✓	✓	2,01	21,4	✓	✓	kolona
3	2,02	109,3	✓	✓	1,92	54,3	✓	✓	kolona
4	1,33	172,7	x	x	1,27	31,6	x	x	var
5	1,91	1,8	✓	✓	1,84	3,2	x	x	kolona
6	1,20	52,2	x	x	2,01	35,1	✓	✓	kolona
7	1,43	755,7	x	x	1,37	722,2	x	✓	var
8	1,87	85,5	✓	✓	1,86	63,0	✓	✓	kolona
9	1,53	37,7	✓	x	1,68	11,4	✓	✓	kolona
10	1,85	42,6	✓	✓	1,59	7,4	✓	✓	kolona
11	1,36	884,3	x	x	1,48	314,5	x	x	fenol-chloroform

1-Isolate Fecal DNA Kit (Bioline, UK); 2-QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU); 3-Dneasy Blood a Tissue Kit (QIAGEN, DEU); 4-mericon DNA Bacteria Kit (QIAGEN, DEU); 5-Bacterial Genomic DNA Isolation Kit (Norgen Biotek, CAN); 6-GenElute Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, USA); 7-izolace varem; 8-Power Food Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio, USA); 9-UltraClean Fecal DNA Isolation Kit (MO Bio, USA); 10-PowerBiofilm DNA Isolation Kit (MO Bio, USA); 11-fenol - chloroformová izolace

Z těchto dat vyplývá, že k izolaci bakteriální DNA z faeces drůbeže jsou vhodnější metody založené na principu vazby DNA na kolonu. V naší studii bylo použito 9 komerčně dostupných kitů, které jsou primárně určeny k izolaci DNA z různých matric, včetně faeces - kit Isolate Fecal DNA Kit (Bioline, UK), QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU) a UltraClean Fecal DNA Isolation Kit (MO Bio, USA). Jako nejefektivnější postupy získávání DNA vysoké kvality a kvantity ze vzorků faeces v nativním stavu i ze vzorků, které byly zředěny ve fyziologickém roztoku, byly po zhodnocení všech sledovaných parametrů vyhodnoceny kity QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU), Dneasy Blood a Tissue Kit (QIAGEN, DEU) a Power Food Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio, USA). Tyto výsledky korespondují také s výsledky studie McOrist *et al.* (2002), která hodnotí kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU) primárně určený k izolaci DNA z čerstvých, tak i zamražených vzorků faeces jako nejúčinnější metodu extrakce bakteriální DNA. Kit Dneasy Blood a Tissue Kit (QIAGEN, DEU) je primárně určen k izolaci DNA z čerstvých nebo zmrazených živočišných tkání, buněk, krve nebo bakterií a kit Power Food Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio, USA) k izolaci mikrobiální genomické DNA z potravin. Tyto výsledky dále ukazují, že k izolaci bakteriální DNA z námi použitých matric je možné a vhodné použít také kity, které nejsou primárně určeny k izolaci bakteriální DNA ze vzorků faeces. Přestože Nelson *et al.* (2010) ve své studii spolehlivě získal dostatečné množství kvalitní bakteriální DNA z faeces pomocí fenol-chloroformové extrakce srovnatelné s

komerčně dostupnými kity, ostatní námi použité postupy (fenol-chloroformová extrakce, izolace varem a mericon DNA Bacteria Kit (QIAGEN, DEU)), jejichž principem je lyze buněk za použití vysokých teplot, příp. fenol-chloroformu a odstranění nadbytečných komponent pomocí centrifugace, se dle výsledků této analýzy jeví jako nejméně vhodné. Naměření velmi vysokých hodnot koncentrace DNA u některých vzorků souvisí s chybným nadhodnocením výsledku měření způsobeného přítomností organických nečistot, proteinů či RNA, které adsorbují při 260 nm; naměřené hodnoty absorbancí (>1,5) také naznačují kontaminaci získané DNA organickými látkami, RNA nebo proteiny. Mimo to ani elektroforetická vizualizace izolované DNA a následná PCR neprokázaly přítomnost bakteriální DNA v získaném izolátu, což je velmi pravděpodobně způsobeno nedokonalým odstraněním všech kontaminujících komponent heterogenního vzorku.

Závěr

Výsledky studie prokázaly nejvyšší efektivitu izolace bakteriální genomové DNA z faeces drůbeže pomocí kitů QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, DEU), Dneasy Blood a Tissue Kit (QIAGEN, DEU) a Power Food Microbial DNA Isolation Kit (MO Bio, USA). Velmi dobře byly hodnoceny i další komerční kity, které jsou založeny na principu vazby DNA na silikátovou kolonu, a z toho vyplývá, že k izolaci bakteriální DNA z faeces jsou tyto metody vhodnější než klasické fenol-chloroformové izolace nebo izolace varem. Ekonomické hledisko, stejně jako primární určení kitu, nejsou hlavními parametry při výběru optimálního způsobu izolace. Zásadním ukazatelem musí být vždy kvalita a kvantita extrahované nukleové kyseliny z příslušné matrice. Použití vhodných DNA extrakčních kitů nebo metod izolace je důležité pro úspěšné a platné studie PCR na klinických, experimentálních a environmentálních vzorcích. Doporučujeme vybírat extrakční techniky pečlivě, zejména s ohledem na typ vzorku.

Poděkování

Tato práce vznikla díky projektu „CEITEC – Středoevropský technologický institut“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje a z finanční podpory projektu IGA 7/2013/FVHE.

Literatura

EYERS, M.; CHAPELLE, S.; VAN CAMP, G.; GOOSSENS, H.; DE WACHTER, R. Discrimination among thermophilic *Campylobacter* species by polymerase chain reaction amplification of 23S rRNA gene fragments. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993, vol. 31, no. 12, s. 3340–3343.

FERMÉR, C.E.; ENGVALL, O. Specific PCR Identification and Differentiation of the Thermophilic *Campylobacters*, *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, and *C. upsaliensis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999, vol. 37, no. 10, s. 3370–3373.

HOLLAND, J.L.; LOUIE, L.; SIMOR, A.E.; LOUIE, M. PCR Detection of *Escherichia coli* O157:H7 Directly from Stools: Evaluation of Commercial Extraction Methods for Purifying Fecal DNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, vol. 38, no. 11, s. 4108–4113.

MCORIST, A.L.; JACKSON M.; BIRD, A.R. A comparison of five methods for extraction of bacterial DNA from human faecal samples. *Journal of Microbiological Methods*. 2002, vol. 50, no. 2, s. 131–139.

NELSON, E.A.; PALOMBO, E.A.; KNOWLES, S.R. Comparison of methods for the extraction of bacterial DNA from human faecal samples for analysis by real-time PCR. *Current research, technology and education topics in applied microbiology and microbial biotechnology / A. Mendez-Vilas (ed.)*. 2010, vol. 2, s. 1479–1485.

Kontaktní adresa: Alena Jurčeková, Ing., Ústav hygieny a technologie masa, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, jurcekovaa@vfu.cz

Stanovenie citlivosti laktobacilov na antimikrobiálne látky významné v humánnej a veterinárnej medicíne

Determination of antibiotic susceptibility of lacobacilli to antimicrobials important in human and veterinary medicine

Fečkaninová Adriána, Popelka Peter, Koščová Jana, Mudroňová Dagmar, Jevinová Pavlína

Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Košice

Summary

*In recent years, the absence of acquired antimicrobial resistance has become an important criterion to evaluate the biosafety of lactobacilli used as probiotic cultures. The aim of this study was to determine the susceptibility of the six Lactobacilli (*L. paraplantarum*, *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. plantarum*, *L. plantarum*, *L. brevis*) isolated from the intestinal contents of rainbow trout to antimicrobials important in human and veterinary medicine (ampicillin, erythromycin, gentamicin, chloramphenicol, kanamycin, clindamycin, streptomycin, tetracycline and vancomycin). Profile of antibiotic resistance of lactobacilli was obtained using qualitative disc diffusion method and E-test. Most strains were sensitive to five antibiotics. All lactobacilli showed resistance to kanamycin and vancomycin.*

Keywords: *Lactobacillus spp.; antimicrobial resistance; rainbow trout*

Úvod

Laktobacily patria medzi najčastejšie používané produkčné mikroorganizmy pre prípravu probiotík. Kritériom bezpečnosti pre využívanie probiotík v praxi má byť skutočnosť, že probiotické mikroorganizmy by nemali zvyšovať už existujúce riziká antibiotickej rezistencie spojenej s normálnou mikroflórou v čreve alebo v potravinách. Gény rezistencie sú rozširované horizontálne medzi baktériami zo suchozemských zvierat, rýb, ľudí a okrem toho sú prítomné vo vonkajšom prostredí.

Materiál a metódy

V pokuse bolo použitých šesťdesiat kusov pstruha dúhového (*Oncorhynchus mykiss*) vylovených zo sádky rybochovného zariadenia v Diviakoch firmy Rybárstvo Požehy s.r.o. Celkovo v tejto práci bolo zahrnutých šesť baktérií mliečneho kvasenia izolovaných z črevného obsahu rýb, ktoré patrili do rodu *Lactobacillus* a zahŕňali druhy: *L. plantarum* (n = 3), *L. paraplantarum* p (n = 1), *L. fermentum* (n = 1), *L. brevis* (n = 1). Na identifikáciu izolovaných kyslomliečnych baktérií sme použili hmotnostnú spektrometriu s laserovou desorpciou a ionizáciou za účasti matrice s preletovým analyzátorom (MALDI-TOF MS) (Ultraflex III, Bruker Daltonics).

Testovanie citlivosti laktobacilov na antimikrobiálne látky

Na stanovenie antibiotickej citlivosti sme použili diskovo difúznou metódu (Oxoid, VB) a E-test (Liofilchem®, Italy). Diskovo-difúzna metóda využíva difúzne vlastnosti antibiotík z papierových diskov. Bolo použitých 9 antibiotík, ktoré doporučuje k testovaniu EFSA (EFSA, 2012), konkrétne ampicilín (10µg), vankomycín (30 µg), gentamicín (15 µg), kanamycín (30 µg), streptomycín (30 µg), erytromycín (15 µg), klindamycín (10µg), tetracyklín (30 µg), chloramfenikol (30 µg). Suspenziu príslušného kmeňa (0,1 ml) v exponenciálnej fáze rastu sme rovnomerne rozotreli po povrchu MRS agaru a nechali vsiaknuť do média. Na takto pripravené platne sme sterilnou pinzetou ukladali disky jednotlivých antibiotík. Platne boli kultivované anaeróbne pri 37 °C po dobu 48 hodín. Po skončení inkubácie sme odmerali

veľkosti priemerov zón inhibície, podľa ktorých sme vyhodnotili testované laktobacily ako citlivé (C), intermediárne citlivé (IC) alebo rezistentné (R) podľa Charteris et al. (1998).

E-test je kvantitatívnou modifikáciou diskovej difúznej metódy. K testovaniu sme použili 48 hodinovú kultúru, z ktorej sme pripravili bakteriálnu suspenziu s turbiditou rovnou 0,5. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice ($\approx 5 \times 10^5$ KTJ/ml). Na povrch agaru zloženého z ISO agaru (90 %) + MRS agaru (10 %) sme aplikovali rozterom suspenziu príslušného kmeňa (0,1 ml). Prúžky E-testu sme umiestnili na vysušené platne. Rovnako ako pri diskovo difúznej metóde sme použili antibiotiká, ktoré doporučuje k testovaniu EFSA (EFSA, 2012) o koncentrácii 0,016-256 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ s výnimkou streptomycínu o koncentrácii 0,064-1024 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Platne boli inkubované pri 37 °C po dobu 48 hodín. Minimálne inhibičné koncentrácie (MIC) boli odčítané priamo z testovacieho prúžku podľa pokynov výrobcu. MIC jednotlivých bakteriálnych kmeňov boli vyhodnotené za rezistentné (R) alebo citlivé (C) na základe mikrobiologických hraničných hodnôt, ktoré definovala FEEDAP (Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed) (EFSA, 2012).

Výsledky

Tabulka 1: Stanovenie citlivosti laktobacilov na antibiotiká diskovo difúznou metódou/E-testom.

	AMP	CH	CD	CN	E	KAN	STR	TE	VA
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	C/C	C/C	C/C	R/C	C/C	R/R	R/C	IC/C	N/N
<i>Lactobacillus plantarum</i>	C/C	C/C	C/C	R/C	C/C	R/R	N/N	IC/C	N/N
<i>Lactobacillus fermentum</i>	C/C	C/C	C/C	R/C	C/C	R/R	R/C	IC/C	N/N
<i>Lactobacillus plantarum</i>	C/C	C/C	C/C	R/C	C/C	R/R	N/N	IC/C	N/N
<i>Lactobacillus plantarum</i>	C/C	C/C	C/C	R/C	C/C	R/R	N/N	IC/C	N/N
<i>Lactobacillus brevis</i>	C/C	C/C	C/R	C/C	C/C	R/R	IC/C	IC/C	N/N

AMP – ampicilín, CH – chloramfenikol, CD – klindamycín, CN – gentamycín, E – erytromycín, KAN – kanamycín, STR – streptomycín, TE – tetracyklín, VA – vankomycín, C – citlivý, IC – intermediárne citlivý, R – rezistentný, N – nevyžadované hodnoty

Diskusia

Antimikrobiálna citlivosť je jedným zo selekčných kritérií pre výber vhodného kandidáta probiotík. S cieľom získať čo najviac informácií o citlivosti laktobacilov na antibiotiká (ATB) sme sa rozhodli použiť v pokuse kvalitatívnu diskovo difúznou metódu a kvantitatívnu metódu E-test. Všetky kmene laktobacilov oboma metódami preukázali citlivosť na ampicilín, chloramfenikol, klindamycín, erytromycín a tetracyklín. Rozdielne výsledky citlivosti na ATB u jednotlivých kmeňov medzi metódami môžu byť zapríčinené dĺžkou inkubácie. Strata antibakteriálnej aktivity nestabilných ATB môže nastať po inkubácii, pri ktorej subinhibičné koncentrácie môžu podporiť vznik rezistentných kmeňov počas predĺženej inkubácie (Herra, Cafferkey, Keane, 1995). Toto tvrdenie potvrdili Mayrhofer a kol. (2008) pri použití erytromycínu a klindamycínu, na ktoré boli rezistentné bakteriálne kmene po 48 hod. inkubácie, ale nie po 24 hod. inkubácie. Aj keď striktne homofermentatívne laktobacily sú citlivé na vankomycín, mnoho kmeňov ako napr. *L. plantarum*, *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. confusus* a *L. leichmannii* sú prirodzene rezistentné voči tomuto ATB vzhľadom na prítomnosť enzýmu D-alanín ligáza (Elisha a Courvalin, 1995). Oboma metódami sme zaznamenali rezistenciu všetkých kmeňov na kanamycín. V práci Zhou a kol. (2005) bola rezistencia na kanamycín pozorovaná hlavne u laktobacilov. Aj v štúdií Belicová, Mikulášová, Dušínský (2013) zaznamenali vysoké percento izolátov *Lactobacillus plantarum* rezistentných na kanamycín. Probiotické kmene rezistentné voči ATB môžu mať aj prínos počas podávania antibiotík v chove rýb a to tým, že sa neporuší prospešná mikroflóra rýb

(Kim a Austin, 2008). Avšak je potrebné zabezpečiť, aby sa táto rezistencia neprenášala prostredníctvom plazmidov (Pérez-Sánchez a kol., 2011).

Záver

Výsledky našej práce poukazujú na to, že laktobacily môžu byť rezistentné k antimikrobiálnym látkam. Stanovenie citlivosti probiotických kmeňov na ATB je jedným zo selekčných kritérií pre výber vhodného kandidáta probiotík pre využitie v akvakultúre. Bezpečnosť týchto probiotických kmeňov je veľmi dôležitá, pretože je možný horizontálny prenos génov rezistencie na iné baktérie.

PodĎakovanie

Práca bola spracovaná s podporou grantu Ministerstva školstva, vedy, výskumu a športu Slovenskej republiky VEGA 1/0067/13.

Literatúra

BELICOVÁ, A.; MIKULÁŠOVÁ, M.; DUŠINSKÝ, R. Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese. *BioMed Research International*. 2013, vol. 2013, 8 p.

ELISHA, B.G.; COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus* spp. *Gene*. 1995, vol. 152, no. 1, p. 79–83.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY (EFSA). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. EFSA Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP). *EFSA Journal*. 2012, vol. 10, no. 6, 10 p.

HERRA, C. M.; CAFFERKEY, M. T.; KEANE, C. T. The in-vitro susceptibilities of vaginal lactobacilli to four broad-spectrum antibiotics, as determined by the agar dilution and Etest methods. *J. Antimicrob. Chemother.* 1995, vol. 35, p. 775–783.

CHARTERIS W. et al. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. In *Journal of Food Protection*. 1998, vol. 61, p. 1636–1643.

KIM, D. H.; AUSTIN, B. Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Letters in Applied Microbiology*. 2008, vol. 47, p. 141-147.

MAYRHOFER S. et al. Comparison of Broth Microdilution, Etest, and Agar Disk Diffusion Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of *Lactobacillus acidophilus* Group Members. *Applied and environmental microbiology*. 2008, vol. 74, no. 12, p. 3745–3748.

PÉREZ-SÁNCHEZ, T. et al. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *Journal of Fish Diseases*. 2011, vol. 34, p. 499–507.

ZHOU, J. S. et al. Antibiotic susceptibility profiles of new probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Strains. *International Journal of Food Microbiology*. 2005, vol. 98, no. 2, p. 211–217.

Kontaktná adresa: Adriána Fečkaninová, Mgr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, e-mail: Adriana.Feckaninova@student.uvlf.sk

Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from goat colostrum in the Czech Republic

¹Bogdanovičová Kateřina, ^{1,2}Dušková Marta, ²Karpíšková Renáta

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

²Veterinary Research Institute, Brno, CZ

Summary

The aim of this study was to monitor *S. aureus* growth and toxin production in goat colostrum. In total, 139 samples were collected and investigated in period from January to February 2015 in the Czech Republic. Detection of *S. aureus* was carried out according to ISO 6888-1. Altogether, 79 (56.8%) positive samples were detected. A total of 79 *S. aureus* isolates were characterised for production of staphylococcal enterotoxins (SEs) SEA-SEE and SEH by multiplex PCR according to Løvseth *et al.* (2004). A total 24 (30.4%) *S. aureus* isolates carrying some of the enterotoxin gene tested were obtained. In our study, the 13 (16.5 %) of these isolates were potentially able to produce the classical enterotoxins SEA-SEE, which are the leading cause of foodborne diseases. No genes encoding the production of SEs were identified in 55 (69.6%) samples. Since consumption of goat colostrum and products from goat colostrum may pose health risks to consumers, the aim of this study was to investigate the bacteriological quality and safety of this product.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; goat colostrum; enterotoxins

Introduction

Public health problems associated with consumption of unpasteurized cow's milk and raw-milk products have been well documented (Harrington *et al.*, 2002). There is no evidence about the risk from unpasteurized goat's or ewe's milk (McIntyre *et al.*, 2002). Colostrum is the secretion of the mammary gland of mammals, produced shortly before and after birth of a baby (Gauthier *et al.*, 2006). Several studies occurred to track positive effects on human health (Uruakpa *et al.*, 2002). Microbiological quality of raw colostrum varies considerably. The microbial contamination occurs most frequently during milking and storage (Johnson *et al.*, 2007). Houser *et al.*, (2008) states that the greatest amount of microorganisms is observed in the presence of aerobic mesophilic microorganisms, but also pathogenic strains can occur there. Based on this information our study focused to monitor the presence of *S. aureus* in goat colostrum, and especially the occurrence of enterotoxin-producing *S. aureus* strains.

Material a Methods

A total of 139 goat colostrum samples from the Czech Republic were collected in the period from January to February 2015. All goat colostrum samples were collected into sterile sampling bottles and transported to the laboratory for immediate examination.

Detection of *S. aureus* was carried out as follows: 25 ml of colostrum was diluted with 225 ml of buffered peptone water (Oxoid, UK). After enrichment at 37 °C overnight samples were cultivated on Baird - Parker agar (B-P, Oxoid, UK) supplemented with egg yolk-tellurite emulsion. From each plate, both the typical and atypical colonies were examined by plasmacoagulase test (DENKA SEIKEN Co., LTD., Japan) and confirmation of suspected *S. aureus* strains was carried out by polymerase chain reaction (PCR) based on the detection of the species specific fragment SA442 (Martineau *et al.* 1998).

More attention has been concentrated to the occurrence of methicillin-resistant *S. aureus* strains (MRSA). For the determination of MRSA, in *S. aureus* isolates, PCR for the detection

of the *mecA* gene, which is responsible for the resistance to methicillin (Poulsen *et al.*, 2003) was used.

For the detection of the genes encoding enterotoxins SEA-SEE and SEH, multiplex PCR according to Løvseth *et al.* (2004) was performed.

Results a Discussion

This study was focused to map the occurrence of *S. aureus* strains in goat colostrum. In total, 139 samples of goat colostrum were collected between January and February 2015 in the Czech Republic.

We recorded the high detection rate of *Staphylococcus aureus* in examined samples Altogether, 79 (56.8%) positive goat colostrum samples were detected and 79 *S. aureus* isolates were obtained for further detection of enterotoxin encoding genes. *Staphylococcus aureus* is considered a major pathogen in dairy goats in concern of both clinical and subclinical intramammary infections (Bergonier *et al.*, 2003).

Global problem of the 21st century becomes the occurrence of pathogenic microorganisms resistant to routinely used antibiotics and the presence of MRSA is the most significant (Hososaka *et al.*, 2007). In this study the presence of MRSA was not detected in the tested colostrum samples.

The attention was paid to the ability of *S. aureus* strains to produce enterotoxins, which are responsible for foodborne intoxication and some allergic reactions (Balaban and Rasooly 2000; Sharma, *et al.*, 2000). In terms of risk of foodborne diseases there is a problem of approximately 50-75% of *S. aureus* strains capability to produce under the suitable conditions the extracellular thermostable enterotoxins (SEs) (Argudín *et al.*, 2010). For their detection multiplex PCR method was used. In total 24 (30.4%) enterotoxin positive *S. aureus* were obtained. In our study, 13 (16.5%) of these isolates were positive for the production of classical enterotoxins SEA-SEE, which are the leading cause of foodborne diseases and 11 (13.9%) of these isolates were positive for the production of enterotoxins SEG and SEI. No SEs were identified in 55 (69.6%) samples. Results are shown in Table 1. One strain (1.3%) was positive for the presence of *sea* gene. Out of 13 strains investigated 1.3% were proven positive for *seb*, combination *sea* and *seh* (1.3%) and *sec* (12.7%). Similarly Cupáková *et al.* (2006) who examined isolates of *S. aureus* from goat milk samples, discovered that 69% of *S. aureus* were positive for the gene encoding formation of staphylococcal enterotoxin type C. Morandi *et al.*, 2007 state that the predominant enterotoxins in the cow's milk are SEA and SED, but in the goat and sheep milk it is primarily enterotoxin SEC.

Table 1: Prevalence and toxin characterisation of *Staphylococcus aureus* from goat colostrum

Combination of toxins	<i>Staphylococcus aureus</i>	
	No. of strains	%
A	1	1.3
A, H	1	1.3
B	1	1.3
C	10	12.7

Conclusion

The results of this study confirm the presence of *Staphylococcus aureus* in goat colostrum. The study shows the fact that the consumption of raw goat colostrum is not safe for the consumers. The most effective tool for the microbiological safety of colostrum is heat treatment or other treatment (drying, freeze-drying and so on).

Acknowledgments

This study was financially supported by the research project NAZV QJ1210300.

References

- BALABAN, N., RASOOLY, A. Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 61, p. 1-10.
- BERGONIER, D., DE CREMOUX, R., RUPP, R., LAGRIFFOUL, G., BERTHELOT, X. Mastitis of dairy small ruminants, *Veterinary Research*, 2003, vol. 34, p. 689–716.
- GAUTHIER, S. F., POULIOT, Y., MAUBOIS, J. L. Growth factors from bovine milk and colostrum: composition, extraction and biological activities. *Lait*, 2006, p. 99-125.
- HARRINGTON, P., J. ARCHER, J. P. DAVIS, D. R. CROFT, J. K. VARMA, AND EIC OFFICERS. Outbreak of *Campylobacter jejuni* infections associated with drinking unpasteurized milk procured through a cow-leasing program-Wisconsin 2001. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 2002, vol. 51, p. 548–549.
- HOSOSAKA, Y., HANAKI, H., ENDO, H., SUZUKI, Y., NAGASAWA, Z., OTSUKA, Y., NAKAE, T., SUNAKAWA, K. Characterization of oxacillin susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 2007, vol. 13, p.79-86.
- HOUSER, B. A., DONALDSON, S. C., KEHOE, S. I., HEINRICH, A. J., JAYARAO, B. M. A survey of bacteriological quality and the occurrence of *Salmonella* in raw bovine colostrum. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2008, vol. 5, p. 853-858.
- JOHNSON, J. L., GODDEN, S. M., MOLITOR, T., AMES, T., HAGMAN, D. Effects of feeding heat-treated colostrum on passive transfer of immune and nutritional parameters in neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 2007, vol. 90, p. 5189–5198.
- LØVSETH, A., LONCAREVIC, S., BERDAL, K. G. Modified multiplex PCR method for detection of pyrogenic exotoxin genes in staphylococcal isolate. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, p. 3869-3872.
- MARTINEAU, F., PICARD, F. J., ROY, P. H., OUELLETTE, M., BERGERON, M. G. Species-Specific and Ubiquitous DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, p. 618-623.
- MCINTYRE, L., FUNG, J., PACCAGNELLA, A., ISAAC-RENTON, J., ROCKWELL, F., EMERSON, B., PRESTON, T., *Escherichia coli* O157 outbreak associated with the ingestion of unpasteurized goat's milk in British Columbia 2001, *Canada communicable disease report*, 2002, vol. 28, p. 6–8.
- POULSEN, A. B., SKOV, R., PALLESEN, L. V. Detection of methicillin resistance in coagulase-negative staphylococci and in staphylococci directly from simulated blood cultures using the EVIGENE MRSA Detection Kit. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003, vol. 51, p.419-421.
- SHARMA, N. K., REES, C. E. D., DODD, C. E. R. Development of a single reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, vol. 66, p. 1347-1353.
- URUAKPA, F. O., ISMOND, M. A. H., AKOBUNDU, E. N. T. Colostrum and its benefits: a review. *Nutrition Research*, 2012, vol. 22, p. 755-767.

Contact address: Kateřina Bogdanovičová, Mgr., Department of Milk Hygiene and Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic, email: H12019@vfu.cz

Antimicrobial susceptibility of *Weissella* spp. isolated from cooked ham and manufacturing area

¹Lačanin Ines, ^{1,2}Dušková Marta, ¹Kameník Josef, ^{1,2}Karpíšková Renáta

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

²Veterinary Research Institute, Brno

Summary

The aim of this study was to investigate the resistance of isolated *Weissella* spp. to selected antibiotics by the quantitative E-test methodology. Together 19 samples were collected from one processor in the Czech Republic in the period of April and May 2013. Twenty isolates identified as *Weissella* spp. were tested on antimicrobial resistance to 7 antimicrobial agents. The results obtained by the MIC₉₀ show that all tested *Weissella* spp. isolates were sensitive to ampicillin, gentamicin and erythromycin. Resistance to streptomycin and chloramphenicol showed 10% of isolates for each, 5% to clindamycin and 35% to tetracycline.

Keywords: *Weissella* spp., cooked ham, processing plant, antimicrobial, E-tests, MIC₉₀

Introduction

Antimicrobial resistance is a worldwide growing problem. About 60 years ago antibiotics were introduced as a treatment against bacterial diseases. Efficiency of antibiotics is seriously threatened by the growing and rapidly spreading of resistant microorganisms. Antimicrobial resistance causes a significant increase in mortality, morbidity and costs. The food chain can be considered as the main route of transmission of antibiotic resistant bacteria and genes between humans and animals (Mathur and Singh, 2005; Nawaz et al., 2011; Verraes et al., 2013).

Lactic acid bacteria (LAB) are bacteria “generally recognized as safe” (GRAS) united by a constellation of morphological, metabolic and physiological characteristics. The whole group consists of around 20 genera united by the same role (producing lactic acid as the end product during fermentation of saccharides) (Limsowtin et al., 2002; König and Frölich, 2009). Increasing application of lactic acid bacteria during the last decades, in the food manufacture (as starter cultures during fermentation) and probiotics, stimulates questions about the safety of these bacteria. *Weissella* spp. are Gram-positive lactic acid bacteria, optionally anaerobic, but rapidly growing under microaerophilic conditions. These bacteria are non-spore forming, mostly non-motile, catalase and oxidase negative irregular short rods with rounded ends or coccid rods, occurring singly, in pairs or in short chains. Representatives of the genus *Weissella* are not easy to identify. Particularly problematic is to differentiate them between heterofermentative genus *Lactobacillus* and *Leuconostoc*. Generally these bacteria are considered as non-pathogenic, but they may be involved in food spoilage. In meat industry *Weissella viridescens* (formerly *Lactobacillus viridescens*) may be the cause of slime formation or the greening of meat (Duškova et al., 2013).

The aim of this study was to investigate the resistance of isolated *Weissella* spp. to selected antibiotics by the quantitative E-test methodology.

Materials and Methods

Together 19 samples (13 samples of sliced cooked ham and 6 swab samples of the material in direct or indirect contact with meat – table, scale, cutting machines) were collected from one processor in the Czech Republic in the period of April and May 2013. Samples were processed immediately, but some of them (slices of cooked ham) were stored in the fridge for 4 weeks and extracted and processed in weekly intervals.

Basic processing of the samples was carried out according to the ISO 7218 and ISO 6887-1 standards. The samples of cooked ham in amount of 25 g were diluted with the 225 ml of sterile buffered MRS broth (Oxoid, UK) and homogenized. The amount of 200 μ L of prepared dilutions was aseptically spread on MRS agar (Oxoid, UK) for the isolation of lactic acid bacteria. MRS plates were incubated under aerobic conditions at 15°C for 6 days. All colonies from each sample, which showed different morphological characteristics, negative oxidase and catalase tests were selected and purified on MRS agar for further characterization. Isolation of bacterial DNA was performed by 20% Chelex 100 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

Isolates that were identified as *Weissella* spp. (n = 20) by polymerase chain reaction (Schillinget et al., 2008) were tested for resistance to 7 antibiotics: ampicillin (AM; 0.015-256 μ g/ml), gentamicin (GM; 0.015-256 μ g/ml), streptomycin (SM; 0.065-1024 μ g/ml), erythromycin (E; 0.015-256 μ g/ml), clindamycin (CM; 0.015-256 μ g/ml), tetracycline (TC; 0.015-256 μ g/ml), chloramphenicol (CL; 0.016-256 μ g / ml) by E-test methodology (Oxoid, UK and BioMérieux, France). Suspension of the test strain to the visual turbidity of 1 °McFarland standard was spread onto a 4 cm diameter MRS agar plate. The E-test strips with antibiotics were applied in a radial fashion and plates were incubated at microaerophilic conditions on 30°C for 24h. The minimum inhibitory concentration (MIC) was read from the interpretative scale, the point of intersection of the ellipse with the strip. Interpretation criteria were carried out according to MIC₉₀.

Results and Discussion

The minimal inhibitory concentration (MIC) is the lowest antibiotic concentration that inhibits the visible bacterial growth after overnight incubation. Minimum inhibitory concentrations are important in diagnostic laboratories to confirm resistance of microorganisms to an antimicrobial agent and also to monitor the activity of new antimicrobial agents (D'Aimmo et al., 2007; Dušková and Karpíšková, 2013).

To distinguish the strains which are resistant from the susceptible ones, the Panel on Additives and Products or Substances used in Animal Feed (FEEDAP) of the European Food Safety Authority (EFSA) defined the microbiological breakpoints categorizing bacteria as resistant. A microorganism is defined as susceptible when it is inhibited at breakpoint level of a specific antimicrobial in a defined phenotypic test system ($S \leq x$ mg/L) and as resistant when it is not inhibited at breakpoint level of a specific antimicrobial in a defined phenotypic test system ($R > x$ mg/L) (FEEDAP 2008).

Although the MICs are defined, for clinically important microorganisms, internationally valid MICs for *Weissella* spp. haven't been determined yet. For this reason within this work we evaluated the lowest antibiotic concentration that inhibits 90 % (MIC₉₀) of the tested strains in order to show MIC distributions. The MIC₉₀ represents the MIC value at which ≥ 90 % of the strains within a tested population are inhibited. Although, MIC₉₀ values can be calculated for small number of obtained tested isolates, like in our study by testing only 20 isolates, under such conditions few strains with high MICs may have a disproportionately high influence on the MIC₉₀ values. The significance of MIC₉₀ increases with the number of tested strains, so sufficiently larger number of test isolates should be used and accordingly researchers are encouraged not to overemphasize MIC₉₀ data obtained from small number of tests (D'Aimmo et al., 2007; Nawaz et al., 2011).

For most antibiotic-organism combination the results of MIC could be easily read out. The results obtained by the MIC₉₀ show that all tested *Weissella* spp. isolates were sensitive to ampicillin, gentamicin and erythromycin.

Conversely, resistance to streptomycin showed 10% of isolates and also for the chloramphenicol, 5% of isolates were resistant to clindamycin and 35% to tetracycline. Resistant strains were already found in first samples of cooked ham, in a swab sample from scale and in the swab sample from cutting machine, but also in the samples of cooked ham after 1st and 3rd week of storage.

Since the *Weissella* spp. belongs to the family *Leuconostocaceae*, the obtained results of MIC may be compared with the EFSA MIC values that are already defined for the *Leuconostoc* spp. (FEEDAP, 2008), which belong to the same family. With the comparison of MIC for *Leuconostoc* spp. obtained by the EFSA and MIC₉₀ obtained for *Weissella* spp. by our results a small difference is provided. For several antibiotics (ampicillin, clindamycin, tetracycline and chloramphenicol) EFSA established higher breakpoint for the *Leuconostoc* spp. than was within our work for the *Weissella* spp. Contrariwise, for antibiotics such as gentamicin, streptomycin and erythromycin were obtained higher breakpoints with MIC₉₀ for *Weissella* spp. than for *Leuconostoc* spp. That means, for some antibiotics lower concentrations already inhibit the growth of culture, they were very sensitive to the particular antibiotics, while for some the higher antibiotics concentration, than the breakpoint, is needed to inhibit their growth.

For several decades studies on the selection and dissemination of antibiotic resistance have focused mainly on clinically relevant bacterial species and pathogens. Fermented dairy products and fermented meats that are not heat-treated before consumption and provide a vehicle for antibiotic resistant bacteria with a direct link between the animal indigenous microflora and the human gastrointestinal tract (Mathur and Singh, 2005; Nawaz et al., 2011). However, since the last decade, researchers have been also focused on observing antibiotic resistance in LAB which can also serve as reservoir for antibiotic resistance genes and transfer it to other microorganisms including pathogens (Nawaz et al., 2011). There are two types of resistance observed in LAB: intrinsic or innate and acquired (Patel et al., 2012). The potential health risk, due to the transfer of antibiotic resistance genes from LAB reservoir strains to bacteria in the resident microflora of the human gastrointestinal tract and pathogenic bacteria, has not been fully addressed (Mathur and Singh, 2005). Many Member States of European Union (EU) have special programs and directives concentrated on the monitoring of antimicrobial resistance in bacteria. Bacterial strains that are carrying acquired resistance should not be used as feed additives, fermented and probiotic food and feed for humans and animals. Otherwise whether the bacterial strains are carrying intrinsic resistance that is not associated with mobile genetic elements the risk of transfer to other organisms can be considered as minimal (FEEDAP, 2008).

Conclusion

Tested isolates of genus *Weissella* were either resistant or susceptible to the tested antibiotics. Determination of the mechanism of their resistance requests further testing. Knowledge of the antibiotic resistance of lactic acid bacteria, especially genus *Weissella*, is still limited, possibly because of the large number of genera and species encountered in this bacteria group and the variances in the resistance spectra.

Acknowledgment

This study was supported by the project NAZV KUS QJ1510338.

References

The used references are available within the author.

Contact address: Ines Lačanin, mag.nur., Department of Milk Hygiene and Technology, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1-3, 612 42 Brno, H12439@vfu.cz

Occurrence of *Helicobacter* spp. in the gastrointestinal tract of broiler chickens in the Czech Republic

^{1,2}Przybylová Renata, ¹Svobodová Irena, ¹Bořilová Gabriela

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

CEITEC²— Central European Institute of Technology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences
Brno, Palackého tr. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

Summary

The aim of this study was to monitor occurrence of *Helicobacter* spp. in 29 conventional broiler-chicken farms, in the Czech Republic. In the period February 2013 - March 2014, a total of 615 samples of caecum content of slaughtered broilers were examined. Detection was performed by optimized cultivation techniques using Brucella Agar with 5 % sheep blood and by PCR method. Identification at genus and species level was performed using PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism). Presence of *Helicobacter* spp. was confirmed in 248 broilers (40.32 %). Using PCR-RFLP method with the restriction enzyme *ApaLI*, these 248 positive samples were identified as *Helicobacter pullorum*. Occurrence of this pathogen was confirmed in 17 conventional farms, the within-farm prevalence ranged from 40 % - 100 %. The results show that *Helicobacter pullorum* is another potential foodborne pathogen with a high incidence in the digestive tract of broiler chickens and may present a potential risk for human consumers.

Keywords: enterohepatic *Helicobacter*; foodborne pathogen; broiler; chickens; PCR-RFLP

Introduction

The genus *Helicobacter* is a group of taxonomically related Gram-negative, microaerobic bacteria. The whole genus is divided into two groups generally related to their natural ecological niche, to gastric and enterohepatic (EHS) species (Solnick et Schauer, 2001). It was found that among the enterohepatic species only *H. pullorum* (Stanley et al., 1994) and *H. canadensis* (Fox et al., 2000) are specifically present in poultry. *H. pullorum* is new potential food-borne pathogen which is associated with human gastritis, chronic cholecystitis, cholelithiasis, liver diseases, tumor diseases of the liver and gallbladder and with diseases of immune system (Hansen et al., 2011). Recent studies have also stated that *H. pullorum* together with *H. canadensis* are repeatedly identified as the most common species in patients with Crohn's disease, but their role in pathogenesis of this disease has not been elucidated yet (Laharie et al., 2009, Hansen et al., 2011). Asymptomatic poultry is considered to be the main reservoir hosts and source for human infection with these two species due to their presence in gastrointestinal tract from where they are able to move to the external environment.

Material and Methods

The occurrence of *Helicobacter* spp. in farmed broiler chickens was studied during the period February 2013 - March 2014. Broilers sampled at the slaughterhouse originated from 29 conventional broiler farms in the Czech Republic. The digestive tract (caecum) (n = 615) of broiler chickens were taken from the processing line. The samples were immediately transported to the laboratory. The caecal content was separated in a sterile way from the gastrointestinal tract. Saline solution was added to the sample, forming a thick suspension. Resuscitation of sublethally damaged cells of *Helicobacter* spp. in obtained suspension was carried out in a mixture of brain heart infusion, glucose and horse serum and in the next step of cultivation was used membrane filter technique as described by Zanoni et al. (2007). Cultivation was carried out on Brucella agar (Oxoid, UK) supplemented with 5 % sheep blood under microaerobic conditions (5 % O₂, 10 % CO₂ and 85 % N₂) in incubator at 37 °C

$\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for $72\text{h} \pm \text{h}$. Grown cultures were visually checked every 24 hours. The DNA from suspected colonies was isolated (Qiagen Tissue Kit, Germany) according to the manufacturer's instructions and species identification was carried out using PCR method (polymerase chain reaction) and PCR-RFLP (polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism) by Fox et al. (2000) with the restriction enzyme *Apa*LI. Mixed DNA from caecal content isolated by the QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Germany) was used for direct detection and isolation of *Helicobacter* spp., followed by PCR identification by Fox et al. (2000).

Results

During the period February 2013 to March 2014, a total of 615 samples of caecal contents of chickens originated from 29 conventional broiler farms were examined. The results of monitoring confirmed the presence of *Helicobacter* spp. at the Czech poultry farms. Cultivation was successful in detection of *Helicobacter* spp. in only 7.64 % of all analyzed samples due to high sensitivity of *Helicobacter* spp. and difficulty to differentiate closely related bacterial species during isolation. All samples were simultaneously examined by molecular genetics methods. According to the PCR results there was a positive detection in 248 samples (40.32 %). Using the PCR-RFLP method with the restriction enzyme *Apa*LI, all 248 positive samples were identified as *H. pullorum*. This pathogen was confirmed to be present at 17 of 29 broiler farms. The within-farm prevalence ranged from 40 to 100 %. In case of 11 farms all the investigated samples were positive. *H. canadensis* was not present in the tested samples at all.

Discussion

Several scientific studies were published about the occurrence of *H. pullorum* in broiler chickens especially in Italy, Belgium and Turkey. It is difficult to compare their studies due to different methods used for the detection of the pathogen and the different processing of samples. A high occurrence of *H. pullorum* in the caecum of broiler chickens was shown in an Italian study by Manfreda et al. (2011), who examined 34 flocks from 30 conventional broiler farms. The samples of caecal content ($n=169$) were examined only by cultivation technique and 142 samples (84 %) were found as positive. The same technique was used for the examination of broilers caecal contents in another Italian study, Zanoni et al. (2007). This study confirmed presence of *H. pullorum* in all of collected samples ($n=60$). But the amounts of 60 samples doesn't comprise an adequate and representative cross-section. In an Egyptian study conducted by Hassan et al. (2014), a total of 900 samples of cloacal swabs, caecal swabs and livers from chickens were examined using conventional phenotypic methods for isolation and identification. *H. pullorum* was found in 39.33 % of the samples. Ceelen et al. (2006) determined the occurrence of pathogens using specific PCR and detected *H. pullorum* in 33.6 % of broilers at 11 Belgian broilers conventional farms. Similarly, Kahraman et Ak (2013) reported the incidence of 55.21 % in Turkish broilers. It appears that the molecular genetics method used in these studies is more sensitive for the detection and direct identification of this pathogen and standard culture techniques should be combined with it. Molecular genetics methods have already been used as standard methods for species identification in all the published studies.

Conclusion

The aim of our study was to evaluate the data on the current prevalence of *Helicobacter* spp. in broiler chickens in the Czech Republic. The results confirm the occurrence of EHS *H. pullorum* in Czech conventional broiler farms. The prevalence of this pathogen as determined in this study (40.32 %) shows that its occurrence in the digestive tract

of poultry is very common. In the case of contamination of carcasses during slaughter processing, raw poultry meat could be a source of infection for humans. In order to ensure the safety of food of animal origin, it appears to be essential to pay attention to monitoring and further characterization of this pathogen in poultry farms in Central Europe.

Acknowledgment

This work was supported by the project “CEITEC - Central European Institute of Technology” (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund and by IGA VFU (Project number 7/2013/FVHE).

References

- CEELEN, L. M.; DECOSTERE, A.; VAN DEN BULCK, K.; ON, S.L.; BAELE, M.; DUCATELLE, R.; HAESEBROUCK, F. *Helicobacter pullorum* in chickens, Belgium. *Emerging Infectious Diseases*. 2006, vol. 12, s. 263-267.
- FOX, J.G.; CHIEN, C.C.; DEWHIRST, F.E.; PASTER, B.J.; SHEN, Z.; MELITO, P.L.; WOODWARD, D. L.; RODGERS, F. G. *Helicobacter canadensis* sp. nov. isolated from humans with diarrhea as an example of an emerging pathogen. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000, vol. 38, s. 2546-2549.
- HANSEN, R.; THOMSON, J.M.; FOX, J.G.; EL-OMAR, E.M.; HOLD, G.L. Could *Helicobacter* organisms cause inflammatory bowel disease? *Medical Microbiology and Immunology*. 2011, vol. 61, s. 1-14.
- KAHRAMAN, B.B.; AK, S. Investigation of *Helicobacter pullorum* Occurrence in Chicken in the Marmara Region of Turkey. *Journal of Faculty of Veterinary Medicine*, Istanbul University. 2013, vol. 39, s. 63-66.
- LAHARIE, D.; ASECIO, C.; ASSELINEAU, J.; BULOIS, P.; BOURREILLE, A.; MOREAU, J.; BONJEAN, P.; LAMARQUE, D.; PARIENTE, A.; SOUL'E, J.C. Association between entero-hepatic *Helicobacter* species and Crohn's disease: a prospective cross-sectional study. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*. 2009, vol. 30, s. 283-293.
- MANFREDA, G.; PARISI, A.; LUCCHI, A.; ZANONI, R. G.; DE CESARE, A. Prevalence of *Helicobacter pullorum* in conventional, organic, and free-range broilers and typing of isolates. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, vol. 77, s. 479-484.
- SOLNICK, J.V.; SCHAUER, D.B. Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, vol. 14, s. 59-97.
- STANLEY, J.; LINTON, D.; BURNEN, A.P.; DEWHIRST, F.E.; ON, S.L.W.; PORTER, A.; OWEN, R.J.; COSTAS, M. *Helicobacter pullorum* sp. nov.-genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. *Microbiology*. 1994, vol. 140, s. 3441-3449.
- ZANONI, R.G.; ROSSI, M.; GIACOMUCCI, D.; SANGUINETTI, V.; MANFREDA, G. Occurrence and antibiotic susceptibility of *Helicobacter pullorum* from broiler chickens and commercial laying hens in Italy. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, vol. 116, s. 168-173.

Contact address: Renata Przybylová, Mgr., Department of Meat Hygiene and Technology, FVHE VFU Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, przybylovar@vfu.cz

Qualitative and quantitative properties of chicken's wings from organic and classic production system

Abdullah Fouad A. A., Buchtová Hana

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The consumers believe that organic food is more quality and healthier than conventional production food. The aim of present study was to investigate quality and quantity properties of chicken's wings from organic and conventional production systems as currently provided in markets for Czech consumers. 14 organic and 19 conventional fresh broilers have been obtained from two farms and were evaluated production properties of wings (yield and weight) and chemicals parameters (dry matter, total protein, net protein, collagen, fat and ash) of deboned wings (meat with skin). The eviscerated carcass of conventional poultry are yielded (from whole alive broiler) higher ($P < 0.05$) than organic, while its wings versa, where yielded and weighted lower than organic wings. The skin, bones, tip (left wings) and the meat with skin (right wings) of organic broilers are heavier ($P < 0.05$) than classic chickens. The dry matter and total Protein content of deboned organic broiler's wings (meat with skin) was greater ($P < 0.01$) than conventional wings. According to this study the type of poultry production method could be had effect on the quantity and quality of broilers wings.

Keywords: *broiler's wing; organic; conventional; production properties; meat quality*

Introduction

There is idea among consumers that organic food is more healthy than conventionally produced food due to that its free from harmful ingredients (e.g. synthetic feed additives, growth promoters or animals offal, pesticides or artificial fertilizers) and prohibition of GMO feed components (Grashorn and Serini, 2006; regulations (EC) 2092/91 and 1804/99). There are a limited number of studies about the comparison between organic and conventional broilers meat quality (Fanatico et al., 2006; Kishowar et al., 2005) and especially the studies which are evaluate the characteristics of broilers' wings. In some countries of Asia (e.g. Vietnam, Thailand and China) people prefer consumption of chicken wings in comparison with breast or legs meat and deemed them as culinary enjoyment (Jansova, 2014). The objective of this study was to evaluate the quality and quantity parameters of poultry wings from organic and conventional production systems.

Material and Methods

In the total 14 organic and 19 conventional fresh broilers were obtained directly from organic and conventional production farms. The weights (in g) of whole alive broilers, carcasses, wings and their parts (skin, meat, bones and tips) were analysed (PionnerTH, Ohaus corp., Čína). The yield (in %) of whole carcass and pair wings has been measured mathematically by division the weight of each carcass portion aforementioned to the weight of alive entire chicken. The wing components yield (in %) has been measured mathematically by division each of wing components [meat, skin, (meat with skin), bone and tip] to the weight of whole single wing. The basic chemical composition of right deboning wing (meat with skin) has been indicated: dry matter (CSN ISO 57 6021), total protein (CSN ISO 937:1978), net protein (after precipitation with hot tannin solution), collagen content (from hydroxyproline), fat (CSN ISO 1443:1973) and ash (CSN ISO 936:1978). Statistical analysis was conducted by using Excel 2003. Student's *t*-test was applied for determination of differences between organic and conventional chickens' samples.

Results

Conventional broilers yielded more ($P < 0.01$) eviscerated carcass (73.12%) than organic (69.22%), also no statistical differences of weight have been observed between organic and conventional alive broilers. The wings (both) of organic poultry are yielded (8.75%) more ($P < 0.01$) than wings of conventional poultry (7.90%), also the wings (both) of organic poultry weighted (200.39 g) higher ($P < 0.05$) than the wings of classic poultry (182.78 g) (Table 1). The meat with skin of right organic wing has been weighted (57.76 g) more ($P < 0.01$) than wing of conventional chicken, the skin of left wing from organic poultry has higher ($P < 0.01$) yield (19.57%) and weight (20.29 g) than wing's skin of conventional chicken (16.46 %, 14.57 g), respectively. The bones of left wing (humerus, radius and ulna) of organic poultry were been weighted (30.11 g) heavier ($P < 0.01$) than the classic chicken (25.98 g). The tip of left wing of organic poultry are yielded (11.82%) and weighted (11.96 g) more ($P < 0.01$) the conventional poultry (10.21%, 9.11 g) respectively (Table 1). The wings (meat with skin) from organic broilers had higher ($P < 0.01$) dry matter (32.06%) and total protein content (20.60%) in compared with conventional broilers (29.73%, 19.27%) respectively (Table 2).

Table 1: Production properties of poultry wings from organic and classic system

	yield in % (mean \pm SD)		stat. sign	weight in g (mean \pm SD)		stat. sign
	organic n = 14	classic n = 19		organic n = 14	classic n = 19	
whole alive broiler	-	-		2379 \pm 384.80	2284 \pm 235.51	NS
whole carcass ¹	69.22 \pm 2.10	73.12 \pm 1.54	**	1630.36 \pm 274.8 1	1671.86 \pm 182.4 3	NS
pair wings ¹	8.75 \pm 0.54	7.90 \pm 2.32	**	200.39 \pm 24.36	182.78 \pm 18.40	*
RW (meat + skin) ²	56.82 \pm 3.28	57.22 \pm 3.13	NS	57.76 \pm 10.96	51.35 \pm 6.76	**
LW (meat) ²	39.14 \pm 3.65	40.66 \pm 3.79	NS	40.86 \pm 8.06	36.24 \pm 6.47	NS
LW (skin) ²	19.57 \pm 2.39	16.46 \pm 1.13	**	20.29 \pm 3.32	14.57 \pm 1.83	**
LW (bones) ²	29.87 \pm 3.22	29.02 \pm 2.08	NS	30.11 \pm 4.83	25.98 \pm 3.26	**
LW (tip) ²	11.82 \pm 0.75	10.21 \pm 0.84	**	11.96 \pm 1.92	9.11 \pm 0.98	**

RW right wing, LW left wing, ¹ yield from whole alive chicken, ² yield from single wing

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS no significance

Discussion

The results of study indicated that the yield of conventional eviscerated carcass was higher than carcass of organic broilers reverse to the wings of organic chickens where yielded higher than conventional poultry, where could be due to to the greater physical activity and larger energy expenditures related to thermoregulation in the case of organic poultry (Steven et al., 2012). Higher contents of total and net protein in organic wings is reflected by the organically production method of poultry, which supporting the idea that motor activity increase myogenesis (Castellini et al., 2002).

Conclusion

The differentiate in results of this study between quality and quantity properties of organic and conventional poultry's wings is could be due to differences in genotypes, diets, ages and production environment of broilers. The main differences observed that the whole eviscerated carcass of organic broilers was yielded higher than classic chickens, while the wings of organic chickens are yielded and weighted higher than classic chickens and contented higher total protein. According to this study the type of poultry production system could be had effect on the quantity and quality of broilers wings.

Table 2: Chemical parameters of poultry wings from organic and classic system

parameter		content in % (mean \pm SD)		Stat. sign.
		organic n = 14	classic n = 19	
dry matter	meat with skin	32.06 \pm 0.53	29.73 \pm 1.36	*
total protein		20.60 \pm 0.62	19.27 \pm 0.50	*
net protein		18.74 \pm 0.29	17.83 \pm 0.81	NS
collagen		2.26 \pm 0.64	1.93 \pm 0.31	NS
fat		8.17 \pm 1.69	5.51 \pm 1.34	NS
ash		0.87 \pm 0.01	0.86 \pm 0.03	NS
dry matter	meat	25.66 \pm 0.99	25.67 \pm 0.69	NS
total protein		21.67 \pm 0.82	20.83 \pm 0.48	NS
net protein		20.12 \pm 0.37	18.93 \pm 0.44	*
collagen		0.92 \pm 0.21	1.22 \pm 0.22	NS
fat		8.17 \pm 1.69	5.51 \pm 1.34	NS
ash		1.07 \pm 0.14	0.90 \pm 0.04	NS
dry matter	skin	48.63 \pm 1.91	42.88 \pm 1.38	**
total protein		15.50 \pm 0.17	15.33 \pm 1.20	NS
net protein		12.74 \pm 0.78	13.79 \pm 0.51	NS
collagen		4.41 \pm 0.26	4.56 \pm 0.38	NS
fat		24.11 \pm 3.73	21.35 \pm 2.96	NS
ash		0.66 \pm 0.01	0.63 \pm 0.02	NS

*P < 0.05, **P < 0.01, NS no significance

Acknowledgment

Financial support for this study was provided by the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic (Institutional research for year 2014).

References

- CASTELLINI, C.; MUGNAI, C.; DAL BOSCO, A. Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. *Meat Science*. 2002, vol. 60, pp. 219–225.
- COUNCIL REGULATION (EC) No 1804/1999 supplementing Regulation (EEC) No. 2092/91 on organic production of agricultural products. *Official Journal*. 1999, L 222, pp. 1–28.
- FANATICO, A. C.; PILLAI, P. B.; CAVITT, L. C.; EMMERT, J. L.; MEULLENET, J. F.; OWENS, C. M. Evaluation of slower growing broiler genotypes grown with and without outdoor access: Sensory attributes. *Poult. Sci.* 2006, vol. 84, pp. 1321–1327.
- GRASHORN, M.A.; SERINI, C. Quality of chicken meat from conventional and organic production. XII European Poultry Conference, Verona, Italy, 10.-14. September. 2006.
- JANSOVA, P. Čech ve Vietnamu: Místní komunismus? Nemakáš, tak nejíš! <http://magazin.aktualne.cz/rozhovor-cech-vevietnamu/r~80e4b5826e9011e4840b002590604f2e/> 2014.
- KISHOWAR, J.; PATERSON, A.; PIGGOTT, J. R. Sensory quality in retailed organic, free range and corn-fed chicken breast. *Food Res. Int.* 2005, vol. 38, pp. 495–503.
- STEVEN, C.R.; ELLEN, J.V.L.; MICHAEL, G.J., CORLISS, A.O'.B. Organic Meat Production and Processing. 2012, Publisher: Wiley-Blackwell, ISBN: 9780813821269, pp. 247-248.

Contact address: Fouad Ali Abdullah ABDULLAH, Ing., Department of meat Hygiene and Technology FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13001@vfu.cz

Nutritional profile and microbiological quality of nigiri sushi meal prepared with different seafood

Dorđević Đani, Buchtová Hana

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

The aim of the study was to establish nutritional characteristics and microbiological quality of nigiri sushi meal including different types of seafood. The research was conducted using 108 pieces of nigiri sushi prepared with salmon (*Salmo salar*), tuna (*Thunnus obesus*) and shrimp (*Penaeus vannamei*). The results are emphasizing difference between protein, saccharide and fat contents in nigiri sushi due to different types of seafood and seafood/rice ratio. It can be concluded that sushi meal represents acceptable meal according to its nutritional characteristics and can be declared as low fat and low calorie meal, but not low salt content food. Microbiological analysis of nigiri sushi samples were close to upper acceptable limit stressing out that higher attention should be paid during preparation since it involves a lot of bare hand manipulation.

Keywords: nigiri sushi; low fat/calorie meal; microbiological acceptance

Introduction

Establishing nutrition profile of specific meals has never been as important as today due to worldwide awareness that food with its different nutritional characteristics influences remarkably humans' health (Insel et al., 2006). Sushi is a traditional Japanese meal made of boiled rice (with vinegar, salt, sugar) and other foodstuffs, and represents potential microbiological hazard for consumers mainly due to raw seafood inclusion. Sushi is very often consumed as type of ready-to-eat food in Asia but also throughout European and USA cities (Leisner et al., 2014).

The aim of the study was to establish nutritional characteristics and microbiological quality of nigiri sushi meal including different types of seafood (salmon, tuna, shrimp).

Materials and Methods

The study was carried out by using samples of nigiri sushi with salmon, tuna and shrimp. The number of samples was in total 108 pieces of nigiri sushi. Weight parameters were obtained on the equipment PionnerTH (Ohaus corp., China). Chemical composition: dry matter/moisture (M/MC) content, crude protein (CP), lipid (L), ash (A) was evaluated; M/MC content was determined gravimetrically (ČSN ISO 1442:1997); crude protein (CP) content (ČSN ISO 937:1978) was determined as the amount of organically bound nitrogen using the analyzer Kjeltec 2300 (FOSS Tecator, Höganäs, Sweden). The amino acid composition was evaluated on the AAA 400 automatic amino acid analyzer (INGOS a.s. Praha, CR). The samples were prepared by acid hydrolysis ($\text{HCl} = 6 \text{ mol.l}^{-1}$) for 24 hours at 110 °C. The lipid content was determined quantitatively (ČSN ISO 1443:1973) by extraction in solvents using Soxtec 2055 (FOSS Tecator, Höganäs, Sweden). The ash content was determined gravimetrically (ČSN ISO 936:1978) by burning weighed samples in a muffle furnace (Elektro LM 212.11, Germany). The salt (NaCl) content was determined according to Mohr's method and saccharide (S) content were determined mathematically: $S = 100 - (MC - CP - L - A)$ and energetical value (EV): $EV = (CP + S) \times 17 + L \times 37$. Total plate count (TPC) was evaluated by colony-count technique at 30 °C (ČSN EN ISO 4833). Statistical significance at $p < 0.05$ was evaluated using one-way ANOVA analysis of variance. Statistical analyses were done using IBM SPSS Statistics 20 software.

Results

Data about examined properties of nigiri sushi samples (weights and nutritional composition) are shown in Table 1.

Table 1: Nutrition composition of nigiri sushi with salmon, tuna and shrimp

Parameters		Nigiri salmon Atlantic Salmon (<i>Salmo salar</i>)	Nigiri tuna Bigeye tuna (<i>Thunnus obesus</i>)	Nigiri shrimp Central American Shrimp (<i>Penaeus vannamei</i>)
Whole nigiri sushi	g	38.08 ± 2.58 ^b	38.44 ± 2.68 ^b	31.27 ± 4.47 ^a
Rice/seafood/ wasabi ratio	%	67/32.82/0.18	62.25/37.48/0.27	80.22/19.47/0.31
Dry matter / moisture	g·kg ⁻¹	413.5 ± 7.2 ^a 586.5 ± 7.2 ^a	388.4 ± 6.3 ^b 611.6 ± 6.3 ^b	410.0 ± 4.9 ^c 590.0 ± 4.9 ^c
Ash	g·kg ⁻¹	13.1 ± 0.8 ^b	13 ± 0.4 ^b	14.96 ± 1.00 ^a
Fat content	g·kg ⁻¹	17.7 ± 7.4 ^a	0.4 ± 0.3 ^b	0.3 ± 0.3 ^b
Protein content	g·kg ⁻¹	84.20 ± 10.20 ^b	104.14 ± 16.77 ^a	56.09 ± 17.36 ^c
Essential amino acids	g·kg ⁻¹	26.75 ± 0.64 ^b	48.2 ± 2.83 ^a	20.7 ± 1.41 ^b
Saccharides	g·kg ⁻¹	298.49 ± 11.86 ^b	270.45 ± 19.61 ^a	338.65 ± 16.82 ^c
Energy value	kJ·100g ⁻¹	716.13 ± 24.18 ^c	638.12 ± 10.64 ^a	672.06 ± 8.72 ^b
Salt content	%	0.97 ± 0.04 ^b	0.89 ± 0.10 ^a	1.06 ± 0.13 ^c
Total plate count (TPC)	log cfu/g range	5.26 ± 0.16 (5.08 – 5.37)	5.88 ± 0.66 (5.13 – 6.32)	5.47 ± 0.92 (4.82 – 6.53)

*Parameters values **a**, **b**, **c** are indicators for statistical significance at p<0.05; different letters indicate statistically significant difference between different types of nigiri sushi

Discussion

Weights of nigiri sushi and ingredients portions are indicating that it is not easy to make standardized piece of nigiri sushi without significant difference among each piece. Higher fat content in nigiri salmon can be explained by higher portion of seafood in this type of nigiri sushi and the fact that salmon fish (*Salmo Salar*) is considered as fish with higher fat content (Du et al., 2012). Fat content in nigiri sushi in all three types (salmon, tuna, shrimp) is very low and nigiri sushi meal can be declared low fat meal (it contains far below recommended 45 to 75 g of fat/daily) (Insel et al., 2006). It can be seen that protein content in nigiri sushi types is positively related with the portion of seafood. One nigiri sushi meal (8 pieces) contains more than 100 g of seafood which almost satisfied recommended intake amount of fish meat per week (150 g – 300g) (EFSA, 2015). Essential amino acids content in all types of nigiri sushi meal is high especially in nigiri tuna where is higher than in egg (41.8 g/kg - almost an ideal protein food) (Caballero, 2005). Average daily energy requirement is around 10 000 kJ (Walker, 2006). According to our results it can be calculated that one nigiri sushi meal (8 pieces of nigiri sushi) contains around 2000 kJ, meaning that nigiri sushi meal can be declared low calorie meal because meal that is consumed during special occasions contains more than 6000 kJ (Angus, 1997). It is not low salt content food because salt content according to our results is over 2 grams in 8 pieces of nigiri sushi, and adults' daily dietary salt needs is 1.5 g (EFSA 2005). It has to be emphasized that refined rice content in nigiri sushi meal is more

than 60% and recommendation is that half of humans' grain intake should consist of unrefined grains (Insel et al., 2006).

Average contents of total bacteria counts in our sushi samples are below 6 log cfu/g, limit which is considered as acceptable upper count (Leisner et al., 2014). But more than 60 % of nigiri tuna and 30% of nigiri shrimp had TPC slightly over 6 log cfu/g. Raw fish and a lot of bare hand manipulation can be responsible for these results. When compared with the study of Leisner et al. (2014) where 19 % of nigiri sushi samples had unsatisfied total bacteria count, in our study unsatisfied counts had more than 30 % of samples.

Conclusion

Nigiri sushi meal can be considered low fat and calorie meal but it is high salt and refined rice content meal. Higher protein content, especially essential amino acids content, is another attribute of nigiri sushi meal. Including nigiri sushi meal consumers can increase and satisfied recommendations for fish meat intake, but they also increase intake of refined rice. Microbiological analysis emphasized that nigiri sushi samples were close to upper acceptable limit stressing out that higher attention should be paid during preparation since it involves a lot of bare hand manipulation, and ingredients quality, especially raw fish, should be monitored on regular basis.

Acknowledgment

The study was financially supported by the Department of Meat Hygiene and Technology (2014).

References

- ANGUS, D. The Analysis of Household Surveys: A Microeconomic Approach to Development Policy. Baltimore, MD: *Published for the World Bank by Johns Hopkins University Press*. 1997, p.213.
- CABALLERO, B. Encyclopedia of Human Nutrition. 2nd ed. Amsterdam Netherlands: *Elsevier/Academic Press*. 2005, p. 87.
- DU, Z.Y.; ZHANG, J.; WANG, C.; LI, L.; MAN, Q.; LUNDEBYE, A.K.; FROYLAND, L. Risk-benefit evaluation of fish from Chinese markets: Nutrients and contaminants in 24 fish species from five big cities and related assessment for human health. *Science of the Total Environment*. 2012, vol. 416, p. 187-199.
- EFSA. Opinion of the Scientific Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the Commission related to the Tolerable Upper Intake Level of Sodium. *The EFSA Journal*. 2005. vol. 209, p. 1-26.
- EFSA. Statement on the benefits of fish/seafood consumption compared to the risks of methylmercury in fish/seafood. *The EFSA Journal*. 2015, vol. 13, no. 1, p. 1-36.
- INSEL, P.; TURNER, R.E.; ROSS, D. Discovering Nutrition, 2nd ed, 1 vols, Sudbury, Mass.: *Jones and Bartlett Publishers*. 2006, p. 321.
- LEISNER, J.J.; LUND, T.B.; FRANDBSEN, E.A.; ANDERSEN, N.B.E.; FREDSLUND, L.; NGUYEN, V.P.T.; KRISTIANSEN, T. What consumers expect from food control and what they get – A case study of the microbial quality of sushi bars in Denmark. *Food Control*, (2014), 45, p. 76-80.
- WALKER, D. Food, Blood and Bones. Science Essentials. Biology. *London: Evans*. 2006, p. 14.

Contact address: Āani ĀorĀeviĀ, Department of Meat Hygiene and Technology, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, dani_dordevic@yahoo.com

Porovnanie rozkladných zmien tukov v mäsových výrobkoch počas skladovania

Comparison of degradation changes of fat in meat products during storage

Reitznerová Anna, Nagy Jozef, Turek Peter, Marcinčák Slavomír, Mačanga Ján, Poláková Zuzana

Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81, Košice

Summary

Lipids are sensible components of food and are subject to oxidative changes during food production and storage. Malondialdehyde (MDA) is the main product of polyunsaturated fatty acids oxidation and is the most important TBA reaction component. The aim of work was to determine the total content of fats and its decomposition changes in meat products. Strassburg frankfurters and Čingov sausage prepared under traditional recipe were compared with products from retail market. The samples were vacuum packed and stored at the temperature 4°C during 14 days. The fat content and MDA were determined in fresh product and MDA repeatedly after in 14th day of storage. The fat content Čingov sausage was lower (30.25%) in comparison with bought one (32.81%), Strassburg frankfurters fat content was higher (44.57%) in comparison with bought ones (35.06%). The increase of MDA was determined in prepared (Čingov sausage 12.9%, Strassburg frankfurters 8,3%) so in bought products (Čingov sausage 101.3%, Strassburg frankfurters 195.3%).

Keywords: meat products; fat; malondiadehyde

Úvod

Lipidy sú dôležité zložky surovín a potravín, ktoré významne ovplyvňujú ich výživovú a energetickú hodnotu (Maček a kol., 2011). Vo výžive tuky zvyšujú jemnosť chuti potravín a zlepšujú senzorickú textúru (konzistenciu) potravín (Sekretár, 2011).

Lipidová oxidácia je jednou z hlavných príčin zhoršovania kvality počas spracovania a skladovania potravín (De las Heras a kol., 2003) a je jedným z hlavných problémov v mäsovom priemysle z dôvodu zníženia kvality chute a straty výživovej hodnoty (Tkáčová, Angelovičová, 2013). Citlivým miestom v štruktúre lipidov sú predovšetkým nenasýtené mastné kyseliny, ich dvojité väzby sa ľahko oxidujú za deštrukcie celej molekuly a tvorby primárnych a sekundárnych produktov peroxidácie. Oxidačná degradácia lipidov je spravidla spojená so zmenou organoleptických vlastností a tiež so vznikom produktov s negatívnym účinkom na zdravie konzumenta (Halamičková a kol., 2003).

Konzumácia zoxidovaných tukov predstavuje zdravotné riziko (tvorba voľných radikálov, oxidácia lipoproteínov, mutagénne zmeny v organizme). Ochrana pred oxidáciou spočíva v eliminácii pôsobenia nepriaznivých faktorov vplyvajúcich na oxidáciu tukov (Sekretár, 2011). Pri skladovaní tukov je potrebné dbať, aby boli obmedzené všetky faktory urýchľujúce ako ich hydrolýzu, tak aj oxidáciu (Bystrický, Dičáková, 1998). Najbežnejším typom oxidácie za bežných podmienok spracovania a skladovania potravín je autooxidácia mastných kyselín. Rýchlosť oxidácie tukov závisí napr. na vrstve tuku – nižšia vrstva umožňuje rýchlejšiu oxidáciu, prítomnosti tepla a svetla, zložení tuku – (čím viac nenasýtených mastných kyselín, tým je rýchlejšia oxidácia), kontakt s kovmi – urýchľuje oxidáciu (okrem nerezovej oceli) (Odstrčil, Odstrčilová, 2006).

Materiál a metodika

V experimente boli použité mäsové výrobky (Čingovská saláma a Štrasburské párky) vyrobené v technologickej cvičebni UVLF v Košiciach a rovnaké výrobky zakúpené v obchodnej sieti. Výrobky boli vákuovo zabalené a skladované pri 4°C počas 14 dní. Vo vzorkách bol stanovený podiel tuku v % extrakčnou metódou podľa Soxhleta (Veterinárni laboratórni metodiky, 1990) a tiobarbiturové číslo TBA – ako miera sekundárneho poškodenia tukov, podmienená oxidáciou nenasýtených mastných kyselín, bolo stanovené podľa Marcinčáka a kol. (2006).

Výsledky

Priemerný obsah tuku (tab.1) vo vyrobenej Čingovskej saláme bol nižší (30,25 %) v porovnaní so salámou zakúpenou v obchodnej sieti (32,81 %); v prípade vyrobených Štrasburských párok bol obsah tuku vyšší (44,57 %) ako u zakúpených (35,06 %).

Tabuľka 1: Priemerný obsah tuku (%) v mäsovéch výrobkoch

Výrobky	Vyrobené UVLF	Zakúpené v obch. sieti
Čingovská saláma	30,25	32,81
Štrasburské párky	44,57	35,06

Výsledky stanovenia TBA čísla, ktoré vyjadruje množstvo malóndialdehydu MDA ako hlavného rozkladného produktu polynenasýtených mastných kyselín, sú uvedené v tabuľke 2. Počas sledovaného obdobia bol zaznamenaný nárast hodnôt MDA u obidvoch výrobkov. Vo vyrobenej Čingovskej saláme bol obsah MDA na začiatku experimentu 0,170 mg.kg⁻¹ a na konci skladovania 0,192 mg.kg⁻¹, čo predstavuje nárast MDA o 0,022 mg.kg⁻¹, zatiaľ čo v zakúpenej bol na začiatku experimentu obsah MDA 0,240 mg.kg⁻¹ a na konci skladovania 0,483 mg.kg⁻¹, čo predstavuje nárast až o 0,243 mg.kg⁻¹. Vo vyrobených Štrasburských párok bol obsah MDA na začiatku experimentu 0,360 mg.kg⁻¹ a na konci skladovania 0,390 mg.kg⁻¹, čo predstavuje nárast MDA o 0,030 mg.kg⁻¹, zatiaľ čo v zakúpených bol na začiatku experimentu obsah MDA 0,129 mg.kg⁻¹ a na konci skladovania 0,381 mg.kg⁻¹, čo predstavuje nárast až o 0,252 mg.kg⁻¹.

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty TBA čísla v mäsovéch výrobkoch, vyjadrené ako množstvo malóndialdehydu (mg.kg⁻¹)

Výrobky	Vyrobené UVLF		Zakúpené v obch. sieti	
	1.deň	14.deň	1.deň	14.deň
Čingovská saláma	0,170 ±0,03	0,192 ±0,06	0,240 ±0,04	0,483 ±0,41
Štrasburské párky	0,360 ±0,02	0,390 ±0,01	0,129 ±0,00	0,381 ±0,02

Záver

Vo vyrobených a zakúpených mäsovéch výrobkoch (Čingovská saláma a Štrasburské párky) bol porovnávaný obsah tuku a hodnotené rozkladné zmeny tukov na základe stanovenia množstva malóndialdehydu. Obsah tuku vo výrobkoch „Čingovská saláma“ bol porovnateľný, avšak vyššie oxidačné zmeny tukov boli zaznamenané vo výrobkoch zakúpených v obchodnej sieti. Obsah tuku vo vyrobených Štrasburských párok bol vyšší v porovnaní s párkami zakúpenými v obchodnej sieti a hodnota MDA na konci skladovania bola bez výraznejších rozdielov.

Pod'akovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené projektom „Vznik a patogenéza obezity vo vzťahu k netradičným rizikovým faktorom obezity“.

Literatúra

BYSTRICKÝ,P. - DIČÁKOVÁ, Z.: Živočíšne tuky v potravinách. In *Slovenský veterinársky časopis, Suplementum*, Košice : 1998, vol. 23, no. 1, s. 1-45. ISSN 1335-0099.

DE LAS HERAS, A. et al.: Comparison of methods for determining malondialdehyde in dry sausage by HPLC and the classic TBA test. In *European Food Research Technology*, 2007, no.217. p.180-184. ISSN 1438-2385.

HALAMÍČKOVÁ, A. a kol.: Dynamika zmien tukových charakteristik krútiho separovaného masa. In *Recenzovaný zborník prednášok a posterových prezentácií z medzinárodnej vedeckej konferencie Hygiena alimentorum XXIV*, ŠVPS SR. 2003, s.124-126. ISBN 80-7148-050-9.

MAČEK,J. a kol.: Základy teórie správnej výživy In KERESTEŠ, J. a kol. *Zdravie a výživa ľudí*. Bratislava : CAD PRESS, 2011. s. 77-111. ISBN 978-80-88969-57-0.

MARCINČÁK, S. a kol.: Rozkladné zmeny tukov počas skladovania bažantov. In *Recenzovaný zborník prednášok a posterových prezentácií z medzinárodnej vedeckej konferencie Hygiena alimentorum XXX*, ŠVPS SR. 2009, s.339-340. ISBN 978-80-7148-060-0.

MARCINČÁK,S. a kol.: Stanovenie malondialdehydu v bravčovom mäse s použitím extrakcie na tuhej fáze a HPLC. In *Chemické listy*. 2006, vol. 100, p.528-532.

ODSTRČIL, J. - ODSTRČILOVÁ, M. *Chemie potravin*, Brno : NCO NZO, 2006.164 s. ISBN 80-7013-435-6.

SEKRETÁR, S.: Tuky vo výžive In KERESTEŠ, J. a kol. *Zdravie a výživa ľudí*. Bratislava : CAD PRESS. 2011. s.171-193. ISBN 978-80-88969-57-0.

TKÁČOVÁ, J. - ANGELOVIČOVÁ, M.: Aetheroleum and fat oxidation of chicken meat, In *Potravinárstvo*. 2013, vol.7, no.1.,p.76-79. ISSN 1337-0960.

VETERINÁRNÍ LABORATÓRNÍ METODIKY. Chémie potravin. SVS ČR, ŠVS SR, Bratislava, 1990, s. 223.

Kontaktní adresa: Anna Reitznerová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, anna.petrova@uvlf.sk

Detekcia prítomnosti rezíduí antimikrobiálnych látok v hydinovom mäse a tkanivách pomocou troch mikrobiálnych inhibičných testov

Detection of the presence of antimicrobial residues in poultry meat and tissues using three microbial inhibition tests

Poláková Zuzana, Kožárová Ivona

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

Summary

The aim of study was to determine the presence of antimicrobial residues in poultry meat and organs with three microbial inhibition test (MIT). The screening was performed using two officially approved methods – Screening Test for Antibiotic Residues (STAR) and Premi[®]Test and by alternative to the currently used MIT - Total Antibiotics (TA). The STAR method comprises five test plates and is suitable for the determination of the aminoglycoside, macrolide, beta-lactam and tetracycline antibiotics, quinolones and sulfonamides. Premi[®]Test and TA are designed to detect a wider range of antibiotics and sulfonamides in one test. Investigated samples were obtained from retail operations and from animals slaughtered in abattoirs and assessed by post-mortem examination to be suitable for human consumption. Using Premi[®]Test, we obtained a positive result in two cases, by TA and STAR method we obtained a positive or dubious results in large amounts of investigated samples.

Keywords: screening; residues; STAR method; Premi[®]Test; Total Antibiotics; poultry

Úvod

Rezíduá sú definované ako rezíduá látok, ktoré majú farmakologický účinok, produktov ich metabolizmu a ostatných látok prenesených do živočíšnych produktov, a ktoré sú pravdepodobne škodlivé pre ľudské zdravie (Smernica Rady 96/23/ES). Rozsiahle používanie antibiotík u zvierat určených na produkciu potravín predstavuje riziko výskytu ich rezíduí v potravinách živočíšneho pôvodu. Ich prítomnosť v potravinách môže mať následne negatívny účinok na zdravie konzumentov. Z tohto dôvodu je potrebné venovať ich prítomnosti v potravinách mimoriadnu pozornosť (Babapour a kol., 2012).

Štátna veterinárna a potravinová správa Slovenskej republiky (ŠVPS SR) každoročne zostavuje Národný plán kontroly rezíduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu (Bíreš a kol., 2005). V súčasnosti sú ŠVPS SR na úradnú kontrolu rezíduí v hydinovom mäse a produktoch schválené metóda STAR a Premi[®]Test. Novou alternatívou k súčasne používaným MIT je Total Antibiotics (TA). Predmetom štúdie bolo stanovenie rezíduí antimikrobiálnych látok v hydinovom mäse a orgánoch a zhodnotiť tým stav výskytu rezíduí v produktoch živočíšneho pôvodu na území SR.

Materiál a metodika

Na vyšetrenie bolo použité hydínové mäso a orgány. Všetky vzorky pochádzali z obchodnej siete a z bitúnkov na území SR, boli zabalené a skladované pri teplote – 20 °C do analýzy. V experimentálnej štúdií bolo vyšetrených 22 vzoriek hydiny. Stanovenie prítomnosti rezíduí antibiotík bolo vykonané metódou STAR, Premi[®]Test-om a TA.

STAR: Kultivačné médiá a testovacie kmene boli zakúpené od firiem Merck (Nemecko), Oxoid (Veľká Británia), Difco (USA) a Českej zbierky mikroorganizmov (Česká republika) a pripravené podľa postupu metódy uvedenej v Zozname úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív (CH 12.19., 2006) Použité boli testovacie kmene *Bacillus subtilis* BGA, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149. Vzorky

svaloviny a orgánov boli získané pomocou sterilného korkovrtu, následne narezané na plátky o hrúbke približne 2 mm a aplikované na povrch agaru. Takto pripravené Petriho misky boli inkubované podľa uvedeného postupu.

Premi[®]Test: 2 – 3 g vzoriek bolo rozmrazených v mikrovlnnej rúre počas 2 minút a 100 µl získanej tekutiny bolo aplikovaných do liekoviek s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Takto pripravené liekovky boli podrobené preinkubácii a následne inkubácii podľa postupu poskytnutého spolu s testom výrobcom.

Total Antibiotics: K 2 – 3 g vyšetovaných vzoriek bolo pridaných 10 ml extrakčného roztoku pripraveného podľa návodu. Takto nachystané vzorky boli inkubované pri 37 °C po dobu 2 hodín. K následnej analýze bolo použitých 200 µl čireho supernatantu, ktorý bol aplikovaný do liekoviek s testovacím kmeňom *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. Liekovky boli inkubované podľa priloženého postupu.

Výsledky

Po inkubácii, v prípade metódy STAR, bola meraná veľkosť inhibičných zón (IZ) od okraja vyšetovanej vzorky po vonkajší okraj IZ. Za pozitívne boli považované vzorky, pri ktorých bola $IZ \geq 2$ mm a v prípade testovacieho kmeňa *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149 $IZ \geq 4$ mm. Po ukončení inkubácie Premi[®]Test-u a TA sa hodnotilo zafarbenie dolných dvoch tretín agaru. Pri negatívnej vzorke bola farba agaru zmenená z fialovej na žltú. Pri pozitívnej vzorke ostala farba agaru nezmenená.

V prvej experimentálnej časti bol vykonaný skrining rezíduí antibiotík v 17 vzorkách s použitím Premi[®]Test-u a TA. V druhej experimentálnej časti bolo vyšetrených celkovo 6 vzoriek pomocou Premi[®]Test-u a TA a výsledky boli následne predbežne potvrdené metódou STAR. Pozitívne výsledky prezentuje Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Pozitívne výsledky skriningu rezíduí s použitím Premi[®]Test-u, Total Antibiotics a metódy STAR

	Matrica	Premi [®] Test	Total Antibiotics	STAR
Experimentálna časť 1	Pečeň	-	+	
	Oblička 1	-	±	
	Oblička 2	-	+	
	Svalovina	+	+	
Experimentálna časť 2	Pečeň	-	-	+
	Oblička	-	-	+
	Svalovina 1	-	+	+
	Svalovina 2	+	+	±
	Svalovina 3	-	+	+

+ pozitívna vzorka, - negatívna vzorka, ± dubiózna vzorka

Pri vyšetovaní vzoriek pomocou metódy STAR sme získali pozitívne výsledky u 4 vzoriek a dubiózny u jednej vzorky. Tabuľka 2 prezentuje IZ nameraných na platniach s testovacím kmeňom *Bacillus subtilis* BGA, *Kocuria rhizophila* ATCC 9341, *Bacillus cereus* ATCC 11778 a *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* ATCC 10149. Vznik IZ predpokladá prítomnosť rezíduí beta-laktámov, makrolidov, tetracyklínov, aminoglykozidov a sulfónamidov vo vyšetovaných matriciach. Pri testovacom kmeni *Escherichia coli* ATCC 11303 inhibičné zóny neboli zaznamenané.

Tabuľka 2: Veľkosti inhibičných zón IZ (mm ± SD) produkované vyšetrovanými tkanivami detegované metódou STAR

Matrica	<i>B. subtilis</i> BGA IZ (mm ± SD)	<i>K. rhizophila</i> ATCC 9341 IZ (mm ± SD)	<i>B. cereus</i> ATCC 11778 IZ (mm ± SD)	<i>B. stearotherophilus</i> ATCC 10149 IZ (mm ± SD)
Pečeň	-	2,86 ± 0,883	9,17 ± 1,360	5,91 ± 1,710
Oblička	2,67 ± 1,594	5,99 ± 0,400	9,46 ± 0,926	5,22 ± 0,982
Svalovina 1	2,07 ± 1,124	2,59 ± 0,659	10,52 ± 1,791	-
Svalovina 2	-	-	-	3,75 ± 0,649
Svalovina 3	-	-	-	4,48 ± 1,149

Záver

Skríning rezíduí antimikrobiálnych látok v produktoch živočíšneho pôvodu je z pohľadu odhalenia zdraviu škodlivých potravín veľmi dôležitý. MIT umožňujú rýchle a nenáročné vyšetrenie veľkého množstva vzoriek. Na základe výsledkov môžeme predbežne konštatovať, že hrozba prítomnosti rezíduí antibiotík v potravinách živočíšneho pôvodu sa vo veľkej miere týka aj územia SR. Platňová metóda STAR je dostatočne citlivá na stanovenie prítomnosti rezíduí antibiotík a vhodnejšou alternatívou k platňovým metódam sa kvôli väčšiemu počtu pozitívnych výsledkov javí novo vyvinutý liekovkový test Total Antibiotics.

PodĎakovanie

Spracovanie príspevku bolo podporené grantom MŠ SR VEGA č. 1/0939/12.

Literatúra

BABAPOUR, A., AZAMI, L., FARTASHMEHR, J.: Overview of antibiotic residues in beef and mutton in Arbedil, North West of Iran. *World Applied Sciences Journal*, 19, 10, 2012, 1417 – 1422. ISSN 1818 – 4952

BÍREŠ, J., IHNÁTOVÁ, M., BÜCHLEROVÁ, Z.: Výsledky kontroly rezíduí v živých zvieratách a v produktoch živočíšneho pôvodu vykonanej orgánmi veterinárnej správy podľa Národného plánu kontroly rezíduí. *Slovenský veterinársky časopis*, XXX, 3, 2005, 142 – 144. ISSN 1335-0099

CH 12.18.: Stanovenie rezíduí inhibičných látok v mäse metódou PREMI® TEST. Úradná metóda laboratórnej diagnostiky potravín a krmív. *Vestník Ministerstva pôdohospodárstva Slovenskej republiky*, ročník 38, čiastka 13, 2006, 64 - 67.

CH 12.19.: Screeningový test na stanovenie rezíduí antibiotík s použitím piatich bakteriálnych kmeňov (metóda STAR). *Zoznam úradných metód laboratórnej diagnostiky potravín a krmív*. In: *Vestník MP SR*, Doplňok č. 1/2006, 38, 2006, str. 68 – 81.

SMERNICA RADY (ES) č. 96/23 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 o rozhodnutí 89/187/EHS a 91/664/EHS. In: *Úradný vestník Európskej únie*, L 125, 1996, 10 – 32.

TOTAL ANTIBIOTICS: Instruction manual. <http://www.biomedica.co.at>

Kontaktná adresa: Zuzana Poláková, MVDr., Ústav hygieny a technológie mäsa, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, zuzutegdesova@gmail.com

Stanovení relativní hodnoty zaplísnění povrchu sýra

The determination of the relative value of the molded surface of the cheese

Osičková Renata, Bartoň Stanislav, Kumbál Vojtěch

Fakulta agronomická, Mendelova univerzita, Brno

Ústav techniky a automobilové dopravy, Brno

Summary

This article discusses processing of the digital image of a food product. The cheese DorBlu with bluish mold was used. The used image analysis is suitable for the determination of relative proportion of the surface covered with mold and further monitoring of evolution of this parameter in time. In this way it is possible to identify and evaluate such variability of the product during aging. All computations were done using program Maple 13.

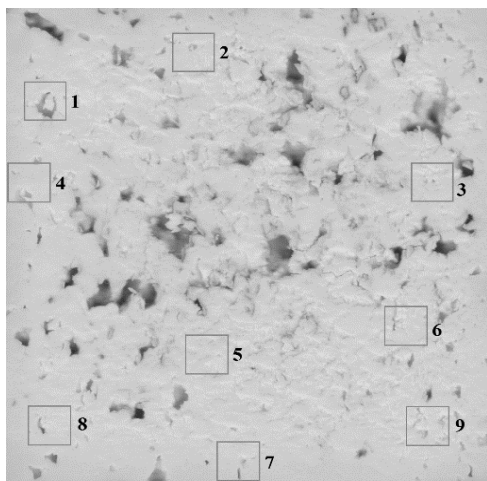
Keywords: Digital Image Processing; RGB; Threshold; LSQ; Maple; Cheese; Mold

Úvod

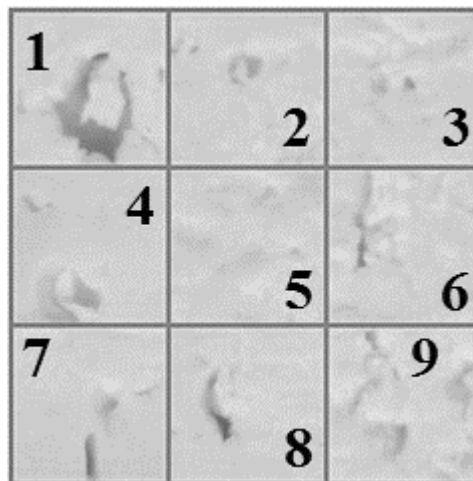
Vyhodnocení relativní části povrchu potraviny, pokryté plísní, patří mezi rozhodující kritéria hodnocení kvality potravin. V předloženém článku je takto vyhodnocen sýr DorBlu, viz [3, 4]. Tento sýr byl zvolen proto, že obsahuje dostatečný počet děr a plísní a pro tuto analýzu sloužil jako vhodný produkt. Pomocí obrazové analýzy lze sledovat nárůst zaplísnění sýra v závislosti na době skladování, což je přínosné z hlediska stanovení kvality sýra a postup uvedený v článku lze použít v oblasti hygieny potravin.

Materiál a metody

Nejdříve byl proveden řez tímto sýrem. Vybraný reprezentativní vzorek, viz obrázek 1, byl umístěn na potravinářskou fólii a poté oskenován. Hlavním důvodem použití scanneru je rovnoměrně osvětlená zobrazovací rovina.



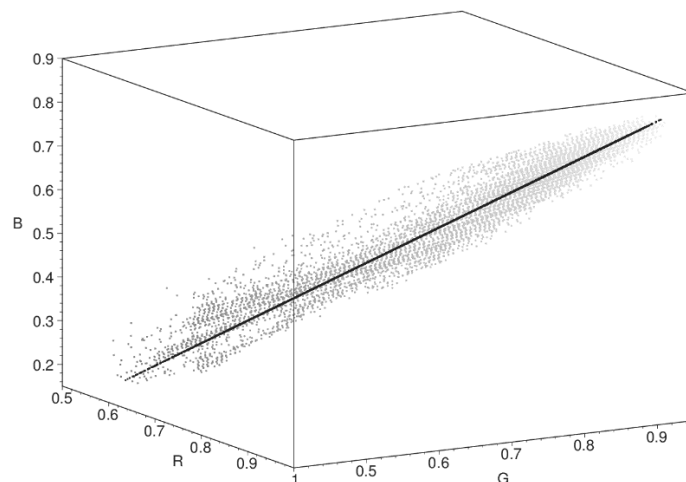
Obrázek 1: Sýr DorBlu



Obrázek 2: Vzorky povrchu

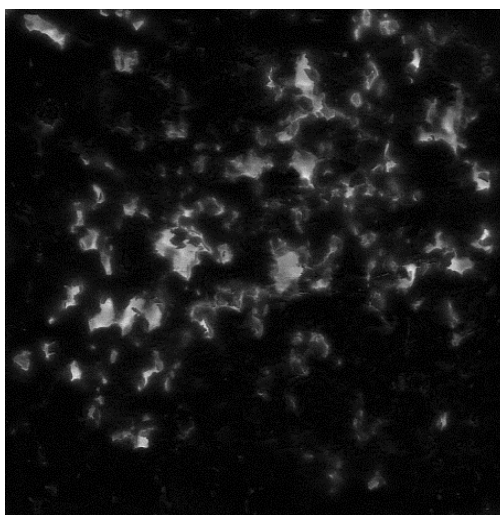
Na digitálním obrazu bylo vybráno 9 reprezentativních vzorků povrchu sýra bez plísně, které byly složeny do pomocného obrázku, viz obrázek 2. Pomocné čáry, zobrazené na snímcích č. 1 a č. 2, slouží pouze pro lepší orientaci. Tyto vzorky slouží pro kalibraci barevné škály, protože sýr obsahuje prohlubně, ve kterých se intenzita barvy povrchu mění v závislosti na hloubce. Proto je obtížné odlišit hlubší dutinu, neobsahující plíseň, od povrch sýra pokrytého plísní.

Každý pixel digitálního obrazu je reprezentován třemi barevnými složkami a to červenou, zelenou a modrou – RGB. Tyto barevné složky je možné přiřadit souřadnicím x -R, y -G a z -B a každý pixel tak odpovídá bodu v prostoru. Z obrázku 3 je zřejmé, že tyto body jsou rozmístěny podle přímky. Parametry této přímky je možné vypočítat v prostředí programu Maple, viz. [1], metodou nejmenších čtverců – LSQ, (Least Squares method), viz [2].



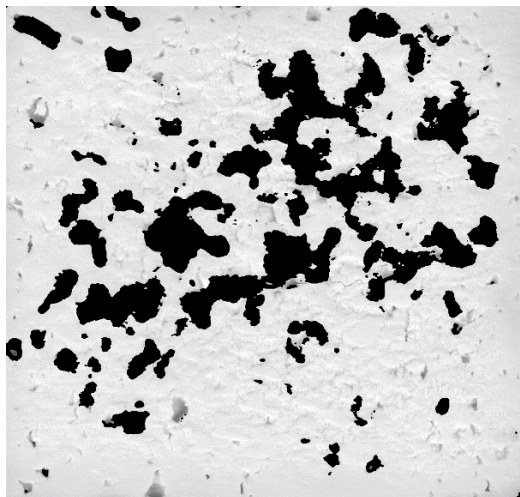
Obrázek 3: Body v prostoru odpovídající pixelům Obr. č. 2 a prostorová přímka

Pokud jsou známy parametry této prostorové přímky, tak pro obrázek č. 1. je možné spočítat vzdálenosti bodů, odpovídajících jeho pixelům, od této přímky. Použité vztahy jsou odvozeny v [5]. Protože pixely, odpovídající plísni, mají odlišné relativní poměry složek RGB, budou tyto body od prostorové přímky více vzdálené než body reprezentující čistý povrch sýra. V dalším kroku je možné tyto vzdálenosti lineárně transformovat tak, aby minimální hodnota vzdálenosti odpovídala 0 a maximální hodnota odpovídala 1. Ke každému pixelu je tak možné přiřadit hodnotu z intervalu $\langle 0,1 \rangle$, což vlastně reprezentuje obraz vzdáleností ve stupních šedi, viz obrázek 4.

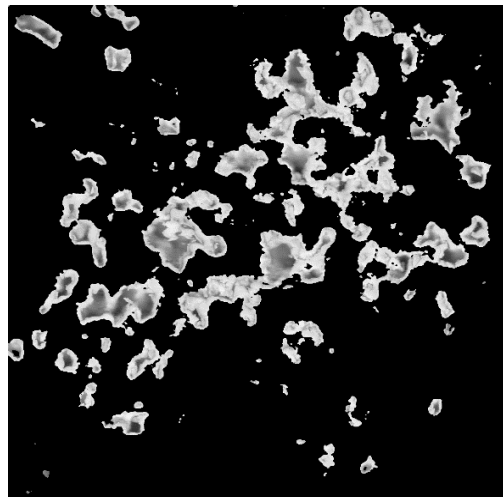


Obrázek 4: Obraz vzdáleností

Pomocí prahování, (thresholding) [1], je možné v programu Maple stanovit intenzitu šedé, která odpovídá hranici mezi pixely odpovídající sýru nebo plísni a oddělit pixely, které reprezentují zaplísněný povrch a nezaplísněný povrch, viz obrázek 5 a obrázek 6. Stanovení procenta povrchu pokrytého plísni je již je elementární záležitost.



Obrázek 5: Nezaplísňený povrch



Obrázek 6: Povrch pokrytý plísní

Výsledky

Pro zobrazený vzorek sýra DorBlu je procento povrchu pokrytého plísní 18 %. Potřebný čas pro zpracování v programu Maple byl 8 sekund.

Diskuze

Tato metoda obrazové analýzy je jednoduchá a přesná, ale vyžaduje jistou obratnost ve zpracování digitálního obrazu a také znalosti programu computerové algebry jako např. Maple nebo Matlab.

Závěr

Tato metoda je použitelná nejen pro vyhodnocení zralosti sýra, ale obecně pro určení relativního pokrytí povrchu předmětu odlišnou barvou. Velmi snadno ji lze použít i pro vyhodnocování pokrytí listů postřikem nebo pro stanovení procenta tuku v šunce apod.

Materiály, které nelze skenovat je možné vyhodnocovat z digitálních fotografií. Výše uvedený algoritmus je však nutné modifikovat – povrch nebude rovnoměrně osvětlený a proto je nutné místo prostorové přímky využít plochu v prostoru, aby kompenzovala nerovnoměrné osvětlení povrchu a určovat vzdálenosti od této plochy. Na odpovídajících algoritmech se již pracuje.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IP 19/2015, „Vývoj algoritmů pro zpracování digitálních záznamů chování a tvarů zemědělských plodin, materiálů a produktů“, IGA AF MENDELU.

Literatura

- [1] *Maple User Manual*. Maplesoft, 2011, Waterloo Canada, ISBN 978-1-926902-07-4
- [2] GANDER, W., BARTOŇ, S.: Least Squares Fit with Piecewise Functions. In: Gander, W., Hřebíček, J.: *Solving problems in Scientific Computing using Maple and Matlab*. 4. vyd., Springer, 2004, s. 433-450. ISBN 3-540-21127-6.
- [3] <http://www.canstockphoto.cz/snimky-fotografie/dorblu.html#types>, 1.4.2015
- [4] <http://www.champignon.de/de/kontakt/kontakt>, 1.4.2015
- [5] REKTORYS, K.: *Přehled užité matematiky*. Prometheus, 2009, s. 720, ISBN 978-80-7196-180-2

Kontaktní adresa: Renata Osičková, Ing., Ústav techniky a automobilové dopravy, Agronomická fakulta, Mendelova Univerzita Brno, Zemědělská 1, 613 00, Brno, xosicko7@node.mendelu.cz

Vplyv selénových doplnkov krmiva na akostné vlastnosti vajec

Effect of selenium supplementation on egg quality

^{1,2}Fašiangová Miroslava, ^{1,2}Bořilová Gabriela, ³Kumprechtová Dana,
^{1,2}Steinhauserová Iva

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²CEITEC — Středoevropský technologický institut, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

³Výzkumný ústav živočišné výroby Praha Uhřetěves

Summary

The aim of this study is to determine of the effect of selenium supplementation on specific egg properties. Bovans Brown aged 19 weeks were divided in 6 groups. Group T1 was fed with diets supplemented with inorganic selenium and group T2 – T5 with organic selenium. The 6th group was a control group (group K) without selenium supplementation. After 21 days of treatment the eggs were collected and certain properties of eggs were determined. Freshness was determined during the storage. The results showed that the concentration of selenium in albumen was statistically the lowest in group T1 and K ($p < 0,05$). The lowest selenium content in yolk was detected in group K ($p < 0,05$). There are neither significant differences in the values of egg weight, nor in the value of yolk weight, nor in the eggshell firmness among the groups. The values of Haugh units were significantly higher in the fresh eggs from the group T1 comparing to the fresh eggs from control group ($p < 0,05$). The highest values of albumen pH were observed in group K. This study showed that the treatment needs to be longer to demonstrate more significant differences between the effects of mentioned selenium forms on the egg properties.

Keywords: eggs, selenium, supplementation, properties, freshness

Úvod

V súčasnosti je dopyt po funkčných potravinách veľmi vysoký. Jednou z možností príjmu nedostatkového selénu je príjem tohto prvku prostredníctvom konzumácie vajec od nosníc kŕmených krmivom so selénovým doplnkom. Okrem faktu, že je tento esenciálny stopový prvok významný v oblasti metabolických pochodov v tele človeka a zvierat'a, v potravinárstve je známy ako prírodný antioxidant pôsobiaci ako preventér oxidácie tukov. Vďaka tomu selén môže vplyvať na niektoré vlastnosti vajec. Je však dokázané, že miera efektu selénu na určité akostné parametre vajec závisí od chemickej formy, v ktorej sa selén nachádza.

Materiál a metodika

Pokus prebieha v rámci projektu, ktorý plyní od novembra 2014 do júla 2015. Nosniciam typu Bovans Brown chovaným v obohatenom klietkovom chove je od 19. týždňa veku podávané krmivo s variabilnými selénovými doplnkami a podľa formy selénového doplnku sú nosnice rozdelené do 6 skupín. Skupine T1 je podávané krmivo s doplnkom anorganického selénu a skupinám T2 – T5 s doplnkom selénu organickej formy. Kontrolnej skupine (K) je podávané bazálne krmivo bez selénovej suplementácie. Projekt zahŕňa sledovanie akostných a chemických parametrov vajec, mäsa a pečene a sledovanie zootechnických aspektov nosníc. Prezentované parciálne výsledky prvej periódy pokusu (dĺžka periódy 21 dní) zahŕňajú hmotnosť vajec, hmotnosť žltka, hrúbku a pevnosť škrupinky, pH bielka a žltka, Haughové jednotky (HU) a obsah selénu vo vaječnom žltku a bielku zisťovaného metódou atómovej absorpčnej spektrometrie. Rozdiely medzi výsledkami jednotlivých skupín sú štatisticky vyhodnocované pomocou Študentovho t-testu.

Výsledky a diskusia

Z výsledkov prvej periódy vyplýva, že obsah selénu v žĺtku bol najvyšší u skupiny T3. U bielka bola štatisticky najvyššia hladina selénu v skupine T4 ($p < 0,05$). Štatisticky najnižšie hodnoty obsahu selénu v žĺtku boli namerané u kontrolnej skupiny ($p < 0,05$). V porovnaní s ostatnými skupinami mala skupina K a T1 výrazne nízke hodnoty obsahu selénu v bielku ($p < 0,05$). Autori Chinrasri et al. (2009) a Skřivan et al. (2006) sa s výsledkami o nižšom obsahu selénu v skupinách s doplnkom anorganickej formy selénu a u skupín bez suplementácie zhodujú s našimi výsledkami. Pri porovnávaní efektu organického a anorganického selénu, zistili Skřivan et al. (2010) vyšší obsah selénu vo vajciach so selénovým doplnkom organickej formy už po troch týždňoch pokusu.

Najvyššie priemerné hodnoty hmotnosti vajec dosiahli skupiny T3 a T4. Naopak najnižšie hodnoty hmotnosti vajec mala skupina K a T1. No rozdiely medzi hodnotami tohto parametru jednotlivých skupín zatiaľ štatisticky významné neboli. Predpokladá sa však, že po dlhšom trvaní nášho pokusu sa efekt organického selénu štatisticky prejaví aj u hmotnosti vajec. Vyššiu hmotnosť vajec u skupín s organickou formou selénu uvádzajú Skřivana et al. (2006) a Paynea et al. (2005), ktorý tvrdia, že prídavok organického selénu má na veľkosť vajec pozitívny efekt. Autori ďalej popisujú súvislosť medzi hmotnosťou vajec a pevnosťou škrupinky. Uvádzajú, že u ťažších vajec sa predpokladá nižšia pevnosť a hrúbka škrupinky. Nami zistené hodnoty z prvej periódy však toto zistenie nepotvrdzujú. Hodnoty hrúbky škrupinky boli u skupiny K významne vyššie ako u skupín T1 a T2 ($p < 0,05$). U hodnôt pevnosti škrupinky a hmotnosti žĺtka sa štatisticky významné rozdiely medzi skupinami nenašli. Medzi skupinami so selénovým doplnkom organickej formy a doplnkom anorganickej formy neobjavili v hmotnosti žĺtka rozdiely ani autori Mohiti-Asli et al. (2008).

Tabuľka 1: Priemerné hodnoty obsahu selénu vo vaječnom bielku a žĺtku ($\mu\text{g/kg}$), hmotnosti vajca a žĺtka (g), hrúbky (mm) a pevnosti škrupinky (N) u čerstvých vajec

	Obsah Se v bielku	Obsah Se v žĺtku	Hmotnosť vajca	Hmotnosť žĺtka	Hrúbka škrupinky	Pevnosť škrupinky
T1	110,7 \pm 35,6 ^a	618,4 \pm 84,9 ^a	54,94 \pm 3,76	11,76 \pm 0,94	0,37 \pm 0,03 ^{abc}	48,89 \pm 9,75
T2	164,9 \pm 7,9 ^b	602,9 \pm 79,3 ^a	55,34 \pm 3,53	11,89 \pm 0,59	0,36 \pm 0,02 ^a	49,43 \pm 7,08
T3	201,0 \pm 15,6 ^c	649,9 \pm 61,5 ^a	55,86 \pm 3,63	11,79 \pm 0,76	0,38 \pm 0,02 ^{bd}	49,64 \pm 6,16
T4	205,9 \pm 31,2 ^{cd}	625,7 \pm 72,4 ^a	55,96 \pm 4,61	11,58 \pm 0,87	0,38 \pm 0,03 ^{abcd}	53,14 \pm 11,51
T5	186,4 \pm 16,1 ^d	628 \pm 42,9 ^a	55,31 \pm 3,63	11,59 \pm 0,88	0,38 \pm 0,02 ^{cd}	52,36 \pm 7,82
K	11,4 \pm 6,3 ^e	491,9 \pm 34,8 ^b	54,15 \pm 2,83	11,75 \pm 0,63	0,39 \pm 0,01 ^d	51 \pm 11,12

abcd; hodnoty v rovnakom stĺpci s rozdielnymi písmenami sú štatisticky významne rozdielne ($p < 0,05$)

Tabuľka 2: Priemerné hodnoty pH vaječného žĺtka a bielka a HU v priebehu skladovania

	pH ŽĽTKA		pH BIELKA		HU	
	čerstvé	28-dňové	čerstvé	28-dňové	čerstvé	28-dňové
T1	6,06 \pm 0,05	6,41 \pm 0,36 ^{ab}	8,12 \pm 0,21 ^{ab}	9,46 \pm 0,02 ^a	104,55 \pm 4,30 ^{ab}	79,15 \pm 5,26
T2	6,03 \pm 0,09	6,50 \pm 0,21 ^a	8,05 \pm 0,16 ^a	9,46 \pm 0,02 ^a	103,95 \pm 4,55 ^b	82,07 \pm 6,39
T3	6,04 \pm 0,04	6,35 \pm 0,19 ^{ab}	8,09 \pm 0,21 ^{ab}	9,44 \pm 0,03 ^a	102,41 \pm 4,79 ^{ab}	80,67 \pm 5,26
T4	6,06 \pm 0,03	6,53 \pm 0,25 ^a	8,14 \pm 0,19 ^{ab}	9,39 \pm 0,09 ^b	103,29 \pm 3,78 ^{ab}	79,78 \pm 2,66
T5	6,07 \pm 0,05	6,55 \pm 0,34 ^a	8,20 \pm 0,06 ^{ab}	9,40 \pm 0,06 ^b	103,32 \pm 3,81 ^{ab}	77,85 \pm 6,45
K	6,03 \pm 0,09	6,21 \pm 0,12 ^b	8,34 \pm 0,18 ^b	9,41 \pm 0,04 ^b	99,014 \pm 5,00 ^a	77,68 \pm 5,60

ab; hodnoty v rovnakom stĺpci s rozdielnymi písmenami sú štatisticky významne rozdielne ($p < 0,05$)

U čerstvých vajec bol medzi hodnotami HU skupiny T1 a skupiny K zistený štatisticky významný rozdiel ($p < 0,05$). Z výsledkov HU u starších vajec vyplýva, že relatívne lepšie hodnoty dosiahli skupiny s doplnkom organického selénu, čo sa zhoduje so zistením autorov Arpášová et al. (2012). Scheider et al. (2010) uvádzajú vyššie hodnoty pH oboch vaječných zložiek u vzoriek so selénovým doplnkom krmiva anorganickej formy v porovnaní so

vzorkami s organickým selénovým doplnkom. Vysvetlením je antioxidačný účinok selénu, ktorý je u organickej formy aktívnejší. Naše výsledky pH získané v priebehu skladovania vajec z prvej periódy zatiaľ toto zistenie nepotvrdili, no očakáva sa, že sa efektivita účinku selénu organickej formy prejaví v nasledujúcich periódach.

Záver

Z výsledkov prvej periódy pokusu je zrejmé, že už po 21 dňoch je účinok selénovej suplementácie krmiva preukázateľný. Rozdiely medzi hodnotami akostných parametrov vajec skupiny bez suplementácie v porovnaní so suplementovanými skupinami boli dokázané. U niektorých parametrov boli dokázané tiež významné rozdiely medzi skupinami s anorganickou a organickou formou selénového doplnku. Je však nutné pripomenúť, že sa jedná o výsledky prvej periódy pokusu, ktorý zahŕňa hodnotenie iba vybraných parametrov v limitovanom čase.

PodĎakovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom 2350 - 96 – SM242352.

Literatúra

ARPAŠOVÁ, H.; HAŠČÍK, P.; KAČÁNIOVÁ, M.; GÁLIK, B.; GOLIAN, J.; MELLEN, M. The Effect of Various Forms and Doses of Selenium Supplementation of the Hens Diet on Selected Qualitative Parameters and Freshness of Table Eggs. *Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies*. 2012, vol. 45, no. 1, s. 11–16.

CHINRASRI, O.; CHANTIRATIKUL, P.; THOSAIKHAM, W.; ATIWETIN, P.; CHUMPAWADEE, S.; SAENTHAWEESEK, S.; CHANTIRATIKUL, A. Effect of Selenium-enriched Bean Sprout and Other Selenium Sources on Productivity and Selenium Concentration in Eggs of Laying Hens. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 2009, vol. 22, no. 12, s. 1661-1666.

MOHITI-ASLI, M.; SHARIATMADARI, F.; LOTFOLLAHIAN, H.; MAZUJI, M.T. Effects of supplementing layer hen diets with selenium and vitamin E on egg quality, lipid oxidation and fatty acid composition during storage. *Canadian Journal of Animal Science*. 2008, vol. 88, no.3, s. 475-483.

PAYNE, R.L.; LAVERGNE, T.K.; SOUTHERN, L.L. Effect of inorganic versus organic selenium on hen production and egg selenium concentration. *Poult Sci*. 2005, vol. 84, no. 2, s. 232-7.

SCHEIDELER, S.E; WEBER, P; MONSALVE, D. Supplemental vitamin E and selenium effects on egg production, egg quality, and egg deposition of α -tocopherol and selenium. *J Appl Poult Res*. 2010, vol. 19, no 4, s. 354-360.

SKŘIVAN, M.; BUBANCOVÁ, I; MAROUNEK, M.; DLOUHÁ, G. Selenium and α -tocopherol content in eggs produced by hens that were fed diets supplemented with selenomethionine, sodium selenite and vitamin E. *Czech J. Anim. Sci*. 2010, vol. 55, no. 9, s. 388–397.

SKŘIVAN, M.; ŠIMÁNĚ, J.; DLOUHÁ, G., DOUCHA, J. Effect of dietary sodium selenite, Se-enriched yeast and Se-enriched Chlorella on egg Se concentration, physical parameters of eggs and laying hen production. *Czech J. Anim. Sci*. 2006, vol. 51, no. 4, s. 163–167.

Kontaktná adresa: Miroslava Fašiangová, Ing., Ústav hygieny a technologie masa, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1-3, 612 42 Brno, H13394@vfu.cz

Detekce porušení medu přehřátím

Detection of honey's adulteration by overheating

Zábrodská Blanka, Dluhošová Sandra, Borkovcová Ivana, Vorlová Lenka

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

Summary

Honey is commodity in great demand nowadays. This is understandable considering the massive loss of bees due to their diseases. There is greater demand for the liquid honey than for crystallized one among the consumers, so both beekeepers and honey vendors attempt to keep honey in liquid state as long as possible. This is most often achieved by heating which is problematical because honey loses its typical nutritional and physicochemical properties. The amount of hydroxymethylfurfural (HMF) in honey increases by heating. HMF is not only very reactive compound but in high concentrations represents health hazard. In addition to that heating of the honey decreases activity of enzymes beneficial for our health such as enzyme diastasis and others. In this study we analyzed forty honey samples collected directly from the Czech beekeepers. Values of diastatic activity and HMF concentration as indicators of honey heating were evaluated. The results of analyses proved that only one sample of honey failed legislative requirements (Decree 76/2003 Coll.) by the parameter of diastatic activity but according to the assessment of quality standards ČSV 1/1999 moreover four samples do not meet the HMF parameter requirements. Nevertheless, from the results is evident that among Czech beekeepers essentially does not occur overheating of the honey.

Keywords: *bee products; hydroxymethylfurfural; diastase activity; warm*

Úvod

Problematika ztekucování medu zahřevem nás provází již od doby, kdy čeští konzumenti začali preferovat tekutý med před medem zkrystalizovaným. Mezi většinou konzumentů medu je totiž zakořeněný mýtus, že správný med neobsahuje krystalky. Především obchodníci, ale také včelaři se snaží této preferenci zákazníků vyhovět tím, že med udržují co nejdelší dobu tekutý (Bartáková et al., 2011), čehož lze v určitých případech dosáhnout vhodným skladováním, ovšem většinou se nelze vyhnout jeho zahřátí (Tosi et al., 2004). Pokud je med zahříván na teplotu do 40 °C, jeho typické fyzikálně-chemické a nutriční vlastnosti nebývají porušeny. Ovšem při zahřevu na vyšší teplotu vzrůstá obsah HMF (Tosi et al., 2002; Fallico et al., 2004; Turhan et al., 2008), který má ve vysokých koncentracích nepříznivé účinky na lidské zdraví (Islam et al., 2014) a jeho limit je dán legislativou (Vyhláška 76/2003 Sb.). Současně klesá aktivita důležitých, zdraví prospěšných enzymů jako je diastatická aktivita (Tosi et al., 2004; Babacan and Rand, 2007; Tosi et al., 2008; Samborska and Czelejewska, 2014), jejíž limit je taktéž uveden v legislativě.

Materiál a metody

V této studii jsme analyzovali čtyřicet vzorků květových i medovicových medů od českých včelařů z let 2011-2014. Vzorky pocházely z těchto lokalit: Mladoňov (Šumperk), Rusava (Bystřice pod Hostýnem), Brumov – Bylnice (Zlín), Krnov, Pržno (Ostrava), Libavá (Olomouc), Náměšť nad Oslavou, Brno, Rudice (Blansko), Petrušov (Moravská Třebová), Mělčany (Brno), Hradec Králové, Slatiňany (Chrudim), Želetava (Třebíč), Úhřetická Lhota (Pardubice), Stará Živohošť (Benešov), Dětkovice (Vyškov), Plzeň, Ostrava – Bartovice, Ostrava – Nová Bělá, Oleksovice (Znojmo), Kralice nad Oslavou, Hodonín, Letovice (Bystřice nad Pernštejnem) a Ostrava Proskovice. HMF byl stanoven metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Analýza byla provedena pomocí separačního modulu Alliance 2695 s PDA detektorem 2996. Separace probíhala na koloně Zorbax Eclipse XDB

C8, 150 x 4,6 mm, 5 micron. Mobilní fázi tvořila směs methanolu a vody v poměru 10: 90. Podmínky pro chromatografii byly průtok 0,8 ml/min, teplota kolony 35 °C, nastříkované množství vzorku 10 µl. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 285 nm. K vyhodnocení byla použita metoda kalibrační přímky pomocí softwaru Empower 2. Diastatická aktivita byla stanovena metodou dle Shadeho.

Výsledky a diskuse

Z analýzy medů jsme zjistili, že pouze jeden vzorek neodpovídá Vyhlášce 76/2003 Sb. u hodnoty diastatické aktivity (min. 8 stupňů dle Shadeho). Ovšem při posouzení vzorků dle Normy jakosti ČSV 1/1999 navíc nevyhovují čtyři vzorky u parametru HMF (max. 20 mg/kg).

Tabulka 1: Analýza HMF a diastatické aktivity květových a medovicových medů

Druh medu	Květový		Medovicový	
	Diastatická aktivita (stupně dle Shadeho)	HMF (mg/kg)	Diastatická aktivita (stupně dle Shadeho)	HMF (mg/kg)
Legislativní parametry				
Statistické parametry				
Průměr	15,59	8,85	15,24	6,31
Max	26,62	31,48	28,64	32,44
Min	7,99	0,83	8,63	0,12
Medián	15,23	6,30	13,99	2,71
Směrodatná odchylka	4,730	7,993	4,952	9,441

Pouze u jednoho vzorku klesla diastatická aktivita pod hranici danou legislativou (Vyhláška 76/2003 Sb.), ovšem u čtyř vzorků došlo ke zvýšení hodnot HMF nad hranici Normy jakosti ČSV 1/1999. U diastatické aktivity u pěti vzorků klesly hodnoty téměř k nejnižší hranici dané legislativou (Vyhláška 76/2003 Sb.). Z toho vyplývá, že by tyto hodnoty nemusely v době spotřeby odpovídat legislativním požadavkům. Všechny tyto vzorky mohly být zahřáty, ovšem dle korelace hodnot diastatické aktivity a HMF lze usuzovat, že zahřát byl pravděpodobně pouze jeden vzorek, kde diastatická aktivita klesla pod hranici danou legislativou (Vyhláška 76/2003 Sb.) a HMF překročil limit Normy jakosti ČSV 1/1999. U ostatních vzorků je možné, že vysoké hodnoty HMF či nízké hodnoty diastatické aktivity vznikly již v úle, kdy v pozdních jarních a letních měsících zde může teplota přesáhnout 45 °C, pokud jsou úly umístěny na přímém slunci.

Závěr

U Českých včelařů téměř nedochází ke ztekucování medu záhřevem. Problémem by mohly být vysoké teploty v nestíněných úlech v pozdních jarních a letních měsících, při kterých pravděpodobně dochází k nárůstu hodnot HMF a poklesu diastatické aktivity.

Poděkování

Tato studie byla podporována projektem IGA VFU Brno 209/2015/FVHE. Děkuji Mgr. Petře Borkovcové, Ph.D. za pomoc s finalizací textu této práce.

Literatura

BABACAN, S.; RAND, A.G. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Sciences*. 2007, vol. 72, s. 50-55.

BATÁKOVÁ, K.; DRAČKOVÁ, M.; BORKOVCOVÁ, I.; VORLOVÁ, L. Impact of microwave heating on hydroxymethylfurfural content in Czech honeys. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011, vol. 29, no. 4, s. 328–336.

ČESKÝ SVAZ VČELAŘŮ Svazová norma ČESKÝ MED Norma jakosti ČSV 1/1999.

FALLICO, B.; ZAPPALÁ, M.; ARENA, E.; VERNERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*. 2004, vol. 85, s. 305–313.

ISLAM, M.N.; KHALIL, M.I.; ISLAM, M.A.; GAN, S.H. Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*. 2014, vol. 34, no. 7, s. 733-742.

MZe Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. *Sbírka zákonů*, 2003, část 32, s. 2470-2487.

SAMBORSKA, K.; CZELEJEWSKA, M. The influence of thermal treatment and spray drying on the physicochemical properties of Polish honeys. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014, vol. 38, no. 1, s. 413-419.

TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RE, E.; LUCERO, H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*. 2002, vol. 77, s. 71–74.

TOSI, E.A.; RE, E.; LUCERO, H.; BULACIO, L. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2004, vol. 37, s. 669–678.

TOSI, E.; MARTINET, R.; ORTEGA, M.; LUCERO, H.; RE, E. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*. 2008, vol. 106, s. 883–887.

TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; REYHAN TAVUKCUOGLU, H. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, vol. 41, s. 1396–1399.

Kontaktní adresa: Blanka Zábrodská, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H13015@vfu.cz

Senzorická a instrumentální analýza vybraných texturních parametrů rajčatových kečupů

Sensory and instrumental analysis of selected textural parameters of tomato ketchups

Taufarová Alexandra, Tremlová Bohuslava

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Práce se zaměřuje na vybrané texturní parametry rajčatových kečupů, které jsou paralelně analyzovány jak instrumentálně tak i pomocí senzorického hodnocení. Instrumentálně hodnocené parametry zahrnovaly viskozitu a konzistenci, senzorická analýza se zaměřila zejména na viskozitu, hustotu a senzorickou přijatelnost textury. Analýzy byly provedeny na souboru vzorků, který tvořilo 7 kečupů zakoupených v české a slovenské tržní síti. Cílem práce bylo současně také srovnání instrumentálně i senzoricky stanovených hodnot, na základě kterého by bylo možné ověřit možnost použití instrumentální analýzy k předběžnému orientačnímu stanovení senzorické přijatelnosti kečupů. V práci jsou uvedeny průměrné hodnoty vybraných texturních parametrů, rovněž také hodnoty těchto parametrů u vzorků se senzoricky nejlépe a nejhůře ohodnocenou texturou. Nebyl potvrzen jednoznačný vliv viskozity a konzistence jako dílčích texturních parametrů na hedonické hodnocení textury. Za účelem odhadování senzorické přijatelnosti textury kečupů tedy není možné využít rychlou instrumentální analýzu viskozity či konzistence.

Keywords: *viscosity; consistency; density; sensory texture acceptability*

Úvod

Textura potravin byla definována jako senzorický a funkční projev mechanických vlastností, strukturních vlastností a vlastností povrchu, které mohou být vnímány zrakem, sluchem, dotykem a kinesteticky (Szczesniak, 2002). Nezahrnuje pouze jednu vlastnost, ale hned několik vlastností, ze kterých je u kečupů významná zejména konzistence a viskozita. Pojmem konzistence (neboli hustota) kečupu je chápáno množství suspendovaných částic v séru, jinými slovy poměr mezi kapalnou a pevnou fází tvořenou nerozpustnými částicemi z rajčat (Varela *et al.*, 2003). Měření konzistence patří k základním stanovením používaným v průmyslu zpracujícím rajčata pro stanovení kvality produktů. Dalším z významných kvalitativních parametrů rajčatových produktů je jejich viskozita. Poznání této reologické vlastnosti je u kapalných a polotuhých potravin důležité zejména pro nastavení tokových parametrů v průběhu výroby. Spolehlivá a přesná reologická data jsou potřebná pro nastavení a optimalizaci jednotlivých operací (nasávání, míchání, zahřívání, atd.), a pro zajištění přijatelnosti produktu, jelikož produkty s nevhodnou viskozitou mohou být posouzeny jako nepřijatelné, nebo prodejné pouze za nižší cenu. Konzistence a viskozita kečupů jsou tedy významným atributem jak z technologického hlediska, tak i z hlediska konzumenta – a to jak v průběhu skladování (pro stanovení stability), tak i v oblasti kontroly jakosti obecně (Sahin and Ozdemir, 2004; Koocheki *et al.*, 2009).

Texturní vlastnosti kečupů mohou být stanoveny instrumentálními metodami i senzorickou analýzou, přičemž obě metody mají své výhody i nevýhody a vzájemně se doplňují. V závislosti na zvolené analýze se pohled na jednotlivé vlastnosti i jejich popis částečně liší. Pod pojmem viskozita ve smyslu fyzikální vlastnosti měřitelné instrumentálně se ukrývá rychlost toku vyvolaného jednotkou síly. V případě senzorické analýzy je viskozita definována jako síla potřebná pro natažení kapaliny ze lžice na jazyk. Co se týká konzistence, její přesná definice je komplikovanější, jelikož je často vnímána jako obecný pojem popisující

texturu. Konzistence rajských protlaků a kečupů se instrumentálně obvykle měří metodou Bostwick založenou na rychlém vylití definovaného množství produktu a měření délky roztékání (Boulekou, 2011). V případě instrumentálního měření konzistence zpětnou extruzí je konzistence popsána jako plocha křivky znázorňující pevnost. V různých slovnících je konzistence vysvětlována jako stupeň hustoty, případně pevnosti. V případě senzoričké analýzy může být konzumentovo vnímání konzistence zjednodušeně označeno jako hustota (Van Vliet, 2002).

Na Evropském trhu je dostupné velké množství kečupů, lišících se vzájemně senzoričkou jakostí. Cílem studie bylo ověření možnosti použití instrumentálního stanovení vybraných texturních parametrů pro odhad senzoričké přijatelnosti textury kečupů. Dalším cílem bylo popsat texturní vlastnosti kečupů dostupných na českém a slovenském trhu.

Materiál a metody

Pro analýzu bylo použito 7 vzorků kečupů zakoupených v české a slovenské tržní síti. Byly charakteristické širokým rozptylem, co se týče obsahu rajčat (130 – 230 g na 100 g kečupu), některé byly bez zahuštění, některé zahuštěny modifikovaným škrobem, v některých případech byl pro stabilizaci textury přidán také xanthan. Vzorky byly před měřením skladovány v chladničce při teplotě 5 °C.

Senzoričkový panel byl tvořen 10 školenými hodnotiteli, kteří měli předchozí zkušenosti se senzoričkou analýzou potravin. Analýza probíhala v senzoričké laboratoři s oddělenými boxy pro hodnotitele na základě připravených formulářů pro senzoričké hodnocení kečupů. U vzorků byly hodnoceny dílčí texturní vlastnosti, mezi které patřila viskozita a hustota a také přijatelnost textury, a to pomocí devítimístní bodové stupnice, kde 9 odpovídala nejvyšší viskozitě/hustotě/přijatelnosti textury.

Instrumentální analýza vybraných texturních vlastností byla provedena pomocí texturometru (TA.XTplus, Stable Micro Systems). Vzorek kečupu byl nadávkován do vzorkovnice o průměru 50 mm přibližně do 75 % jejího objemu. Texturní vlastnosti každého ze vzorků byly měřeny třikrát. Pro měření byly použity parametry výrobcem doporučené pro měření textury kečupů: disk pro zpětnou extruzi o průměru 35 mm, hloubka průniku sondy 30 mm, rychlost pohybu sondy v průběhu snímání dat 1,0 mm.s⁻¹, moment spuštění měření při zátěži 5 g (spodní část disku již v plném kontaktu s produktem). Statistická analýza byla provedena pomocí statistického softwaru Minitab (Minitab Inc., State College, USA).

Výsledky a diskuse

Textura patří u kečupů k významným parametrům ovlivňujícím přijatelnost produktů konzumenty. Viskozita byla hodnocena v průběhu nalévání vzorku ze lžice, hustota jako vnímání odporu v ústní dutině. Průměrné hodnoty viskozity vzorků stanovené u 7 vzorků kečupů senzoričkou analýzou se pohybovaly v rozmezí od 3,00 do 8,33, u hustoty od 2,67 do 7,33. Průměrná hodnocení senzoričké přijatelnosti textury dosahovaly hodnot od 3,78 do 7,67. V případě instrumentálního měření se hodnoty konzistence pohybovaly v rozmezí od 864,26 do 2 330,03 g.s. Hodnoty instrumentálně naměřené viskozity se pohybovaly v rozmezí od -1 517,97 do -352,54 g.s. Hodnocení kvality rajčatových produktů bylo provedeno také v rámci řecké studie (Boulekou *et al.*, 2011), která na základě viskozity (měřené pomocí rotačního viskozimetru) a konzistence (měřené pomocí Bostwickova konzistometru) srovnávala kvalitu tepelně ošetřených rajčatových šťáv vyrobených klasickým postupem hot break a cold break se šťávami ošetřenými vysokým tlakem.

Analýzou výsledků instrumentálního i senzoričkého hodnocení texturních parametrů byla na základě hodnot Pearsonova korelačního koeficientu potvrzena vysoká korelace ($p < 0,05$) mezi instrumentálně a senzoričkou stanovenou viskozitou, a také mezi instrumentálně

a senzorycky stanovenou konzistencí (hustotou). Ani jeden z těchto dílčích texturních parametrů samostatně však neovlivňoval senzoryckou přijatelnost textury. Díky vysoké korelaci obou použitých metod je však možné využít výsledků senzorycké analýzy, konkrétně hedonického hodnocení příjemnosti textury, pro popis texturních vlastností panelem nejlépe ohodnoceného vzorku. Tento je charakteristický vysokou instrumentálně naměřenou viskozitou i konzistencí, rovněž vysokou senzorycky stanovenou viskozitou a hustotou. Senzorycky nejhůře ohodnocený vzorek z hlediska příjemnosti textury dosahoval jak v případě senzorycké, tak i instrumentální analýzy nízkých hodnot dílčích texturních parametrů, jak je uvedeno v tabulce 1.

Tabulka 1: Texturní parametry senzorycky nejlépe a nejhůře hodnocených vzorků

	Instrumentální konzistence [g.s]	Instrumentální viskozita [g.s]	Senzorycká viskozita	Senzorycká hustota	Senzorycká přijatelnost textury
Nejlepší vzorek	2 218,96	-1 401,42	8	7	7,67
Nejhorší vzorek	1 076,35	-542,20	4	3,56	3,78

Co se týče množství rajčat použitých pro výrobu 100 g kečupu, u obou vzorků bylo použito přibližně stejné množství, a to kolem 130 g rajčat, což byla minimální hodnota v rámci souboru námi hodnocených vzorků. Charakteristiky nejlépe a nejhůře senzorycky ohodnocených vzorků kečupu však naznačují, že pro hodnotitele reprezentující běžné konzumenty byly přijatelnější vzorky s vyššími hodnotami instrumentálně stanovené konzistence a viskozity a senzorycky stanovené hustoty a viskozity. To je v souladu s výsledky studie Weenen *et al.* (2005), ve které byla, na základě senzorycké analýzy zahuštěných omáček, dressingů a podobných produktů, potvrzena vyšší senzorycká přijatelnost v případě produktů s vyšší hustotou.

U našeho souboru vzorků však po provedení analýzy zobecněného lineárního modelu (General linear model) nelze potvrdit jednoznačný vliv viskozity a konzistence jako dílčích texturních parametrů na hedonické hodnocení textury. Podobný závěr lze vyvodit i z výsledků publikovaných ve studii Sharoba *et al.* (2005). Za účelem odhadování senzorycké přijatelnosti textury kečupů tedy není možné využít rychlou instrumentální analýzu viskozity či konzistence. Nepřítomnost závislosti mezi vybranými texturními vlastnostmi a senzoryckou přijatelností textury však může být způsobena samotnou volbou zkoumaných texturních vlastností. Vhodnější texturní vlastností by mohla být například mez toku, u které byl ve studii Štern *et al.* (2007) potvrzen téměř lineární vztah se senzoryckou přijatelností textury.

Závěr

Na základě výsledků této studie lze říct, že pro hodnotitele, potažmo konzumenta, je textura mnohem komplexnější vlastností a není zřejmě vnímána výlučně jako viskozita či hustota, i když tyto dílčí charakteristiky jsou nejsnadněji popsitelné. Další studií bychom chtěli navázat na zjištěná fakta a vyselektovat dílčí texturní parametry, které by lépe zachytily faktory ovlivňující přijatelnost textury pro konzumenta.

Literatura

K dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Alexandra Tauferová, Ing., Ústav hygieny a technologie vegetabilních potravin, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, tauferovaa@vfu.cz

Hodnotenie rizika prieniku potravinového nebezpečenstva do potravín na rozhraní systémov HACCP

Risk assessment of food hazards penetration into foods at the HACCP systems contact points

Toropilová Júlia, Bystrický Pavel

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

Summary

Since 2001, every food business operator has to have implemented HACCP system. Great part of them relies on functional HACCP of their business partners at risk analysis and consider the input materials to be safe. Maybe this is why there are „unexpected“ food hazards penetrations into foods and through them to consumers. There is an assumption that after years since establishing many HACCP systems are maintained routinely and become levelled with GMP in their functionality, i.e. they do not act preventively. The RSF data are an indirect evidence. Information gathered from 22 answered questionnaires (from 50 distributed) allow to estimate the motivation level and functionality of the existing HACCP systems and their benefits as seen by the FBOs.

Keywords: HACCP systém; riziko; prienik nebezpečenstvi; potraviny živočíšneho pôvodu

Úvod

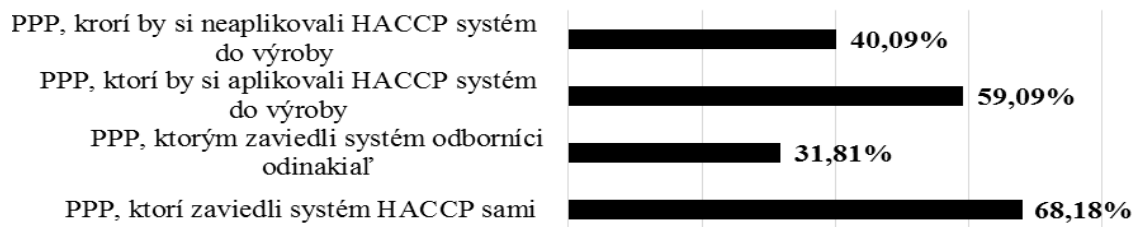
HACCP je systém, ktorý sa používa v potravinárskom priemysle na zabezpečenie bezpečnosti potravín. Ide o systém založený na prevencii rizika, ktorý umožňuje prevádzkovateľom potravinárskych podnikov identifikovať kritické kontrolné body pre riziká skôr, ako ohrozia bezpečnosť potravín (FAO, 1998). Nebezpečné potraviny poškodzujú spotrebiteľa a ohrozujú zdravie konzumenta. Od roku 2001 je HACCP systém povinnou súčasťou systémov na zabezpečenie hygieny výroby potravín a teda aj predmetom kontroly kontrolných orgánov. Z podstaty HACCP vyplýva, že jeho implementácia do systémov zabezpečovania hygieny potravín je komplexná a v rôznych prevádzkových podmienkach má pomerne veľkú variabilitu. To môže byť potenciálnym zdrojom nedorozumení medzi prevádzkovateľmi a kontrolnými orgánmi. Aj keď zo zákona vyplýva povinnosť pre všetkých výrobcov a osoby, ktoré manipulujú alebo uvádzajú potraviny do obehu, vypracovať a zaviesť systém zabezpečenia kontroly hygieny potravín, značná časť prevádzkovateľov pri analýze rizika počíta s tým, že dodávatelia surovín (potravín na ďalšie spracovanie) a zložiek majú tiež výrobu riadenú pod funkčným HACCP systémom a teda považuje tieto vstupy za bezpečné. Po rokoch od zavedenia sú mnohé systémy HACCP udržiavané rutinne bez dôkladnej verifikácie a dostávajú sa svojou funkčnosťou na úroveň základnej SVP, t.j. nie sú viac funkčne preventívne. Kombináciou týchto faktorov dochádza k prieniku "neočakávaných" potravinových nebezpečenstiev do potravín a cez ne ku konzumentovi, spôsobujúc alimentárne ochorenia. Preto je potrebné analyzovať mieru motivácie a funkčnosti existujúcich systémov HACCP a so zameraním nie iba na ich individuálnu funkčnosť, ale aj na funkčnosť celku po ich vzájomnom prepojení. Pritom je dôležité zohľadniť aj ekonomické a kvalifikačné možnosti prevádzkovateľov a spoluprácu s kontrolnými orgánmi, najmä v súvislosti s tokom informácií o potravinových nebezpečenstvách.

Materiál a metodika

Potrebné informácie o implementácii HACCP systému boli zhromažďované prostredníctvom dotazníka. S cieľom zapojenia čo najviac prevádzkovateľov do projektu boli dotazníky zaslané e-mailom a opätovne aj poštou. Do projektu sa doteraz zapojilo 22 z celkového počtu 50 oslovených prevádzkarní. Dotazník pozostával zo 17 otázok.

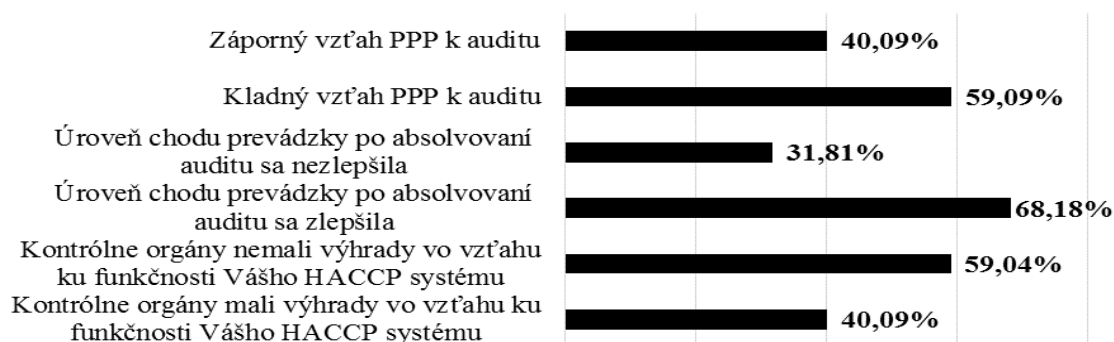
Výsledky a diskusia

100% prevádzkarní má zavedený HACCP systém, z toho 40% prevádzkarní len kvôli tomu, že im to zákon určuje. Samostatne si zaviedlo HACCP 68% z opýtaných respondentov. Kontrolné orgány boli nápomocné pri zavádzaní systému do výroby až v 90% prevádzkarní (Graf 1).



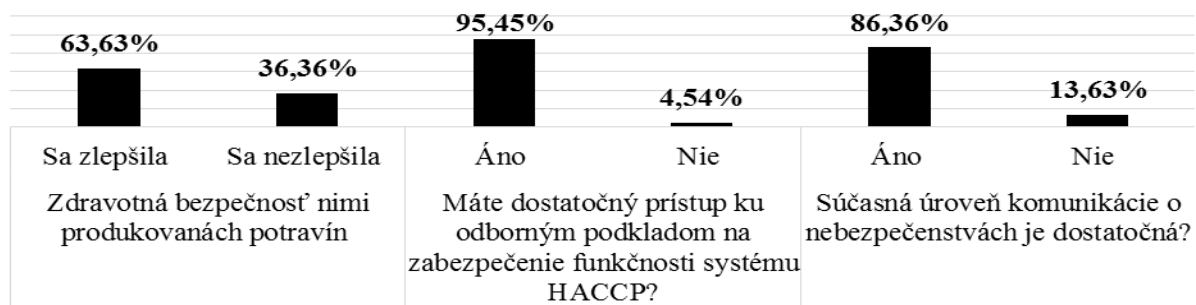
Graf 1: Zavedenie HACCP systému prevádzkovateľov do svojej výroby

Nebezpečné výrobky poškodzujú spotrebiteľa a ohrozujú jeho zdravie. Ak keď každý výrobca či dovozca smie ponúkať na trhu iba výrobky, ktoré sú bezpečné, kontrolné orgány majú za povinnosť na to dohliadať. Preto kontrolujú funkčnosť HACCP systému aj prostredníctvom auditov a na základe ich zistení je možné zlepšiť mieru zdravotnej bezpečnosti produkovaných potravín. Vzťah k takýmto auditom zo strany prevádzkovateľov je kladný (viac ako 59%). U viac ako 68% prevádzkovateľov boli audity prospešné pretože viedli k zdokonaleniu chodu prevádzky. Pritom kontrolné orgány zistili a pomohli odstrániť nedostatky v 40% zavedených systémov HACCP a u ostatných (59%) nemali výhrady voči funkčnosti HACCP systému (Graf 2). Viac ako 82% prevádzkarní už svoj HACCP systém po prvotnom zavedení upravovalo. Zmeny boli vynútené buď výrobnými procesmi (31%), alebo zmenou právnych predpisov (27%), či oboma vplyvmi (40%). Viac ako 64% prevádzkovateľov sa domnieva, že po zavedení systému HACCP do výroby sa zlepšila zdravotná bezpečnosť nimi produkovaných potravín (Graf 3).



Graf 2: Postoj prevádzkovateľov potravinárskych podnikov (PPP) ku auditom

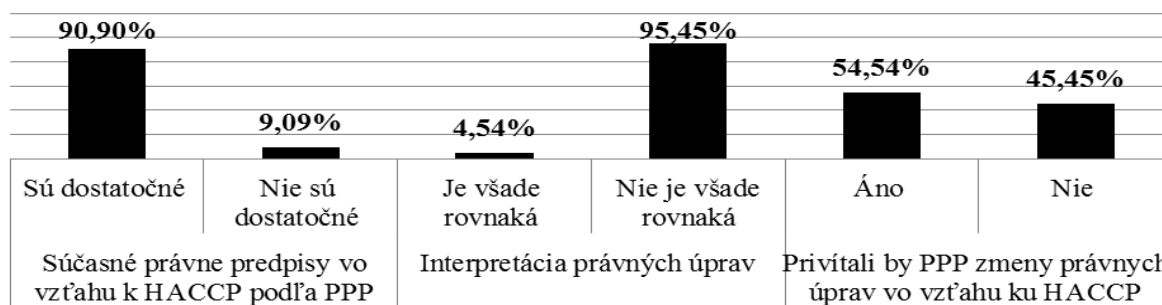
V procese analýzy rizík je veľmi dôležitá komunikácia. K odborným diskusiám dochádza medzi posudzovateľmi rizík a samozrejme producentami, t. j. tými, ktorí sa podieľajú na výrobe, resp. môžu nejako ovplyvniť bezpečnosť produktov. V prípade výskytu rizika je potrebné čo najlepšie a najrýchlejšie zvládnuť opatrenia na zabránenie prieniku nebezpečenstva do potravín. Preto dobrá a rýchla komunikácia o rizikách medzi kontrolnými orgánmi (napr. pomocou RASF) a producentmi je veľmi dôležitá. Väčšina prevádzkovateľov (86%) považuje súčasnú komunikáciu o možných nebezpečenstvách za dostatočnú (Graf 3).



Graf 3: Úroveň zlepšenia bezpečnosti potravín po zavedení HACCP systému do výroby PPP

Viac ako 90% prevádzkovateľov sa zhodlo v tom, že súčasné právne úpravy sú vo vzťahu ku HACCP dostatočné, no až 95% z nich si myslí, že interpretáciu zákona nie je všade rovnaká. V ekonomicky otvorenom systéme s nestabilnou ekonomikou to môže spôsobovať problémy či už na úrovni implementácie práva, alebo na úrovni ochrany konzumenta.

Väčšina opýtaných prevádzkovateľov (55%) by privítala zmeny právnych úprav (napr. zjednodušenie, tak aby zákony boli pre každého zrozumiteľné a podľa možnosti viedli k zníženiu nákladov na výrobu). Na druhej strane prevádzkovatelia pristupujú ku zmenám proaktívne keďže zmeny môžu výrazne zasahovať už do vypracovaných systémov a môžu navyšovať finančný rozpočet producenta (Graf 4).



Graf 4: Postoj prevádzkovateľov potravinárskych podnikov (PPP) ku súčasným právnym predpisom vo vzťahu ku HACCP

Záver

Získané informácie nám poskytli možnosť oboznámiť sa s tým, ako prevádzkovatelia vnímajú funkčnosť a prínos HACCP systému. Nízka motivácia prevádzkovateľov naznačuje možnosť zlyhania HACCP a to najmä na úrovni verifikácie analýzy nebezpečenstiev. Je potrebné analyzovať príčiny tejto nízkej motivácie pretože HACCP systém je už dosť aj tak náročný a nie je vhodné navrhovať jeho úpravy bez dôkladného uváženia a bez spolupráce s tými ktorých sa to týka, teda s prevádzkovateľmi.

Literatúra

Food and Agricultural Organization (1998). Food quality and safety systems – A training manual on food hygiene and the Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) system. ISBN 92-5-104115-6

Kontaktná adresa: Júlia Toropilová, MVDr., Katedra hygieny a technológie potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 040 01 Košice, julia.toropilova@gmail.

SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat
a hygiena vegetábilí*

Využití rakytníkových výlisků (*Hippophae rhamnoides*) v dietách u užitkových nosnic a jejich vliv na zbarvení vaječného žloutku

Use of sea buckthorn pellets (*Hippophae rhamnoides*) in diets for laying hens and their effect on the colour of egg yolk

¹Krejcarová Jana, ¹Straková Eva, ²Suchý Pavel

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

Summary

The aim of this study was to find out the effect of supplement of sea buckthorn pellets in feed mixture for laying hens on intensity of egg yolk colour. Sea buckthorn pellets, which are formed as waste products during obtaining juice from sea buckthorn berries, are very rich source of nutrients and bioactive compounds. In 1 kg of sea buckthorn pellets were included 208.4 g nitrogenous substances, 169.2 g of fat, 171.3 g of fibre, 430.1 g of non-nitrogenous extract substances and 21.1 g of ash matter. Among other things sea buckthorn pellets are very rich source of natural pigments, which could have a positive influence on colour of egg yolk of laying hens. The study included 4 groups of laying hens. One group was control group and 3 groups were experimental groups (feed mixture enriched by 2, 5 and 10 % of sea buckthorn pellets). Length of this experiment was 4 weeks. Every week was taken 40 eggs in each group in this study. Results showed that enrichment of feed mixture by sea buckthorn pellets significantly increased intensity of egg yolk colour of experimental groups against control group.

Keywords: sea buckthorn; fruit pellets; chemical composition; feed mixture hens

Úvod

Rakytník řešetlákový (*Hippophae rhamnoides*) je zařazován mezi rostliny z čeledi hlošínovité (*Elaeagnaceae*) (Christaki, 2012). Jeho název pochází ze staré řečtiny. „*Hippo*“ znamená v překladu kůň a „*phaos*“ znamená v českém jazyce záře nebo světlo. Tyto dvě slova můžeme dohromady přeložit jako „*třpytící se kůň*“ (Suryakumar et Gupta, 2011). Jedná se dvoudomý, opadavý keř či strom, který je posetý tuhými trny (Kumar et Sagar, 2007). Jeho přirozený výskyt je v oblastech střední Asie a severozápadní Evropy. Kořeny rakytníku jsou schopny fixovat vzdušný dusík. Stromy rakytníku obvykle dosahují výšky 3 – 4 metrů. Zeleně zbarvené listy mají na povrchu trichomy, které jim dávají stříbrný nádech. Listy jsou úzké, kopinaté a mají střídavé uspořádání (Li et Beveridge, 2003; Suryakumar et Gupta, 2011). Plody rakytníku dosahují velikosti 6 – 9 mm, mají oválný tvar, jsou šťavnaté a bohaté na obsah olejů. Zralé plody mají barvu od tmavě žluté, přes oranžovou až po načervenalou (Suryakumar et Gupta, 2011). Rakytník se nejčastěji vyskytuje ve volné přírodě na březích řek a na slunných stranách příkrých svahů v nadmořské výšce 2 000 až 3 600 metrů nad mořem (Dhyani et al., 2007). Všechny jeho části obsahují mnoho bioaktivních složek, nejvíce však jeho plody. Rakytník je velmi dobrým zdrojem přírodních antioxidantů (kyselina askorbová, tokoferoly, karotenoidy a flavonoidy). Dále je také významným zdrojem proteinů, lipidů (především nenasycených mastných kyselin – kyselina olejová, kyselina linolová a kyselina linolenová), cukrů, organických kyselin, fytoosterolů, vitamínů (hlavně vitamínu C) a minerálních látek (Christaki, 2012). Velký zájem si získal díky svým početným pozitivním účinkům, především příznivému působení na zdraví organismu. Z těchto důvodů je v posledních letech rakytník řešetlákový stále více využíván jak v oblasti výživy lidí, tak také se rozšiřuje jeho použití v oblasti výživy zvířat.

Materiál a metodika

Tato práce vznikla na základě požadavků pěstitelů rakytníku, kteří rakytník pěstují pro získání šťávy z jeho plodů. Při získávání šťávy vznikají odpadní produkty, pro které se snažíme najít vhodné využití a to hlavně v rámci výživy zvířat. Při sklizni 1 ha se získá 1 500 l šťávy z plodů rakytníku a vznikne 570 kg odpadního produktu ve formě výlisků.

Ze základních chemických analýz byl u rakytníku stanoven obsah dusíkatých látek a obsah dusíku. Obsah dusíku byl stanoven metodou dle Kjeldahla a vynásoben koeficientem 6,25. Dusík byl zjištěn pomocí analyzátoru Buchi (*firma Centec automatika, spol. s.r.o.*). Tuk byl stanoven na přístroji ANKOM^{XT10} Fat Analyzer (*firma O.K. SERVIS BioPro*). Obsah vlákniny byl stanoven na přístroji ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer (*firma O.K. SERVIS BioPro*). Obsah popelovin se stanovil vázkově po zpopelnění při teplotě 550 °C za předepsaných podmínek. Obsah Ca, P, Mg, K, Zn, Cu a Fe byl zjištěn pomocí atomové absorpční spektrometrie. Brutto energie výlisků byla stanovena kalorimetricky pomocí přístroje AC 500 (*firma LECO*).

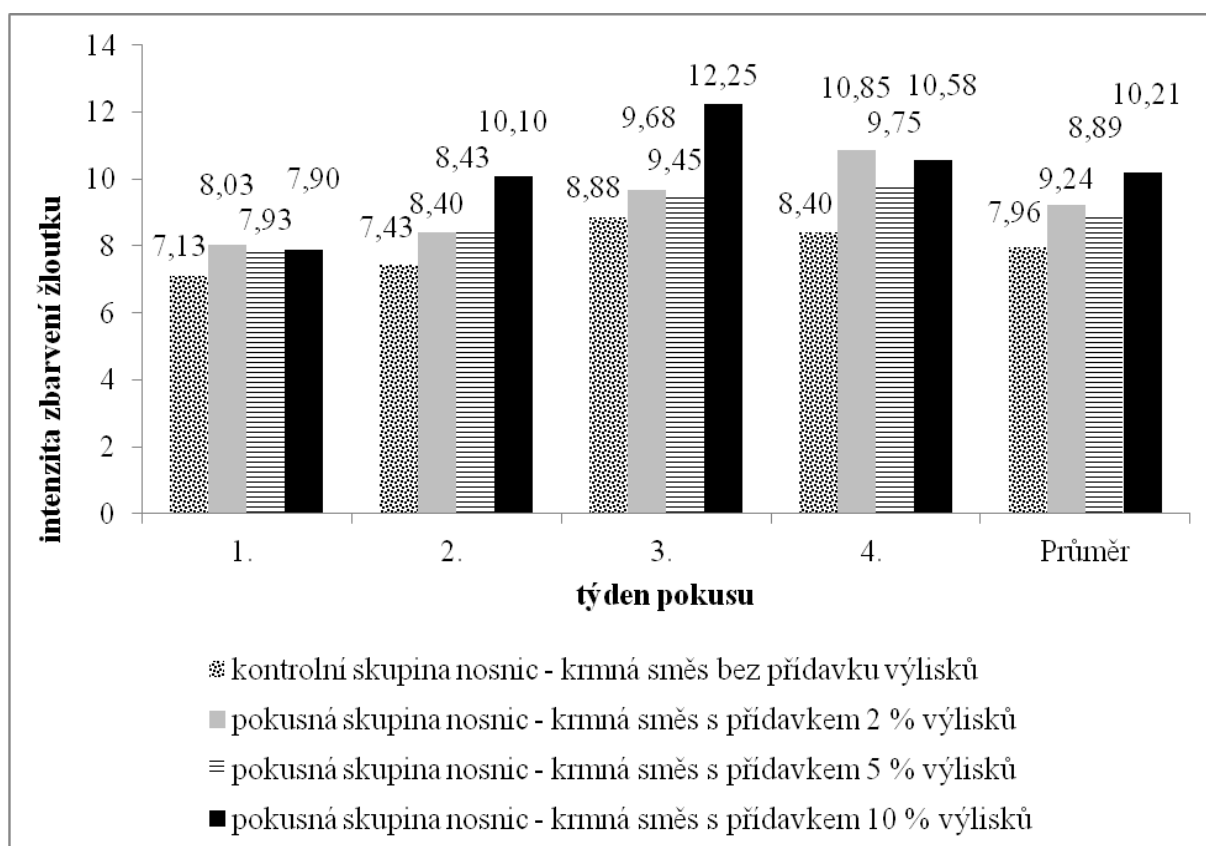
Cílem této studie bylo zhodnotit na základě chemického rozboru nutriční hodnotu výlisků rakytníku a posoudit jejich možné použití jako přísada do krmných směsí ve výživě užitkových nosnic a to především z hlediska využití pigmentů obsažených v rakytníku a následného ovlivnění zabarvení vaječného žloutku nosnic.

Experiment byl prováděn na nosnicích Isa Brown. Byly vytvořeny 4 skupiny po 8 nosnicích. Jednalo se o kontrolní skupinu (krmná směs bez rakytníkových výlisků) a 3 pokusné skupiny (s přísadou 2 %, 5 % a 10 % rakytníkových výlisků v krmné směsi). Vlastní pokus trval 4 týdny. Každý týden bylo odebráno od každé skupiny 40 vajec, tj. 160 vajec z každé skupiny za celé období experimentu. Barva žloutků byla hodnocena pomocí stupnice La Roche.

Výsledky a diskuze

Na základě provedené chemické analýzy jsme zjistili, že rakytníkové výlisky obsahují velmi hodnotné živiny, které můžeme využít ve výživě zvířat. V 1 kg výlisků z rakytníku je obsaženo vysoké množství dusíkatých látek (208,4 g), velké množství tuku (169,2 g) a také vlákniny (171,3 g). Vysoké množství vlákniny je v případě vyššího podílu rakytníkových výlisků v krmivu pro monogastrická zvířata méně vhodné. Vyšší podíl vlákniny je hlavně prospěšný ve výživě býložravců, kde je často limitující nedostatek vlákniny. Množství bezdusíkatých látek výtažkových v 1 kg rakytníkových výlisků bylo 430,1 g a množství popela bylo 21,1 g. Brutto energie byla 23,6 MJ/kg rakytníkových výlisků. Při hodnocení minerálních látek obsažených ve výliscích z rakytníku, lze říci, že z makroprvků je ve větším množství zastoupen pouze draslík (K). V 1 kg sušiny je přítomno 6,3 g draslíku. Co se týče obsahu mikroprvků, je rakytník jejich bohatým zdrojem.

Ze získaných výsledků testace rakytníkových výlisků můžeme říci, že výlisky obsažené v krmných směsích příznivě ovlivňují intenzitu zbarvení vaječného žloutku. Výsledky experimentu vychází ze 4 sledovaných skupin užitkových nosnic. Skupina kontrolní byla krmena krmnou směsí bez přísady výlisků, pokusné skupiny nosnic byly krmeny obohacenou krmnou směsí o přísadu 2 %, 5 % a 10 % rakytníkových výlisků. Výsledky uvedené v grafu 1 dokládají, že krmné směsi obohacené rakytníkovými výlisky průkazně zvyšují intenzitu zbarvení vaječného žloutku ve všech pokusných skupinách ve srovnání se skupinou kontrolní. V průběhu prováděného pokusu byla zachycena tendence zvyšování intenzity barvy vaječného žloutku u všech pokusných skupin. Jako optimální považujeme přísadu 2 % rakytníkových výlisků v krmných směsích pro užitkové nosnice.



Graf 1: Změny intenzity zbarvení žloutku užitkových nosnic v průběhu čtyřtýdenního experimentálního pokusu.

Závěr

Výsledky experimentu dokládají, že rakytníkové výlisky mohou sloužit jako vhodná krmná komponenta do krmných směsí pro užitkové nosnice: pro svůj vysoký obsah dusíkatých látek, pro vysoký obsah tuku, pro dobrý zdroj minerálních látek, vysoký efekt na zbarvení vaječného žloutku.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena Interní grantovou agenturou VFU Brno, IGA 1/2014/FVHE.

Literatura

CHRISTAKI, E. *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn): a potential source of nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2012, vol. 2, no. 3, s. 69-72.

DHYANI, D.; MAIKHURI, R.K.; RAO, K.S.; KUMAR, L.; PUROHIT, V.K.; SUNDRIYAL, M.; SAXENA, K.G. Basic nutritional attributes of *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn) populations from Uttarakhand Himalaya, India. *Current Science*. 2007, vol. 92, no. 8, s. 1148-1152.

KUMAR, S.; SAGAR, A. Microbial associates of *Hippophae rhamnoides* (Seabuckthorn). *Plant Pathology Journal*. 2007, vol. 6, no.4, s. 299-305.

LI, T.S.C.; Beveridge T.H.J. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): Production and utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003. 133 s. ISBN 0-660-19265-9.

SURYAKUMAR, G.; GUPTA, A. Medicinal and therapeutic potencial of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, vol. 138, no. ?, s. 268-278.

Kontaktní adresa: Jana Krejcarová, MVDr., Ústav výživy zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H14002@vfu.cz

Změny aminokyselinového spektra pastevních porostů v průběhu vegetačního období

Changes in amino acid spectrum of pasture vegetation during the growing season

¹Vopálenský Josef, ²Krejcarová Jana

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

Summary

The aim of this study was to compare changes in amino acid spectrum of pasture vegetation during the growing season, as a basis for optimizing nutrition for pasture breeds of beef cattle. Samples of pasture vegetation were collected at selected pasture Šumava in locality Křišťanov (District Prachatice). Pasture crop from which the samples were obtained, is used year-round for pasture beef cattle breed. During follow-up were performed in total 4 samples (May, June, July, August). In each of the months of collection stand of 10 points, which was randomly selected. The area of one sampling site was 1 m². Samples were weighed immediately after collection and were immediately transported to the laboratory. After drying green mass and homogenize it was made basic analysis. During the growing season changes were observed in the monitored values as nitrogen substances (NL) and even individual amino acids (AK). The analysis shows that the amount of NL is from May to July declined gradually, then in August it has increased. For amino acids was observed during these months drop their quantitative representation in the stand.

Keywords: pasture; nitrogen substances; amino acids

Úvod

Přirozené travní porosty (drnový fond) s převahou trav nazýváme podle způsobu využití loukami a pastvinami. Jsou to složitá a pestrá floristická společenství trav, jetelovin a ostatních dvouděložných rostlin, která vznikla samovolným zatravněním nebo umělým zatravněním na specifických stanovištích, udržující se pravidelným využíváním. Složení pastevních a lučních směsek ve značné míře rozhoduje o produkční schopnosti a kvalitě porostu. Musí zaručovat vysoký a stálý výnos píce, brzy vytvořit zapojený drn a vyhovovat způsobu využívání porostu. Při sestavování lučních a pastevních směsek musí být přihlíženo ke klimatickým podmínkám dané oblasti a rozložení dešťových srážek, k půdním podmínkám dané oblasti a lokality, způsobu využívání porostu tj. výroba sena, senáže nebo pastva, k druhu pasených zvířat a pastevní technice.

Materiál a metody

Cílem práce bylo porovnat zastoupení dusíkatých látek, esenciálních a neesenciálních aminokyselin zelené hmoty pastevního porostu a na základě jeho analýzy posoudit změny aminoanalýzy pastevního porostu v průběhu vegetačního období. Z hlediska botanického spektra byl v odebraných vzorcích porostu determinován převažující jetel bílý (*Trifolii albi*), z pícních trav byla determinována zejména kostřava červená (*Festuca rubra*), kostřava luční (*Festuca pratensis*) a lipnice luční (*Poa pratensis*). Pastviny byly trvale využívány v letním i zimním období zvířaty (pasoucí se masná plemena skotu). Celkem byly provedeny 4 odběry vzorků, a to v květnu, červnu, červenci a srpnu z 10 míst porostu. Individuální vzorek byl odebrán vždy z plochy 1 m². U odebraných vzorků byla přímo v terénních podmínkách stanovena hmotnost zelené hmoty. Po převozu do laboratoře byly vzorky kvantitativně usušeny a homogenizovány pro následnou analýzu. Z chemických analýz jsme se zaměřili na obsah dusíkatých látek, obsah dusíku stanovený metodou dle Kjeldahla vynásobený

koeficientem 6,25. Dusík byl stanoven analyzátozem Buchi (*firma Centec automatika, spol. s.r.o.*). Na základě aminoanalýzy byl zjištěn obsah jednotlivých aminokyselin: Asp, Thr, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Val, Met, Ile, Leu, Tyr, Phe, His, Lys a Arg. Aminokyseliny byly stanoveny po kyselé hydrolýze 6 N HCl při 110 °C po dobu 24 hodin automatickým analyzátozem aminokyselin AAA 400 (*firma INGOS a.s. Praha*) na základě barvotvorné reakce aminokyselin s oxidačním činidlem-ninhydrinem. Dosažené výsledky byly zpracovány matematicko-statistickými metodami za použití statistického programu Unistat 5.6 for excel.

Výsledky

V průběhu vegetačního období, jak dokumentuje tabulka 1, docházelo k výrazným změnám v obsahu dusíkatých látek. Tyto změny byly charakterizovány statisticky významným ($P \leq 0,05$) až vysoce významným ($P \leq 0,01$) poklesem dusíkatých látek (NL) v letním období červen - červenec, oproti květnu. Naopak od srpna bylo zaznamenáno jejich významné ($P \leq 0,05$) až vysoce významné ($P \leq 0,01$) zvýšení, oproti letním měsícům. Tabulka 1 dále uvádí podíl tzv. čistého proteinu (vyjádřeno sumou aminokyselin) z celkových dusíkatých látek. Na základě dosažených výsledků můžeme konstatovat, že i když byl zachycen výraznější pokles v měsících červen, červenec, srpen oproti květnu, stále jsou dosažené výsledky uspokojivé a můžeme konstatovat, že se jednalo o kvalitní zdroj pastevní píce s dostatečnou dotací aminokyselin pro výživu masného plemene skotu.

Naše pozornost byla dále věnována zastoupení esenciálních aminokyselin v pastevním porostu. Jak uvádí tabulka 2, jejich nejvyšší obsah byl v pastevním porostu zaznamenán při 1. odběru (květen). Významný pokles podílu esenciálních aminokyselin v pastevním porostu byl zachycen v měsíci červnu, červenci i srpnu oproti odběru v měsíci květnu.

Tabulka 1: Průměrné zastoupení dusíkatých látek a podíl dusíku aminokyselinového původu v pastevním porostu v průběhu vegetačního období

Sledované ukazatele	Dusíkaté látky	Čistý protein
	g/kg	%
1. odběr (květen)	43,7	90
2. odběr (červen)	39,0	76
3. odběr (červenec)	37,5	81
4. odběr (srpen)	47,7	76

Obdobný průběh změn v aminokyselinové skladbě pastevního porostu v průběhu vegetačního období, jako u esenciálních aminokyselin, byl pozorován i u neesenciálních aminokyselin (tabulka 2). Tyto změny byly charakterizovány snížením podílu neesenciálních aminokyselin v pastevním porostu v měsíci červnu, červenci i srpnu oproti měsíci květnu.

Ze sledovaného souboru esenciálních aminokyselin (Thr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, His, Lys, Arg) byla v pastevním porostu v rámci celého vegetačního období nejméně zastoupena aminokyselina metionin, nejvíce pak aminokyseliny lysin, arginin a leucin.

Ze sledovaného souboru neesenciálních aminokyselin (Asp, Ser, Glu, pro, Gly, Ala, Tyr) byla v pastevním porostu nejméně zastoupena aminokyselina serin, nejvíce pak kyselina aspartová a glutamová.

Tabulka 2: Průměrný podíl esenciálních a neesenciálních aminokyselin v pastevním porostu v průběhu vegetačního období

Sledované ukazatele	Dusíkaté látky %	Podíl esenciálních aminokyselin %	Podíl neesenciálních aminokyselin %
1. odběr (květen)	100	43	47
2. odběr (červen)	100	36	40
3. odběr (červenec)	100	40	41
4. odběr (srpen)	100	35	41

Diskuse

Práce si stanovila za cíl posoudit změny v obsahu dusíkatých látek a aminokyselin v pastevním porostu v průběhu vegetačního období. O obsahu aminokyselin v pastevních porostech jsou v praxi jen minimální poznatky. Podobnou problematikou se u koní zabýval např. Lewis (1995), který studoval stravitelnost proteinů. Významem dílčích aminokyselin, zejména pak obsahem lysinu a treoninu, se zabývali Antilley et al. (2007) a Graham et al. (1994).

Závěr

Práce dává přehled o dynamických změnách obsahu dusíkatých látek a zastoupení esenciálních i neesenciálních aminokyselinách na konkrétním pastevním areálu Šumavy v lokalitě Křišťanov (okres Prachatice), který slouží k výživě masného skotu. Výsledky budou sloužit jako podklad k optimalizaci výživy masného skotu v průběhu pastevního období, a tím povedou ke zlepšení užitekosti pasoucích se zvířat.

Poděkování

Práce byla finančně podpořena centralizovaným rozvojovým projektem Zvyšování kvalifikace studentů doktorských studijních programů a post-doktorandů zemědělských a veterinárních oborů zapojením do multidisciplinárních meziuniverzitních týmů.

Literatura

ANTILLEY TJ, GARY MS, POTTER GD, GIBBS PG, SCOTT BD, CLABORN LD. Evaluating the technique of using nitrogen retention as a response criterion for amino acid studies in the horse. *J Equine Vet Sci.* 2007, vol. 27 p. 525-30.

GRAHAM PM, OTT EA, BRENDEMUEHL JH, TENBROECK SH. The effect of supplemental lysine and threonine on growth and development of yearling horses. *J Anim Sci.* 1994, vol. 72, p. 380-86.

LEWIS LD. Equine clinical nutrition: Feeding and care. Williams & Wilkins. 1995, 587p.

Kontaktní adresa: Josef Vopálenký, MVDr. Ing., Ústav zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, vopalensky@post.cz

SEKCE 3

Veterinární ekologie

Occurrence of vancomycin-resistant enterococci in municipal wastewater treatment plant in Brno

¹Oravcová Veronika, ¹Žáková Jana, ^{2,3}Masaříková Martina, ^{2,3}Čížek Alois,
^{1,3}Literák Ivan

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

²Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

³CEITEC VFU Brno, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

Forty-nine isolates of vancomycin-resistant enterococci (VRE) from a wastewater treatment plant (WWTP) in Brno, Czech Republic were studied. Samples obtained from WWTP effluents were cultured selectively for VRE and characterized. VRE were isolated from 32 of 37 wastewater samples (86%) taken weekly. The forty-nine enterococcal isolates belonged to *Enterococcus faecium* (44), *E. gallinarum* (2), *E. casseliflavus* (2) and *E. raffinosus* (1). All *E. faecium* isolates were multiresistant, with resistance to five and more antibiotics. These resistances were encoded by the *vanA*, *ermB*, *tet(M)*, *tet(L)*, *aac(6')aph(2'')* and *aph(3')-IIIa* genes. A total of 35 (71%) isolates carried virulence genes *hyl* and/or *esp*. Based on multilocus sequence typing, the *E. faecium* isolates were considered to be nosocomial high-risk enterococcal lineages 17, 18, 78, and 323. Eighteen of 20 selected *E. faecium* isolates had ability to transfer the vancomycin-resistance trait via filter mating with a transfer rate of $7.15 \pm 3.78 \times 10^{-4} T/D$ (transconjugants per donor). Clinically important enterococci occurred in outflow from the WWTP and could pose a risk of environmental contamination.

Keywords: vancomycin-resistant enterococci; wastewater treatment plant; antibiotic resistance

Introduction

The emergence and spread of vancomycin resistant enterococci (VRE) have become a substantial clinical and epidemiological concern since they cause hospital outbreaks worldwide. The global occurrence of resistant bacteria in wastewater treatment plant (WWTP) is also an increasing concern. WWTPs are ideal locations for transfer of resistance genes and spread of the resistance because of frequent interaction of bacteria and good environmental conditions. In addition, the presence of antibiotics and their metabolites in sewage may promote selection of resistant strains and also horizontal transfer of antibiotic resistance genes.

Material and Methods

The samples were taken using the Moore swabs, which were exposed to the WWTP effluents for 7 days. In total, we collected 37 wastewater samples between March and December 2012 on weekly basis. Samples were cultured on Slanetz-Bartley agar with 32 mg/l vancomycin and incubated at 37°C for 48 hours. Individual colonies with enterococcal morphology were selected, identified and screened for *vanA* gene. The *vanA*-carrying isolates were tested for minimal inhibitory concentration of vancomycin, susceptibility to other antibiotics by disk diffusion method and occurrence of genes responsible for resistance and virulence genes by PCR. Pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and multilocus sequence typing (MLST) were used to examine the genotypic diversity of *vanA*-carrying VRE. Horizontal transfer of *vanA* gene was tested.

Results

VRE with *vanA* gene were found in 32 (86%) wastewater samples. From morphologically different colonies we obtained 49 isolates of *Enterococcus faecium* (44), *E. gallinarum* (2), *E. casseliflavus* (2) and *E. raffinosus* (1) species. All *E. faecium* isolates were multi-resistant with resistance to five and more antibiotics. In addition to vancomycin, all were resistant to ciprofloxacin and ampicillin. Resistance to vancomycin was encoded by *vanA* gene (48 isolates), to erythromycin by *ermB* (17), and to tetracycline primarily by *tetM* (22) and *tetL* (22) genes. A total of 35 (71%) isolates carried virulence genes *hyl* and/or *esp*. According to PFGE analysis, of *E. faecium* isolates, we can observe 8 important clonal groups with Dice similarity index higher than 85%, among them 6 groups contained identical strains. We observed repeatedly the same isolate in WWTP effluents for the period from 2 to 17 weeks. The MLST profile of *E. faecium* showed that the majority of isolates belonged to clinically important nosocomial lineages **17** – ST17 (10 isolates), ST555 (2); **18** – ST18 (9), ST262 (1), ST273 (3), ST275 (1); and **78** – ST78 (5), ST549 (2). The remaining isolates belonged to ST323 (3) and its new SLV ST884 (7). Eighteen of 20 selected *E. faecium* isolates had ability to transfer the vancomycin-resistance trait via filter mating with a transfer rate of $7.15 \pm 3.78 \times 10^{-4}$ T/D.

Discussion

Human sewage constitutes an important source of antibiotic residues and antibiotic-resistant bacteria in the environment. The presence of low concentrations of different antimicrobial compounds in wastewater has been documented (Guerra et al., 2014), and these antibiotics may exert selective pressure favoring resistant strains.

Vancomycin is commonly used for treatment of infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (Chavers et al., 2003) and *Clostridium difficile* (Bartlett, 2008). Prevalence of VRE infections in Czech hospitals is relatively low but has shown an increasing tendency, rising from 1.6% in 2001 to 11.5% in 2012 (ECDC, 2014). Therefore, we must consider the possibility that VRE can spread from hospitals and colonized patients to WWTPs.

In addition to vancomycin, all *E. faecium* isolates were resistant to ciprofloxacin and ampicillin, the drugs of choice for VRE. Resistances to these antibiotics have been reported to be markers for hospital-associated *E. faecium*. Almost all isolates were moreover resistant to erythromycin. Similarly, co-resistance of VRE to ciprofloxacin and erythromycin has been observed at WWTP in Portugal (Varela et al., 2013). All isolates were susceptible to chloramphenicol, one of the few agents still effective against VRE infections. The multi-resistance profile of isolates supports our idea that the strains were of hospital origin. Moreover, we detected virulence-determining genes *esp* and *hylA*, which are usually found in VRE of human clinical origin (Willems et al., 2001).

Using sequencing and MLST analyses of *E. faecium* isolates, we found that 77% of the VRE belonged to the HiRECC initially described as clonal complex 17 (Leavis et al., 2006). This nosocomial subpopulation consists of three main lineages, named for the central ST and defined by MLST as lineages 17, 18 and 78 (Willems et al., 2012). In our study, ST17 and ST18 were found most frequently – in almost half of the *E. faecium* isolates. These STs have been found worldwide in hospitalized patients and are known to cause hospital outbreaks (MLST database, <http://efaecium.mlst.net>). These HiRECC STs often carry the *vanA* gene, *esp* gene and resistance to ampicillin (MLST database, <http://efaecium.mlst.net>). All isolates of ST18 and almost all ST17 (70%) carried the *tet(M)* and/or *tet(L)* gene. Novel ST884 is a DLV of ST17 and an SLV of ST323. All isolates of this ST were resistant to ampicillin, ciprofloxacin, rifampicin, and to erythromycin. Moreover, all carried the *hyl* virulence gene

and 57% also the *esp* gene. Based on these characteristics, we consider ST884 to be a clinically important sequence type which may be responsible for human infections.

Conclusion

We demonstrate that multiresistant, potentially pathogenic enterococci with the *vanA* gene, virulence genes and other resistance genes occurred in outflow from WWTP throughout the year. Majority of isolates belonged to high-risk enterococcal clonal complexes, and were able to transfer the *vanA* gene horizontally. Therefore we conclude that the treatment process has insufficient effect in removing bacteria harboring antibiotic resistance such as VRE, and urban WWTP effluents might be a significant vehicle for disseminating clinically important antibiotic-resistant enterococci into the environment.

Acknowledgement

This study was funded by the project 'CEITEC - Central European Institute of Technology' (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from the European Regional Development Fund and by project IGA VFU Brno No. 17/2014/FVHE.

References

- BARTLETT, J.G. The case for vancomycin as the preferred drug for treatment of *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis* 2008, 46:1489-1492.
- ECDC. Antimicrobial resistance interactive database: EARS-Net. http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/graph_reports.aspx. Accessed [12 November 2014], 2014.
- GUERRA, P.; KIM, M.; SHAH, A.; ALAEE, M.; SMYTH, S.A. Occurrence and fate of antibiotic, analgesic/anti-inflammatory, and antifungal compounds in five wastewater treatment processes. *Sci Total Environ* 2014, 473:235-243.
- CHAVERS, L.S.; MOSER, S.A.; BENJAMIN, W.H.; BANKS, S.E.; STEINHAUER, J.R.; SMITH, A.M.; JOHNSON, C.N.; FUNKHOUSER, E.; CHAVERS, L.P.; STAMM, A.M.; WAITES, K.B. Vancomycin-resistant enterococci: 15 years and counting. *J Hosp Infect* 2003, 53:159-171.
- LEAVIS, H.L.; BONTEN, M.J.M.; WILLEMS, R.J.L. Identification of high-risk enterococcal clonal complexes: global dispersion and antibiotic resistance. *Curr Opin Microbiol* 2006, 9:454-460.
- VARELA, A.R.; FERRO, G.; VREDENBURG, J.; YANIK, M.; VIEIRA, L.; RIZZO, L.; LAMEIRAS, C.; MANAIA, C.M. Vancomycin resistant enterococci: From the hospital effluent to the urban wastewater treatment plant. *Sci Total Environ* 2013, 450:155-161.
- WILLEMS, R.J.L.; HOMAN, W.; TOP, J.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.; TRIBE, D.; MANZIOROS, X.; GAILLARD, C.; VANDENBROUCKE-GRAULS, C.; MASCINI, E.M.; VAN KREGTEN, E.; VAN EMBDEN, J.D.A.; BONTEN, M.J.M. Variant *esp* gene as a marker of a distinct genetic lineage of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* spreading in hospitals. *Lancet* 2001, 357:853-855.
- WILLEMS, R.J.L.; TOP, J.; VAN SCHAIK, W.; LEAVIS, H.; BONTEN, M.; SIREN, J.; HANAGE, W.P.; CORANDER, J. Restricted Gene Flow among Hospital Subpopulations of *Enterococcus faecium*. *MBio* 2012, 3.

Contact address: Veronika Oravcová, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H12006@vfu.cz

Comparative analysis of *Escherichia coli* sequence type 131 isolates from humans, animals, and the environment

¹Jamborová Ivana, ²Johnson R. James, ²Johnston Brian, ^{1,3}Dolejská Monika, ¹Kachlíková Kateřina, ²Clabots Connie, ⁴Micenkova Lenka, ^{1,3}Literák Ivan

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

²Veterans Affairs Medical Center and University of Minnesota, Minneapolis, Minnesota, USA

³CEITEC, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

⁴Department of Biology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

The *Escherichia coli* sequence type (ST) 131 is currently the world's most studied bacterial lines of clinical significance. The essence of this study is a comparative analysis of phenotypic, genotypic and clonal characteristics of 168 strains of *E. coli* ST131 isolated from various sources (wildlife, waste water, community and nosocomial isolates) to determine whether wild animals share identical strains of human origin, indicating the transmission of this clone to wildlife. The isolates were tested for susceptibility to 32 antimicrobials. The genes for resistance to beta-lactams, quinolones, other antibiotics and 52 virulence genes including *fimH30* were tested by PCR and sequencing. Epidemiological relatedness was determined by pulse-field gel electrophoresis. Most isolates carried genes *bla*_{CTX-M-15} or *bla*_{CTX-M-27} and other resistance genes characteristic for this pandemic clone (e.g., *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA}, *aac*(6')-Ib). One hundred and ten (65%) isolates belonged to the rapidly expanding highly resistant H30-Rx subclone. 74 (45 %) strains originating from different sources showed identified virulence profile (genes *afa/dra*, *iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsII*, *traT*, *usp*, *ompT*, *malX*). We demonstrated common characteristics in the isolates of pandemic ST131 clone from various sources, suggesting its transmission between different environments including wildlife.

Keywords: antibiotics; resistance genes; *Escherichia coli* ST131; wildlife

Introduction

Escherichia coli sequence type 131 (ST131) is currently one of the most important bacterial clonal lineage of high clinical relevance, involved in the global spread of the extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) CTX-M-15. A substantial level of virulence combined with carriage of transferable elements encoding multi-drug resistance is likely responsible for the pandemic success of this clone (Johnson et al., 2010). Although as the ST131 clone is known to cause community-onset infections in humans, including urinary tract infections, bacteraemia, and neonatal sepsis, it has also been identified in companion animals, poultry, livestock, wild animals, and food (Platell et al., 2012; Ewers et al., 2012). The detection of this particular *E. coli* clone in food, water, the environment, and other non-human sources identifies an almost entirely unexplored complexity of potential transmission routes, whereby migrating birds and waste waters may play an important role in its distribution and circulation (Woodford et al., 2011). We used comparative analysis of phenotypic, genotypic, and clonal characteristics of 168 *E. coli* ST131 isolates of diverse origins collected during various studies, including human community and nosocomial sources (n=130), waste water (n=19), stray dogs (n=3) and wild birds (n=16) – to determine whether wild animals and the environment share highly similar strains with humans, implying exchange of ST131 between humans and the environment, including wildlife.

Materials and Methods

The collection of *E. coli* ST131 isolates (n=168) was tested by PCR-based methods for ST131, including the H30 and H30Rx subclones (Price et al., 2013), beta-lactams and

quinolones resistance genes (Jamborova et al., 2015), 52 virulence genes (Johnson et al., 2010), integrons and replicon types (Dobiasova et al., 2013). ST131 status was verified selectively by multi-locus sequence typing (MLST); (Jamborova et al., 2015). Beta-lactam and quinolone resistance genes were sequenced. Integron structure was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP). Susceptibility to 32 antimicrobials was determined by disc diffusion and microdilution (CLSI, 2011). Genomic relatedness was determined by XbaI pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Macrorestriction patterns were calculated using BioNumerics (version 6.6) software (Applied Maths, Ghent, Belgium). Cluster analysis of the Dice similarity indices was done to generate a dendrogram describing the relationships among the PFGE profiles (Jamborova et al., 2015). The minimum level of similarity between the PFGE patterns was defined to be 93%.

Results

Comparative analysis of 151 ESBL-positive and 17 ESBL-negative *E.coli* ST131 isolates was performed. Most ESBL-producing ST131 isolates carried *bla*_{CTX-M-15} (106, 70%) followed by *bla*_{CTX-M-27} (42, 28%), together with other genes typical for this pandemic clone (*bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *aac*(6')-*Ib-cr*). Overall, 110 (65%) isolates belonged to the rapidly expanding H30Rx ST131 subclone. Fully 102 (93%) of the H30Rx ST131 isolates carried *bla*_{CTX-M-15}. In contrast, the remaining 58 (35%) isolates, representing the ST131-H30R subclone, contained mostly *bla*_{CTX-M-27} (42, 72%). Seventy-four (45%) isolates exhibited a conserved set of 11 virulence genes (*afa/dra*, *iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsII*, *traT*, *usp*, *ompT*, *malX*) and carried almost exclusively *bla*_{CTX-M-15} (97%, n=74) or were ESBL-negative (3%). The second most common virulence profile (*iha*, *fimH*, *sat*, *fyuA*, *iutA*, *kpsII*, *kii*, *kpsM II-K5*, *traT*, *usp*, *ompT*, *malX*) was detected mainly among *bla*_{CTX-M-27}-positive H30R isolates (35, 80%). Most isolates (98%) harbored FIA replicons, often in combination with FIB replicons (31%). A 1.7-kb class 1 integron with *dhfr17* and *aadA5* gene cassettes was present in 125 (77%) isolates. PFGE identified the same pulsotypes in all three sources, i.e., humans, wastewater and wildlife. The representatives of ST131, belonged to one cluster, shared conserved profile of virulence genes, harbored same types of replicons, carried identical type of integron and they have also similar resistance profile.

Discussion

The presence of *Escherichia coli* ST131 in the wildlife and environment is alarming, since this clone is responsible for serious infections of humans and animals. Environmental and animal isolates shared PFGE, virulence and resistance profiles as well as other characteristics with human isolates, suggesting that wild animals and the environment may contribute to the global dissemination of this pandemic clone. We assume that the isolates found in the animals and the wildlife are of human origin mainly due to the presence of H30-Rx, the most expanded, highly prevalent subclone of ST131 in human population (Price et al., 2013). Finding of this epidemiologically important clone in wildlife reflects the presence of such isolates in the environment, most likely as a result of inadequate decontamination procedures regarding waste of various origins. Since expansion of ST131 has had a major impact on human health, interruption of such dissemination and elimination of reservoirs should be a public health priority.

Conclusion

Our study demonstrated *E. coli* ST131 isolates from humans, waste water, and wild animals with common genetic characteristics, suggesting spreading of this pandemic clone between different niches, including wildlife.

Acknowledgments

This study was supported by CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), IGA VFU Brno (12/2014/FVHE), IGA MZ (NT14398), Czech Science Foundation (15-14683Y/P502) and the Office of Research Development, Department of Veterans Affairs (JRJ).

References

CLSI 2011. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. CLSI M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.

DOBIÁŠOVÁ, H., M. DOLEJSKÁ, I. JAMBOROVÁ, E. BRHELOVÁ, L. BLAŽKOVÁ, I. PAPOUŠEK, M. KOZLOVÁ, J. KLIMEŠ, A. ČÍŽEK a I. LITERÁK. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. FEMS Microbiology Ecology. 2013, vol. 85, issue 3, s. 604-611.

EWERS, C., A. BETHE, T. SEMMLER, S. GUENTHER a WIELER, L., H. Extended-spectrum β -lactamase-producing and AmpC-producing *Escherichia coli* from livestock and companion animals, and their putative impact on public health: a global perspective. Clinical Microbiology and Infection. 2012, vol. 18, issue 7, s. 646-655.

JAMBOROVA, I., M. DOLEJSKA, J. VOJTECH, S. GUENTHER, R. URICARIU, J. DROZDOWSKA, I. PAPOUSEK, K. PASEKOVA, W. MEISSNER, J. HORDOWSKI, A. CIZEK a I. LITERAK. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. Applied and Environmental Microbiology. 2015-01-05, vol. 81, issue 2, s. 648-657.

JOHNSON, J. R., B. JOHNSTON, C. CLABOTS, M. A. KUSKOWSKI a M. CASTANHEIRA. *Escherichia coli* sequence type ST131 as the major cause of serious multidrug-resistant *E. coli* infections in the United States. Clinical Infectious Diseases. 2010, vol. 51, issue 3, s. 286-294.

PLATELL, J. L., J. R. JOHNSON, R. N. COBBOLD a D. J. TROTT. Multidrug-resistant extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* of sequence type ST131 in animals and foods: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. Veterinary Microbiology. 2011, vol. 153, issue 1-2, s. 99-108.

PRICE, L. B., J. R. JOHNSON, M. AZIZ, C. CLABOTS, B. JOHNSTON, V. TCHESNOKOVA, L. NORDSTROM, M. BILLIG, S. CHATTOPADHYAY, M. STEGGER, P. S. ANDERSEN, T. PEARSON, K. RIDDELL, P. ROGERS, D. SCHOLE, B. KAHL a E. V. SOKURENKO. The epidemic of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* ST131 is driven by a single highly pathogenic subclone, H30-Rx. MBio. 2013-10-29, vol. 4, issue 6, e00377-13-e00377-13.

WOODFORD, N., J. F. TURTON a D. M. LIVERMORE. Multiresistant gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. FEMS Microbiology Reviews. 2011, vol. 35, issue 5, s. 736-755.

Contact address: Ivana Jamborová, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, ivca.jamborova@gmail.com

Characterization of IncX plasmids carrying quinolone and beta-lactam resistance genes in *Enterobacteriaceae* from various sources and geographic areas

^{1,2}Dobiasova Hana, ¹Vojtech Jiri, ^{1,2}Dolejska Monika

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

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

Summary

The aim of the study was to map the diversity of IncX plasmids carrying resistance genes to quinolones and beta-lactams in non-related *Enterobacteriaceae* from various sources and geographic areas and to identify the most prevalent types of these plasmids. A collection of 1800 *Enterobacteriaceae* isolates resistant to cefotaxime (2 mg/L) or with reduced susceptibility to ciprofloxacin (0.05 mg/L) were tested for IncX1-X4 plasmids using PCR. Isolates were tested for antibiotic resistance genes by PCR and sequencing. Isolates were identified using biochemical tests or MALDI-TOF and their relatedness was determined by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). Plasmid analysis included conjugation and transformation, sizing using S1-nuclease and PFGE, restriction analysis and hybridization. A total of 190 *Enterobacteriaceae* isolates (10.6%, n=1800) harboured at least one IncX subgroup. IncX1 subgroup was the most prevalent (107 isolates), followed by IncX2 (47), IncX4 (28) and IncX3 (17). IncX1 and IncX2 plasmids (30-60 kb) were associated predominantly with *qnrS1* and IncX3 (40-50 kb) plasmids carried predominantly *bla_{SHV-12}*. IncX4 plasmids were not further analysed as they were not successfully transferred to recipient cells as single plasmids. Identical or related IncX1 and IncX2 plasmids were identified in non-related *Enterobacteriaceae* from different sources and countries suggesting wide distribution of the plasmids.

Keywords: plasmids; *Enterobacteriaceae*; quinolones; beta-lactams

Introduction

Development and dissemination of antibiotic resistance in Gram-negative bacteria is currently one of the most significant health problems worldwide. Beta-lactams and quinolones belong to the most frequently administered antibiotics in order to treat severe infections caused by multiresistant *Enterobacteriaceae* (Livermore 2012). Plasmids are considered to be the most important molecules facilitating antibiotic resistance gene spread in Gram-negative bacteria (Carattoli 2013). Recently, self-transferable plasmids of incompatibility group X (IncX) were shown to be a diverse group of plasmids consisting of 5 subgroups. IncX plasmids were found to be associated with diverse antibiotic resistance genes – quinolone resistance genes (*qnrS1*, *oqxAB*), beta-lactam resistance genes (*bla_{TEM-1-52}*, *bla_{SHV-11}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{KPC-5}*) and many others (Johnson *et al.* 2012, Chen *et al.* 2013). Therefore, IncX plasmids might have contributed considerably to dissemination of quinolone and beta-lactam resistance genes in *Enterobacteriaceae*. The aim of the study was to compare molecular traits of IncX plasmids found in non-related *Enterobacteriaceae* of various sources and countries of origin and to identify the most disseminated types of these plasmids.

Materials and Methods

Using PCR, IncX plasmids were screened in a collection of 1800 *Enterobacteriaceae* isolates resistant to cefotaxime (2 mg/L) or with reduced susceptibility to ciprofloxacin (0.05 mg/L) originating from humans, wildlife and environment in Europe, North and South America, Africa and Australia obtained during 2006-2012 (Johnson *et al.* 2012). Isolates with IncX plasmids were tested for antibiotic resistance genes using PCR and sequencing (Pérez-Pérez and Hanson 2002, Poirel *et al.* 2011, Dobiasova *et al.* 2013). Isolates were identified using API 10S (bioMérieux, France) or MALDI-TOF and their relatedness was determined using

pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Dobiasova *et al.* 2013). IncX plasmids were further analysed from isolates with unique macrorestriction profile. Horizontal transfer of IncX plasmids was tested using transformation and conjugation. Sizes of successfully transferred plasmids were determined using S1-nuclease and PFGE. Resistance gene content was tested using PCR (Dobiasova *et al.* 2013). Relatedness of plasmids was determined using restriction analysis and hybridization with probes targeting relevant antibiotic resistance and *taxC* genes.

Results

A total of 190 *Enterobacteriaceae* isolates (10.6%, n=1800) resistant to cefotaxime or with reduced susceptibility to ciprofloxacin carried at least one IncX subgroup. IncX1 and IncX2 plasmids were found in 107 and 47 isolates, respectively. IncX3 and IncX4 plasmids were detected in 17 and 28 isolates, respectively. A total of 71 plasmids belonging to IncX1-X3 subgroups from *Enterobacteriaceae* with unique macrorestriction profiles were successfully transferred to recipient *Escherichia coli* cells as single plasmids and were further typed. None of IncX4 plasmids was transferred to recipients as single plasmid, therefore IncX4 plasmids were not further analysed. IncX1-X3 plasmids were 30-60 kb in size apart from three plasmids identified as mosaic replicons (IncX2-IncI1, IncX3-IncN). IncX plasmids were predominantly associated with quinolone resistance genes (*qnrS1*, *qnrS2*, *qnrB7*, *qnrB19*). A total of 41 identical or closely related IncX1 plasmids (91%, n_{IncX1 plasmids}=45) harbouring *qnrS1* and *bla*_{TEM-1/-135} were found in non-related *E. coli* isolates from wildlife, livestock, captive animals and wastewater in the Czech Republic, Poland, Spain and Australia. IncX2 and IncX3 plasmids were more diverse in terms of resistance gene content and restriction profiles. The predominant type of IncX2 plasmids carrying *qnrS1* and tetracycline resistance gene *tetA(A)* was found in 10 non-related *E. coli* isolates (45%, n_{IncX2 plasmids}=22) from wildlife in the Czech Republic and Poland. Of 4 IncX3 plasmids, three carried *bla*_{SHV-12} along with *qnrS1* or *qnrB7* and one carried *bla*_{NDM-4}. All IncX3 were highly diverse in their restriction profiles.

Discussion

Our results demonstrated high distribution of IncX plasmids in *Enterobacteriaceae* isolates originating from wildlife indicating their possible source as was previously suggested by Johnson *et al.* (2012). IncX plasmids were predominantly associated with quinolone resistance genes, mainly *qnrS1*, and therefore they might have contributed to dissemination of the resistance gene considerably in *Enterobacteriaceae*. Quinolones belong to antibiotics showing high persistence in the environment and subinhibitory concentrations of quinolones (ng/L) were documented in WWTP effluent as well as in surface waters. These low concentrations of quinolones might represent a selection pressure on bacteria in the aquatic environment leading to maintaining quinolone resistance genes and facilitating horizontal transfer of plasmids (Gillings, 2013; Marti *et al.* 2014). In our study, we found 29 IncX plasmids (41%, n_{IncX plasmids}=71) carrying quinolone resistance genes in *E. coli* isolates obtained from wastewater or water birds living in the Czech Republic, Poland or Australia. Of these, 15 IncX1 and 7 IncX2 plasmids were identical or closely related and originated from non-related isolates suggesting the important role of horizontal transfer of quinolone resistance genes by these plasmids. Moreover, identical and related IncX1 and IncX2 plasmids were found in *Enterobacteriaceae* isolates with unique macrorestriction profiles from other sources including wildlife, captive animals, livestock and humans suggesting the existence of additional factors that might possibly affect maintaining and dissemination of these plasmids. IncX2 and IncX3 plasmids were more diverse regarding antibiotic resistance gene content and restriction profiles in comparison with IncX1 plasmids highlighting their ongoing evolutionary changes.

Conclusion

The overall prevalence of IncX plasmids in our collection of antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* isolates was rather low (10.6 %, n=1800) and most of IncX plasmids were found in *E. coli* from wildlife all over the world. These plasmids were strongly associated with quinolone resistance genes, predominantly *qnrS1*. Identical or closely related IncX1 and IncX2 plasmids were found in antibiotic resistant *Enterobacteriaceae* isolates with unique macrorestriction profiles originating from various sources and geographic areas suggesting wide distribution of particular types of these plasmids. Higher variability of IncX2 and IncX3 plasmids in terms of antibiotic resistance gene content and restriction profiles may imply the great potential of these plasmids to evolve. Based on our results, diversity of IncX4 plasmids remains unrevealed. Therefore, IncX4 and IncX5 plasmid prevalence and diversity may represent a topic for further investigation.

Acknowledgement

The study was funded by IGA VFU Brno (13/2014/FVHE), IGA MZ (NT14398), CEITEC (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) and Czech Science Foundation (15-14683Y/P502).

References

- LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 2012, vol. 27, no. 2, pp. 128-142.
- CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology*. 2013, vol. 303, no. 6-7, pp. 298-304.
- JOHNSON, T.J.; BIELAK, E.M.; FORTINI, D.; HANSEN, L.H.; HASMAN, H.; DEBROY, C.; NOLAN, L.K.; CARATTOLI, A. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Plasmid*. 2012, vol. 68, no. 1, pp. 43-50.
- CHEN, L.; CHAVDA, K.D.; FRAIMOW, H.S.; MEDIIVILLA, J.R.; MELANO, R.G.; JACOBS, M.R.; BONOMO, R.A.; KREISWIRTH, B.N. Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4} and *bla*_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2013, vol. 57, no. 1, pp. 269-726.
- PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, vol. 40, no. 6, pp. 2153-2162.
- POIREL, L.; WALSH, T.R.; CUVILLIER, V.; NORDMANN, P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2011, vol. 70, no.1, pp. 119-123.
- DOBIASOVA, H.; DOLEJSKA, M.; JAMBOROVA, I.; BRHELOVA, E.; BLAZKOVA, L.; PAPOUSEK, I.; KOZLOVA, M.; KLIMES, J.; CIZEK, A.; LITERAK, I. Extended spectrum beta-lactamase and fluoroquinolone resistance genes and plasmids among *Escherichia coli* isolates from zoo animals, Czech Republic. *FEMS Microbiology Ecology*. 2013, vol. 85, no.3, pp. 604-611.
- GILLINGS, M.R. Evolutionary consequences of antibiotic use for the resistome, mobilome and microbial pangenome. *Frontiers in microbiology*. 2013, vol. 4, article no. 4.
- MARTI, E.; HUERTA, B.; RODRÍGUEZ-MOZAZ, S.; BARCELÓ, D.; JOFRE, J.; BALCÁZAR, J.L. Characterization of ciprofloxacin-resistant isolates from a wastewater treatment plant and its receiving river. *Water Research*. 2014, vol. 61, pp. 67-76.

Contact address: Hana Dobiášová, RNDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, 612 42 Brno, dobiasova.hanka@gmail.com

Effect of long-term exposure to 17 β -estradiol on feedback of important antioxidant and transport mechanisms of *Eisenia fetida*

^{1,2}Heger Zbynek, ²Cernei Natalia, ¹Nemcova Barbora, ^{1,2}Beklova Miroslava, ²Adam Vojtech, ²Kizek Rene

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

²Středoevropský technologický institut, Brno

Summary

Herein, we demonstrate that long-term exposure (8 weeks) of earthworm *Eisenia fetida* to contaminant of emerging concern - 17 β -estradiol (E_2), significantly affects molecules involved in transport and antioxidant protection. *E. fetida* individuals were exposed to E_2 (0 - 100 $\mu\text{g/L}$) and EC_{50} was found to be 98.29 $\mu\text{g/L}$. After 8 weeks, individuals exposed to the highest concentrations of E_2 (80; 100 $\mu\text{g/L}$) exhibited significant inhibition of reproduction (25.12 or 50.70% respectively). Subsequently, analysis of expression of genes, encoding ABC transporter P-glycoprotein (P-gp/ABCB1), metallothionein and phytochelatin synthase, revealed correlation between expression and E_2 levels. Moreover, on translated protein levels, it was found that important antioxidant molecules – metallothionein, glutathiones (expressed as GSH:GSSG ratio) and phytochelatins are regulated by E_2 post-transcriptionally. Thus, we put the evidence that despite the fact that *E. fetida* cannot employ E_2 for physiological regulation due to lack of estrogen receptors, it can be affected by bioaccumulation of hormones, which can generate reactive oxygen and nitrogen species (RO/NS), and thus impact crucial inhabitants of soil environment.

Keywords: endocrine disruptors; environmental pollution; glutathiones; metallothionein; xenobiotic efflux

Introduction

All species, sexes, and classes of farm animals eliminate natural estrogenic hormones into the environment; however, the environmental significance of these releases is largely unknown. Under common conditions, E_2 is expected to dissipate rapidly in the soil as a result of sorption [1]. Subsequently, E_2 can be transformed into E_1 , which persists in the soil for a long time without further degradation, as was indicated by [2] or degraded through a metabolic oxidation sequence, where E_3 and E_1 are produced, and further transformed into semiquinones and quinones [3]. Although the possible fates of E_2 in soil system were suggested, the real biological impact on its inhabitants remains still not fully understood. Thus we tested whether the long-term exposure of E_2 affects the growth and reproduction and the substantial antioxidant and transport mechanisms in *E. fetida*.

Material and Methods

Tested earthworm species

The Oligochaete *Eisenia fetida* (family Lumbricidae) were employed for testing when they were between two and twelve months old (350-500 mg), with fully developed clitellum.

Long-term reproduction test

The experiments were carried out as described in the OECD Guideline 222. After termination of the test, earthworms were immediately washed with MilliQ water and bathed 500 μL of RNAlater® (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Extraction and quantification of RNA

RNA was isolated by using MagNA Pure Compact RNA isolation Kit (Roche, Basel Switzerland) and quantified using Infinite M200 PRO (Tecan, Männedorf, Switzerland).

Reverse transcription, PCR amplification and agarose gel electrophoresis

To obtain cDNA 500 ng of total RNA was reversely transcribed (High Capacity cDNA RT kit, Life Technologies). Obtained cDNA was employed for PCR of *MT*, *pcs* and *ABCB1*. β -actin was utilized as a housekeeping gene. DNA fragments were confirmed by electrophoresis on 1.5% agarose gel.

Antioxidant molecules

The homogenized samples were centrifuged ($16\,000 \times g$, 15 min, 4°C) using Microcentrifuge Eppendorf 5402 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Supernatant was further filtered through a membrane filter ($0.45\ \mu\text{m}$ nylon filter disk, Millipore, Billerica, MA, USA). Filtered samples were further analyzed using HPLC-ED system. For the determination of metallothionein, 1 mL of sample was denatured at 99°C for 20 min and centrifuged for 10 minutes to remove high-abundant proteins and peptides. The analyses were performed using differential pulse voltammetry.

Results

The effect of E_2 long-term exposure on growth and reproduction properties of *E. fetida*

The entire experiment fulfilled the OECD criteria for test to be valid - each replicate have to produce ≥ 30 juveniles till the end of the test; the coefficient of variation of reproduction $\leq 30\%$; adult mortality over the initial 4 weeks $\leq 10\%$. The results demonstrate that only the highest applied concentrations of E_2 ($100\ \mu\text{g/L}$) caused the 10% mortality of *E. fetida*. Although the observed effects on growth (biomass) and survival properties were weak, strong impact on the reproduction of was observed.

The effect of E_2 long-term exposure on gene expression

The analyses of expression of genes revealed dose-dependent stimulation of gene expression of fundamental antioxidant molecules. Similarly, expression of gene encoding transport protein P-gp/ABCB1 expression was significantly induced by E_2 exposure.

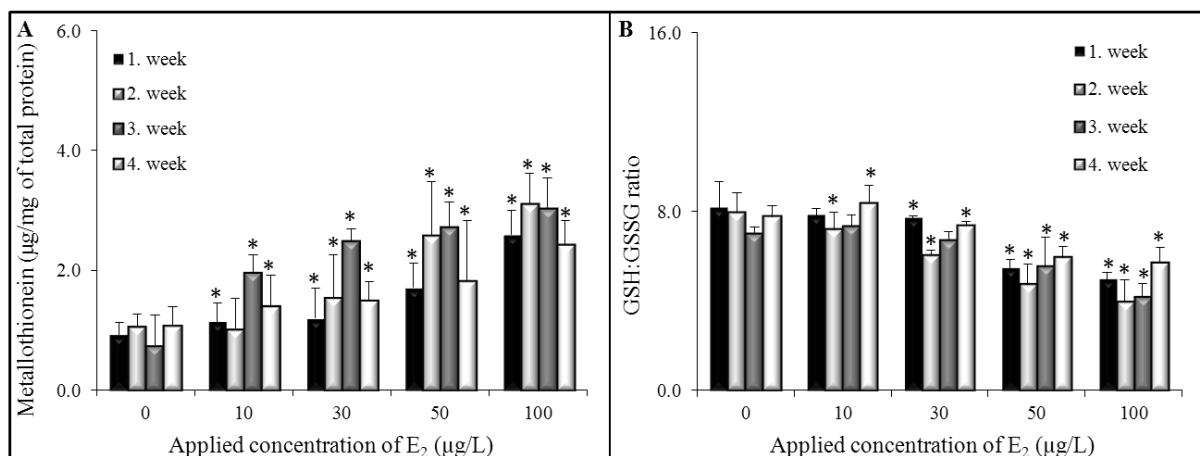


Figure 1: Levels of antioxidant molecules in *E. fetida* after exposure to E_2 (0 – 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A) Metallothionein. (B) The ratio between GSH and GSSG. Values are means of three independent replicates ($n = 3$). Vertical bars indicate standard error. Asterisks indicate significant differences ($p < 0.05$) to the control groups.

The effect of E_2 long-term exposure on antioxidant molecules

In case of antioxidant molecules, it was revealed that E_2 exposure leads to increase in their levels (MT and GSH:GSSG ratio depicted in Figure 1A-B). Phytochelatin isoforms were induced in concentration-dependent manner, however only PC_2 , PC_3 and PC_4 isoforms were identified. As the most abundant isoform was determined PC_2 , whose amounts were approx.

10-fold higher when compared to other identified isoforms (PC₃, PC₄). In fourth week, decrease of levels of antioxidant molecules point at start of elimination of E₂-associated RO/NS and the return of physiological redox equilibrium.

Discussion

As the earthworms live and feed within the soil, the bioaccumulation of EDCs including E₂ occurs with potential deleterious effects, which have already been reported for aquatic invertebrates. In his survey of annelid endocrine disruptors Krajniak mentions that EDCs can affect invertebrates within the meaning of decrease of growth, reproductive outputs, delayed sexual maturation and inhibition of immune system, however the mechanisms underlying these responses are still more or less concealed [4]. E₂ degradation was described as a producer of few types of RO/NS - mainly catechols. Since, antioxidant molecules are in general, inducible and their transcription is controlled by cell microenvironment, their elevated levels point at presence of increased oxidative stress. Phytochelatins (PCs) - cysteine-rich non-ribosomal peptides are molecules with antioxidant properties and their presence was known only in plants. Nevertheless, current studies demonstrate their role in a number of animal cells. In our study, it was found that only PC₂, PC₃ and PC₄ isoforms can be triggered by E₂, other isoforms were not determined and to best of our knowledge their presence have never been described.

Conclusion

E₂ is a potent estrogen with broad spectra of biological effects. Although invertebrate cannot utilize it for physiological regulation, its elevated levels in soils has potential to cause them deleterious effects. This is the first evidence that E₂ can stimulate expression of antioxidant molecules in *E. fetida*, which points at generation of RO/NS. Such contamination of environment can thus affect entire populations of soil inhabitants, which are fundamental for ecosystem. Further steps have to reveal the mechanisms of E₂ degradation in *E. fetida*, which is probably carried out through cytochrome enzymes and to describe the free radicals evolving during this degradation. Antioxidant molecules could be used as biomarkers for earthworm responses to E₂ contamination, however analyses in natural populations are required for this to be confirmed.

Acknowledgements

The financial support by CEITEC CZ.1.05/1.1.00/02.0068 is greatly acknowledged.

References

- [1] YU, Z. Q.; XIAO, B. H.; HUANG, W. L.; PENG, P. Sorption of steroid estrogens to soils and sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2004, vol. 23, no. 3, p. 531-539.
- [2] COLUCCI, M. S.; BORK, H.; TOPP, E. Persistence of estrogenic hormones in agricultural soils: I. 17 beta-estradiol and estrone. *Journal of Environmental Quality*. 2001, vol. 30, no. 6, p. 2070-2076.
- [3] BOLTON, J. L.; PISHA, E.; ZHANG, F. G.; QIU, S. X. Role of quinoids in estrogen carcinogenesis. *Chemical Research in Toxicology*. 1998, vol. 11, no. 10, p. 1113-1127.
- [4] KRAJNIAK, K. G. A survey of invertebrate FMRFamide-related peptides: Annelid endocrine disruptors. *Integrative and Comparative Biology*. 2003, vol. 43, no. 6, p. 897-897.

Contact address: Zbyněk Heger, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvířete, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42, Brno, zbynek.heger@ceitec.vutbr.cz

Environmental implications of fluoroquinolone exposure on aquatic ecosystems

¹Janecko Nicol, ²Blahova Jana, ³Pokludova Lucie, ²Svobodova Zdenka, ^{1,4}Literak Ivan

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

²Department of Veterinary Public Health and Animal Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

³Institute for State Control of Veterinary Biologicals and Medicines, Brno, Czech Republic

⁴CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

Summary

The manufacturing and the use of fluoroquinolones in animal and human medicine contribute to the dissemination of residues and byproducts into aquatic environments as dictated by the antibiotic's pharmacokinetic and physio-chemical properties and half-life among other factors. The objective was to create a concise review of the true ecotoxicological effects of fluoroquinolones on lifeforms and the impacts to aquatic ecosystems. High doses in toxicological assessment models show significant effects on embryo development, mortality rates and reproductive system abnormalities. At lower doses, the effects are less clear, as long term exposure at low doses and generational exposure are difficult to assess in natural environments. The multifactorial nature of ecotoxicological effects have proven difficult to fully extrapolate scientific models and in silico tests regarding different toxicity endpoints to the natural environment, however today's scientific evidence suggests an overall negative impact of fluoroquinolones on the aquatic environment.

Keywords: fluoroquinolone; antimicrobials; toxicity; aquatic environment

Introduction

Nalidixic acid was the first synthetic quinolone discovered in 1962. Subsequently in the late 1970's and early 1980's the synthetic drug was modified to contain a fluorine at the central carbon ring, thereby widening its use. The broad spectrum of antimicrobial activity and excellent pharmacokinetic properties make fluoroquinolones an almost ideal antimicrobial and has propelled compounds such as ciprofloxacin and enrofloxacin to therapeutic success both in human and animal medicine. The increased demand for fluoroquinolones worldwide has meant an increased supply. In other words, the manufacturing of fluoroquinolones has dramatically risen, including the by-products and effluent from the manufacturing process. In the EU, Canada and USA, fluoroquinolones are to be used by prescription only in animal agriculture however the use levels vary greatly by country. Therapeutic levels of fluoroquinolones are not commonly found in environmental scenarios. For this reason, the emphasis of ecotoxicity research has been focused on sub-therapeutic level concentrations which have been found around waste water treatment plants and surface waters attributed by agricultural runoff (Kummerer, 2009, Carlsson et al., 2009, Sarmah et al., 2006). As a consequence of manufacturing and the use of fluoroquinolones in agriculture and in part human medicine, residues and metabolites enter the environment through a number of pathways.

Material and Methods

Literature searches using the following keywords were utilized for scientific document searches with no stipulation on dates: fluoroquinolones, ecotoxicity, fluoroquinolones+environment, antibiotic use, ciprofloxacin + effects in water among others. Personal communication and government documents were gathered from European Union,

Canada and USA using government contacts and committee publications. Articles were assessed based on the project review objective. Over 60 documents were gathered and critiqued with result comparison standardized for units.

Results and Discussion

Fluoroquinolones are broadly used in community health practices, and less so in hospital environments. In Europe, ciprofloxacin (J01MA02), made up almost the entire consumption of fluoroquinolone antibacterials in the EU/EEA (ATC group J01M) (ECDC, 2014). The EU/EEA population-weighted mean quinolone consumption did not change significantly in community or hospital consumption between 2008-2012, after previous significant increase in community consumption from 1997-2009. Belgium, Norway and Spain showed a significant increase in the consumption of fluoroquinolones, as did the EU/EEA population-weighted mean. The Czech Republic, Cyprus, the Netherlands, Sweden and the United Kingdom showed a significant decrease during the period 2008–2012 (ECDC, 2014). In Canada, the overall purchasing and consumption rate for all antibiotics has decreased between 2000-2013, however ciprofloxacin prescription rates have remained the same in that time period (Gov. of Canada, 2014). In 2013, ciprofloxacin was ranked 2nd with 50.3 prescriptions/1,000 inhabitants. As in Europe, there was great regional variation in both community and hospital based use data, however both surveillance systems measured levels of ciprofloxacin to be unchanged as a temporal trend.

Through the common use of fluoroquinolones in human and veterinary medicine, these compounds continuously contribute active compounds (residues of parent compound or metabolites) into unintended environments via manure from intensive farm operations, sewage treatment plants as biosolids and as effluent wastewater from pharmaceutical plants as direct manufacturing effluent. The water solubility properties of antibiotics play a large role in their mobility in the water environment if the solubility is >1g/l, the compound is relatively hydrophilic. Water solubility of fluoroquinolones to be 30 g/l (ciprofloxacin) and 130 g/l (enrofloxacin), therefore relatively resistant to hydrolysis (Chee-Sanford et al., 2009). The concentration of fluoroquinolones in various water sources ranged widely with river surface water containing 0.005-1.6µg/l, untreated hospital sewage ranging from 3-876µg/l and shrimp aquaculture pond water with 6-6,606µg/l. The ranges varied depending on the source and the country. Seasonality also plays a role in the concentration found as do cycles in agriculture and human activity.

At high therapeutic doses, fluoroquinolones have been reported to cause toxic effects in vertebrate and invertebrate species including inhibition of the neurotransmitter gamma-aminobutyric acid, central nervous system excitement, convulsions, ocular problems, neuropathy or gastrointestinal disturbances. Toxic effects are evident and documented throughout literature however prolonged exposure and impacts on humans and wildlife at concentrations previously found in environmental ecosystems are difficult to determine. In recent years there have been a number of published studies investigating the adverse effects of fluoroquinolone antibiotics on various non-target aquatic species. Unfortunately, most reports have been specialized in assessment of acute toxicity, with only few studies evaluating chronic exposure to typically low environmental concentrations. Ecotoxicological results showed that acute toxicity resulted after exposure at mg/l concentrations, while for long term exposure data, the antibiotics were bioactive at concentrations in the order of µg/l. Fluoroquinolone range of concentrations are considered toxic to cyanobacteria, algae and some invertebrate and vertebrate species (e.g. crustaceans, frog, fish). Toxicological effects have been found in aquatic species ranging from cyanobacteria to invertebrates and vertebrates with variable EC50 ranges depending on the concentration of the testing agent. Most experiments were

laboratory based animal models, with very few documented results for open water ecological testing.

Conclusions

Fluoroquinolones are an important class of antibiotics for treating infections, and its use in veterinary and human medicine will continue to be used. What is not typically taken into account in prudent use guidelines is the environmental impact of manufacturing effluent, residue and metabolites entering through the various delivery mechanisms into land and aquatic environments. The literature available to date provides a wealth of information on specific concentration-effect relationships in various animal models, however it does not clearly conclude with certainty the extent to which fluoroquinolones play a contributing role in the disturbance of open environment ecosystems, therefore it must be emphasized that this class of antibiotic continues to play an overall negative role in the ever changing aquatic ecosystem even though, a full definitive conclusion cannot be made on the precise level.

Acknowledgements

This work was supported by grant no. NT/14398 from the Ministry of Health of the Czech Republic.

References

- CARLSSON, G; ORN, S; LARSSON, D.G.J. Effluent from bulk production is toxic to aquatic vertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009, vol. 28, s. 2656-2662.
- CHEE-SANFORD, J; MACKIE, R.I.; KOIKE, S; KRAPAC, I.G; LIN, Y.F.; YANNAREL, A.C.; MAXWELL, S; AMINOV, R.I. Fate and transport of antimicrobial residues and antimicrobial genes following land application of manure waste. *Journ. Environ. Qual.* 2009, vol. 38, s.1086-1108.
- ECDC, (European Centre for Disease Prevention and Control). Surveillance of antimicrobial consumption in Europe 2012. Stockholm, ECDC. 2014.
- GOVERNMENT OF CANADA. Chapter 3. Antimicrobial Use: Canadian Integrated Program for Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS) 2013. Public Health Agency of Canada, Guelph, ON, Canada, 2014.
- KUMMERER, K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere.* 2009, Vol, 75 s.417-434.
- SARMAH, A.H.; MEYER, M.T.; BOXALL, A.B.A. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antimicrobials (Vas) in the environment. *Chemosphere.* 2006, vol.65 s.725-729.

Contact address: Nicol Janecko, MSc. Department of Biology and Wildlife Diseases Brno, VFU Palackého 1-3, 612 42 Brno, njanecko@uoguelph.ca

Vliv nízkých dávek γ -záření na kachní vejce The effect of low doses of gamma radiation on duck eggs

Rulík Václav

Ústav biochemie a biofyziky, FVHE, VFU Brno
PERENA, spol. s r. o.

Summary

In our experiment we deal with a phenomenon of radiation hormesis and due to it improve different growing characteristic of fast growing, very feed efficient and with high yielding carcass hybrid of Beijing duck (Cherry-Valley SM3 Medium). In the first phase of the project we exposed duck hatching eggs low and middle dose of gamma radiation ^{60}Co (0,06 – 2,00 Gy) before putting into the incubator. Then we followed the standards of artificial incubation. Treatment of our chosen doses of gamma radiation has no significant influence to history and result of hatching. It was influenced only by basic management and husbandry of parent stock. From our observation we confirm that Beijing Duck, despite of genetic progress, remained its vitality and robustness. Its embryos are not damage even with dose of 2 Gy, which is by birds over deterministic effect of ionizing radiation.

Keywords: *hormesis; duck; low doses radiation*

Úvod

V uvedeném pokusu se zabývám, zda je možné vlivem fenoménu radiační hormeze ovlivnit líhivost kachních vajec a dále posunout parametry užítkovosti pekingské kachny, která byla v minulých padesáti letech předmětem intenzivního šlechtění. Zatímco Šatava et al. (1984) uvádí, že kachňata ve věku sedmi týdnů dosahují jatečné zralosti a hmotnosti 2,5 – 2,8 kg při spotřebě 3 kg krmiva na 1 kg přírůstku, podle Skřivana et al. (2000) ve věku sedmi týdnů je průměrně dosaženo 3 kg hmotnosti. Současný manuál Cherry Halley (producent hybridů pekingských kachen) uvádí hmotnost 3,2 kg po 42 dnech výkrmu při konverzi 2 kg.

Podle Rattan (2008) je radiační hormeze mírným stresem indukovaná stimulace protektivních mechanismů v buňkách a v organismu vedoucí k biologicky výhodným efektům. Heřmanský (2002) a Feinendegen (2005) popisují u nízkých dávek ionizujícího záření dvojí efekt na buněčnou DNA. Na jedné straně dochází k poškození DNA, které je ale menší než poškození z endogenních zdrojů, např. při buněčném dělení a působením reaktivních forem kyslíku, zároveň ale zvyšují výkon biosystému, který vede k reparaci DNA.

Materiál a metody

Do pokusu byla použita násadová vejce o váze 86 – 94 g pekingských kachen hybridu Cherry Valley SM3 Medium z rodičovského chovu ve 35. týdnu snášky. Na příjmu do líhně byla vejce ošetřena mytím s přídavkem prostředku Chlor Wash Powder (detergent na bázi chloru) a dezinfikována přípravkem Sorgene (na bázi peroctové kyseliny). Druhý den po snášce byla vejce ozářena v ÚJV Řež u Prahy. Bylo vytvořeno 8 skupin, z toho 2 skupiny kontrolní a 6 pokusných, každá o 126 kusech vajec. Jednotlivým pokusným skupinám odpovídají experimentální dávky γ -záření ^{60}Co : 2 Gy, 1 Gy, 0,5 Gy, 0,250 Gy, 0,125 Gy, 0,060 Gy. První kontrolní skupina vajec (označená K0) byla společně s pokusnými skupinami převezena do ÚJV Řež u Prahy, nebyla však ošetřena ionizujícím zářením. Druhá kontrolní skupina vajec (označená K) zůstala v líhni, do doby nasazení byla skladována za standardních podmínek a sloužila k vyloučení chyby u pokusných skupin způsobené manipulací a transportem do ÚJV Řež. Následující den byla vejce nasazena a dále postupováno dle standardů velkokapacitního líhnutí. Experiment byl proveden v zimním období.

Výsledky a diskuse

V tabulce 1 je uveden počet a procentický podíl vylíhnutých kachňat z oplozených vajec, dále počet čistých (neoplozených) vajec a vajec odumřelých v průběhu inkubace v jednotlivých pokusných a kontrolních skupinách.

Námi zvolené dávky γ - záření nevykázaly vliv na průběh a výsledek líhnutí. Ten byl ovlivněn pouze zoohygienickými poměry v inkubátoru a zootechnickým stavem chovného hejna rodičů. Neexistuje korelační závislost mezi absorbovanou dávkou záření a počtem vylíhnutých kachňat.

Tabulka 1: Líhivost z oplozených vajec pokusných a kontrolních skupin

Dávka (Gy)	Vloženo ks vajec	Čistá vejce ks	Odumřelá vejce ks	Počet kachňat	Líhivost z opl.%
2	126	1	10	115	92
1	126	2	18	106	85,5
0,5	126	1	15	110	88
0,25	126	2	14	110	88,7
0,125	126	2	18	106	85,5
0,060	126	3	17	106	86,2
K0	126	4	9	113	92,6
K	126	3	14	109	86,5

Výsledek této fáze experimentu je obdobný výsledkům u jiných druhů drůbeže. Falis et al. (2006) zjistil, že líhivost u ozářených a neozářených vajec brojlerů je stejná, ve sledovaných biochemických parametrech jsou ale zjištělné rozdíly. Kraljevic et al. (2009) nezaznamenal rozdíl mezi kuřaty z ozářených a neozářených vajec těsně po vylíhnutí, ale statisticky významné rozdíly byly prokázány na konci výkrmu. Vilič et al. (2014) zaznamenal inhibiční efekt na celkový protein krevní plazmy v 1. týdnu po vylíhnutí kuřat z vajec ošetřených nízkými dávkami ionizujícího záření. Vilič et al. (2009) potvrdil vliv těchto dávek na odpověď imunitního systému při vakcinaci proti Newcastlelské chorobě. Sledování pozdních změn metabolismu u výkrmových kachen v důsledku ošetření násadových vajec nízkými dávkami ionizujícího záření bude věnována další fáze experimentu.

Závěr

Pekingská kachna, i přes vysokou míru prošlechtěnosti, si uchovala svou vitalitu a robustnost, neboť její zárodky nepoškodila ani dávka 2 Gy, která je ptáků nad hranicí pro deterministické účinky ionizujícího záření.

Literatura

Šatava, M. et al. *Chov drůbeže (velká zootechnika)*. 1. vyd. Praha : Státní zemědělské nakladatelství, 1984. s.352.

Skřivan, M. et al. *Drůbežnictví 2000*. 1.vyd. Praha : Agrospoj, 2000. s.112

Rattan, S. I. S. Hormesis in aging. *Ageing Research Reviews* 7 (2008) 63–78

Heřmanský, B. Racionální a iracionální přístup k hodnocení rizik jaderné energetiky. Věda kontra iracionalita 2. Sborník. Academia, Praha 2002, 74 – 93

Feinendegen, L.E. Evidence for beneficial low level radiation effects and radiation hormesis. *The British Journal of Radiology*, 78 (2005), 3–7

Falis, M., Strišková, K., Dvořák, P. Late metabolit changes in broiler chicks after irradiation of setting eggs. *Folia Veterinaria*, 50, 3, Supplementum: S32- S33, 2006

Kraljević, P. et al. Body weight and enzymes activities in blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated with low level gamma rays before incubation. *Acta Veterinaria (Beograd)*, Vol. 59, No. 5-6, 503-511, 2009

Vilić, M. et al. Concentration of proteins and protein fractions in blood plasma of chickens hatched from eggs irradiated with low dose gamma radiation. *Vet. arhiv* 84, 401-409, 2014.

Vilić, M. et al. Effect of low dose gamma-radiation upon Newcastle disease virus antibody level in chicken. *Iran. J. Radiat. Res.*, 2009; 7 (1): 27-31

Kontakní adresa: Václav Rulík, MVDr., Ústav biochemie a biofyziky, FVHE VFU Brno, Palackého1-3, 612 42 Brno, PERENA, spol. s r. o., Boženy Němcové 127, 503 51 Chlumeč nad Cidlinou, rulvac@seznam.cz

Průkaz vztekliny a přítomnosti těžkých kovů u středoevropských netopýrů Proof of rabies and the presence of heavy metals in central European bats

Miklíková Miroslava, Band'ouchová Hana, Brichta Jiří, Havelková Barbora, Hrubá Hana, Kováčová Veronika, Pikula Jiří

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Bats have been recognised to host a diversity of viruses of zoonotic potential. Insectivorous bats are also known to bioaccumulate toxic pollutants. The aim of this study, therefore, was to screen central European bats for lyssaviruses as well as for residues of heavy metals in tissues. In cooperation with wildlife rescue centers in the Czech Republic we managed to obtain 980 specimens of bats that died naturally or were euthanased for incurable injuries. One sample was positive for antibodies against rabies from a total of 143 bat blood serum samples. Heavy metals were proved in kidney, liver and pectoral muscles. Results of the study are unique due to both the lack of prevalence data of rabies and epidemiological risk assessment regarding synanthropism of different bat species in the Czech Republic, and ecotoxicological implications of importance for veterinarians, zoologists, nature conservation and rescue centers.

Keywords: bats; heavy metals; lyssaviruses; rabies

Úvod

Vzteklina patří k nejobávanějším zoonózám, ke kterým jsou vnímaví všichni teplokrevní obratlovci. Na vzteklinu ročně umírá cca 50 000 lidí a postexpoziční terapii podstoupí okolo 10 milionů lidí. Specifickou variantou nákazy, jejímž výskytem není dotčen statut České republiky jako země prosté nákazy dle kritérií OIE, je vzteklina netopýrů (Schatz et al., 2012). V porovnání s ostatními zeměmi Evropy se v České republice nikdo aktivně vzteklinou netopýrů nezabýval, a to i přes velký význam této problematiky z hlediska ochrany veřejného zdraví (Johnson et al., 2010). Hmyzožraví netopýři jsou také známí bioakumulací toxických polutantů.

Screening středoevropských netopýrů prokázal výskyt lyssavirů v populaci netopýrů a také přítomnost těžkých kovů ve tkáních. Ve spolupráci se záchrannými centry jako jsou Nyctalus, ČESON a institucemi zabývajícími se ochranou, léčbou a výzkumem netopýrů v České republice se nám podařilo získat v průběhu několika let 980 vzorků netopýrů. Vzorky pocházely od druhů *Myotis myotis*, *M. daubentonii*, *M. bechsteinii*, *M. nattereri*, *M. brandtii*, *M. mystacinus*, *M. emarginatus*, *M. dasycneme*, *Rhinolophus hipposideros*, *Eptesicus serotinus*, *E. nilssonii*, *Plecotus auritus*, *P. austriacus*, *Barbastella barbastellus*, *Pipistrellus pipistrellus*, *Vespertilio murinus* a *Nyctalus noctula*.

Monitoring vztekliny netopýrů lze provádět pasivně prostřednictvím standardních metod detekce viru v CNS netopýrů, a/nebo aktivně v populaci netopýrů prostřednictvím detekce virové RNA ve stěrech z dutiny ústní pomocí RT-PCR, izolace viru nebo serologického průkazu protilátek (Schatz et al., 2012). Vzhledem k tomu, že všichni evropští netopýři jsou chráněni, jedná se o nesmírně cenný materiál (Zukal et al., 2012).

Materiál a metodika

Seroprevalence protilátek proti vzteklině

Odebírané vzorky

Pro tuto analýzu jsme použili krevní séra získaná od 20 netopýrů ze Slovinska, 21 z Ruska (oblast Jekaterinburgu, Ural), 12 z Kateřinské jeskyně (Moravský kras), 20 z Malé Morávky

(Jeseníky) a 70 z Národního parku Podyjí. Protilátky proti vzteklině byly testovány pomocí komerčního kitu Platelia™ RABIES II. Test byl založen na principu nepřímé ELISA, kdy mikrotitrační destičky byly pokryty glykoproteinem viru vztekliny extrahovaném z inaktivované a purifikované virové membrány. Enzymatický konjugát se skládal z proteinu A ze *Staphylococcus aureus* spolu s peroxidázou. Pozitivní kontroly, kalibrované proti normě OIE, umožnily kvalitativní nebo kvantitativní stanovení protilátek vztekliny v séru.

Chemická analýza

Vzorky z jater, ledvin a prsních svalů byly použity k prokázání přítomnosti těžkých kovů pomocí diferenční pulsní anodické voltametrie. Tkáňové hladiny metalothioneinů (MT) byly stanoveny pomocí elektrochemické detekce.

Výsledky

Ze 143 odebraných vzorků krevního séra byl 1 pozitivní na vzteklinu. Tento vzorek pocházel z druhu *Myotis myotis*, který byl vzorkován v polovině dubna 2014 v Malé Morávce v Jeseníkách.

Nejvyšší hodnoty metalothioneinů (MT) byly prokázány u *Pipistrellus pipistrellus* v koncentraci 110.80 µg/g v játrech, 694.11 µg/g v ledvinách, 117.56 µg/g v prsních svalech. Nejnížší hodnoty MT o koncentraci 15,66 µg/g byly v prsních svalech *Pipistrellus nathusii*. Nejvyšší koncentrace Zn 0.28 µg/g byla nalezena v játrech *Pipistrellus pipistrellus*, 0,63 µg/g v ledvinách *Pipistrellus pygmaeus* a v prsních svalech *Myotis myotis* 0.30 µg/g. Nejvyšší koncentrace Pb 2.51 µg/g byla zjištěna v játrech *Eptesicus serotinus*, v ledvinách *Myotis myotis* 0.30 µg/g a v prsních svalech *Myotis daubentonii* 0.21 µg/g. Cd bylo v koncentraci 0.01 µg/g zjištěno v játrech *Myotis myotis*.

Relativní směrodatná odchylka (SD) MT byla pod 5%. Detekční limit MT byl 2 pM. Relativní SD těžkých kovů byla pod 8%. Detekční limity Zn, Cd, Pb a byly 20, 6 a 8 pM.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem č. 23/2014/FVHE.

Literatura

JOHNSON, N., A. VOS, C. FREULING, N. TORDO, A.R. FOOKS a T. MÜLLER. Human rabies due to lyssavirus infection of bat origin. *Veterinary Microbiology* [online]. 2010, vol. 142, 3-4, s. 151-159 [cit. 2015-03-16]. DOI: 10.1016/j.vetmic.2010.02.001.

SCHATZ, J., A. R. FOOKS, L. MCELHINNEY, D. HORTON, J. ECHEVARRIA, S. VÁZQUEZ-MORON, E. A. KOOL, T. B. RASMUSSEN, T. MÜLLER a C. M. FREULING. Bat Rabies Surveillance in Europe. *Zoonoses and Public Health* [online]. 2012, vol. 60, issue 1, s. 22-34 [cit. 2015-03-16]. DOI: 10.1111/zph.12002.

ZUKAL, J., PIKULA, J., BANDOUCHOVA, H. Bats and toxic pollutants. *Programme, abstracts and list of participants: proceedings of the International Symposium on the Importance of Bats as Bioindicators*. Granollers: Museum of Natural Sciences Edicions, 2012, s. 75-79. ISBN 9788487790690.

Kontaktní adresa: Miroslava Mikšíková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13006@vfu.cz

What we know about tortoise ticks – are they potential danger?

¹Kautman Matej, ^{1,2}Dvořáková Nela, ^{1,2}Široký Pavel

¹Department of biology and wildlife diseases, Faculty of veterinary hygiene and ecology, University of veterinarian and pharmaceutical sciences, Brno

²CEITEC – Central European Institute of Technology, University of veterinary and pharmaceutical sciences, Brno

Summary

We analysed our large collection of tortoise ticks (*Hyalomma aegyptium*), which was collected from almost whole area of their distribution (North Africa, Southeaster Europe, Caucasus and Middle East). Tortoise ticks, as their name suggests are highly host-specific parasites and in their adult stage they parasitize almost entirely on *Testudo* genus tortoises. Non-adult stages may parasitize on various types of vertebrates, including humans. Research is focused on two main topics. First is intraspecific variability of tortoise ticks, therefore we used mitochondrial genes (COI, 16S rDNA) to get a picture of relations between populations, their distribution and variability. Second part is to detect viral and bacterial pathogens as Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. We determined three main genetic lineages of tick populations, which correlate with geographical pattern and we confirmed presence of all above mentioned pathogens.

Keywords: *Hyalomma aegyptium*; CCHFV; *Anaplasma*; *Rickettsia*; tortoise tick

Introduction

Hyalomma aegyptium is three-host Ixodid tick. Its distribution area is large and spread from Morocco across the North Africa, the Balkans, Middle East and reaches Afghan and Pakistani steppes. General hosts of *Hyalomma aegyptium* are tortoises of genus *Testudo*. Records of adult ticks parasitizing on other than tortoise vertebrates come very sparsely and there are no records of human infestation with adult tick. However, non-adult stages are less host-specific; they can feed on wide spectrum of other vertebrates as other reptiles, birds and mammals, including humans (Bursali *et al.* 2010, Kar 2013).

This species was underrated for a long time in epidemiological studies, mainly for its high level of host specificity in adult stage. Nevertheless, *Hyalomma aegyptium* has been recently defined as a carrier of numerous zoonotic pathogens including Crimean-Congo hemorrhagic fever virus, *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Borrelia* spp. (Pastiu *et al.* 2012; Široký *et al.* 2014).

Methods

First aim of study focused on phylogeography of *H. aegyptium* and its population structure requires analysis of mitochondrial genes 16S rDNA and Cytochrome *c* oxidase I. After amplification of fragments of COI (Rees *et al.* 2003) and 16S rDNA (Noureddine *et al.* 2011) samples were purified with Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Genaid Biotech Ltd., Taiwan) and sent for sequencing. Together 97 sequences from 55 localities in 16 countries were used for analysis in MrBayes 3.1.2. (Ronquist & Huelsenbeck 2003) with GTR model for 10⁷ generations. Second part of study was focused on pathogen identification. Together 465 ticks were analysed for presence of viral and bacterial pathogens. From each tick both DNA and RNA were isolated, each from one longitudinal half of the tick body and isolated nucleic acids were stored in -20°C. Our samples originate from 29 localities from 6 countries. For CCHFV we used RT-PCR amplification of S-segment according to Schwartz *et al.* (1996) with the modifications from Široký *et al.* (2014) and our modification of annealing temperature increased in both reactions to 51°C. For *A. phagocytophilum* we used amplification of 16S rDNA according to Majláthová *et al.* (2011) and for *Rickettsia* spp.

amplification of *glt A* gene with primers published in Boretti *et al.* (2009). Samples positivity was controlled visually on 1,5% agarose gel on UV transilluminator. Positive samples were purified. Samples were sent for sequencing (Macrogen, Netherland). Obtained sequences were compared with GenBank database (GenBank, NCBI) using BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) to confirm the origin of the infectious agent. CCHFV strains were identified by comparing our sequences with sequences available on GenBank database, using MrBayes 3.1.2. (Ronquist & Huelsenbeck 2003) with GTR model of 10^7 generations.

Results

Analysis of sequences revealed three main population lineages of *Hyalomma aegyptium*, one Eastern group, one Mediterranean group, and one large group spread in the Balkans, Turkey and in the centre of the distribution of the studied localities.

Pathogen analyses confirm presence of all testes pathogens, in some cases in surprisingly high prevalence (Table 1).

Table 1: Number of tested and positive samples

country	tested/ positive samples for CCHFV	tested/positive samples for <i>A. phagocytophilum</i>	tested/positive samples for <i>Rickettsia</i> spp.
Turkey	112/12	112/2	76/0
Syria	16/-	16/0	-
Iran	146/4	146/2	98/15
Georgia	61/0	61/6	46/2
Algeria	56/16	74/0	74/2
Morroco	74/0	-	-
total	465/32	409/10	294/19

Conclusions

Despite *H. aegyptium* was traditionally overlooked in epidemiological studies; its potential in epidemiology of zoonotic pathogens can be considerable. They are verified carriers of many infectious agents, which cause serious diseases like CCHF, Q-fever, anaplasmosis, Lyme disease or rickettsioses. As mentioned before, non-adult tick infestations on humans are not an individual case and many of these zoonotic pathogens can be also vertically transmitted. Other important fact is, that tortoises, as a general host of *H. aegyptium* often share biotope with herds of domestic animals where they hypothetically can act as a natural reservoir of some pathogens, or at least just carry infected vectors. It has been proved, that migratory birds can transmit tortoise tick larvae and nymphs to distant localities on migration routes with no natural *H. aegyptium* occurrence, so there is potential of passive dispersion of infected ticks to new, until now relatively safe areas. Until now pathogen screening in tortoise ticks was focused on relatively small geographic regions, usually limited to one country. We had an opportunity to make complex pathogen screening of localities throughout the area of tortoise tick natural distribution and make the phylogeographical study revealing relations between individual tick populations.

Acknowledgement

Study was financially supported by GAČR P506/11/1738 and IGA15/2014/FVHE

References

BORETTI F. S., PERRETEN, A., MELI, M. L.; CATTORI, V.; WILLI, B.; WENGI, N.; HORNOK, S.; HONEGGER, H.; HEGGLIN, D.; WOELFEL, R.; REUSCH, C. E.; LUTZ, H.; HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigation of *Rickettsia Helvetica* infection in dogs, fosex, humans and

Ixodes ticks. *Applied and environmental microbiology*. 2009. Vol. 75, no. 10, p. 3230—3237. DOI: 10.1128/AEM.00220-09.

BURSALI A.; TEKIN, S.; ORHAN, M.; KESKIN, A.; OZKAN, M. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) infesting humans in Tokat province of Turkey: species diversity and seasonal activity. *Journal of vector ecology*. 2010. Vol. 35, no. 1: 180—186.

KAR, S., DERVIS, E.; AKM, A.; ERGONUL, O.; GARLI, A. Preferences of different tick species for human hosts in Turkey. *Exp. Appl. Acarol.* 2013, 61: 349—355. DOI: 10.1007/s10493-013-9698-2.

MAJLÁTHOVÁ, V.; IGOR, M.; VÍCHOVÁ, B.; GUL'OVÁ, I.; DERDÁKOVÁ, M.; SESZTÁKOVÁ, E.; PEŤKO, B. Polymerase chain reaction Confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in Dogs Suspected of Babesiosis in Slovakia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011, vol. 11, issue 11, s. 1447-1451.

NOUREDDINE R.; CHAUVIN, A.; PLANTARD, O. Lack of genetic structure among Eurasian populations of the *Ixodes ricinus* contrasts with marked divergence from north-African populations. *International journal for parasitology*. 2011. 41: 183—192.

PASTIU A. I.; MATEI I. A.; MIHALICA, A. D.; D'AMICO, G.; DUMITRACHE, M. O.; KALMÁR, Z.; SÁNDOR, A. D.; LEFKADITIS, M.; GHERMAN, C. M.; COZMA, V. Zoonotic pathogens associated with *Hyalomma aegyptium* in endangered tortoises: evidence for host-switching behaviour in ticks? *Parasites and vectors*. 2012. 5: 301. DOI: 10.1186/1756-33055-5-301.

REES D. J.; DIOLI, M.; KIRKENDALL, L. R. Molecules and morphology: evidence for cryptic hybridization in African *Hyalomma* (Acari: Ixodidae). *Molecular phylogenetics and evolution*. 2003. 27: 131—142. DOI: 10.1016/S1055-7903(02)00374-3.

SCHWARZ, T. F., NSANZE, H.; LONGSON, M.; NITSCHKO, H.; GILCH, S.; SHURIE, H.; AMEEN, A.; ZAHIR, A. R. M.; ACHARYA, U. G.; JAGER, G. Polymerase chain reaction for diagnosis and identification of distinct variants of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in the United Arab Emirates. *J. Trop. Med. Hyg.* 1996, 55(2), s. 190-196.

ŠIROKÝ, P.; BĚLOHLÁVEK, T.; PAPOUŠEK, I.; JANDZIK, D.; MIKULÍČEK, P.; KUBELOVÁ, M.; ZDRAŽILOVÁ-DUBSKÁ, L. Hidden threat of tortoise ticks: high prevalence of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in ticks *Hyalomma aegyptium* in the Middle East. *Parasites and Vectors*. 2014, 7: 101. DOI: 10.1186/1756-3305-7-101.

Contact address: Matej Kautman, Msc., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, kautman.matej@gmail.com

Rickettsial infections in ticks from reptiles, birds and humans in Honduras

^{1,2}Nováková Markéta, ^{1,2}Literák Ivan, ³Chevez Luis, ⁴Martins Thiago F.,
⁵Ogrzewalska Maria, ⁴Labruna⁴Marcelo B.

¹Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

²CEITEC VFU, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Brno, Czech Republic

³Bay Island Foundation, Iguana Station, Utila, Islas de la Bahía, Honduras

⁴Faculty of Veterinary Medicine and Husbandry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁵Laboratory of Hantaviruses and Rickettsioses, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Summary

The aim was to determine rickettsial infection in ticks from reptiles, wild birds and humans in Honduras. In total, 95 ticks were collected from reptiles, wild birds and accidentally from humans at two locations in Honduras. Four tick species were found: *Amblyomma dissimile* on iguanas, *A. longirostre* and *A. nodosum* on birds, and *A. mixtum* on humans. Both *A. longirostre* and *A. mixtum* were infected with *Candidatus Rickettsia amblyommii*. *Amblyomma dissimile* was infected with *Rickettsia* sp. strain *Colombianensis*. This work provides the first report of rickettsiae in ticks from reptiles, birds and humans in Honduras. New host-*Amblyomma* tick associations are documented.

Keywords: rickettsiae; ticks; reptiles; birds; humans; Honduras; *Amblyomma* spp.

Introduction

The objective of the present work was to investigate rickettsial infection among ticks collected on reptiles, wild birds and humans. It is the first study of this type from Honduras.

The information of tick fauna, their hosts and bacterial agents transmitted by ticks in Honduras is limited. Relapsing fever and Rocky Mountain spotted fever, are suspected in the country but not confirmed (Chen and Wilson, 2009). In some Central American countries, some rickettsial infections in ticks and various arthropod hosts have been reported. In Nicaragua, cases of spotted fever group are suspected. In Costa Rica, infections in humans and ticks caused by *R. rickettsii*, *R. akari* and *R. felis* were diagnosed. In Panama and Guatemala *R. typhi* and *R. rickettsii* have been found (Estripeaut et al., 2007; Hun et al., 2008; Peacock et al., 1971).

Material and Methods

Ticks were collected in August and September 2014 at Tela, 15°44'N and 87°27'W and on Isla de Utila, Islas de la Bahía, 16°06'N and 86°54'W. Ticks from reptiles were collected from captive iguanas in the Iguana Research and Breeding Station in Utila. Wild birds were trapped by ornithological mist nets, observed for the presence of ectoparasites and identified using Howell and Webb (2013). Ticks were collected from people working in the field.

Ticks were stored in 96% ethyl alcohol and classified to species, and stage (Onofrio et al., 2006; Martins et al., 2010). Larvae were identified by molecular analysis of the *16S rDNA* mitochondrial gene.

DNA was extracted from all individuals except those ones that were deposited at the tick collection. Rickettsial DNA was detected and analyzed according to Novakova et al. 2015.

Results

A. dissimile (12 nymphs, 7 males, 4 females) and *Amblyomma* spp. (18 larvae) were found on 24 captive iguanas. Eleven (48%, n= 23) and one (100%, n=1) *Ctenosaura bakeri* and *Iguana iguana* were infested, respectively. In total, 280 birds were captured and 25 (9%) birds were

found parasitized by ticks. Two species of ticks were found on birds: immature stages of *A. longirostre* (7 larvae, 6 nymphs) and *A. nodosum* (2 nymphs). The rest 54 larvae belonged to *Amblyomma* spp. All 9 ticks collected on people in Lancetilla were identified as nymphs of *Amblyomma mixtum*. *Amblyomma dissimile* ticks (4 nymphs, 4 males, 3 females), 4 *A. mixtum* nymphs, 4 *A. longirostre* nymphs and 5 *Amblyomma* spp. larvae were deposited at the tick collection “Coleção Nacional de Carrapatos” of the University of São Paulo. All remaining ticks were tested for the presence of *Rickettsia*.

Four (6%) out of 67 *Amblyomma* spp. larvae and three (38%) out of 8 nymphs of *A. dissimile* contained DNA of *Rickettsia* sp. strain Colombianensi. Four (80%) out of 5 *A. mixtum* nymphs collected from humans in Jardín Botánico Lancetilla, Tela yielded positive results for the *gltA*- and *ompA*-PCR. This rickettsia was diagnosed as *Candidatus* ‘*Rickettsia amblyommii*’.

Discussion

In this study, we obtained different species of ticks: *Amblyomma dissimile* on iguanas, *A. longirostre* and *A. nodosum* on birds, and *A. mixtum* on humans, and two rickettsial agents: *Candidatus* ‘*Rickettsia amblyommii*’ and *Rickettsia* sp. strain Colombianensi.

A. longirostre and *A. nodosum* are neotropical species, adults preferably feed on porcupines (*A. longirostre*), and on anteaters (*A. nodosum*). Subadults feed primarily on birds (Nava et al., 2010). *Amblyomma dissimile* is a common parasite of various reptile species throughout Central and South America. In Honduras, it has previously been reported from *Iguana rhinolopha* (Bequaert, 1932). We found *C. bakeri* and *I. iguana* parasitized with *A. dissimile*. It is the first record of parasitism on these species. *Amblyomma mixtum* is a human-biting tick (Guglielmone et al., 2006).

Two rickettsiae were detected: *Rickettsia* sp. strain Colombianensi in *A. dissimile* and *Candidatus* ‘*Rickettsia amblyommii*’ in *A. longirostre* and *A. mixtum*. Both of these rickettsiae are incompletely characterized bacteria from the spotted fever group (SFG) with unknown pathogenicity and both are here reported in Honduras for the first time. *Rickettsia* sp. strain Colombianensi has been described recently in ticks by Miranda et al. (2012). It has been found in Colombia in *A. dissimile* collected from iguanas. We detected *Rickettsia* sp. strain Colombianensi outside Colombia for the first time. *Candidatus* ‘*Rickettsia amblyommii*’ is highly prevalent rickettsia in many species of *Amblyomma* ticks (Zhang et al., 2012). It is considered to cause mild or subclinical infections in humans but it has never been proven by a direct detection.

Conclusion

This is the first study of this type from Honduras. New *Amblyomma*-host associations were found. Further studies are crucial to evaluate the role of ticks in transmitting pathogens to humans and animals in Honduras.

Acknowledgements

The field work was permitted with Instituto Nacional de Conservación y Desarrollo Forestal, Áreas Protegidas y Vida Silvestre, Gobierno de la República de Honduras (RESOLUCIÓN-DE-MP-063-2014). We thank Stanislav Kolenčík, Miroslav Valan and Alberto Andres Velasquez Castillo, for their cooperation in the field. We appreciate the help of the staff of Centro de Investigación y Jardín Botánico Lancetilla and the staff and volunteers of the Iguana Research and Breeding Station Utila. Markéta Nováková and Ivan Literák were supported by the project CEITEC – Central European Institute of Technology (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) of the European Regional Development Fund.

References

- BEQUAERT, J.C. *Amblyomma dissimile* Koch, a tick indigenous to the United States (Acarina: Ixodidae). *Psyche*. 1932, vol. 39, no. 1-2, p. 45-47.
- CHEN, L.H.; WILSON, M.E. Tick-borne rickettsiosis in traveler returning from Honduras. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, vol. 15, no. 8, p. 1321–1323.
- ESTRIPEAUT, D.; ARAMBURÚ, M.G.; SÁEZ-LLORENS, X.; THOMPSON, H.A.; DASCH, G.A.; PADDOCK, C.D.; ZAKI, S.; EREMEEVA, M.E. Rocky Mountain spotted fever, Panama. *Emerging Infectious Diseases*. 2007, vol. 13, no. 11, p. 1763–1765.
- GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental Applied Acarology*. 2006, vol. 40, no. 2, p. 83–100.
- HOWELL, S.N.G.; WEBB, S. A guide to the Birds of Mexico and Northern Central America. *Oxford University Press, New York*, 2013.
- HUN, L.; CORTÉS, X.; TAYLOR, L. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine*. 2008, vol. 79, no. 6, p. 899–902.
- MARTINS, T.F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2010, vol. 1, no. 2, p. 75–99.
- MIRANDA, J.; PORTILLO, A.; OTEO, J.A.; MATTAR, S. *Rickettsia* sp. strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): a new proposed *Rickettsia* detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. *Journal of Medical Entomology*. 2012, vol. 49, no. 4, p. 960-965.
- NAVA, S.; VELAZCO, P.M.; GUGLIELMONE, A.A. First record of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) from Peru, with a review of this tick's host relationship. *Systematic and Applied Acarology*. 2010, vol. 15, no. 1, p. 21–30.
- NOVAKOVA, M.; BULKOVA, A.; COSTA, F.B.; KRISTIN, A.; KRIST, M.; KRAUSE, F.; LIZNAROVA, E.; LABRUNA, M.B.; LITERAK, I. Molecular characterization of '*Candidatus Rickettsia vini*' in *Ixodes arboricola* from the Czech Republic and Slovakia. *Ticks and Tick-borne diseases*. 2015, *In Press*.
- ONOFRIO, V.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D.M. Comentários e chaves para as espécies de *Amblyomma*. In: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H. (Eds.), Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. *Impresso São Paulo*, 2006, p. 53-71.
- PEACOCK, M.G.; ORMSBEE, R.A.; JOHNSON, K.M. Rickettsioses of Central America. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1971, vol. 20, no. 3, p. 941-949.
- ZHANG, X.; REN, X.; NORRIS, D.E.; RASGON, J.L. Distribution and infection frequency of '*Candidatus Rickettsia amblyommii*' in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*) and culture in an *Anopheles gambiae* mosquito cell line. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2012, vol. 3, no. 1, 38–42.
- Contact address:** Markéta Nováková, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, novakovamar@vfu.cz

SEKCE 4

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

Sledování koncentrace stopových prvků (Cu, Zn, Se) v srsti lam

The concentration monitoring of trace elements (Cu, Zn, Se) in llama hair

Holasová Milada, Pechová Alena, Vyskočilová Věra

Ústav biochemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The aim of this work was to optimize a method for the assessment of trace elements in llama hair and to evaluate the variability in concentrations of trace elements from different places on their bodies. The cleaning procedure of the hair and sample processing was optimized. The concentration of copper and zinc was measured by flame technique Atomic Absorption Spectroscopy (AAS) and the concentration of selenium by the hydride generation technique AAS. We found that the place of sampling did not affect significantly the concentrations of the monitored trace elements.

Keywords: hair; llama; trace elements; copper; zinc; selenium; AAS

Úvod

V posledních letech stoupá popularita lam a tato zvířata se začínají chovat v mnoha zemích Evropy. Obdobný trend je i v České republice, kde se lamy chovají především jako zájmová zvířata, případně pro produkci vlny. Přestože jsou lamy na výživu nenáročné, nejčastější zdravotní problémy u těchto zvířat plynou právě z nesprávného složení jejich potravy. Jedním z aktuálních problémů u těchto zvířat je problematika zásobení stopovými prvky, jejichž deficit negativně ovlivňuje zdravotní stav zvířat, reprodukční funkce i kvalitu produkované vlny (Husáková a kol. 2012). Hodnocení zásobení zvířat stopovými prvky je prováděno nejčastěji na základě vyšetření krve, případně orgánových koncentrací sledovaných prvků. Odběry krve u lam jsou však poměrně náročné a vzhledem k nezbytné fixaci jsou zvířata i zbytečně stresována. Alternativní metodou pro hodnocení obsahu minerálních látek v organismu je stanovení koncentrace těchto látek v srsti. Výhodou odběru srsti je minimální stresování zvířat bez násilné fixace.

Využití stanovení minerálních látek je nejvíce propracováno u lidí, kde je vyšetření vlasů sledováno jako alternativní metoda nejen pro hodnocení zásobení biogenními prvky, ale také pro hodnocení zátěže toxickými prvky (Bencko 1995). Obsah minerálních látek ve vlasech je ovlivňován řadou faktorů, jako je stáří, pohlaví, životní prostředí, zdravotní stav, výživa apod. (Długaszek a kol. 2012). Rovněž u přežvýkavců byly publikovány práce, které dokumentují vhodnost sledování koncentrace stopových prvků v srsti (Pavlata a kol. 2011, Combs 1987), i když je této problematice u farmových zvířat věnována poměrně malá pozornost vzhledem ke snadné dostupnosti vzorků krve a tkání.

Cílem naší práce bylo optimalizovat metodu stanovení stopových prvků v srsti lam a vyhodnotit variabilitu koncentrací na různých částech jejich těla.

Materiál a metody

Čištění a mineralizace srsti lam

Optimalizovaná metoda čištění srsti je uvedena v Tabulce 1.

Mineralizace byla provedena metodou mikrovlňného rozkladu vzorků srsti na přístroji Microwave Labstation Ethos SEL (Milestone, Itálie). Pro stanovení mědi a zinku bylo použito 0,25 g vyčištěného vzorku srsti a pro stanovení selenu 0,5 g, vždy spolu s 6 ml HNO₃ a 2 ml H₂O₂. Samotná mineralizace probíhala při 200°C po dobu 35 minut při maximálním výkonu 1000 W. Mineralizáty byly poté zředěny deionizovanou vodou do 25 ml odměrných baněk.

Pro stanovení selenu byly mineralizáty odpařeny s cílem odstranění zbytků kyseliny dusičné ze vzorku a poté opět zředěny do 25 ml odměrných baněk deionizovanou vodou s přidavkem 12,5 ml 6M HCl. K redukci Se^{6+} na Se^{4+} dojde pomocí 6M HCl během 20-24 hodin při pokojové teplotě ve tmě (Pechová a kol. 2005).

Tabulka 1: Příprava vzorku srsti – promytí a následné sušení

Promývací roztok	Procedura a doba trvání	Počet opakování
0.5% Triton X-100	Promývání 60 min.	3
0.5% Triton X-100	Promývání 15 – 20 hodin	1
0.5% Triton X-100	Promývání 60 min	2
Destilovaná voda	Promývání 60 min.	2
Aceton	Promývání 60 min.	1
Destilovaná voda	Promývání 60 min.	2
	Sušení (75°C) 60 – 90 min.	

Stanovení koncentrace mědi, zinku a selenu

K vlastnímu měření vybraných stopových prvků jsme použili přístroj ContrAA 700 (Analytik Jena, SRN). Podle zjištěných koncentrací byla pro stanovení mědi a zinku použita plamenová atomová absorpční spektrofotometrie (AAS) a pro stanovení koncentrace selenu hydridová technika AAS s využitím jednotky HS 600.

Odběr vzorků srsti

Odběr vzorků probíhal v rámci každoročního stříhání lam v chovu na Hádech. Celkem byly odebrány vzorky srsti od 7 alpak z 8 různých míst na těle. Vzorky srsti byly odebírány ostříháním konkrétně v oblasti hřbetu, břicha, krku v horní a dolní části, plece pravé a levé, kýty pravé a levé.

Výsledky a diskuse

Ve všech odebraných vzorcích srsti bylo provedeno stanovení koncentrace mědi, zinku a selenu. Průměrné koncentrace sledovaných stopových prvků u jednotlivých zvířat jsou uvedeny v Tabulce 2.

Tabulka 2: Koncentrace mědi, zinku a selenu v srsti odebrané z 8 různých míst na těle lam

		Zv. 1	Zv. 2	Zv. 3	Zv. 4	Zv. 5	Zv. 6	Zv. 7
Cu	\bar{x} [mg/kg]	28,6	24,1	6,2	33,3	8,6	39,4	34,1
	SD [mg/kg]	7,2	6,2	1	13	2,2	19,4	4,2
	RSD [%]	25,4	25,9	15,9	38,9	25,2	49,3	12,3
Zn	\bar{x} [mg/kg]	61,8	118,9	127	80,1	136,4	66	122,1
	SD [mg/kg]	13,9	13,6	14,9	24,6	12,1	9,3	13
	RSD [%]	22,5	11,5	11,8	30,7	8,9	14,2	10,7
Se	\bar{x} [µg/kg]	764,1	534,5	581,1	505,4	452	798,6	445,6
	SD [µg/kg]	76,7	84,4	64,5	41,1	64,1	62,7	42,6
	RSD [%]	10	15,8	11,1	8,1	14,2	7,9	9,6

\bar{x} – průměr, SD – směrodatná odchylka, RSD – relativní směrodatná odchylka

Získaná data byla vyhodnocena jednofaktorovou analýzou variance ANOVA v programu Microsoft EXCEL. Místo odběru srsti neovlivnilo signifikantně koncentraci mědi, zinku ani selenu ($P > 0,05$). Nejmenší rozdíly mezi jednotlivými odběrovými místy byly zjištěny u

selenu, kde byla průměrná relativní směrodatná odchylka 11 %, o něco vyšší variabilita byla u zinku (15,7 %) a největší rozdíly byly u mědi, kde byla průměrná relativní směrodatná odchylka 27,5 %. Vyšší variabilita u zinku byla způsobena zvýšenou koncentrací v srsti u jednoho zvířete z oblasti stehna a u dalšího zvířete z oblasti hřbetu a horní části krku. U mědi byla zvýšená variabilita způsobena většinou nižšími koncentracemi v oblasti hřbetu, u jednoho zvířete na krku a na břiše.

Přestože místo odběru signifikantně neovlivnilo u mědi, zinku ani selenu koncentraci sledovaného prvku, doporučujeme na základě našich výsledků při odběru upřednostnit standardizované místo odběru nejlépe z oblasti plece.

Závěr

Byla provedena optimalizace metody pro stanovení mědi, zinku a selenu v srsti lam. Z výsledků analýz vyplývá, že místo odběru srsti signifikantně neovlivňuje koncentraci sledovaných stopových prvků. Pro odběr srsti je přesto vhodné upřednostnit standardizované místo odběru z oblasti plece.

Literatura

BENCKO V. Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. *Toxicology*. 1995, vol. 101, s. 29-39.

COMBS D. K.: Hair of analysis as an indicator of mineral status of livestock. *Journal of Animal Science*. 1987, vol. 65, s. 1753-1758.

DLUGASZEK M.; KASZCZUK M.; MULARCZYK-OLIWA M. Application of atomic absorption spectrometry in the elements and heavy metals determination in biological media- human hair. *Proceedings of electrotechnical institute*. 2012, vol. 255, s. 346-354.

HUSÁKOVÁ T.; PAVLATA L. Vyhodnocení výskytu karencí stopových prvků s ohledem na způsob krmení u lam a alpak v České republice. *Závěrečná zpráva projektu IGA VFU Brno*. 2012, s. 1-7.

PAVLATA L.; CHOMÁT M.; PECHOVÁ A.; MIŠUROVÁ L.; DVOŘÁK R. Impact of long-term supplementation of zinc and selenium on their content in blood and hair in goats. *Veterinarní Medicina*. 2011, vol. 56, s. 63-74.

PECHOVÁ, A.; PAVLATA, L.; ILLEK, J. *Acta Veterinaria Brno*. 2005, vol. 7, s. 483-490.

Kontaktní adresa: Milada Holasová, MVDr., Ústav biochemie a biofyziky, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1-3 Brno 612 42, H13004@vfu.cz

SEKCE 5

Veřejné veterinářství a ochrana zvířat

Vybrané projevy chování telat do dvou hodin po narození

Behavior of calves within two hours after birth

Vomočilová Vendula, Voslářová Eva, Bedáňová Iveta, Večerek Vladimír

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

Summary

Cílem této studie bylo zhodnotit projevy chování telat po standardním (normálním) a komplikovaném porodu se zaměřením na specifické, vybrané projevy chování, jejich pořadí a časový výskyt od narození, zaznamenávaných v průběhu prvních 2 hodin života telat.

Keywords: *behavior; cattle; calving; sucking*

Úvod

Narození telete s sebou vždy přináší novorozenecký stres a období s nízkým zásobením organismu kyslíkem. Těžké porody tyto problémy umocňují. V průběhu několika minut se musí organismus novorozeného telete přebudovat z ideálního prenatalního života v děloze na vnější prostředí. První známky života telete se projevují tím, že zvedá hlavu. Dochází k tomu rychle, většinou do 3 – 4 minut. Do 60 minut se postaví a udělá první kroky, ve druhé hodině života již hledá vemeno matky (Kovalčiková a Kovalčik, 1984). Telata se v čase prvního sání velmi liší, některá sají už půl hodiny po narození, méně vitální se nenapíjí sama ani do 12 hodin. Na opožděném sání má mimo opožděného postavení podíl i dlouhé hledání vemene (Brouček a Kišac, 2001). Edwards a Broom (1979) a Edwards (1982) zjistili, že polovina telat, která se narodila kravám po jejich třetí graviditě, nedokázala struk najít do 4 hodin po porodu. Je to způsobeno povislým vemenem u těchto matek a silnými struky, které jsou umístěny níže. Další studie (Illman and Spinka 1993) uvádí u telat prvorodiček (krav po prvním otelení), až 6 hodin po porodu. Novorozená telata sají 5 – 10 krát za den, přičemž délka jednotlivých sání je do 10 minut (Fraser a Broom, 2005). Cílem této studie bylo zhodnotit projevy chování telat po standardním (normálním) a komplikovaném porodu se zaměřením na specifické, vybrané projevy chování, jejich pořadí a časový výskyt od narození, zaznamenávaných v průběhu prvních 2 hodin života telat.

Materiál a metodika

Projevy chování novorozených telat byly sledovány v chovu skotu se zaměřením na mléčnou produkci. Vlastní pozorování probíhalo v porodním kotci, do kterého je kráva přesunuta několik dní před předpokládaným telením. Pozorování bylo zahájeno při zjištění přípravy k porodu a pokračovalo po dobu 2 hodin od narození telete. U každého telete byla zaznamenána doba prvního výskytu sledovaných projevů chování. Do analýzy bylo zařazeno 8 porodů, z toho dva porody ztížené, poměr pohlaví narozených telat byl 50 % jalovičky a 50 % býčci.

Data byla hodnocena pomocí programu Unistat ver. 6.5. Pro zjištění statistické významnosti rozdílů mezi porovnávanými soubory byl použit neparametrický Mann-Whitneyův test.

Výsledky

Zaznamenané projevy chování telat po narození jsou uvedeny v Tabulce 1.

Mezi býčky (n = 4) a jalovičkami (n = 4) nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl u žádného ze sledovaných projevů chování: zvednutí hlavy (p > 0,05 mediány býčci = 3, jalovičky = 3), u doby pokusu o postavení (p > 0,05 mediány býčci = 15, jalovičky = 14), u úspěšného stání

($p > 0,05$ mediány býci = 27, jalovičky = 25), prvních kroků ($p > 0,05$ mediány býci = 38, jalovičky = 38), u doby hledání vemene ($p > 0,05$ mediány býci = 49, jalovičky = 55).

Při srovnání telat (bez rozdílu pohlaví) s normálním porodem ($n = 6$) a komplikovaným porodem ($n = 2$) byl zjištěn statisticky významný rozdíl ve všech sledovaných parametrech: u doby zvednutí hlavy ($p = 0,033$, mediány: normální p. = 3,0 min, komplikovaný p. = 7,5 min), u doby pokusu o postavení ($p = 0,043$, mediány: normální p. = 14,5 min, komplikovaný p. = 40 min), v době úspěšného stání ($p = 0,044$ mediány: normální p. = 26 min, komplikovaný p. = 100 min), v době výskytu prvních kroků ($p = 0,043$ mediány: normální p. = 38 min, komplikovaný p. = 100 min), u doby hledání vemene ($p = 0,044$, mediány: normální p. = 53 min, komplikovaný p. = 120 min).

Tabulka 1: Projevy chování telat do dvou hodin po narození v minutách

projev chování	tele							
	býček	býček	býček	býček kompl.	jalovička	jalovička	jalovička	jalovička kompl.
zvednutí hlavy	3	2	3	7	3	3	4	8
pokus o postavení	14	15	18	55	12	15	14	25
úspěšné stání	24	27	33	80	24	25	30	N
první kroky	38	37	44	80	38	39	37	N
hledání vemene	46	49	68	N	55	64	51	N

N – projev chování během 2 hodin po narození nezaznamenán

Diskuze

Brouček a Kišac (2001) uvádějí, že první známky života telete se projevují tím, že zvedá hlavu, většinou do 3 – 4 minut. U našich sledovaných telat po standardním porodu došlo ke zvednutí hlavy v rozmezí 2 – 4 minut. Tele se obvykle postaví do 30 minut a sání je započato o 30 minut až 1 hodinu později (Fericean, M., L., et al., 2010). Kovalčíková a Kovalčík (1984) uvádějí, že se tele do 60 minut postaví a udělá první kroky a ve druhé hodině života už hledá vemeno matky. U pozorovaných 8 telat po standardním porodu k uvedeným projevům chování došlo rychleji, kdy první pokusy o postavení byly zpozorovány během prvních 20 minut, a hledání vemene matky byla započata během první hodiny života. Metz a Metz (1987) zjistili, že u telat po komplikovaném porodu je opožděno postavení, stání a sání oproti ostatním telatům. U našich sledovaných telat po komplikovaném porodu došlo také kromě zmíněných projevů k opožděnému zvednutí hlavy. Po úspěšném postavení tele začíná prozkoumávat tělo matky. Pokud začíná průzkum v oblasti hrudních končetin matky, největší pozornost věnuje oblasti lokte, pokud průzkum započal u pánevních končetin, tele nejvíce prozkoumává oblast třísel (Fraser a Broom, 2005). Uvedené chování nastalo u telat po standardních porodech v prvních 70 minutách od narození, kdy průzkum byl započat u hrudních končetin matky. U telat po komplikovaném porodu ve sledovaném časovém úseku 2 hodiny po narození nebylo zaznamenáno. Fraser a Broom (2005) uvádějí, že doba, za kterou se teleti podaří najít struk je odlišná a závisí na utváření vemene matek. Brouček a Kišac (2001) uvádějí, že při sání tele zaujme opačně paralelní postoj těsně vedle matky, což se nám ve všech případech nekomplikovaných porodů při pokusu o sání telat potvrdilo. Telata

z komplikovaných porodů přijala mlezivo z lahve s gumovým strukem podané ošetřovatelem. Z hlediska posuzování vlivu pohlaví Uhrinčat' et al. (2000) zjistili, že v prvních aktivitách na tom byli lépe býčci, kteří začínali zdvihát hlavu dříve než jalovičky. Avšak přes to, že býčci dříve zdvihali hlavu, první pokusy o postavení zaregistrovali dříve u jaloviček. U našich sledovaných telat mezi býčky a jalovičkami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl u žádného ze sledovaných projevů chování. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn při porovnání standardních a komplikovaných porodů bez rozdílu pohlaví. Hlavním důvodem zde zřejmě byla aspirace plodové vody během porodu a zjevný stres telete, případně pokud matka byla prvorodička a nejevila o tele zájem. Za těchto okolností byly všechny projevy chování v porovnání s porody bez komplikací o něco opožděny, avšak navazovaly na sebe ve stejném pořadí jako u dalších pozorovaných telat.

Závěr

Nebyl zjištěn rozdíl v době nástupu sledovaných projevů chování mezi novorozenými býčky a jalovičkami. Rozdíly však byly zjištěny u chování telat narozených po komplikovaném porodu. Pořadí sledovaných projevů chování telat bylo stejné jako u telat narozených kravám s normálním průběhem porodu, avšak docházelo k nim s významným časovým zpožděním.

Literatura

- BROUČEK, J., KIŠAC, P. (2001). Etologické aspekty napájení telat, *Veterinářství* 51, 493-497.
- EDWARDS, S. A. (1982). Factors affecting the time to first suckling in dairy calves. *Anim. Prod.* 34, 339-346.
- EDWARDS, S. A., BROOM, D. M. (1979). The period between birth and the first suckling in dairy calves. *Research in Veterinary Science*, 26, 255-256.
- EDWARDS, S. A., BROOM, D. M. (1982). Behavioural interactions of dairy cows with their newborn calves and the effects of parity. *Animal Behaviour*, 30, 525-535.
- FERICEAN, M. L., PALICICA, R., RADA, O. (2010). The Behaviour of calves. *Research Journal of Agricultural Science*, 42 (2), 248-254.
- FRASER, A. F., BROOM, D. M. (2005). *Farm animal behaviour and welfare*, p. 109, 131, 231-233.
- ILLMAN, G., SPINKA, M. (1993). Maternal behaviour of dairy heifers and suckling of their newborn calves in group housing. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 36, 91-98.
- METZ, J., METZ, J. H. M. (1987). Behavioural phenomena related to normal and difficult deliveries in dairy cows. *Netherlands Journal of Agricultural Science* 35, 87-101.
- RUSHEN, J. et al. (2008). *The Welfare of Cattle*, 5. vyd. Netherlands, Springer, p. 70-111.
- UHRINČAŤ, M. et al. (2000). Vplyv rôzneho spôsobu odchovu na správanie dojníc po otelení. Správa za účelovú úlohu, VÚŽV Nitra.

Kontaktní adresa: Vendula Vomočilová, Mgr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H13020@vfu.cz

SEKCE 6

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

Assessment of the hygienic quality of canned fish from the perspective of mercury

Král Tomáš, Blahová Jana, Sedláčková Lenka, Svobodová Zdeňka

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

This study focused on the total mercury content in the muscle of canned fish (tuna, sardine, herring, mackerel and sprat). A total of 66 canned fish was analysed. Canned fish were bought in superstore in the Czech Republic in 2014. Total mercury was determined by atomic absorption spectrophotometry using an AMA 245 analyser. The highest concentration of total mercury was found in muscle of tuna (0.65420 mg/kg), whereas the lowest concentration of mercury (0.0056 mg/kg) was found in muscle of sardine. The results are used as an indicator of hygienic quality of fish and fish products.

Keywords: *tuna; canned fish,; sea*

Introduction

Fish are considered the most appropriate indicators of heavy metals in aquatic systems (Yilmaz, 2006). Metals (mercury) entered to the aquatic system by human activities or may occur naturally in the environment (Dltri, 1991). Fish concentrate amounts of metals from the water (Mansour a Sidky, 2002). The degree of mercury accumulation in fish tissues is dependent on the concentration of this element in the environment, especially in bottom sediments, on the physico - chemical and biological characteristics of water, on the species, age, weight of fish and other factors (Janoušková and Svehla, 2002). The most toxic forms of mercury are organic compounds, especially methylmercury (Kružíková et al., 2008). Methylmercury produces neurologic or renal damage (Pichichero et al., 2002) and has a long biological half-life (Berlin, 1990), It can also cross the blood-brain barrier (Pichichero et al., 2002). The main way of mercury exposure of humans is consumption of fish (Sarmani and Alakili, 2004). Commission Regulation (EC) 1881/2006 entered in force in 2006, this Regulation established maximum limits of certain contaminants in foodstuffs. In case that those maximum values of the mercury contained in fish muscle exceed the limit, the consumption of these fish poses a health risk for humans. The maximum hygienic limit was determined to be 0.5 mg/kg for freshwater fish except pike, eel and sturgeon, which have, together with marine fish and fishery products, the maximum hygienic limit 1 mg/kg.

Materials and Methods

The amount of mercury (THg) in fish muscle from canned fish was determined by cold vapour atomic absorption spectrometry on AMA 254 (Altec Ltd., Czech Republic) where mercury was determined without sample pre-treatment.

The limit of detection was set as a sum of triple the standard deviation of a blank and a blank mean value. Detection limit for THg determination methods was 1 mg/kg. Accuracy of the results of THg was validated using standard reference material BCR-CRM 464 (Tuna Fish, IRMM, Belgium).

Results and Discussion

In this work samples of canned fish (tuna, herring, mackerel, sardines, sprat) were measured. Results of median mercury concentration are presented in Table 1. Among the samples there was detected a quite high variability, because the samples were statistically evaluated using non-parametric statistic test. The highest median concentrations of total mercury were found

in the samples of tuna and herring, and these values differed from the total mercury content, which was found in sprat.

The Figure 1 shows a trend that the total mercury content in fish increases with increasing size and weight of fish. also yCizdziel et al. (2002) indicate this fact in their study where they proved that the mercury concentration increases depending on the trophic level. Higher trophic level of fish means higher mercury levels in fish due to mercury bioaccumulation in the food chain. This statement is confirmed by (Fitzgerald et al., 2007; Ipolyi et al., 2004), who state that the mercury in the aquatic environment accumulates in the bodies of aquatic animals, especially fish.

Furthermore, they state that the size of the fish affects the level of mercury in fish. The linear increase is observed, which confirms the accumulation of mercury in the food chain. In this way, mercury may subsequently enter the food chain of humans, as well as animals (Sakai, 1995).

Table 1: Results of mercury content in samples of canned fish

	tuna	herring	mackerel	sardines	sprats
n	12	13	11	18	12
Mean (mg/kg)	0.16839	0.04959	0.03112	0.03739	0.01981
Median (mg/kg)	0.08830	0.05210	0.03280	0.02365	0.01905
Minimum (mg/kg)	0.02480	0.02050	0.00690	0.00560	0.00670
Maximum (mg/kg)	0.65420	0.09800	0.04810	0.15640	0.03840
Variation coefficient (%)	1.06930	0.46343	0.40835	0.95514	0.44630

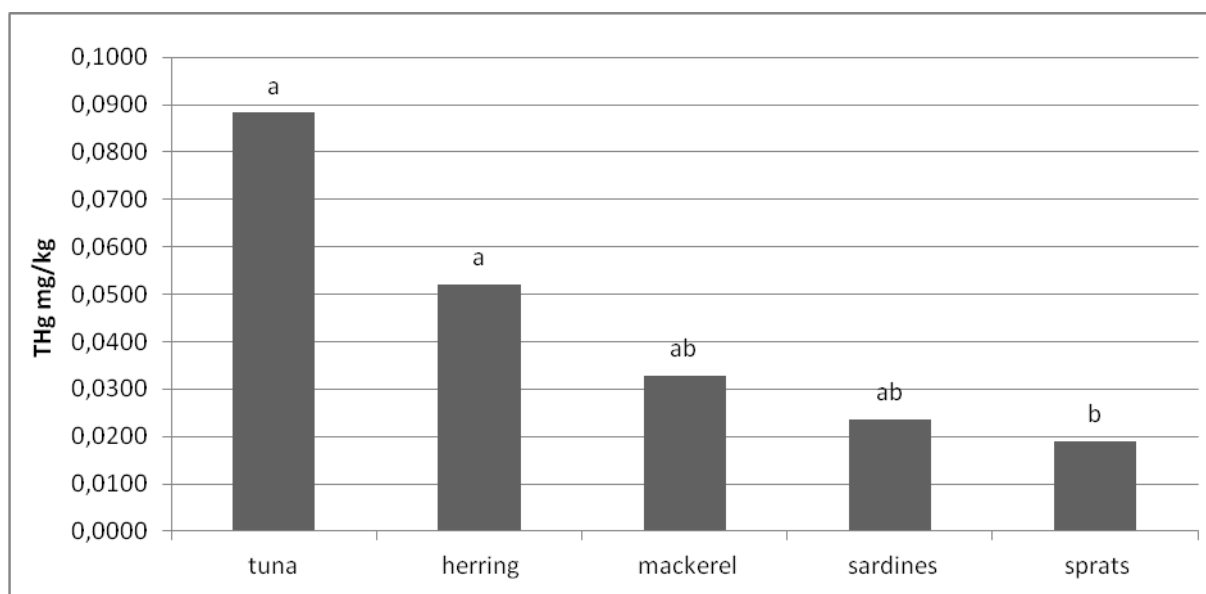


Figure 1: Results of median concentration of THg in fish. Significant differences are indicated by different alphabetic superscripts (P<0,05)

Conclusion

The hygienic limit of Commission Regulation (EC) 1881/2006 that entered in force in 2006 was not exceeded in fish samples. A highly significant difference between the total mercury content in tuna and sprat (P <0.01) and a significant difference between herring and sprat (P <0.05) were proved. We demonstrated the dependence of total mercury accumulation on the weight and body size of fish.

References

- CIZDZIEL, J. V., HINNERS, T. A., POLLARD, J.E., HEITHMAR, E. M., CROSS, C. L. Mercury concentrations in fish from Lake Mead, USA, related to fish size, condition, trophic level, location, and consumption risk. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 2002, vol. 43, no. 3., p. 309-317.
- FITZGERALD, W. F., ENGSTROM, D. R., MASON, R. P., NATER, E. A. The case for atmospheric mercury contamination in remote areas. *Environ. Sci. Technol.* 1998, vol. 32, no. 1, p. 1-7.
- IPOLYI, I., MASSANISSO, P., SPOSATO, S., FODOR, P., MORABITO, R. Concentration levels of total and methylmercury in mussel samples collected along the coasts of Sardinia Island (Italy). *Anal. Chim. Acta.* 2004, vol. 505, no. 1, p. 145-151.
- SAKAI, T., ITO, M., AOKI, H., AIMI, K., NITAYA, R. Hair mercury concentrations in cats and dogs in central Japan. *British Veterinary Journal.* 1995, vol. 151, no. 2, p. 215-219.
- YILMAZ, F. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediment, aquatic plants and tissues of *Cyprinus carpio* from Kizilirmak, Turkey. *Fresenius Environ. Bull.* 2006, vol. 15, no. 5, p. 360-369.
- DITRI, F. M. Mercury contamination – what we have learned since minamata. *Environ. Monit. Assess.* 1991, vol. 19, no. 1-3, p. 165-182.
- MANSOUR, S. A., SIDKY, M. M. Ecotoxicological studies. 3. Heavy metals contaminating water and fish from Fayoum Governorate, Egypt. *Food Chem.* 2002, vol. 78, no. 1, p. 15-22.
- JANOŤKOVÁ D., ŠVEHLA J. Mercury concentrations in fish tissues in the water reservoir Římov, South Bohemia. *Series for Crop Sciences.* 2002, vol. 19, p. 43-48.
- KRUŤÍKOVÁ, K., RANDÁK, T., KENŠOVÁ, R., KROUPOVÁ, H., LEONTOVYČOVÁ, D., SVOBODOVÁ, Z. Mercury and methylmercury concentrations in muscle tissue of fish caught in major rivers of the Czech Republic. *Acta Vet Brno.* 2008, vol. 77, no. 4, p. 637-643.
- PICHICHERO, M. E., CERNICHIARI, E., LOPREIATO, J., TREANOR J. Mercury concentrations and metabolism in infants receiving vaccines containing thiomersal: a descriptive study. *LANCET.* 2002, vol. 360, no. 9347, p. 1737-1741.
- SARMANI, S. B., ALAKILI, I. Determination of total mercury and methylmercury in hair samples from residents of Kuala Lumpur, Malaysia by neutron activation analysis. *J. Radioanal. Nucl. Chem.* 2004, vol. 259, no. 2, p. 261-264.

Contact address: Tomáš Král, Mgr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H12024@vfu.cz

Stanovení antikoagulačních rodenticidů dvourozměrnou kapalinovou chromatografií

Determination of anticoagulant rodenticides by column switching liquid chromatography

Doubková Veronika, Maršálek Petr, Modrá Helena

Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, Fakulta Veterinární Hygieny a Ekologie, Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno, Česká Republika

Summary

It was developed a new method for determination of 10 anticoagulant rodenticides (coumafuril, warfarin, pindone, coumatetralyl, coumachlor, difenacoum, bromadiolone, brodifacoum, chlorophacinone and flocoumafen) in tissue samples. This method is very fast and sensitive. The sample preparation composes the double extraction with methanol. The analytical method exploits on-line SPE extraction with column switching and detection by tandem mass spectroscopy with electrospray ionization (LC/LC-ESI-MS/MS). For SPE extraction was used C-18 trapping column (Optimize Technologie EXP trap C-18) and as mobile phase was used 0,1% formic acid with water, methanol and acetonitrile. The separation column was C-18 Thermo Hypersil and mobile phase was 5mM buffer prepared from ammonium formate (pH=9) and methanol. Extraction recovery and process efficiency were 84 – 105% for tissue. Linear response was observed for all ten rodenticides. Correlation coefficient was more than 0,999. The limits of detection were from 0,001 to 0,028 ng.g⁻¹ and the limits of quantification were from 0,003 to 0,092 ng.g⁻¹.

Keywords: anticoagulant rodenticides; liquid chromatography; on-line SPE

Úvod

Antikoagulační rodenticidy jsou látky patřící mezi pesticidy, používající se k hubení hlodavců, kteří svým výskytem škodí v domácnostech, potravinářském průmyslu a zemědělství (Modra 2009, Pelferen 2001). Pro stanovení antikoagulačních rodenticidů se využívají mnohé metody jako například plynová chromatografie v kombinaci s hmotnostním spektrometrem (Maurer et Arth, 1998), chromatografie na tenké vrstvě (Tosti et al., 2009) nebo voltametrie (Beklová et al., 2007). Nejvíce používanou metodou je však vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) v kombinacemi s různými detektory (Hao et al., 2014). V této práci byla použita vysokoúčinná kapalinová chromatografie, jejíž součástí byla zároveň on-line SPE extrakce v kombinaci s ionizací elektrosprejem a tandemovou hmotnostní spektrometrií.

Materiál a metodika

Standardy a rozpouštědla

Standardy antikoagulačních rodenticidů, amoniak, mravenčan amonný a kyselina mravenčí byly získány od firmy Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Metanol a acetonitril byly v čistotě pro LC/MS (Chromservis, sro, CZ). Deionizovaná voda byla získána z Milli-Q zařízení (Millipore, Bedford, MA). Standardní zásobní roztoky (200 ug.ml⁻¹) jednotlivých antikoagulačních rodenticidů byly připraveny přesným vážením a rozpuštěním v metanolu. Pracovní roztoky (1 ug.ml⁻¹) jednotlivých rodenticidů, používaných pro optimalizaci hmotnostního spektrometru byly připraveny zředěním ve směsi metanolu a 5 mM pufru mravenčanu amonného (pH=9), (50/50; v/v).

Příprava vzorků

Vzorek tkáně (0,5 g) byl navážen do 10 ml skleněné zkumavky, ke tkáni byly přidány 3 ml metanolu. Vzorek byl homogenizován po dobu 5 minut a následně dán na 15 minut do centrifugy při $800\times g$ a teplotě 20 °C. Extrakt byl převeden do 10 ml skleněné zkumavky. Ve vzorku tkáně byly přidány další 2 ml metanolu a extrakce byla provedena stejným způsobem. Nový extrakt byl převeden do zkumavky k předchozímu extraktu. Smíchané extrakty byly následně filtrovány přes 0,45 μm celulosový filtr (Millipore, Billerica, MA), zředěn vodou (40/60; v/v) a následně použit pro analýzu for LC/LC–ESI–MS/MS.

Chromatografický systém

Chromatografický systém se sestával z následujících součástí: Pumpa 1 byla kvartérní chromatografická pumpa Thermo Scientific UHPLC Accela 1250 (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA), Pumpa 2 byla kvartérní chromatografická pumpa Thermo Scientific HPLC Accela 650, Autosampler byl CTC PAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland) vybaven 500 μl injekční stříkačkou, 6-ti cestným nástřikovým ventilem s 250 μl smyčkou a 6-ti cestným přepínacím ventilem. Hmotnostní spektrometr byl Thermo Scientific TSQ Quantum Access MAX Triple Quadrupole Instrument (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) vybavený 6-ti cestným ventilem a ionizací elektrosprejem (HESI-II). Kapalinový chromatograf, stejně jako hmotnostní spektrometr byl řízen softwarem Thermo Scientific Xcalibur 2.0.

Chromatografický postup

Extrakt vzorku (100 μl) byl injektován do izokratického toku mobilní fáze voda/metanol (70/30; v/v) při průtokové rychlosti 600 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$. Analyty byly zachyceny na záchytné koloně (Optimize Technologies; Oregon City, OR, USA), zatímco polární látky kolonou prošly do odpadu. Pomocí gradientového toku mobilní fáze o rychlosti 300 $\mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$ byly pak analyty z kolony vyeluovány na analytickou kolonu (Thermo Scientific Hypersil C-18; 2.1 mm \times 100 mm, 1.9 μm), kde byly separovány a následně eluovány do hmotnostního spektrometru. Binární gradient byl tvořen směsí 5 mM pufr mravenčan amonný (pH=9)/metanol. Celý proces měl délku trvání 8 minut a probíhal při teplotě 23 °C.

Výsledky a diskuse

Hmotnostní spektrometrie

Fragmentace a ionizace byly provedeny u všech 10 antikoagulačních rodenticidů v pozitivním i v negativním módu ESI. ESI hmotností spektra byla stanovena pomocí režimu full scan na 1. kvadrupólu dávkováním standardního roztoku (1 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$, 5 μl) do proudu mobilní fáze. Většina antikoagulačních rodenticidů vykazovala dobrou citlivost v pozitivním i v negativním režimu ESI. Stejného postupu se využilo i při nalezení fragmentů mateřského iontu. Přestože byla citlivost ve většině případů vyšší v pozitivním módu, jako vhodnější byl pro některé rodenticidy (coumachlor, coumafuryl, coumatetralyl, and warfarin) zvolen negativní mód ESI a to z důvodu nižšího šumu a menší iontové suprese.

Chromatografická separace

V případě vývoje on-line SPE extrakce i separace na analytické koloně jsme zvolili variantu chromatografie na reverzní fázi s využitím kolon se stacionární fází C-18. Při optimalizaci podmínek na záchytné koloně (on-line SPE extrakce), jsme hledali optimální podmínky, které povedou k zachycení stanovovaných analytů a zároveň umožní projít interferujícím polárními látkám. U separace na analytické koloně jsme hledali podmínky, které zajistí optimální separaci píků a jejich dostatečnou ostrost. Výsledný chromatografický program zajišťuje

provedení on-line extrakce, díky níž jsme dosáhli nevýznamných matričních vlivů na ionizaci analytů a zároveň jejich dobrou separaci.

Příprava vzorků

Pro přípravu vzorku jsme se snažili zavést metodu extrakce, která by byla rychlá a co nejjednodušší na provedení. Testovali jsme různá extrakční činidla, a nakonec jsme zvolili za metanol, zejména z důvodů kompatibility se složením mobilní fáze. U něj jsme dále testovali vhodný poměr množství vzorku k objemu metanolu. Výsledná příprava vzorku pak obsahuje dvě po sobě jdoucí extrakce metanolem s minimálním počtem ředění.

Účinnost metody, linearita, mez detekce, mez stanovitelnosti

Výtěžnost analytů a účinnost metody se pohybovala v rozmezí 89-100% pro játra a 84-105% pro ledviny. Byla pozorována linearita u všech deseti rodenticidů, pro jednotlivé testované koncentrace v rozmezí (0,1 - 500 ng.g⁻¹). Korelační koeficienty byly větší než 0,999. Meze detekce (LOD) byly v rozmezí 0,001 - 0,028 ng.g⁻¹ a meze stanovitelnosti byly od 0,003 do 0,092 ng.g⁻¹.

Závěr

Naším cílem bylo vyvinout jednoduchou a rychlou metodu stanovení antikoagulačních rodenticidů s dvourozměrnou chromatografií. Tato metoda vykazuje vysokou citlivost a přesnost a jednoduchou a rychlou přípravou vzorků.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 29/2012/FVHE Veterinární a Farmaceutické univerzity Brno.

Literatura

BEKLOVÁ M., KRÍŽKOVÁ S., ŠUPÁLKOVÁ V., MIKELOVÁ R., ADAM V., PIKULA J., KIZEK R.. Determination of bromadiolone in pheasants and foxes by differential pulse voltammetry. *Int J Environ Anal Chem*, 2007, vol. 87, no. 6, s. 459-469.

HAO Y., DONG X.F., LIANG S.X., SUN H.W. . Analysis of four anticoagulants rodenticides in foodstuff and body fluids by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detector. *Analytical Methods*. 2014, vol. 6, no. 7, s. 2356-2362.

LANGFORD K.H., REID M., THOMAS K.V.. The occurrence of second generation anticoagulant rodenticides in non-target raptor species in Norway. *Science of the Total Environment*. 2013, vol. 450, s. 205-208.

MAURER H.H., ARLT J.W.. Detection of 4-hydroxycoumarin anticoagulants and their metabolites in urine as part of a systematic toxicological analysis procedure for acidic drugs and poisons by gas chromatography mass spectrometry after extractive methylation. *J Chromatogr B*. 1998, vol. 714, no. 2, s.181-195.

PELFRENE A.F.. Rodenticides, *Handbook of Pesticide Toxicology*. 2001, Krieger R, Academic Press, San Diego, s. 1793 – 1836.

TOSTI T., RAKIC G., NATIC M., MILOJKOVIC-OPSENICA D., HUSINEC S., SAVIC V., TESIC Z..TLC Retention Behavior of Brodifacoum, Bromadiolone, and Coumatetralyl and their Impurities on Different Adsorbents. *JPC-J Planar Chromatogr-Mod TLC*. 2009, vol. 22, no. 5, s.333-343.

Kontaktní adresa: Veronika Doubková, Mgr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13022@vfu.cz

Vliv T-2 toxinu na vznik oxidačního stresu a hematologické a biochemické ukazatele u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

The effect of T-2 toxin on oxidative stress origin and haematological and biochemical indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Vakula Josef, Modrá Helena, Hostovský Martin, Blahová Jana, Šišperová Eliška

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The aim of the study was determination of effects of T-2 toxin containing feed on rainbow trout organism after subchronic 28-day exposure. Two concentrations of T-2 toxin: 1,0 and 1,8 mg.kg⁻¹ were tested. T-2 toxin affected parameters of oxidative stress (glutathion-S-transferase - GST, catalase - CAT, glutathion reductase - GR, glutathion peroxidase - GPx and marker of lipid peroxidation – TBARS) in fish tissues at both tested concentrations. We found decrease of total protein (TP) and albumin and changes in triacylglycerols content and ALP activity in plasma. T-2 toxin had increased erythrocyte content and decreased haemoglobin concentration. These results show that trout are extreme sensitive to T-2 toxin in feed.

Keywords: trichothecenes; mycotoxin; antioxidant enzymes; proteosynthesis; red blood cells

Úvod

T-2 toxin je trichotecenový mykotoxin, produkovaný mikroskopickými houbami rodu *Fusarium*. Mnohé studie dokazují, že T-2 toxin je toxický pro lidi a zvířata zejména je zmiňován jeho toxický dopad na reprodukci, neurotoxicitu, hematotoxicitu a imunotoxický vliv. Mnozí autoři popisují vliv T-2 toxinu také na hematologické a histopatologické změny, konverzi živin a váhový přírůstek u ryb (Manning a kol., 2003).

Materiál a metody

Celkový počet 95 ks pstruhů duhových (260 ± 30 g) byl rozdělen do 6 nádrží o objemu 1m³. Kontrolní skupina (n=19), první experimentální (n=36) a druhá experimentální (n=40) byly testovány duplicitně. Test probíhal v recirkulačním systému s fotoperiodou 12h světlo/12 h tma. V průběhu testu byly ryby krmeny dvakrát denně dietou o celkovém množství 1% hmotnosti obsádky. Kontrolní skupina dostávala krmivo bez přítomnosti T-2 toxinu, experimentální skupiny přijímaly krmivo koncentracemi 1,0 a 1,8 mg.kg⁻¹ T-2 toxinu. Po ukončení testu (za 28 dní) byly rybám odebrány vzorky krve a tkání na histologické, biochemické vyšetření a na vyšetření markerů oxidačního stresu (GPx, GR, TBARS, CAT) a aktivitu detoxikačního enzymu (GST). U ryb byl stanoven hepatosomatický index (HSI) a kondiční faktor (CF). Analýza mykotoxinů v krmivu se prováděla metodou kapalinové chromatografie.

Statistická analýza získaných dat byla provedena pomocí programu Unistat 5.6 for Excel.

Výsledky

Výsledky hematologického stanovení jsou uvedeny v tabulce č. 1, výsledky biochemického vyšetření v tabulce č. 2 a ukazatele oxidačního stresu v tabulkách č. 3 a 4. Data jsou uvedena jako průměr ± směrodatná odchylka. Vysoce signifikantní rozdíly (p < 0.01) mezi různými testovanými skupinami jsou značeny rozdílnými písmeny abecedy.

Při histologickém vyšetření nebyly zaznamenány rozdíly mezi kontrolou a testovanými rybami.

Tabulka 1: Hematologické ukazatele u pstruha duhového po 28-dnech testu

ukazatel	kontrola	T-2 toxin 1,0 mg.kg ⁻¹	T-2 toxin 1,8 mg.kg ⁻¹
počet erytrocytů[10 ¹² l ⁻¹]	1,30 ± 0,19 ^a	1,76 ± 0,28 ^b	1,90 ± 0,41 ^b
hemoglobin [g.l ⁻¹]	85,75 ± 6,21 ^a	80,66 ± 7,52 ^a	65,14 ± 11,95 ^b
hematokrit [l.l ⁻¹]	0,31 ± 0,04 ^a	0,27 ± 0,05 ^b	0,27 ± 0,07 ^b
MCH [p.g ⁻¹]	66,10 ± 11,56 ^a	47,21 ± 9,28 ^b	35,35 ± 7,69 ^b
MCV [fl]	247,46 ± 52,93 ^a	159,51 ± 39,24 ^b	154,95 ± 58,68 ^b
MCHC [l.l ⁻¹]	0,27 ± 0,04 ^a	0,29 ± 0,04 ^a	0,25 ± 0,07 ^b

Tabulka 2: Výsledky biochemického vyšetření (alkalická fosfatáza – ALP, albumin – ALB; celková bílkovina - TP, triacylglyceroly – TAG) po 28-dnech testu

Ukazatel	jednotka	koncentrace T-2 toxin mg.kg ⁻¹		
		kontrola	1.0	1.8
TP	g.l ⁻¹	40,90 ± 1,14 ^a	40,29 ± 0,66 ^b	36,74±0,85 ^b
ALB	g.l ⁻¹	21,08 ± 0,73 ^a	19,38 ± 0,44 ^a	17,53±0,55 ^b
TAG	mmol.l ⁻¹	1,59 ± 0,13 ^a	2,20 ± 0,14 ^b	1,49±0,10 ^a
amoniak	μmol.l ⁻¹	390,89 ± 21,15 ^a	383,16 ± 23,29 ^a	294,09±13,13 ^b
ALP	μkatal.l ⁻¹	1,23 ± 0,15 ^a	1,80 ± 0,14 ^b	1,52 ± 0,14 ^b

Tabulka 3: Aktivity antioxidantních enzymů: kataláza (CAT, U.mg⁻¹ protein), glutathion reduktáza (GR, mU.mg⁻¹ protein), glutathion peroxidáza (GPx, mU.mg⁻¹ protein), glutathione S-transferáza (GST, mU.mg⁻¹ protein) a lipid peroxidázy (TBARS, nmol.g⁻¹ ww⁻¹) v játrech a kaudální ledvině pstruha duhového po 28-dnech testu

	játra			ledviny		
	kontrola	1,0 mg.kg ⁻¹	1,8 mg.kg ⁻¹	kontrola	1,0 mg.kg ⁻¹	1,8 mg.kg ⁻¹
CAT	433,57 ± 28,40 ^a	345,64 ± 15,74 ^b	316,84 ± 16,69 ^b	26,60±1,13 ^a	27,16 ± 0,86 ^{bc}	25,62±0,90 ^{ac}
GR	11,0 ± 0,53 ^a	12,14 ± 0,53 ^b	11,86 ± 0,57 ^b	43,40 ± 1,63 ^a	43,02 ± 1,09 ^a	44,09±0,89 ^a
GPx	26,57 ± 1,68 ^a	28,84 ± 1,04 ^b	27,49 ± 0,81 ^b	50,22 ± 1,80 ^a	55,47 ± 1,11 ^{bc}	54,45±1,25 ^{ac}
GST	467,65 ± 28,46 ^a	479,62 ± 21,67 ^b	500,93 ± 22,52 ^b	196,22 ± 9,63 ^a	203,60 ± 5,08 ^b	214,52±9,45 ^b
TBARS	28,77 ± 5,35 ^a	26,61 ± 1,56 ^a	36,92 ± 2,34 ^b	7,56 ± 0,38 ^a	7,76 ± 0,58 ^a	7,12±0,45 ^a

Tabulka 4: Aktivita ceruloplasminu a schopnost plazmy redukovat železo (FRAP) u pstruha duhového po 28-denní expozici dvěma koncentracím T-2 toxinu 1 mg.kg⁻¹ (n=36) a 18 mg.kg⁻¹ (n=40) a v kontrolní skupině (n=19)

Parametr	jednotka	kontrola	1 mg.kg ⁻¹	1,8 mg.kg ⁻¹
Ceruloplasmin	A/min	14,10 ± 6,84 ^a	157,47 ± 7,61 ^b	157,58 ± 7,76 ^b
FRAP	μmol.L ⁻¹	859,51 ± 28,26 ^a	879,81 ± 21,47 ^a	740,20 ± 16,38 ^b

Diskuze

Signifikantní zvýšení ($p < 0,01$) počtu erytrocytů u obou testovaných koncentrací ve srovnání s kontrolou svědčí o zvýšené erythropoeze a tím i o zvýšení jejich funkce tj. transportu dýchacích plynů ve stresové situaci, vyvolané expozicí mykotoxinu. Zvýšený počet erytrocytů a nízký hemoglobin souvisí se statisticky signifikantním poklesem ($P < 0,01$) v hodnotách MCH, MCV, a MCHC pozorovaným v obou testovaných skupinách. Snížení hodnot MCV svědčí pro kvalitativní narušení erythropoezy. Z markerů oxidačního stresu byl pozorován pokles aktivity CAT v ledvinách, což je důsledkem dlouhodobého negativního působení T-2 toxinu na produkci CAT. Dále došlo v ledvinách ke zvýšení aktivity GPx při koncentraci 1 mg.kg⁻¹ a zvýšení GST v obou koncentracích. V játrech se zvýšila aktivita GPx, GR a GST u obou testovacích skupin. V játrech došlo k významnějším změnám oproti ledvinám. Zvýšená lipoperoxidace resp. TBARS byla zaznamenána v játrech při koncentraci T-2 toxinu 1,8 mg.kg⁻¹. Naopak žádné změny tohoto charakteru nebyly pozorovány v ledvinách, což vypovídá o tom, že cílovým orgánem působení T-2 toxinu jsou játra a trávicí trakt (Wu a kol., 2014). Rovněž hodnota aktivity ceruloplasminu v plazmě vzrostla u obou experimentálních skupin ve srovnání s kontrolou, což je typické pro působení polutantů (pesticidy, kovy, PCB) ve vodě u různých druhů ryb (Dunier a kol., 1994; Dautremepuits a kol., 2009). Podobně jako Dabrowski a kol. (2004) jsme zaznamenali pokles v hodnotách FRAP, což dokazuje úplné vyčerpání antioxidační kapacity plazmy pstruhů při koncentraci 1,8 mg.kg⁻¹. T-toxin jako silný inhibitor proteosyntézy způsobil statisticky signifikantní pokles celkové bílkoviny a albuminu v plazmě v obou testovaných skupinách.

Závěr

Naše studie potvrdila, že pstruh duhový je citlivý k působení T2-toxinu v krmivu. Testované koncentrace 1,0 mg.kg⁻¹ a 1,8 mg.kg⁻¹ vyvolaly oxidační stres, který se projevil zvýšením aktivity GST v játrech a zadní ledvině, zvýšením lipoperoxidace v játrech, zvýšením aktivity ceruloplasminu v plazmě a poklesem FRAP. Navíc došlo k narušení biochemických a hematologických parametrů.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 31/2014/FVHE, CZ.1.07/2.3.00/30.0053.

Literatura

- Dautremepuits C, Marcogliese DJ, Gendron AD, Fournier M. Gill and head kidney antioxidant processes and innate immune system responses of yellow perch (*Perca flavescens*) exposed to different contaminants in the St. Lawrence River, Canada. *Sci. Total. Environ.* 2009, **407**, 1055–1064.
- Dabrowski K, Lee KJ, Guz L, Verlhac V, Gabadaun J. Effects of dietary ascorbic acid on oxygen stress (hypoxia or hyperoxia), growth and tissue vitamin concentrations in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*. 2004, **233**, 382–392.
- Dunier M, Siwicki AK, Scholtens J, Molin SD, Vergnet C, Studnicka M. Effects of lindan exposure on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) immunity; III. Effect on nonspecific immunity and B lymphocyte functions. *Ecotox. Environ. Safe.* 1994, **27**, 324–334.
- Manning BB, Li MH, Robinson EH, Gaunt PS, Camus AC, Rottinghaus GE. Response of channel catfish to diets containing T-2 toxin. *J. Aquat. Anim. Health.* 2003, **15**, 229–238.
- Wu QH, Wang X, Yang W, Nüssler AK, Xiong LY, Kuča K, Dohnal V, Zhang XJ, Yuan ZH. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. *Arch. Toxicol.* 2014, **88**, 1309–1326.

Kontaktní adresa: Josef Vakula, Ing., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1-3, 612 42 Brno, H13021@vfu.cz

Effect of the T-2 toxin on the immune responses of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*

^{1,2}Matejova Iveta, ³Palikova Miroslava, ²Faldyna Martin, ¹Modra Helena,
¹Svobodova Zdenka

¹ Department of Veterinary Public Health and Welfare, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, Brno 612 42, Czech Republic

² Department of Immunology, Veterinary Research Institute, Hudcova 70, Brno 621 00, Czech Republic

³ Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho tr. 1/3, Brno 612 42, Czech Republic

Summary

The aim of this study was to determine the effects of diet containing mycotoxin T-2 toxin on immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish were divided into three groups, control (n = 20) and two experimental groups receiving diets containing 1 ppm/kg of T-2 toxin (n = 20) and 2 ppm/kg of T-2 toxin (n = 20). Fish in control group were fed commercial diet, fish in experimental groups were fed commercial feed with artificially added T-2 toxin. The experiment lasted 28 days. Feeding a diet with addition of T-2 toxin showed significant effect as indicated by changes in white blood cell count and complement activity in fish exposed to two different T-2 toxin concentrations. The present data show that prolonged ingestion of feed contaminated with T-2 toxin may influence the immune responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Keywords: T-2 toxin; immune response; white blood cell; complement

Introduction

T-2 toxin is a fungal metabolite produced by various *Fusarium species* (*F. sporotrichioides*, *F. langsethiae*, *F. acuminatum*, and *F. poae*). These fungi infect grains such as maize, wheat and oats. Over the past decade, reduced availability of fish meal has led to increasing use of cereal grains, especially wheat, as a source of protein in commercial aquaculture feeds. Feed formulations for rainbow trout range from 15 to 27% wheat. For herbivorous species such as cyprinids, the amount of wheat is higher, from 20 to 70% (Pietsch et al., 2013).

T-2 toxin is known as the most potent myelotoxin and haematotoxin (Yuan et al., 2014). Mechanism of T-2 toxin action is inhibition of protein synthesis which is apparent particularly in cells with high rate of turnover, such as the cells of bone marrow and the epithelial cells of the digestive tract (Wu et al., 2011).

Material and Methods

The study was carried out with 60 clinically healthy rainbow trout obtained from a commercial fish farm. Fish were randomly assigned to aerated tanks with recirculation system and maintained under a 12:12 L:D photoperiod. The aquaria were cleaned daily by siphoning off the faeces and debris.

Rainbow trout were acclimatized to laboratory conditions for 14 days, during which time they were fed a commercial rainbow trout diet (BioMar, Denmark) twice daily at 1% of body mass. After the adaptation period, trout were randomly divided into control (n = 20) and experimental (n = 20) groups and fed their respective diet twice daily.

Blood samples for detection of complement activity, concentration of IgM and leukocyte count were taken from each fish by caudal venipuncture and stabilized with sodium heparin (50 IU per 1 mL of blood). Trout were subsequently stunned with a blow to the head and killed by the spinal transection.

Results

Significant differences between control and experimental groups were observed in total leukocytes and lymphocytes count and in complement activity in fish after 28 day exposure to T-2 toxin. Total leukocytes (* $P < 0.05$) and lymphocytes (* $P < 0.01$) count increased markedly in group fed 2 ppm of T-2 toxin (Figure 1). The complement activity were significantly lower (* $P < 0.01$) in both treated groups compared to control (Figure 2). The differences in concentration of IgM in blood serum were not observed (Figure 3).

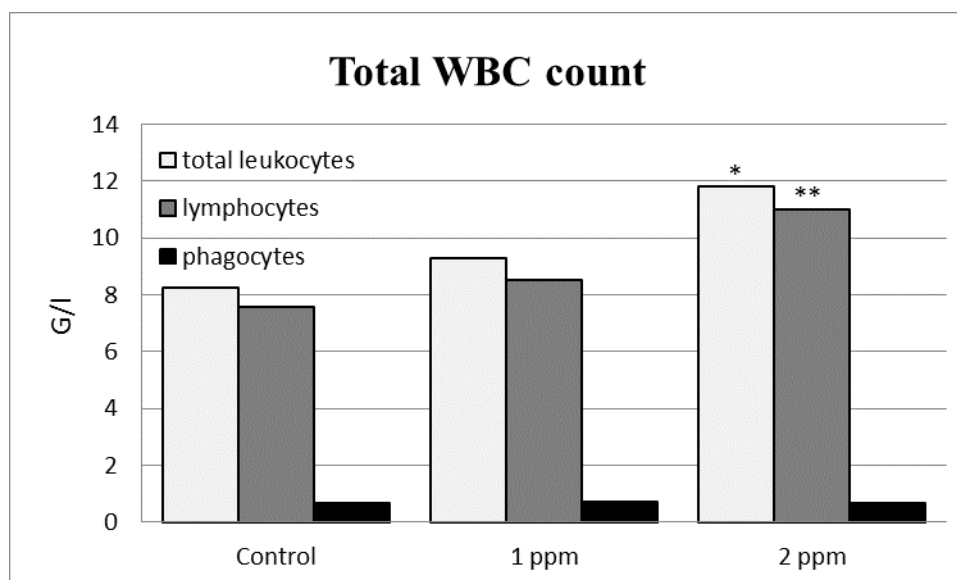


Figure 1. Leukocyte counts in rainbow trout affected by exposure to T-2 toxin. Significant difference between test groups (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

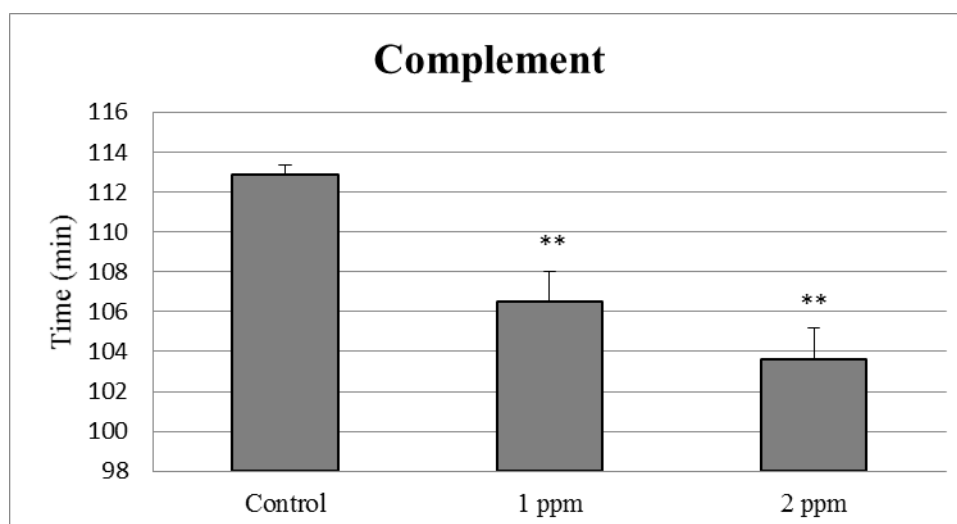


Figure 2. Complement activity in fish exposed to T-2 toxin. Significant difference between test groups (** $P < 0.01$)

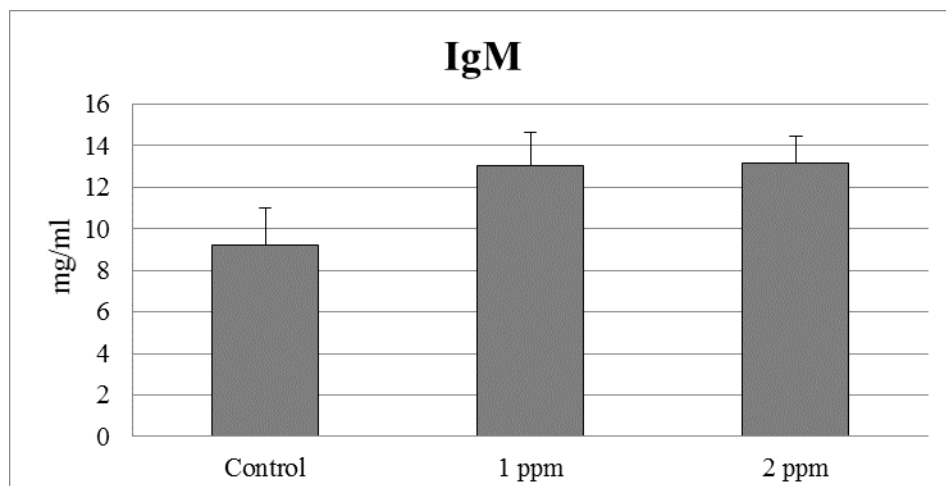


Figure 3. The serum immunoglobulin (IgM) concentration (mg/ml) in rainbow trout

During the experiment, the mortality of fish was not recorded in control and experimental groups.

Discussion

The immunological toxicity of T-2 toxin in fish has not been extensively studied before. Our 28 days study was focused on immunological parameters (total WBC count, complement activity, concentration of IgM in blood serum). The results indicate that exposure to T-2 toxin may influence the immune responses of rainbow trout.

Acknowledgements

This research was supported by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (project no. 31/2014/FVHE).

References

- WU, Q.; HUANG L.; LIU Z.; YAO M.; WANG Y.; DAI M.; YUAN Z. A comparison of hepatic *in vitro* metabolism of T-2 toxin in rats, pigs, chickens, and carp. *Xenobiotica*. 2011, vol. 41, no. 10, s. 863-873.
- PIETSCH, C.; KERSTEN, S.; BURKHARDT-HOLM, P.; VALENTA, H.; DÄNICKE, S. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: an initial study. *Toxins*. 2013, vol. 5, no. 1, s. 184-192.
- YUAN, G.; WANG, Y.; YUAN, X.; ZHANG, T.; ZHAO, J.; HUANG, L.; PENG, S. T-2 toxin induces developmental toxicity and apoptosis in zebrafish embryos. *Journal of Environmental Sciences*. 2014, vol. 26, no. 4, 2014, s. 917–925.

Contact address: Iveta Matejová, MVDr., Ústav veřejného veterinářství, ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H12026@vfu.cz

SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat
zoologických zahrad*

Parasitosis fish ponds aquaculture lowland areas and possibilities for treatment and prevention

Madžunkov Michal

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

Summary

*The occurrence of cestoda larvae in common carp in natural conditions is a relatively little explored area. The research includes the carp in the age of 1 – 4 years coming from the large pond system in Velké Blahovo, the district of Dunajská Streda, about the size of 72 ha water surface. Samples are taken continuously while monitoring the quantity and type of cestoda larvae of each individual. According to on going results the number of positive fish 43,32 %. Larval cestoda are represented by *Khawia sinensis*, *Caryophyllaeus fimbriceps* and *Atractolytocestus huronensis* species. The occurrence of cestoda in carp fry has not been confirmed yet. For the possibility of verification of treatment a 2-year age group is suitable. It is administered Praziquantel containing 1 -2 % in compound granules under test conditions. Damping the occurrence of endoparasites may contribute to the increase of efficiency of fish meat production and improve fish health.*

Keywords: *Khawia; Caryophyllaeus; Atractolytocestus; tapeworms*

Introduction

The occurrence of parasites in carp farming ponds is the which has not been explored adequately though it has breeding and economic impact on the production of Carp and other additional fish. It is important to know the species composition and abundance of parasites in natural conditions. For my research I have choose the ponds in Velké Blahovo. They belong to typical field ponds lying in the Danube Plain on the island of Žitný ostrov in the vicinity of Dunajská Streda. The Pond system consists of three main ponds of the average size of 20 ha and terrier area of 72 hectares. On the basis of the examination carp of fish stock and fry the results point at an annual incidence of the tapeworm *Khawia sinensis* (Scholz, Speta, Zajicek, 1990). The tapeworm *Atractolytocestus huronensis* (Anthony, 1958) originally found in carp *Cyprinus carpio* l. from North America was recently transferred to Europe (United Kingdom, Hungary).

The scattering of tapeworm was described in the countries of Central Europe, including its first observation in carp on the River Tisza in the South-Eastern Slovakia. Due to the location of the cross-border river where, is the ability to quickly spread of the parasite to other regions in the entire Danube basin. The parasite has also been found in pond carps of the ponds in southern Bohemia, where the carp is explored to many European countries. The rapid spread of this tapeworm in Europe indicates its ability to colonize new areas and represents another example of the artificial introduction of potential pathogens from carp and other fish from other carp farming ponds (Oros, Hanzelová, Scholz, 2004).

Material and Methods

The pond system Velké Blahovo is located in the South-West of Slovakia, only 4 km from Dunajská Streda at an altitude of 116 m n. m. For the research I used a fry, a stock and a market Carp. Fish were harvested from each of the three ponds. After measuring the fish and the basic indicators such as body length, and height of the body they were subsequently killed, and an autopsy has been performed. Cestoda present in the small intestine were removed and preserved. To fix them used 2% solution of formaldehyde.

For the illumination of the sample of tapeworms we used potassium acetate solution, glycerine and distilled water. In this solution, the samples were placed for 5 – 7 days.

Tapeworms samples have been identified by an identification key, and the bright light of the microscope Delta Optical genetic Pro with a digital camera. So far, 166 pieces of market carp K3 and K4, and 23 pieces of K1 have been processed. An Asian tapeworm *Khawia sinensis* reaches the length of up to 11.5 cm, parasitizes on the carp body (*Cyprinus carpio* l.) and can cause the mortality of carp fry. Since 1960s this tapeworm has successfully colonized a large part of Europe, including the British Isles, North America and Japan (Oros, Hanzelová, Scholz, 2009). The degree of infestation of the fish was characterized by (Margolis et al., 1982) on the following dates: prevalence (the percentage of the infected fish from fish in the sample reviewed), the medium intensity of infection (average number of parasites per infected fish) the minimum and maximum intensity of infection (the minimum and maximum number of parasites in the host).

Results and Discussion

Table 1: Number carps examined for the presence of tapeworms

Number of carps					Number of tapeworms	(Min - Max)average	
Date	Category	Examined	Infected	Prevalen			
29.9.2012	K3 - K4	30	12	40%	34	(1-4)	2
24.10.2012	K3 - K4	20	11	55%	58	(1-35)	9
27.3.2013	K3 - K4	15	5	33,30%	13	(1-4)	2
4.4.2014	K3 - K4	20	9	45%	24	(1-6)	3
09.11:2014	K3 - K4	55	20	36%	35	(1-4)	2
15.11.2014	K3 - K4	26	11	42%	15	(1-2)	1
4.4.2014	K1	23	0	-	-	-	-
Total		189	68	42%	179		3

From continual results the prevalence of in the category of the K3 and K4 has a value of 42% and the medium intensity of infection (3). The species composition is represented by *Caryophyllaeus fimbricempis*, *Khawia sinensis* and *Atracolytocestus huronensis*. The largest number of 89 pieces has been represented by, *Caryophyllaeus fimbricempis*, and has reached the length from 10 to 35 mm. *Khawia sinensis* in the number of 50 pieces reaches length from 40 to 92 mm and *Atracolytocestus* in the number of 40 pieces has the length from 6 to 13 mm. The incidence of tapeworm has been represented only by six pieces of *huronensis*. K3, and in one case up to 35 pieces. The Pathology in Hungarian carp from the fish farms of *Atracolytocestus huronensis*. These tapeworms we also found in carps, which have already passed on the benthos and in several one-year old carp. During the survey in 2002, fish of 14 ponds and 9 fish farms have been shown to be infected. The parasite was also detected several times in a market size of carp imported from the Czech Republic (Molnar et al. 2003). In the age categories of K1 the presence of tapeworms has not been confirmed yet. This is probably due to the food source and mainly to zooplankton and cereals.

Category K1 - K2 is composed of ingredients, including benthos. The contents of the intestine consisted of feed, mud and debris benthos, mainly *Chironomidae* larvae or corixids, plankton, preferably *Cladocera*, also in the autumn of *Copepoda*, pasty digests or plant residues other than food, which was located in a large proportion of checked fish. From mid-June to early November the predominance of planktonic crustaceans was observed. The residues of mud and benthos were found in the intestine of carp most often in the middle of July, in August and the end of September (Scholz, Speta, Zajicek, 1990). To reduce the tapeworm infections propose, to feed carp the stock Praziquantel together with fodder at feed sites and carry out disinfection by quicklime and hydrated lime connected to with the wintering of ponds. To

check the effect of Praziquantel the sample carp of stock will be treated in controlled conditions and the effect will be proved.

Based on our recent results, which are not definite yet it can be said that the incidence of tapeworms on fish farms is relatively high. It is certain that there is interspecific competition between cestoda. New species (*A. huronensis*) strongly compete with native species (*M. sinensis*, *C. fimbricemps*). To reduce the parasite is necessary to carry out preventive measures in the form of liming and wintering of ponds due to an intermediate host of tapeworms of the genus of *Tubifex* located in the active layer of mud. For the treatment it is necessary to give medicated feed, together with the active substance. Tapeworms are dangerous especially for the category K1 - K2 at a time of growing, at the strong invasion, it causes weakening, growth retardation and ultimately the failure of this age group especially in the spring at the time of weakened immunity and lightening.

Acknowledgement

I would like to thank my predecessor and teacher MVDr. Ing. Oldřich Švestka for knowledge and experience, which he gave me the field of fish farming and fish diseases, as well as, to my trainer Prof. MVDr. Stanislav Navrátilovi, PhD., who allowed me to study in the field that interests me and is my hobby. Last but not least to my employer SOS Ivanka pri Dunaji, which allowed me to do the research on our school ponds and to my colleague Ing. Jaroslav Šubjak for more than a ten year cooperation often in difficult conditions.

References

- Margolis, L., et al. (1982): The Use Of Ecological Terms In Parasitology. *J. Parasitol* 68(1), pp. 131 – 132.
- Molnár, K., Majoros, G., Csaba, G., Székely, C. (2003): Pathology of *Atractolytocestus huronensis* Anthony, 1958 (Cestoda, Caryophyllaeidae) in Hungarian pond-farmed common carp. *Acta Parasitologica* 48(3): 222–228.
- Oros, M., Hanzelová, V., Scholz, T. (2004): The cestode *Atractolytocestus huronensis* (Caryophyllidea) continues to spread in Europe: new data on the helminth parasite of the common carp. *Diseases of Aquatic Organisms* 62(1-2):115-9.
- Oros, M., Hanzelová, V., Scholz, T. (2009): Tapeworm *Khawia sinensis*: review of the introduction and subsequent decline of a pathogen of carp, *Cyprinus carpio*. *Vet Parasitol* 14;164(2-4):217-22.
- Scholz T., Speta, V., Zajicek, T. (1990): Life History of the Tapeworm *Khawia sinensis* Hm, 1935, a Carp Parasite in the Pond Dražský Skaličany near Blatná, Czechoslovakia. *Acta vet Brno* 59: 51-63.

Contact address: Michal Madžunkov, Ing., Ústav ekologie a chorob zvěř, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, dzunko@post.sk

Changes of hematological and immune parameters during proliferative kidney disease in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Marková Zdeňka, Palíková Miroslava, Papežiková Ivana, Vojtek Libor

¹Faculty of veterinary hygiene and ecology, Veterinary and pharmaceuticals sciences, Brno

²Department of Experimental Biology, Masaryk university, Brno

Summary

Proliferative kidney disease (PKD) is an endoparasitic disease of salmonids caused by the myxozoan parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa: Malacosporea). We have recently described the typical pathological and histological changes for PKD. Haematologically we found decreased numbers of red and white blood cells, low haematocrit values and low concentrations of haemoglobin in diseased fish. The complement value and mainly oxidative burst of phagocytes were significantly elevated. But fish examined one month later showed better health status and the haematological parameters tended to normal values.

Keywords: *Tetracapsuloides bryosalmonae*; haematological parameters; immune parameters

Introduction

Proliferative kidney disease (PKD) is caused by the myxozoan parasite *Tetracapsuloides bryosalmonae*. The main target organs are the kidneys, which are due to infection to increase enormously. Swollen kidneys have the appearance of marble with the presence of greyish bearings. There is a proliferation of interstitial renal tissue and the disappearance of renal tubules. Similar changes may also to be in the spleen. Most sensitive to this disease is the rainbow trout where in the participation of secondary infections mortality can reach up to 95% (Clifton-Hadley et al., 1984). *T. bryosalmonae* is a two-host parasite. Infective stages are released from bryozoans (Bryozoa) into the water where float and permeate into the salmonids through the skin and especially over the gills. For salmonids are described two phases of development: In the first phase, the infectious agent is transported in the blood to the internal organs, especially to the kidneys and spleen, which develops extrasporogonic stage causing massive infiltration and proliferation interstitium. The second stage starts after 2-3 weeks, when the agent migrates to renal tubular and there creates sporogenous stage. Spores are excreted in the urine. The presence sporogenic stages was experimentally demonstrated only at the common trout and rainbow trout, but backward infection bryozoans was successful only through common trout and brook trout (Grabner et El-Matbouli, 2008). PKD is characterized by significant seasonality associated with the water temperature. Clinical symptoms and increased mortality occurs at temperatures above 15 ° C. The most common occurrence is in one year old fish from July to October, which is associated with the release of infectious spores from bryozoans and also with proliferation of parasites at the host - fish. The resulting increase intensity of the infection can then lead to a temperature-dependent increase in mortality of fish (Bettge et al., 2009). After a previous infection, fish can be resist to reinfection (Foott and Hedrick, 1987). Smith-Posthaus et al. (2012) reported in trout ability to completely regenerate kidney tissue and eliminate most parasites. For identification of pathogens in their work presents the use of immunohistochemical staining histological preparations.

Materials and Methods

Based on the findings of health problems in salmonid there were five times removed fish showing signs of disease and healthy fish of different origin, but of the same age as the control fish. In total were examined 60 diseased fish and 45 healthy fish. Blood was drawn

from caudal vein after then fish were killed and examined for patho-anatomic changes. From all fish were taken samples of kidney, liver and spleen for histologic and immunologic examination. From the blood was determined total number of erythrocytes, hematocrit value, concentration of hemoglobin and calculated values: MCV, MCH a MCHC. Furthermore immunological parameters were determined: total number of leukocytes, differential count of leucocytes, total immunoglobulin concentration in the plasma, bacteriolytic complement activity in the fish plasma and oxidative burst of phagocytes. Index number of blood count, total and differential leukocyte counts were determined according to the methodology by Svobodová et al. (2012). Determination of IgM from fish plasma was performed by ELISA, bacteriolytic complement activity in the fish plasma, and intensity of phagocyte oxidative burst in fish blood were determined by chemiluminescence. As a phagocyte activator was used opsonized zymozan. Samples for histological examination were immediately fixed in 10% formaldehyde and then were processed by standard way. Cuts were dyed by hematoxylin-eosin and immunohistochemically using a monoclonal antibody MAb Aqua-P01 (Aquatic Diagnostics, Stirling, UK). Index trapping agent was calculated from 10 fields of vision at 400x augmentation. Temperatures of the water in a monitoring period were: t1 - 14°C, t2 - 12,5°C, t3 - 8°C, t4 - 4°C, t5 - 3°C.

Results and Discussion

In the first sampling the red blood count was characterized by very low red blood cell numbers, low hematocrit value and low hemoglobin, which is reflected in the calculation values. The large volume of erythrocytes indicated stress effects of pathogenic factors on the organism of fish. In this period there was increased mortality of fish. Fish indicated clinical symptoms such as apathy and loss of food intake. After pathological-anatomical investigation, we found 100% morbidity investigated fish in various extents of patho-anatomical changes. Fish showed increased body cavity, one or two-sided exophthalmos, petechial haemorrhages in the skin, fluid in the body cavity, anemia of gills and internal organs, the kidneys swollen especially in the caudal part, altered consistency and color of the kidney, usually enlarged spleen possibly with color change. Big changes were evident within the white blood cell counts. Infections caused a rapid decline in leukocyte and myeloid lineage, although ill fish continued to show lymphocyte character of the blood. Phagocytes were characterized by significantly higher levels of oxidative burst, which is particularly noticeable after conversion to a certain number, it was their ability to release oxygen radicals more than 15 x higher than the healthy fish. Complement activity and concentrations of total immunoglobulins in diseased fish reached of higher values. The results showed that the agent significantly stimulated the immune response of the organism as in cellular nonspecific immunity so in humoral specific and also humoral nonspecific immunity. PKD is known for stimulate the immune response. The intensity and type of the immune response can be affected by environment temperature (Bette et al., 2009). By histological and immunohistochemical analyses we detected the presence of the infectious agent of PKD *Tetracapsuloides bryosalmonae* in the kidney and spleen. The histology was characterized by different degrees of proliferation, in some individuals was present necrosis, haemorrhages and alteration of the tubular walls in the different extents. Also we found the districts with massive fibroproductive proliferation and new basophilic tubular formation, which indicate neotubulogenesis. In the second sampling mortality has declined. Patho-anatomic findings were favorable. Although haematology showed a statistically significant reduction of erythrocytes, leukocytes and hematocrit values, but it was already seeing a trend to normalization of this indicators. The increased phagocytic activity persisted. Chilmonczyk et al. (2002) described the suppression of congenital immune responses including of the phagocytosis and oxidative flare of renal phagocytes opposite the predominant negative IgM lymphocyte proliferation. We measured in

infected fish sharp increase in phagocytic activity. Equalization of the number of red blood count was faster than at white blood cell counts. Haemoglobin is settled already in the second sampling, the total number of erythrocytes in the third sampling. Total leukocyte counts equalized during the fourth sampling, which corresponded with the modification of the phagocytic activity, which in this collection reduced to the value of the control group.

Conclusion

Despite of significant changes in the blood count and patho-anatomical and histological findings, the fish were able to cope with infection. After month patho-anatomical changes were decreased and hematology examination indicates gradual changes of the parameters. From the perspective of the farming it is important that the fish also in connection with decreasing temperature stopped mortality and disappeared clinical symptoms. Fish are able to regenerate parenchyma and may even be resistant to reinfection.

Acknowledgements

The study was financially supported by the project of Ministry of Agriculture NAZV no. QJ1210013.

References

- BETTGE, K., SEGNER, H., BURKI, R., SCHMIDT-POSTHAUS, H., WAHLI, T. Proliferative kidney disease (PKD) of rainbow trout: temperature- and time-related changes of *Tetracapsuloides bryosalmonae* DNA in the kidney. *Parasitology*. 2009, vol. 136, p. 615-625.
- CLIFTON-HADLEY, R.S., BUCKE, D., RICHARDS, R.H. Proliferative kidney disease of salmonid fish: a review. *J Fish Dis*. 1984, vol. 4, p. 363-377.
- CHILMONCZYK, S., MONGE, D., DE KINKELIN, P. Proliferative kidney disease: Cellular aspects of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), response to parasitic infection. *J Fish Dis*. 2002, vol. 25, p. 217-226.
- FOOTT, J.S., HEDRICK, R.P. Seasonal occurrence of the infectious stage of proliferative kidney disease (PKD) and resistance of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, to reinfection. *J Fish Biol*. 1987, vol. 30, p. 477-483.
- GRABNER, D.S., EL-MATBOULI, M. (2008): Transmission of *Tetracapsuloides bryosalmonae* (Myxozoa:Malacosporea) to *Frederica sultana* (Bryozoa: Malacosporea) by various fish species. *Dis Aquat Org*. 2008, vol. 79, p. 133-139.
- SCHMIDT-POSTHAUS, H., BETTGE, K., FORSTER, U., SEGNER, H., WAHLI, T. Kidney pathology and parasite intensity in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* surviving proliferative kidney disease: time course and influence of temperature. *Dis Aquat Org*. 2012, vol. 97, p. 207-218.

Contact address: Zdeňka Marková, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, FVHE VFU Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, soukupova.zdenka@centrum.cz

Effect of the genetic origin on the presence of skeletal deformities and swimbladder anomaly in cultured gilthead seabream (*Sparus aurata* L)

¹Cutáková Zdeňka, ²García-Celdrán Marta, ²Armero Eva

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

²Department of Agricultural Science and Technology, Technical University of Cartagena, Spain

Summary

Lordosis, lack of operculum and failure to inflate the swimbladder constitute a major problem for the gilthead seabream aquaculture industry. In this study, the effect of the broodstocks origin on these major anomalies in juvenile seabream was analyzed. A population of farmed seabream ($n=909$) obtained by industrial mass-spawning from broodstock from three different origins and reared under common conditions was analyzed from X-ray photograph for skeletal deformities and for uninflated swimbladder. Lordosis and lack of operculum were the most common deformities. The origin had an effect on skeletal deformities as well as on uninflated swimbladder. Differences among origins could be partly explained through their different genetic background, but also environmental conditions in the initial facilities and genotype environment interaction should be considered. A posteriori reconstruction of pedigree was carried out using a microsatellites multiplex (SMsa1) to estimate genetic parameters for these traits. Considerable heritabilities were estimated for lordosis (0.53[0.25-0.77]), lack of operculum (0.37[0.01-0.81]) and uninflated swimbladder (0.36[0.12-0.72]) with a positive genetic correlation between uninflated swimbladder and lordosis (0.48[0.07-0.97]). All these findings should be relevant for the establishment of successful breeding programs in aquaculture of this species.

Keywords: heritability; genetic correlations; broodstock origin; lordosis; lack of operculum; Gilthead seabream

Introduction

The gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) is the most relevant marine species in Mediterranean aquaculture, which reached an annual production of 176 191 metric tons in 2012 (APROMAR 2013).

In gilthead seabream the most common deformities are those that affect the opercular complex, neurocranium and vertebral column (lordosis and vertebral fusion) (Boglione *et al.* 2001). Skeletal deformities might affect up to 30 % of the production and several factors are believed to be the basis of them: Nutritional, environmental, hydrodynamic conditions and genetic factors or their interaction (Castro *et al.* 2008).

Therefore, the goals of this research were: A) To study the effect of origin of the broodstocks on the major anomalies present in gilthead seabream: skeletal deformities (vertebral and cranial deformities) and uninflated swimbladder; B) To study the incidence of skeletal deformities along the vertebral column; C) To estimate genetic parameters (heritabilities and genetic correlations) for these anomalies.

Materials and Methods

Samples of seabream were captured from wild populations from three geographically differentiated origins; Cantabrian Sea (CAN), the Atlantic Ocean (ATL), and Mediterranean Sea (MED), hence from the Northern, Southern, and Western Spanish coasts respectively.

From these samples, three broodstocks were established. A random sample of 2500 descendants (845 from CAN, 777 from ATL and 878 from MED) was taken to the on-growing facilities of the Centro de Cultivos Marinos de la Región de Murcia and constituted the population under study. After an adaption period of 20-30 days, fry were individually

tagged in the abdominal cavity for individual identification with a Passive Integrated Transporter and then randomly distributed (one third of each origin) in 12 tank in an open circuit with intake water from the sea and reared under communal conditions. A random sample of about 300 juveniles from each origin was slaughtered by immersion in ice cold water (hypothermia).

Fish were radiographed using a medical X-ray system The X-ray photographs were used for the skeleton and SB examination. Vertebral deformities were identified and classified according to a deformities catalog (PROGENSA®).

PCR reaction, genotyping and parental assignments between breeders and their descendants were determined as described in Lee-Montero *et al.* (2013). A total of 225 full-sib families, 5 paternal half-sib families and 7 maternal half-sib families were represented.

Results

Frequencies of deformed fish, vertebral and cranial skeletal deformities, and uninflated SB are given in Table 1. The frequency of deformed fish was lower in fish from CAN in which a 23,4 % of examined individuals had at least one or more kinds of deformities while this frequency was almost 40 % for ATL and MED origins. Lordosis was the most common vertebral deformity, with frequencies around 20 % in two of the studied origins (ATL and MED), followed by vertebral shortening.

The incidence of uninflated SB was 78,9 % for lordotic fish and 27,9 % for normal fish. Regarding broodstock origin effect, fish from ATL showed the highest frequency (>70 %) of uninflated SB coinciding with those that exhibit the highest frequency of lordotic fish.

Table 1: Frequencies (%) of deformed fish (skeletal deformities), vertebral deformities, cranial deformities and uninflated swimbladder (SB) in gilthead seabream sourced from broodstocks from three origins

Broodstock origin	CAN	ATL	MED
N	304	282	323
Deformed	23,4	37,9	38,7
Lordosis	6,6	19,2	21,6
L. Pre-haemal	2,3	5,3	8,2
L. Haemal	4,3	13,9	13,5
Vertebral shortening	3,6	7,8	10,5
Vertebral Fusion	1,3	1,4	1,5
Kyphosis	0,7	0,7	2,5
Lack of operculum	8,2	9,2	5,9
Premaxillar	3,9	0	1,8
Uninflated SB	6,9	70,9	32,5

Discussion

The presence of deformities, as a measure of fish quality, is the second most economically important trait for the industrial production of gilthead seabream (Georgakopoulou *et al.* 2010). Lordosis and lack of operculum can reach more than 80 % individuals in some reared populations (Beraldo *et al.* 2003) seriously compromising both fish morphology and biological performance.

No evidence of genetic component (heritabilities adjusting an animal model) has been found for lordosis in gilthead seabream (Castro *et al.* 2008). However, an increasing number of studies suggest that some fish deformities are determined by a relevant selective breeding. According to this, we found considerable heritability for lordosis which is one of the most relevant deformities in gilthead seabream (Belardo *et al.* 2003).

We found substantial heritabilities for lack of operculum and deformities in the jaw. Nevertheless, other authors found no evidence of genetic component for cranial deformities in seabream (Castro *et al.* 2008). This suggests the absence of additive genetic variation, although it could also be a consequence of the difficulty in correctly identifying head deformities.

Conclusions

Juveniles from CAN showed the lowest frequency of skeletal deformities as well as the lowest frequency of uninflated SB which constitutes relevant information for the establishment of the broodstock to produce commercial fish. Vertebral and cranial skeletal deformities and uninflated SB showed considerable heritabilities being the genetic correlation between lordosis and uninflated SB positive.

Therefore, it could be recommended, by precaution, to eliminate deformed fish from a breeding nucleus although it would also be relevant to study the genetic correlation between deformities and growth which is the most economically important objective in the majority of fish genetic selection programs. All these findings should be relevant for the establishment of successful breeding programs in aquaculture of this species.

Acknowledgments

This study was supported by the PROGENSA® project (Ref: PNMCM/GEN/09). Spanish Ministry of Environment, Rural and Marine JACUMAR.

References

- APROMAR. Fish marine aquaculture in Spain [online]. [cit. 2014-01-08]. <<http://www.apromar.es>>.
- BERALDO P.; PINOSA M.; TIBALDI E. & CANAVESE B. Abnormalities of the operculum in gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphological description. *Aquaculture*. 2003, vol. 220, p. 89-99.
- BOGLIONE C.; GAGLIARDI F.; SCARDI M. & CATAUDELLA S. Skeletal descriptors and quality assessment in larvae and post-larvae of wild-caught and hatchery-reared gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquaculture*. 2001, vol. 192, p. 1-22.
- CASTRO J.; PINO-QUERIDO A.; HERMIDA M.; CHAVARRÍAS D.; ROMERO R. *ET AL.* Heritability of skeleton abnormalities (lordosis, lack of operculum) in gilthead seabream (*Sparus aurata*) supported by microsatellite family data. *Aquaculture*. 2008, vol. 279, p. 18–22.
- GEORGAKOPOULOU E.; KATHARIOS P. *ET AL.* Effect of temperature on the development of skeletal deformities in Gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*. 2010, vol. 308, p. 13-19.
- LEE-MONTERO I.; NAVARRO A.; BORRELL Y. *ET AL.* Development of the first standardised panel of two new microsatellites multiplex PCRs for gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Animal Genetics*. 2013, vol. 44, p. 533–46.

Contact address: Zdeňka Cutáková, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, FVHE University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, H14405@vfu.cz

Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Czech Republic

¹Slezáková Radka, ¹Bártová Eva, ²Nágl Ivan, ²Sedlák Kamil

¹University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Department of Biology and Wildlife Diseases, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic

²State Veterinary Institute Prague, Sidlištní 136/24, 165 03 Prague 6, Czech Republic

Summary

The aim of this study was to find out prevalence of *N. caninum* and *T. gondii* antibodies in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the Czech Republic. Sera of 80 foxes were examined for *N. caninum* and *T. gondii* antibodies by indirect fluorescent antibody test (IFAT). Competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) were also used for detecting *N. caninum* and *T. gondii* antibodies, respectively. Antibodies to *N. caninum* were found by IFAT in three (3.8 %) red foxes with titre 50 and by cELISA in two (2.5 %) red foxes with inhibition 42.7 % and 30.2 %. *T. gondii* antibodies were found in all tested animals by IFAT with titres 50 – 6400 and by ELISA with S/P ranging from 34 % to 133 %.

Keywords: neosporosis; toxoplasmosis; serology; *Vulpes vulpes*

Introduction

Neosporosis is a serious disease of cattle and dogs worldwide (Dubey and Schares 2011); definitive hosts of *N. caninum* are dogs and other canids such as dingo, coyote and grey wolf. *T. gondii* is a coccidian parasite with cats and other felids as the definitive host, and warm-blooded animals as the intermediate hosts. Experimentally infected foxes remained asymptomatic irrespective of *T. gondii* strain (Dubey 2010).

In Europe, there are reports of *N. caninum* and *T. gondii* seroprevalence in red foxes (*Vulpes vulpes*) in the range 0 % – 4.4 % and 33.3 % – 68 %, respectively; reports from the Czech Republic are missing.

Material and Methods

Blood samples from 80 red foxes were collected in 2012 (February - March) in 29 districts of 8 regions of the Czech Republic as the part of survey for the detection of post vaccination anti-rabies antibodies. The blood samples were centrifuged and sera were stored at -20 °C until assayed.

The sera were tested for *N. caninum* and *T. gondii* antibodies by reference method indirect fluorescent antibody test (IFAT) using a commercially available *N. caninum* and *T. gondii* substrate slide (VMRD Inc., Pullman, USA) and anti-dog IgG conjugate (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). The sera were diluted in a double dilution starting at 1:50 as a basic dilution; a titre of 50 was considered positive for both parasites. In case of positive samples, green antigens of *N. caninum* or *T. gondii* were observed under immunofluorescence microscope. The seroprevalence of antibodies to *N. caninum* were investigated also by competitive enzyme linked immunosorbent assay (cELISA, VMRD Inc.) according to the manufacturer's instruction. The plate was read by spectofotometer with using wavelength 630 nm. In case of positive samples other dilutions of sera were prepared. Inhibition (%) was calculated by following formula: Inhibition (%) = 100 - [(OD sample x 100) - (average of negative controls OD)], where OD = optical density. Samples with inhibition \geq 30 % were marked as positive. The same samples were analyzed for Toxoplasma-specific IgG antibodies by ELISA according our protocol. The microtiter plates coated with *T. gondii* antigen (Test-line, Brno, Czech Republic), positive and negative serum samples of were used. ELISA was

validated by panel of IFAT positive and negative canine sera. For each sample, S/P was calculated according to the formula: $S/P (\%) = (\text{absorbance of sample} / \text{absorbance of positive control} - \text{absorbance of negative control}) \times 100$. Samples with the $S/P (\%) \geq 30 \%$ were considered positive.

Results

Antibodies to *N. caninum* were detected by IFAT in 3.8 % (3/80) foxes with titre 50. Two of these positive samples were collected from district South Bohemia and one from district Ústí nad Labem. These positive samples were simultaneously positive for *T. gondii* antibodies with titres 3200, 400 and 400. In cELISA, *N. caninum* antibodies were detected in 2.5 % (2/80) foxes with inhibition 42.7 % and 30.2 %. These samples were collected in districts of South Bohemia and Ústí nad Labem and were simultaneously positive for *T. gondii* antibodies with titres 800 and 200, respectively.

Antibodies to *T. gondii* were detected by IFAT in all of 80 foxes with titres in the range 50 – 6400. In ELISA, *T. gondii* antibodies were detected also in all of 80 foxes with S/P ranging from 34 % to 133 %.

Table 1: Titres of antibodies to *Toxoplasma gondii* in foxes according to districts

District	Area (km ²)	Number of animals	Total positive	<i>T. gondii</i> - IFAT (titres)						
				50	200	400	800	1600	3200	6400
South Bohemia	10 056	15	15	1	3	5	5	-	1	-
Karlovy Vary	3 314	6	6	-	3	1	-	-	1	1
Hradec Králové	4 758	9	9	2	1	5	-	1	-	-
Liberec	3 163	21	21	3	3	9	3	-	2	1
Pardubice	4 519	4	4	1	-	1	-	1	1	-
Plzeň	7 561	1	1	-	-	-	-	1	-	-
Central Bohemia	11 016	16	16	4	3	4	4	-	-	1
Ústí nad Labem	5 335	8	8	-	3	2	-	1	1	1
Total	49 722	80	80	11 (14%)	16 (20%)	27 (34%)	12 (15%)	4 (5%)	6 (8%)	4 (5%)

IFAT - indirect fluorescent antibody test

Discussion

The results of this study indicate that *T. gondii* is fairly common (100 %) in foxes in the Czech Republic in contrast with *N. caninum* that was detected only in 3.8 % foxes. It would be interesting to find out the risk factors such as sex and age of animals, unfortunately, we do not have these data available. Similarly high *T. gondii* seroprevalence (100 %) was found in 123 foxes from Belgium (Buchton et al. 1997). Lower titre of antibodies to *T. gondii* (35 % - 84.7 %) were observed in other European countries (Jakubek et al. 2001; Wanha et al. 2005; Jakubek et al. 2007; Herrmann et al. 2012; Verin et al. 2013). In the case on *N. caninum*, there were found none or low antibodies to this parasite (0 % - 3.2 %) also in other European country (Jakubek et al. 2001; Wanha et al. 2005; Jakubek et al. 2007; Sobrino et al. 2008). The results of seroprevalence studies may differ according to the method, number of tested animals, location and year of sampling.

Since the foxes are on the top of food pyramid, their prevalence reflects the situation in environment. Stray cats and dogs shed *T. gondii* and *N. caninum* oocysts, respectively and contaminate environment for long time. Prey animals could be continuously infected and serve as the main source of infection for carnivorous. Although foxes have not been proved as the definitive host of *N. caninum* based to experimental infection (Schaes et al. 2002, Constantin et al. 2012), they play important role in maintaining *N. caninum* and *T. gondii*

infection in the sylvatic cycle. So, it is important to continue with monitoring of *T. gondii* and *N. caninum* infection in foxes and small mammals and hares to know actual situation.

Acknowledgements

We would like to thank Lenka Žáčková for help with sample examinations.

References

- BUCHTON, D.; MALEY, S.W.; PASTORET, P.P.; BROCHIER, B.; INNES, E.A. Examination of red foxes (*Vulpes vulpes*) from Belgium for antibody to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Veterinary Record*. 1997, vol. 141, s. 308–309.
- CONSTANTIN, E.M.; SHARES, G.; GROSSMANN, E.; SAUTER, K.; ROMIG, T.; HARTMANN, S. Studies of the role of the red fox (*Vulpes vulpes*) as a potential definitive host of *Neospora caninum*. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift* 2012, vol. 124, s. 148–153.
- DUBEY, J.P. (Ed.). *Toxoplasmosis of animals and humans*, second edition. CRC Press, Taylor and Francis Group, Boca Raton, Florida. 2010, s. 5–221.
- DUBEY, J.P.; SCHARES, G. Neosporosis in animals - the last five years. *Veterinary Parasitology*. 2011, vol.180, s. 90–108.
- HERRMANN, D.C.; MAKSIMOV, P.; MAKSIMOV, A.; SUTOR, A.; SCHWARZ, S.; JASCHKE, W.; SCHLIEPHAKE, A.; DENZIN, N.; CONRATHS, F.J.; SCHARES, G. *Toxoplasma gondii* in foxes and rodents from the German Federal States of Brandenburg and Saxony-Anhalt: Seroprevalence and genotypes. *Veterinary Parasitology*. 2012, vol. 185, s. 78–85.
- JAKUBEK, E.B.; BROJER, C.; REGNERSEN, C.; UGGLA, A.; SCHARES, G.; BJORKMAN, C. Seroprevalences of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Swedish red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*. 2001, vol. 102, s. 167–172.
- JAKUBEK, E.B.; FARKAS, R.; PALFI, V.; MATTSSON, J.G. Prevalence of antibodies against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Hungarian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*. 2007, vol. 144, s. 39–44.
- SCHARS, G.; HEYDORN, A.O.; CUPPERS, A.; MEHLHORN, H.; GEUE, L.; PETERS, M.; CONRATHS, F.J. In contrast to dogs, red foxes (*Vulpes vulpes*) did not shed *Neospora caninum* upon feeding of intermediate host tissues. *Parasitology Research*. 2002, vol. 88, s. 44–52.
- SOBRINO, R.; DUBEY, J.P.; PABON, M.; LINAREZ, N.; KWOK, O.C.; MILLAN, J.; ARNAL, M.C.; LUCO, D.F.; LOPEZ-GATIUS, F.; THULLIEZ, P.; GORTAZAR, C.; ALMERIA, S. *Neospora caninum* antibodies in wild carnivores from Spain. *Veterinary Parasitology*. 2008, vol. 155, s. 190–197.
- VERIN, R.; MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PAPINI, R.A.; ARITI, G.; POLI, A.; MANCANTI, F. Serologic, molecular, and pathologic survey of *Toxoplasma gondii* infection in free-ranging red foxes (*Vulpes vulpes*) in central Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 2013, vol. 49, s. 545–551.
- WANHA, K.; EDELHOFER, R.; GABLER-EDUARDO, C.; PROSL, H. Prevalence of antibodies against *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in dogs and foxes in Austria. *Veterinary Parasitology*. 2005, vol. 128, s. 189–193.

Contact: Radka Slezáková, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13391@vfu.cz

Toxoplasmosis and neosporosis in exotic ruminants in the Czech Republic

¹ Kobédová Kateřina, ¹ Bártová Eva, ² Sedlák Kamil, ³ Lamka Jiří

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

² Department of Virology and Serology, State Veterinary Institute Prague

³ Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Charles University

Summary

Toxoplasma gondii and *Neospora caninum* are the protozoan parasites that can cause significant productive and economic losses in the farming of exotic ruminants. This work is aimed at estimating the *T. gondii* and *N. caninum* seroprevalence in the group of exotic ruminants ($n = 184$) including bezoar goat, barbary sheep, common eland, plain bison, water buffalo, yak, bactrian camel, llama, guanaco, alpaca and vicuña. *T. gondii* antibodies were found in 66 (35.9 %) and in 95 (51.6 %) animals by indirect immunofluorescence test (IFAT) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Antibodies to *N. caninum* were detected in 31 (16.8 %) and 44 (23.9 %) animals by IFAT and cELISA, respectively. Mixed infection was found in 18 (9.8 %) and 22 (12 %) animals by IFAT and ELISA, respectively. The results indicate the high prevalence of antibodies, especially in case of parasite *T. gondii*.

Keywords: Toxoplasmosis; Neosporosis; exotic ruminants; ELISA; IFAT

Introduction

Toxoplasma gondii infection is very dangerous for immunocompromised individuals and gravid animals as a frequent reason of resorption, early embryonic death, abortion, fetal death and mummification, still birth and neonatal death. *T. gondii* is also very important zoonosis. There is a risk of infection in humans, after the consumption of infected ruminants (Tenter et al. 2000; Dubey et al. 2006). In the Czech Republic, some important seroprevalence studies concerning the occurrence of *T. gondii* antibodies in domestic, wildlife and ZOO animals were done in the past few years (Bártová et al. 2012a). In case of ruminants, antibodies to *T. gondii* were proved in sheep (Bártová et al. 2008), goats (Bártová et al. 2012b) and Zoo animals such as barbary sheep, camels, llamas, antelopes, bison, buffaloes and yaks (Sedlák et al. 2006).

N. caninum infection is very serious disease mainly in cattle and dogs. It causes neuromuscular disorders in dogs and abortions in other animals, mostly in cows. In the past few years, the seroprevalence studies of *N. caninum* antibodies in domestic and exotic ruminants were conducted mainly on goats (Bártová et al. 2012b) and sheep (Bártová et al. 2008) in the Czech Republic. In the group of zoo animals, there were examined samples from barbary sheep, common elands, bison, buffaloes, yaks, bactrian camels and llamas. *N. caninum* antibodies were detected only in one sample of common eland (Sedlák et al. 2006).

Materials and Methods

The samples were taken from 184 animals, some of them came from privately farmed animals, the other from Zoo animals: from bezoar goats ($n = 70$), barbary sheep ($n = 24$), bactrian camels ($n = 36$), bison ($n = 16$), llamas guanaco ($n = 2$), 1 llama alpaca, 1 llama vicuna, the other llamas ($n = 8$), water buffaloes ($n = 5$), yaks ($n = 2$) and common elands ($n = 19$). The sera were examined in the State Veterinary Institute, Prague, the Czech Republic.

The sera were tested by Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) for detection of antibodies to *T. gondii* and also by Competitive Inhibition Enzyme-Linked Immunoabsorbent

Assay (cELISA) for *N. caninum* antibodies. All samples were simultaneously examined by Indirect Fluorescent Antibody Test (IFAT).

Results and Discussion

Antibodies to *T. gondii* were found in 95 (51.6%) and 66 of 184 (39.5 %) exotic ruminants by ELISA and IFAT, respectively. Antibodies to *N. caninum* were detected in 44 (23.9 %) and 31 (16.8 %) of 184 animals by cELISA and IFAT, respectively. Mixed infections were found in 22 (12 %) and 18 (9.8 %) of 184 animals by ELISA and IFAT, respectively. The results of serological examination are summarized in Table 1.

Table 1: The prevalence of *T. gondii* and *N. caninum* antibodies in various groups of exotic ruminants

Species	Latin name	n	<i>Toxoplasma gondii</i>		<i>Neospora caninum</i>	
			IFAT	ELISA	IFAT	cELISA
Barbary sheep	<i>Ammotragus lervia</i>	24	4 (16.7 %)	6 (25 %)	1 (4.2 %)	5 (20.8 %)
Bactrian camel	<i>Camelus bactrianus</i>	36	22 (61.1 %)	25 (69.4 %)	17 (47.2 %)	11 (30.6 %)
Common eland	<i>Taurotragus oryx</i>	19	5 (26.3 %)	4 (21.1 %)	4 (21.1 %)	12 (63.2 %)
Llama sp.	<i>Lama species</i>	12	3 (25 %)	8 (66.7 %)	1 (8.3 %)	1 (8.3 %)
Plain bison	<i>Bison bison</i>	16	2 (12.5 %)	1 (6.2 %)	1 (6.2 %)	1 (6.2 %)
Water buffalo	<i>Bubalus bubalis</i>	5	1 (20 %)	0 (0 %)	2 (40 %)	1 (20 %)
Bezoar goat	<i>Capra aegagrus</i>	70	27 (38.6 %)	49 (70 %)	5 (7.1 %)	13 (18.6 %)
Yak	<i>Bos mutus f. grunniensis</i>	2	2 (100 %)	2 (100 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total		184	66 (35.9 %)	95 (51.6 %)	31 (16.8 %)	44 (23.9 %)

ELISA – Enzym Linked Immunoabsorbent Assay, IFAT – Indirect Fluorescent Antibody Test

*Llama sp. includes: 2 llamas guanaco (*Lama guanicoe*), 1 llama alpaca (*Lama guanicoe f. pacos*), 1 llama vicuna (*Vicugna vicugna*) and 8 llamas (*Lama guanicoe f. glama*)

The prevalence of *T. gondii* antibodies in bezoar goats was 38.6 % and increased with the age of animals; the prevalence of *N. caninum* antibodies in bezoar goats was very low (7.1 %). The similar prevalence 6.4 % was detected by ELISA in domestic goats in the Czech Republic. In Barbary sheep, low prevalence of *T. gondii* (16.7 %) and *N. caninum* (4.2 %) antibodies was found. This is in contrast with Sedlák et al. (2006) who detected much higher *T. gondii* prevalence (40 %) in these animals, however without detection of *N. caninum* antibodies. In camels, a high prevalence to *T. gondii* (61.1 %) and *N. caninum* (47.2 %) antibodies was found. This is in contrast to previous studies in the Czech Republic. Sedlák et al. (2006) detected *T. gondii* antibodies in 10 % (1/10) animals by IFAT and no antibodies to *N. caninum* were proved. Based to the fact that camels are herbivore, the high incidence of antibodies can be related to environment, food or water contaminated with oocysts from definitive hosts. In llamas, higher prevalence of *T. gondii* (25 %) antibodies was detected compared to *N. caninum* (8.3 %). A higher prevalence of *T. gondii* (26.3 %) and *N. caninum* antibodies (21.1 %) was found in the group of examined common elands. These animals were included in several seroprevalence studies worldwide. In the Czech Republic, serum from 12 animals coming from ZOO was examined (Sedlák et al. 2006). Antibodies to *N. caninum* were proved in one case, while *T. gondii* antibodies were not found. A low prevalence was also proved in the group of examined bison (6.2 % for *N. caninum* and 12.5 % for *T. gondii*). In the past, bison have been screened by IFAT in the Czech Republic. *N. caninum* antibodies were not detected, nevertheless *T. gondii* antibodies were proved in 67 % of animals (Sedlák a Bártová 2006). Antibodies to *N. caninum* were found in two water buffaloes (40%); *T. gondii*

was proved only in one sample (20 %). In our study, *T. gondii* was detected in both tested yaks. In the Czech Republic, *T. gondii* antibodies have been found in yaks and buffaloes, but there was no detection of *N. caninum* antibodies in comparison to our results. The prevalence in water buffaloes is very low worldwide and these animals appear to be immune to *T. gondii* infection (Dubey 2010).

This study brings information about seroprevalence of *T. gondii* and *N. caninum* antibodies in various groups of exotic ruminants in the Czech Republic. Compared to the previous research in the Czech Republic, we detected for the first time both antibodies in barbary sheep, camels, llamas bison and buffaloes. A higher incidence of *T. gondii* antibodies was proved in several groups of animals and high prevalence of *N. caninum* antibodies in camels. The main sources of infection are food and the water contaminated with *T. gondii* and *N. caninum* oocysts. Therefore it is important to limit free movement of domestic animals (especially dogs and cats) and stray animals to prevent contamination of food and environment with the oocysts of these two parasites.

Acknowledgement

We would like to thank to student Bc. Kateřina Hamšíková for her assistance with the serological examination.

References

- BÁRTOVÁ, E., SEDLÁK, K. (2012a): Toxoplasmosis in animals in the Czech Republic - The last 10 years. In: Toxoplasmosis - Recent Advances, ISBN: 978-953-51-0746-0, DOI: 10.5772/50022.
- BÁRTOVÁ, E., SEDLÁK, K. (2012b): *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* antibodies in goats in the Czech Republic. *Vet. Med.*, vol. 57, s. 111-114.
- DUBEY, J.P., LINDSAY, D.S. (2006): Neosporosis, toxoplasmosis, and sarcocystosis in ruminants. *Vet. Clin. Food Anim.*, vol. 22, s. 645-671.
- DUBEY, J.P. (2010): Toxoplasmosis of animals and humans. 2nd ed. Boca Raton: CRC Press, XVII, [4] 313 p., ISBN 14-200-9236-7.
- SEDLÁK K, BÁRTOVÁ E. (2006): Seroprevalences of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in Zoo animals. *Vet. Parasitol.*, vol. 136, s. 223-231.
- TENTER, A.M, HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M. (2000): *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Int. J. Parasitol.*, vol. 30, s. 1217-1258.

Contact address: Kateřina Kobédová, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic, kobedovak@vfu.cz

Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera) of hummingbirds

Valan Miroslav, Sychra Oldřich, Literák Ivan

Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Summary

In total, 579 individuals of fifty species of hummingbirds have been investigated for ectoparasites. Collecting was conducted in years 2004 to 2014 on various locations in Costa Rica, Brazil, Paraguay, Peru, and Honduras. Sixty-two hummingbirds of 20 species have been parasitized at least with one of their four known genera of lice: *Leremenopon* (1), *Myrsidea* (2), *Trochiloecetes* (44) and *Ricinus/Trochiliphagus* (14) including 24 of 28 host-lice association as new records, possibly some new species. In two hosts were found lice of the genus *Menacanthus*, which is considered to be a straggler.

Keywords: chewing lice; Trochilidae; *Leremenopon*; *Myrsidea*; *Trochiloecetes*; *Ricinus*; *Trochiliphagus*

Introduction

Despite the relatively large number of hummingbirds, 336 species known today (Clements *et al.* 2013), there is only 50 described species of chewing lice on hummingbirds, all belonging to the order Amblycera and grouped into genera *Leremenopon*, *Myrsidea*, *Trochiloecetes* and *Ricinus/Trochiliphagus* (Carriker 1963, 1960; Dalgleish a Price 2003a, 2003b; Mey 1983; Oniki 1995; Oniki and Emerson 1982). In all, 37 species of hummingbirds (only 11% of all species spectrum) were found to be parasitized. Genera *Leremenopon* (4 species) and *Myrsidea* (3 species) were recently well described by Dalgleish and Price (2003a; b). Revision of the genus *Trochiliphagus* was performed by Rheinwald (2007) and he synonymized *Trochiliphagus* and *Ricinus* and declared that all 12 known species of the genus *Trochiliphagus* should be one single species *Ricinus jimenezi*. Regarding genus *Trochiloecetes*, presently, there is 30 valid species but unfortunately, most of them are based on the description of one single female (in 11 species) or one single male (4 types). The aim of this study is deepening knowledge about ecology of hummingbirds and their lice.

Material and Methods

Data were sampled at localities in Costa Rica, Brazil, Paraguay, Peru, and Honduras in years 2004 to 2014. Birds were caught by mist nets. Chewing lice were collected using fumigation chamber method (Clayton and Drown 2001). Once sampled, unharmed birds were released back to the wild. Lice were preserved in 96% ethyl alcohol. Subsequently, lice were identified to the genus level, sexed, aged and deposited in the freezer on -72°C to enable molecular studies. Specimens were deposited in the Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, UVPS Brno. Host names follow Clements *et al.* (2013).

Results and Discussion

A total of 579 individuals of 50 species of hummingbirds were examined, and 62 birds of 20 species were parasitized. All four known genera have been found: *Leremenopon* (1 bird was parasitized with louse/lice of this genus), *Myrsidea* (2), *Ricinus/Trochiliphagus* (14) and *Trochiloecetes* (44). Twenty four of 28 host-lice association are reported for the first time, and some are possibly new species. Remaining four host species have been known as hosts for the lice genus found on them. Until proper revision and clarification of their status is done, lice will remain identified to the genus level. Two genera of chewing lice were present in eight

host species, but all bird individuals have been parasitized only by one lice genus. Sex ratio is 2:1 female to male and around one third of specimens are immature as reported by Clayton *et al.* (1992); only report regarding ecology of hummingbird lice. Prevalence is 11% with mean intensity 4,3 (range 1-33). Significantly high prevalence is present in *Selasphorus flammula* (50%). Although prevalence appeared to be the same or higher than in *Leremenopon* and *Myrsidea*, *Menacanthus* is considered to be a straggler. Rheinwald (2007), when synonymized *Ricinus* and *Trochiliphagus*, based his study on investigation of only two specimens from the same host. That leaves some open questions: 1. Does it exist only one species of *Trochiliphagus/Ricinus* or more; 2. Whether the status of the genus *Trochiliphagus* is valid or it is indeed part of the genus *Ricinus*; 3. Does the genus *Ricinus* occurring on Passeriformes should be also divided into several genera? Application of modern enzymatic and DNA technics may provide the answer.

Table 1: A list of parasitized hummingbirds (P^A = parasitized/examined; % = prevalence; ♀ = females; ♂ = males; N = nymphs; T = total; * = new association; ** = straggler)

<i>Host species</i>	<i>P^A</i>	<i>%</i>	<i>Lice genus and count of hosts</i>	♀	♂	<i>N</i>	<i>T</i>
<i>Amazilia candida</i>	1/13	8	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i>	-	3	5	8
<i>A. chionogaster</i>	2/19	11	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *1	2	-	-	2
			<i>Trochiloecetes</i> *1	5	9	6	20
<i>Campylopterus hemileucurus</i>	1/43	2	<i>Trochiloecetes</i> *	14	7	12	33
<i>Elvira cupreiceps</i>	1/1	100	<i>Trochiloecetes</i> *	-	-	1	1
<i>Eugenes fulgens</i>	4/26	15	<i>Menacanthus</i> **1	-	1	-	1
			<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *2	1	1	-	2
			<i>Trochiloecetes</i> *1	1	-	-	1
<i>Eupherusa eximia</i>	3/8	38	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *1	1	-	-	1
			<i>Trochiloecetes</i> *2	1	2	4	7
<i>E. nigriventris</i>	3/5	60	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *2	2	1	2	5
			<i>Trochiloecetes</i> *1	1	-	1	2
<i>Heliodoxa jacula</i>	1/10	10	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *	1	-	-	1
<i>Chalybura urochrysia</i>	3/21	14	<i>Leremenopon</i> *1	-	-	1	1
			<i>Trochiloecetes</i> *2	3	1	12	16
<i>C. canivetii</i>	1/7	14	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *	-	-	1	1
<i>Lampornis calolaemus</i>	4/29	14	<i>Trochiloecetes</i> *	6	5	2	13
<i>L. castaneoventris</i>	2/5	40	<i>Trochiloecetes</i> *	6	4	-	10
<i>L. hemileucus</i>	1/8	13	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *	-	-	1	1
<i>Panterpe insignis</i>	6/42	14	<i>Menacanthus</i> 1**	-	-	1	1
			<i>Trochiloecetes</i> *4	14	9	2	25
			<i>Myrsidea</i> *1	1	-	-	1
<i>Phaethornis atrimentalis</i>	2/4	50	<i>Trochiloecetes</i> *	2	-	-	2
<i>P. striigularis</i>	1/6	17	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> *	1	-	-	1
<i>P. superciliosus</i>	10/75	13	<i>Trochiloecetes</i> 9	24	7	12	43
			<i>Myrsidea</i> *1	-	1	6	7
<i>Selasphorus flammula</i>	11/22	50	<i>Ricinus/Trochiliphagus</i> 3	8	4	6	18
			<i>Trochiloecetes</i> 8	7	1	7	15
<i>Threnetes leucurus</i>	1/3	33	<i>Trochiloecetes</i> *	7	4	1	12
<i>T. ruckeri</i>	4/30	13	<i>Trochiloecetes</i> *	10	1	7	18
Birds from species without lice	202	-	-	-	-	-	-
Total	62/579	11		118	61	90	269

Conclusion

Regarding low prevalence and mean intensity presented herein, and having scarce descriptions and unreliable collecting technics in the past it is obvious that further studies are

needed. Those studies should include a morphological revision of known species supported with DNA analyses.

References

CARRIKER, M.A. Studies in neotropical Mallophaga, XVII: a new family (Trochiliphagidae) and a new genus of the lice of hummingbirds. *Proceedings of the United States National Museum*. 1960, vol. 112, no. 3438, s. 307–342.

CARRIKER, M.A. On some Mallophaga from Trinidad, W.I. and British Guiana in the collections of the British Museum (Natural History). *Annals and Magazine of Natural History (Series 13)*. 1963, vol. 5, s. 449–483.

CLAYTON, D.H.; DROWN, D.M. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology*. 2001, vol. 87, no. 6, s. 85–94.

CLAYTON, D.H.; GREGORY, R.D.; PRICE, R.D. Comparative ecology of Neotropical bird lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Animal Ecology*. 1992, vol. 61, s. 781–795.

CLEMENTS, F.J.; SCHULENBERG, S.T.; ILIFF, J.M.; SULLIVAN, L.B.; WOOD, L.C.; ROBERSON, D. *The eBird/Clements checklist of birds of the world: Version 6.8*. 2013.

DALGLEISH, R.C.; PRICE, R.D. Two new species of *Myrsidea* (Phthiraptera: Amblycera: Menoponidae) from hummingbirds (Apodiformes: Trochilidae). *Occasional Papers of the Western Foundation of Vertebrate Zoology*. 2003a, vol. 6, s. 1–9.

DALGLEISH, R.C.; PRICE, R.D. A new genus and four new species of chewing lice (Phthiraptera: Amblycera: Menoponidae) from hummingbirds (Apodiformes: Trochilidae). *Occasional Papers of the Western Foundation of Vertebrate Zoology*. 2003b, vol. 7, s. 1–9.

MEY, E. Kubanische Mallophagen I. (Ergebnisse der I. Kubanisch-Deutschen "Alexander von Humboldt"-Expedition 1967/68, Nr. 32). *Reichenbachia, Staatliches Museum für Tierkunde, Dresden*. 1983, vol. 20, no. 27, s. 213–218. [in German]

ONIKI, Y. *Trochiliphagus austini* sp.n. (Mallophaga, Trochiloecetidae) from *Amazilia candida* (Aves, Trochilidae) of Belize, with biological notes. *Iheringia, Série Zoologia, Porto Alegre*. 1995, no. 78, s. 67–71.

ONIKI, Y.; EMERSON, K.C. A new species of *Trochiloecetes* (Mallophaga: Ricinidae) from the saw-billed hermit, *Ramphodon naevius* (Dumont) (Apodiformes: Trochilidae). *Revista Brasileira de Biologia*. 1982, vol. 42, no. 1, s. 85–87

RHEINWALD, G. The Position of *Trochiliphagus* Carriker within the Ricinidae (Insecta: Phthiraptera). *Bonner Zoologische Beiträge*. 2007, vol. 55, s. 37–46.

Contact address: Miroslav Valan, DVM., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, miroslav.valan@yahoo.com

Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from wild birds in Vietnam

¹Najer Tomáš, ¹Kounek Filip, ²Hung Nguyen Manh, ¹Literák Ivan, ¹Sychra Oldřich

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

²Department of Parasitology, Institute of Ecology and Biological Resources (IEBR), Vietnam Academy of Science and Technology (VAST), Hanoi, Vietnam

Summary

Chewing lice of wild birds were examined in 2008-2012 in five national parks in Vietnam (Ba Be, Cuc Phuong, Cat Tien, Binh Chau, Bi Doup Nui Ba). In generally, 639 birds of 115 species were examined. A total of 176 birds of 53 spp. (prevalence 27%) were parasitized by lice of nine genera from suborders Ischnocera and Amblycera. The birds examined were mostly passerines (597 ex., 103 spp.) of 26 families. In passerines, 1196 lice were found in 161 birds of 48 spp. (prevalence 27%), the prevalence and dominance is discussed in the paper. Only two birds were infested by more than 50 lice – *Garrulax yersini* (56 lice) and *Zoothera dauma* (72 lice). A total of 72 host-lice associations were found, of which 61 new, including nine new species. Interesting association was found for *Cymbirhynchus macrorhynchus* parasitized by *Myrsidea claytoni* (100% prevalence, n=32). This is the first record of one species of *Myrsidea* from two distantly related hosts, an interesting case of natural host-switching. While the original hosts belong to the family Pycnonotidae, *C. macrorhynchus* to Eurylaimidae.

Key words: chewing lice; Amblycera; Ischnocera; Vietnam; wild birds; passerines

Introduction

There are 889 birds recorded in Vietnam, of which 460 are known as hosts of 758 species of chewing lice of 11 genera (Najer et al., 2014). However, before our study there were only ten species recorded in Vietnam itself, with all the other species known from neighbouring countries (Sychra et al., 2009). This purpose of this paper is to present new data on chewing lice found in both northern as well as southern Vietnam.

Material and Methods

Our research of chewing lice of wild birds took place in 2008 and 2010 in territories of two national parks (Ba Be and Cuc Phuong NP) in northern Vietnam, and in 2011 and 2012 in four locations within three NP in southern Vietnam (NP Cat Tien, Binh Chau; NP Phuoc Buu and Bi Doup; NP Nui Ba). In generally, 639 birds of 115 species were examined, 206 ex. of 43 spp. in northern Vietnam and 239 ex. of 50 spp. in southern Vietnam. The birds were captured alive using mist nets, determined, examined and deloused as described in our previous papers (Najer et al., 2012a, b, c, 2014; Sychra et al., 2009, 2014).

Results and Discussion

A total of 176 birds of 53 spp. (prevalence 27%) were parasitized by 1299 chewing lice (mean intensity 7.4) belonging to nine genera from two suborders, Ischnocera: *Alcedoecus*, *Alcedofulla*, *Brueelia*, *Cuculicola*, *Meropoecus*, *Penenirmus*, *Philopteroides*, *Philopterus* and *Sturnidoecus*, and Amblycera: *Menacanthus*, *Meromenopon*, *Myrsidea* and *Ricinus*.

The birds examined were mostly passerines (93%, 597 ex., 103 spp.) from 26 families, the other 42 birds belonged to orders Coraciiformes, Cuculiformes and Piciformes. In passerines, 1196 lice (mean intensity 7.4, mean abundance 2.0) were found in 161 birds of 48 spp. (prevalence 27%; 47% of all species of examined passerines). The highest prevalences of infestation were found on bulbuls (Pycnonotidae; 52%, 65 birds of 9 spp. were examined),

babblers (Timaliidae sensu lato; 27%, 194 birds of 21 spp. were examined), and Old World flycatchers (Muscicapidae; 18%, 110 birds of 18 spp. were examined). Concerning dominance, both Amblycera and Ischnocera were equal, the most dominant genera were *Myrsidea* (35%) and *Brueelia* (35%); other genera were less frequent: *Menacanthus* (16%), *Philopterus* (10%), *Philopteroides* (4%), *Ricinus* (0.7%). Most of passerines (84%) were infested by one louse species, 25 birds (16%) were infested by two louse species and one Grey-eyed Bulbul (*Iole propinqua*) was infested by three species of lice. Only two birds were infested by more than 50 lice – endemic Collared Laughingthrush (*Garrulax yersini*) (56 lice) and Scaly Thrush (*Zoothera dauma*) (72 lice). A total of 72 host-lice associations were found, of which 61 are new, including nine new species out of which 7 belonged to the genus *Brueelia*, 1 to *Philopteroides* and 1 to *Myrsidea*. Interesting host-lice associations was found in Black-and-red Broadbill (*Cymbirhynchus macrorhynchos*). All 32 birds examined were parasitized by *Myrsidea claytoni*. Mean abundance was 27.3, with intensity range 5–80 lice per bird. This is the first record of one species of *Myrsidea* from very distantly related hosts. While the original hosts of *M. claytoni* belong to the family Pycnonotidae, *C. macrorhynchos* is a member of the family Eurylaimidae representing the Old World Suboscines. Therefore, our record represents probably an interesting case of natural host-switching (Sychra et al., 2014).

Acknowledgement

We are grateful to the Institute of Ecology and Biological Resources in Hanoi, Vietnam, and also to authorities of all the national parks, where took place our field work. We owe special thanks to Ricardo L. Palma for his review of our drafts and improvements of our English grammar. This research was supported by the projects IGA VFU No. 74/2011/FVHE and 1/2012/FVHE from the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic.

References

- SYCHRA, O., LITERÁK, I., NGUYEN, M. H., PODZEMNÝ, P. 2009: Chewing lice from wild passerines (Aves, Passeriformes) from Vietnam, with description of a new species of the genus *Brueelia* (Phthiraptera, Ischnocera, Philopteridae). *Acta Parasitologica*, 54(2): 154-157.
- NAJER, T., SYCHRA, O., NGUYEN M. H., ČAPEK, M., PODZEMNÝ, P., LITERÁK, I. 2012a: New species and new records of chewing lice (Phthiraptera: Amblycera and Ischnocera) from bulbuls (Passeriformes: Pycnonotidae) in Vietnam. *Zootaxa*, 3357, 37-48.
- NAJER, T., SYCHRA, O., NGUYEN M. H., ČAPEK, M., PODZEMNÝ, P., LITERÁK, I. 2012b: Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from wild passerines (Aves: Passeriformes) in northern Vietnam, with descriptions of three new species. *Zootaxa*, 3530, 59-73.
- NAJER, T., SYCHRA, O., KOUNEK, F., PAPOUSEK, I., NGUYEN, M. H. Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera and Ischnocera) from wild birds in southern Vietnam, with descriptions of two new species. *Zootaxa*, 2014, vol. 14, no. 3755, p. 419–433.
- SYCHRA, O., NAJER, T., KOUNEK, F., NGUYEN, M. H., TOLSTENKOV, O. O. *Myrsidea claytoni* (Phthiraptera: Menoponidae) from *Cymbirhynchus macrorhynchos* (Passeriformes: Eurylaimidae): A case of natural host switching. *Journal of Parasitology*, 2014, vol. 100, no. 3, p. 280-283.

Contact address: Tomáš Najer, DVM, Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic, tomas.najer@gmail.com

Prevalence of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in European hares (*Lepus europaeus*)

¹Marková Jiřina, ¹Bártová Eva, ²Sedlák Kamil

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

² State Veterinary Institute Prague, Department of Virology and Serology

Summary

Encephalitozoon cuniculi is obligate intracellular parasite infecting especially domestic rabbits, however spontaneous infections have been documented in other mammalian species all over the world. There are limited reports on encephalitozoonosis in wildlife that is why the aim of this study was to detect the prevalence of antibodies to *E. cuniculi* in European hares. Blood sera from 701 wild hares from the Czech Republic, the Slovak Republic and Austria were examined by indirect immunofluorescence reaction (IFAT); samples with titer ≥ 40 were marked as positive. The total seroprevalence of *E. cuniculi* antibodies was 1.42 % with titres in the range 40 – 640. This is the first detection of antibodies to *E. cuniculi* in hares showing that hares could be exposed to *E. cuniculi* infection however with low rate.

Keywords: Encephalitozoonosis; serological examinations; IFAT; Czech Republic

Introduction

Encephalitozoon cuniculi was first identified in a group of laboratory rabbits in 1922 and currently is considered a zoonotic parasite (Jordan, 2006). The most frequently infected animals are domestic rabbits (Jeklová et al., 2010b); however spontaneous infections have been documented in other mammalian species (Jordan, 2006). Encephalitozoonosis is a chronic and latent disease leading to renal failure, encephalitis, disorders of brain and urinary tract and may lead to death (Deplazes et al., 2000). The first description of encephalitozoonosis in European hare (*Lepus europeus*) was in 2007 in Belgium when *E. intestinalis* and *E. hellem* were diagnosed in the kidneys of an adult free-ranging hare with multifocal wedge-shaped chronic interstitial nephritis. Fresh kidney tissue was examined by real-time PCR and microarray (De Bosschere et al., 2007). In Europe, antibodies to *E. cuniculi* were detected in various groups of domestic and wildlife animals but not yet in hares.

Materials and Methods

Blood sera from 701 wild European hares (*Lepus europaeus*) were serologically examined to determine specific *Encephalitozoon cuniculi* antibodies. These samples were collected in the Czech Republic (n = 245) from November 2004 to December 2005 in the regions of the Central Bohemia, South Moravia and Olomouc; in the Slovak Republic (n = 211) from November 2006 to March 2007 in the district of Nitra; and in Austria (n = 245) from October to December 2005 in the federal lands of Lower Austria, Salzburg and Tyrol. All of the hare were without apparent clinical signs and their blood was withdrawn by hunters and veterinarians from their hearts. The sera were examined in the State Veterinary Institute, Prague, the Czech Republic.

The sera were tested by the indirect immunofluorescence (IFAT) antibody test using the commercial set MegaScreen Fluencephalitozoon c. (Megacor Diagnostic, Hörbranz, Austria) containing positive and negative controls (rabbit serum) and anti-rabbit FITC conjugate. The sera were tested with the basic dilution 1:40; the samples with titres ≥ 40 were considered positive. The slides were examined under the immunofluorescent microscope. In case of positive samples, the green fluorescence was visible in the microscope; if there was a red coloration of antigen (spores of *E. cuniculi*), the sample was considered negative.

Results

In our study, 701 samples of blood sera from hares were used for serological examination. Antibodies to *E. cuniculi* were detected in 10 (1.42 %) hares with prevalence 2.9 % (7/245), 0.8 % (2/245) and 0.5 % (1/211) in hares from the Czech Republic, Austria and the Slovak Republic, respectively. The titres of *E. cuniculi* were detected in the range 40 – 640.

Discussion

Encephalitozoon cuniculi is a parasite that primarily infects rabbits (Jeklová et al., 2010a). After infection, the specific antibodies to *E. cuniculi* could be detected by serological methods; these antibodies remain in animals throughout their life (Deplazes et al., 2000). Except rabbits and other domestic animals, antibodies to *E. cuniculi* were also detected in wildlife and zoo animals (Guscetti et al., 2003). In 2007, *E. intestinalis* and *E. hellem* were diagnosed in the kidneys of free-ranging European hare (*Lepus europaeus*) living in Belgium (De Bosschere et al., 2007). It was one from five hares which were found dead in the same area during one month. The visible kidney lesions were similar with lesions caused by *E. cuniculi* in rabbits, nevertheless by help of methods of molecular biology it was proved as *E. intestinalis* and *E. hellem*.

In our study, 701 samples of blood sera from hares were used for serological examination. This is the first detection of *E. cuniculi* antibodies in hares. From that reason we can compare our results just with similar studies done in European rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) belonging to the same order *Lagomorpha*. For example, the seroprevalence 24.7 % (20/81) was detected by IFAT in wild rabbits in Australia (Thomas et al., 1997), 44.7 % (21/47) in wild rabbits from the Slovak Republic tested by ELISA (Bálent et al., 2004) and 3.9 % (8/204) in wild rabbits from France tested by IFAT (Künzel and Joachim, 2010).

During years 1993 – 2012, there were several seroprevalence studies done in various groups of animals from the Czech Republic. The serological prevalence in domestic animals was much higher than the prevalence in hares from our study. One explanation for it may be the fact that domestic animals could be more often in contact with rabbits which are the primary hosts of *E. cuniculi*. Rodents also play an important role in spreading this infection because they can contaminate the water and food with *E. cuniculi* spores. In the Czech Republic, high prevalence of *E. cuniculi* antibodies were found in laboratory animals such as guinea pig, Syrian golden hamster and rat (Chalupský et al., 1979). *E. cuniculi* was also determined in wild animals European otter (*Lutra lutra*), stone marten (*Martes foina*) (Hůrková and Modrý, 2006), and wild mouse (*Mus musculus musculus*, *M. m. domesticus*) (Sak et al., 2011). Hares may be primarily infected by ingestion of food and water contaminated with *E. cuniculi* spores and when they become prey for foxes or other carnivores, encephalitozoonosis can spread through other wild animals. In the Slovak Republic, the situation is similar as in the Czech Republic. According to the results of serological studies done during years 1996 – 2010, much higher prevalences were also detected in domestic and other wildlife animals than in hares from our study. In Austria, there are not seroprevalence studies, *E. cuniculi* was determined by PCR in 6 % (16/268) of voles (*Microtus arvalis*) and in 7 % (6/86) of European water voles (*Arvicola terrestris*) (Fuehrer et al., 2010); other groups of wild animals have not been yet examined in this country.

Results of serological examinations may be variable due to many factors such as number of animals, gender and their age because the risk of infection increases with the age of animals (Dipineto et al., 2008). In case of hares and other wildlife, it is important if they live in rural or urban environment; it can be affected also by the climate and geographic location.

Acknowledgement

We would like to thank to prof. František Treml from the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, FVM, Department of Infectious Diseases and Microbiology, Brno and to Ivan Holko from Tomas Bata University in Zlin, Faculty of Technology, Department of Food Technology and Microbiology, Zlín for providing the hare sera and to Mgr. Barbora Zahradníčková for help with sample examination.

References

- BÁLENT, P.; HALÁNOVÁ, M.; SEDLÁKOVÁ, T.; VALENČÁKOVÁ, A.; ČISLÁKOVÁ, L. *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits and laboratory mice in Eastern Slovakia. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*. 2004, vol. 48, p. 113-116.
- CHALUPSKÝ, J.; VÁVRA, J.; BEDRNÍK, P. Encephalitozoonosis in laboratory animals – a serological survey. *Folia Parasitologica*. 1979, vol. 26, p. 1-8.
- DE BOSSCHERE, H.; WANG, Z.; ORLANDI, P.A. First diagnosis of *Encephalitozoon intestinalis* and *E. Hellem* in the European Brown hare (*Lepus europaeus*) with kidney lesions. *Zoonoses and Public Health*. 2007, vol. 54, p. 131-134.
- DEPLAZES, P.; MATHIS, A.; WEBER, R. Epidemiology and zoonotic aspects of Microsporidia of mammals and birds. *Cryptosporidiosis and Microsporidiosis*. 2000, vol. 6, p. 236-260.
- DIPINETO, L.; RINALDI, L.; SANTANIELLO, A.; SENSALÉ, M.; CUOMO, A.; CALABRIA, M.; MENNA, L.F.; FIORETTI, A. Serological survey for antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in pets rabbits in Italy. *Zoonoses and Public Health*. 2008, vol. 55, p. 173-175.
- FUEHRER, H.P.; BLOSCHL, I.; SIEHS, C.; HASSL, A. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). *Parasitology Research*. 2010, vol. 107, p. 469-473.
- GUSCETTI, F.; MATHIS, A.; HATT, J.-M.; DEPLAZES, P. Overt fatal and chronic subclinical *Encephalitozoon cuniculi* microsporidiosis in a colony of captive emperor tamarins (*Saguinus imperator*). *Journal of Medical Primatology*. 2003, vol. 32, p. 111-119.
- HŮRKOVÁ, L.; MODRÝ, D. PCR detection of *Neospora caninum*, *Toxoplasma gondii* and *Encephalitozoon cuniculi* in brains of wild carnivores. *Veterinary Parasitology*. 2006, vol. 137, p. 1-2.
- JEKLOVÁ, E.; JEKL, V.; KOVAŘČÍK, K.; HAUPTMAN, K.; KOUDELA, B.; NEUMAYEROVÁ, H.; KNOTEK, Z.; FALDYNA, M.. Usefulness of detection of specific IgM and IgG antibodies for diagnosis of clinical encephalitozoonosis in pet rabbits. *Veterinary Parasitology*. 2010a, vol. 170, p. 143-148.
- JEKLOVÁ, E.; LEVÁ, L.; KOVAŘČÍK, K.; MATIAŠOVIČ, J.; KUMMER, V.; MAŠKOVÁ, J.; ŠKORIČ, M.; FALDYNA, M. Experimental oral and ocular *Encephalitozoon cuniculi* infection in rabbits. *Parasitology*. 2010b, vol. 137, p. 1749-1757.
- JORDAN, C.N. *Encephalitozoon cuniculi*: Diagnostic test and methods of inactivation. *Veterinary Parasitology*. 2006, vol. 135, p. 235-240.
- KÜNZEL, F.; JOACHIM, A. Encephalitozoonosis in rabbits. *Parasitology Research*. 2010, vol. 106, p. 299-309.
- SAK, B.; KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; ALBRECHT, T.; PIÁLEK, 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, p. 3-4.
- THOMAS, C.; FINN, M.; TWIGG, L.; DEPLAZES, P.; THOMPSON, R.C.A. Microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) in wild rabbits in Australia. *Australian Veterinary Journal*. 1997, vol. 75, p. 808-810.

Contact address: Jiřina Marková, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, Czech Republic, H14005@vfu.cz

Bacterial skin colonization associated with bats in Europe

¹Kovacova Veronika, ¹Bandouchova Hana, ⁴Garcia-Fraile Paula, ⁵Kohoutova Eva,
⁴Kolarik Miroslav, ^{3,6}Martinkova Natalia, ^{2,3}Zukal Jan, ¹Pikula Jiri

¹Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, VFU Brno, Czech Republic

²Department of Botany and Zoology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

⁴Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology ASCR, Czech Republic

⁵Department of Infectious Diseases and Microbiology, VFU Brno, Czech Republic

⁶Institute of Biostatistics and Analysis, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Summary

White-nose syndrome monitoring efforts in the Czech Republic also include collection of skin swabs for bacterial culture to evaluate skin condition in different species of central European bats. Cultures yielded a variety of bacterial isolates. Finally, we found phytopathogen *Lonsdalea quercina* isolated from animal reservoir bat, *Rhinolophus hipposideros*. 16S rRNA gene sequencing and phylogenetic analysis revealed that these isolates form a distinct lineage within the genus *Lonsdalea*, family Enterobacteriaceae, and are most closely related to *Lonsdalea*. Further analysis based on two housekeeping genes (*infB* and *atpD*) confirmed their position within the genus *Lonsdalea*. *Lonsdalea quercina* is gram-negative facultatively anaerobic bacteria and is reported to cause disease in oaks. This is the first evidence *L. quercina* in the Czech Republic. However the role of bats in its transmission or as reservoir hosts is unknown yet.

Keywords: *Lonsdalea*; *Rhinolophus*; White-nose syndrome; 16S rRNA; housekeeping genes

Introduction

The majority of data on infection dynamics in bats originate from virology or parasitology studies. Ectoparasites commonly found on bats or in bat habitats have been found to be infected with *Bartonella*, *Borrelia* and *Rickettsia* species (Loftis *et al.*, 2005; Reeves *et al.*, 2005, Billeter *et al.*, 2012; Hornok *et al.*, 2012), posing a potential risk of intra- and interspecies transmission cycles between bats, humans and domestic animals (D'Auria *et al.*, 2010). Various studies have investigated infectious agents and bats, little is known about actual bats role as a vectors for phytopathogens (Mühldorfer *et al.*, 2010; Wong *et al.*, 2007). Although the ability of bats to transmit bacteria from trees is recorded (Buregyyaet al., 2014). *Lonsdalea quercina* is a particular gram-negative bacterium associated above all with oak decline syndrome what has been reported in several European countries (Biosca *et al.*, 2003; Brady *et al.*, 2012; Soria *et al.*, 1997). The affected trees suffer progressive loss of vigor, foliage reduction, and early leaf senescence. Under the bark is developed mucus, white and stinky exudate with variable in size (reaching in some cases up to 20 cm) usually appeared on bark surface of the lower trunk (Biosca *et al.*, 2003). Newly is reported *Lonsdalea quercina*, spp. *populi* which affects poplar species in Hungary (Tóth *et al.*, 2013). The identification of bacteria was based on 16S rRNA sequencing and housekeeping genes especially.

Material and Methods

White-nose syndrome monitoring efforts in the Czech Republic also include collection of skin swabs for bacterial culture to evaluate skin condition in different species of central European bats. Bat species were represented as follows: *Myotis myotis* (33), *M. emarginatus* (33), *M. daubentonii* (22), *M. bechsteinii* (13), *M. mystacinus* (6), *M. nattereri* (9), and *M. brandtii* (10). One hundred twenty-six samples from bats were cultured for bacteria in 2013. Bacterial isolates obtained from bats were detected and identified by MALDI-TOF and sequence

analysis of 16S rRNA gene. One selected strain was analysis based on two protein-encoding genes *infB* and *atpD*. The gene *atpD* encodes the β -subunit of the ATP synthase (Ludwig *et al.*, 1993; Christensen & Olsen, 1998) and the *infB* gene encodes the translation initiation factor 2, which is essential for the initiation of protein synthesis in prokaryotes (Laalami *et al.*, 1991). Genes have been used for phylogenetic investigation.

Results

Cultures yielded a variety of bacterial isolates including a phytopathogen. *Pseudomonas* and *Serratia* bacteria were found consistently, followed by *Artrobacter spp.* Phytopathogen isolate was identified as *Lonsdalea quercina* by MALDI-TOF. 16S rRNA gene sequence and housekeeping genes (*infB* and *atpD*) showed high (99 %) similarity to *Lonsdalea quercina subs. britannica*, the causal agent of bark canker and drippy nut disease of oaks.

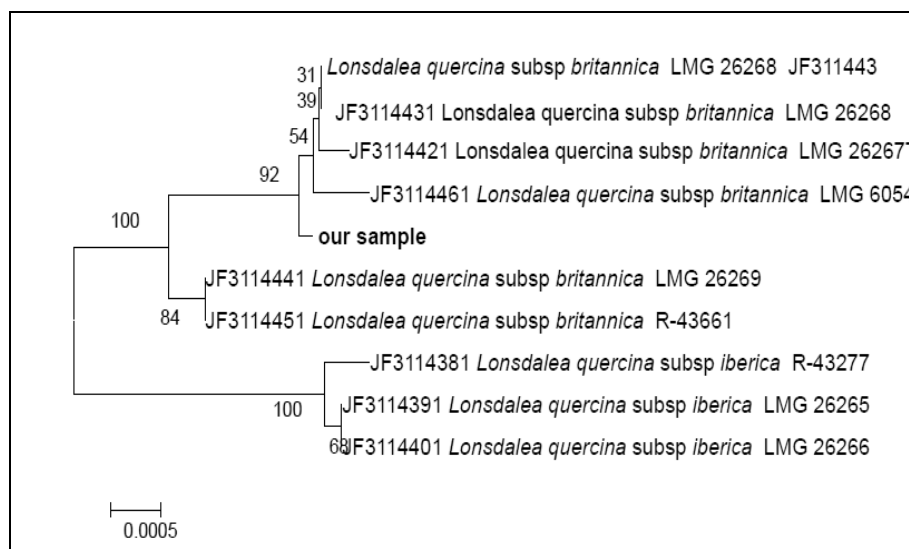


Figure 1: Evolutionary relationships of taxa

Discussion

Therefore, it is clear that the phytopathogenic agent is present in the area of Moravian Karst and this is the first evidence of *L. quercina* in the Czech Republic. The disease of oaks caused by *L. quercina* was first described in Europe (Spain) in 1992. The affected trees show progressive loss of vigour, foliage reduction, early leaf senescence and exudates from bark. A similar condition was noted in oaks of Britain (Biosca *et al.*, 2003` Brady *et al.*, 2012). While migratory animals are known to act as long-distance vectors for infectious agents, this bat species (*Rhinolophus hipposideros*) is particularly sedentary, with the average movement between summer and winter roosts between 5 to 10 km and the maximum reported migration of up to 153 km (Heymer 1964 in Hutterer *et al.*, 2005). The role of bats in its transmission or as reservoir hosts is unknown yet. Possible transmission of *Lonsdalea quercina* on bats maybe occurs after contact with contaminated plants, but no finding was observed on plants in the area Moravian Karst. All bat species in the Czech Republic are insectivorous, and insects can carry various microbial agents from affected trees. It was found that near of this area is commerce horticulture what can have a potential role in transmission bacterium around. On the other hand the actual role played by bats as reservoir or in disseminating zoonoses is still enigmatic a multitude of zoonotic diseases are known to be associated with bats. Such diseases including viral, bacterial, parasitic, fungal and rickettsial diseases, reported from all over the world (Hornok *et al.*, 2012, Meteyer *et al.*, 2009, Wong *et al.*, 2007). Feeding bats on

the contaminated fruits and nectar were found carrying bacteria on their bodies (Buregyeya et al., 2014) and it is not surprising that it can be similar with phytopathogens as *Lonsdalea*.

Conclusion

Phytopathogenic bacteria *Lonsdalea quercina* was isolated from a lesser horseshoe bat (*Rhinolophus hipposideros*) when we monitor white-nose syndrome in the Czech Republic. This is the first evidence of *L. quercina* in the Czech Republic. The role of bats in transmission or as reservoir hosts is unknown yet. The lesser horseshoe bat may bio-indicate presence of the phytopathogenic bacterium in broad-leaved forests of Moravian Karst and phytopathologists should inspect the area for signs of oak disease and decline. What more, deciphering the diversity and function of these microbes may provide insights into the roles they play in maintaining health of bats.

Acknowledgment

Study was supported by project IGA 32/2013 FVHE.

References

- BILLETER, S. A., D. T. HAYMAN, A. J. PEEL, K. BAKER, J. L. WOOD, A. CUNNINGHAM, T. SUU-IRE, K. DITTMAR, M. Y. KOSOY. *Bartonella species in bat flies (Diptera: Nycteribiidae) from western Africa. Parasitology. 2012, vol. 139, p. 324-329.*
- BIOSCA E. G., GONZÁLEZ R., LÓPEZ- LÓPEZ M., SORIA S., MONTÓN C., PÉREZ-LAORGA E., LÓPEZ M. M. Isolation and characterization of *Brenneria quercina* causal agent for bark canker and drippy nut of *Quercus* spp. in Spain. *Phytopathology. 2003, vol. 93(4), p. 485-492.*
- BRADY C.L., CLEENWERCK I., DENMAN, S., VENTER S.N., RODRÍGUEZ-PALENZUELA P., COUTINHO, T.A. DE VOS P. Proposal to reclassify *Brenneria quercina* (Hildebrand and Schroth 1967) Hauben et al. 1999 into a new genus, *Lonsdalea* gen. nov., as *Lonsdalea quercina* comb. nov., descriptions of *Lonsdalea quercina* subsp. *quercina* comb. nov., *Lonsdalea quercina* subsp. *iberica* subsp. nov. and *Lonsdalea quercina* subsp. *britannica* subsp. nov., emendation of the description of the genus *Brenneria*, reclassification of *Dickeya dieffenbachiae* as *Dickeya dadantii* subsp. *dieffenbachiae* comb. nov., and emendation of the description of *Dickeya dadantii*. *Int J Syst Evol Microbiol. 2012, vol. 62, p. 1592-1602.*
- BUREGYEYA, H., KUBIRIBA, J., TUSIIME, G., KITYO, R., SSEKIWOKO, F., TUSHEMERIERWE W. K. Role of Birds & Bats in Long Distance Transmission of Banana Bacterial Wilt in Uganda. *IJAIR. 2014, vol. 2, p. 636-640.*
- CHRISTENSEN, H., OLSEN, J. E. Phylogenetic relationships of *Salmonella* based on DNA sequence comparison of *atpD* encoding the β subunit of ATP synthase. *FEMS Microbiol Let. 1998, vol. 161, p. 89-96.*
- D'AURIA, S. R. N., M. C. CAMARGO, R. C. PACHECO, E. S. SAVANI, M. A. DIAS, A. R. DA ROSA, M. F. DE ALMEIDA, M. B. LABRUNA. Serologic survey for rickettsiosis in bats from São Paulo City, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis. 2010, vol. 10, p. 459-463.*
- HUTTERER, R., IVANOVA, T., MEYER-CORD, CH. AND RODRIGUES, L. 2005. Bat Migrations in Europe. 2005. *Naturschutz und Biologische Vielfalt, p. 162.*
- HORNOK, S., R. KOVÁCS, K. L. MELI, J. KONTSCHÁN, E. GÖNCZI, M. GYURANECZ, Á. DÁN, V. MOLNÁR, HOFMANN-LEHMANN, R. First detection of bartonellae in a broad host range of bat ectoparasites. *Vet. Microbiology. 2012, vol. 159, p. 541-543.*
- LAALAMI, S., PUTZER, H., PLUMBRIDGE, J. A., GRUNBERG-MANAGO, M. A severely truncated form of translational initiation factor 2 supports growth of *Escherichia coli*. *J Mol Biol. 1991, vol. 220, p. 335-340.*

LOFTIS, A. D., J. S. GILL, M. E. SCHRIEFER, M. L. LEVIN, M. E. EREMEEVA, M. J. GILCHRIST, G., DASCH, A. Detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Bartonella* in *Carios kelleyi* (Acari: Argasidae). *J. Med. Entomol.* 2005, vol. 42, p. 473-480.

LUDWIG, W., NEUMAIER, J., KLUGBAUER, N. et al. *Phylogenetic relationships of Bacteria based on comparative sequence analysis of elongation factor Tu and ATP-synthase beta-subunit genes.* *Antonie van Leeuwenhoek.* 1993, vol. 64, p. 285-305.

METEYER, C. U., BARBER, D., MANDL, J. N. Pathology in euthermic bats with white nose syndrome suggests a natural manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome. *Virulence.* 2012, vol. 3, s. 583-588.

MÜHLDORFER K, WIBBELT G, HAENSEL J, RIEHM J, SPECK S. *Yersinia* species isolated from bats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2010, vol. 16, p. 578-580.

REEVES, W. K., A. D. LOFTIS, J. A. GORE, G. DASCH A. Molecular evidence for novel *Bartonella* species in *Trichobius major* (Diptera: Streblidae) and *Cimex adjunctans* (Hemiptera: Cimicidae) from two southeastern bat caves, U.S.A. *J. Vector Ecol.* 2005, vol. 30, p. 339-341.

SORIA, S., LOPEZ, M., LOPEZ, M. J. Presencia, sintomatología y danos de *Erwinia quercina* en Espana y suposiblerelacion con la secade la encina. *Ecologia* 1997, vol. 11, p. 295-301.

TÓTH T., LAKATOS T., KOLTAY A. *Lonsdalea quercina* subsp. *populi* subsp. nov., isolated from bark canker of poplar trees *Int J Syst Evol Microbiol.* 2013, vol. 63, p. 2309-2313.

WONG S, LAU S, WOO P, YUEN K-Y. Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol.* 2007, vol. 17, p. 67-91.

Contact address: Veronika Kováčová Mgr. Ing., Department of Ecology and Diseases of Game, Fish and Bees, Palackeho tr. 1-3, 612 42 Brno Czech Republic, kovacovav@vfu.cz

Pseudogymnoascus destructans: Evidence of Virulent Skin Invasion for Bats Under Natural Conditions, Europe

¹Brichta Jiri, ¹Bandouchova Hana, ²Bartonicka Tomas, ³Berkova Hana, ⁴Cerny Jan, ¹Kovacova Veronika, ⁵Kolarik Miroslav, ⁶Kulich Pavel, ³Martinkova Natalia, ²Rehak Zdenek, ⁷Turner Gregory, ^{2,3}Zukal Jan, ¹Pikula Jiri

¹ Faculty of veterinary hygiene and ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

² Department of Botany and Zoology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

³ Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno, Czech Republic

⁴ Department of Cell Biology, Faculty of Science, Charles University in Prague, Prague, Czech Republic

⁵ Laboratory of Fungal Genetics and Metabolism, Institute of Microbiology ASCR, Prague, Czech Republic

⁶ Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

⁷ Pennsylvania Game Commission, Harrisburg, PA, USA

Summary

While *P. destructans* has been responsible for mass bat mortalities in North America, its virulence in Europe has been questioned. To elucidate host–pathogen interaction between European bats and *P. destructans*, we examined bats from the fungus-positive hibernacula in the Czech Republic. UV-illumination guided wing biopsies were taken from 6 species for histopathology and electron microscopy. Microscopy revealed oedema of the connective tissue and derangement of the fibroblasts and elastic fibres associated with skin invasion by *P. destructans*. Inflammatory infection attracted neutrophils at the interface between the damaged part of the wing membrane replaced by the fungus and non-invaded tissue. We show lesions pathognomonic for WNS are common in European bats and may include full-thickness fungal growth through the wing membrane equal to reports from N. America. Inter-continental differences in mortality outcome of WNS therefore may not be due to differences in the pathogen.

Keywords: *Pseudogymnoascus destructans*; WNS; Europe; inter-continental differences

Introduction

White-nose syndrome (WNS) has rapidly become a threat to six hibernating bat species in the United States and Canada since its emergence in 2006 (Blehert et al., 2009). and (Warnecke et al., 2012) described causal relationship between the fungus *P. destructans* infection of *Myotis lucifugus* and induction of WNS, with subsequent mortality for both North American and European isolates of the fungus. Mass mortalities have not been reported in European bats, despite the presence of *P. destructans* in many European countries (Martinkova et al., 2010; Puechmaille et al., 2011). These findings tend to support the ‘novel pathogen hypothesis’, suggesting that WNS may have originated in Europe (Warnecke et al., 2012). Little is known of host–pathogen interactions between European bats and *P. destructans*, previous results having been based on histopathological studies on few individuals (Pikula et al., 2012; Wibbelt et al., 2013). In addition, little is known of inter-continental differences in infection with WNS fungus, therefore, the objectives of the present study were to evaluate pathological findings associated with the WNS fungus infection using non-lethal collection of suspected lesions from several European bat species for standard histopathology and transmission electron microscopy (TEM).

Materials and Methods

We netted bats emerging from hibernacula from caves situated in the Moravian Karst, mines in the Jeseníky Mountains, and pseudo-karst caves in the Podyji National Park from 15 April to 3 May, 2013. Seventeen bats were collected: *Barbastella barbastellus*(1), *Myotis daubentonii*(1), *Myotis emarginatus*(1), *Myotis myotis*(11), *Myotis nattereri* (1) and *Plecotus auritus* (2). Wing-membrane biopsies were taken for histopathology and TEM, the samples

being fixed in 10% neutral buffered formalin and 2% glutaraldehyde, respectively. Biopsy of suspected WNS lesions was guided by trans-illumination of the wing with ultraviolet light. Formalin-fixed paraffin embedded samples were cut into tissue sections of 5µm and stained with acid–Schiff stain. Glutaraldehyde-osmium fixed biopsies for ultrathin sections were embedded in Epon–Durcupan mixture. The sections were then stained with 2% uranyl acetate and 2% lead citrate and observed under a Philips EM 208 TEM (FEI, Czech Republic). Classification of lesions as WNS-positive was based on diagnostic criteria (Meteyer et al., 2009). Ethical permissions: No. 169/2011 in compliance with Law No. 312/2008 on Protection of Animals against Cruelty, non-lethal sampling permissions were issued by Nature Conservation Agency (01662/MK/2012S/00775/MK/2012, 00356/KK/2008/AOPK).

Results and Discussion

All bats selected for ultramicroscopic analysis exhibited pinpoint orange–yellow fluorescent foci (range = 14–455 loci per left wing) and were PCR-positive for *P. destructans*. Microscopic findings were consistent with the histopathological criteria for WNS diagnosis, with fungal infection stages from superficial colonization of skin to tissue-invasive growth observed in sections from all bats examined. The most frequent lesions in WNS-positive sections were cup-like erosions packed with *P. destructans* hyphae locally invading the dermis. Severe invasive infection spanning the full thickness of the wing membrane was found in two specimens (*M. daubentonii* and *P. auritus*); TEM images provided higher resolution and finer detail than light microscopy, enabling comparison of successive *P. destructans* infection stages on the wing membrane. Fungal hyphae penetrated and separated stratum corneum layers on both sides of the wing membrane. Other layers of skin had an orderly structure with no sign of inflammation at sites of superficial skin colonization by the fungus.

In the most common cupping erosions were observed flattened layers of stratum corneum with some fungal hyphae become detached from the non-keratinized epidermis. Packed fungal hyphae erode close to the epidermal/dermal interface while individual hyphae penetrate between elastic fibres within the oedematous dermis. Closer look at skin pathology spanning the full thickness of the wing membrane revealed a marked inflammatory neutrophil infiltration at the interface between the damaged part of the wing membrane replaced by the fungus and membrane tissue not yet invaded by the pathogen. Ultramicroscopy revealed oedema of the connective tissue and derangement of the fibroblasts and elastic fibres associated with an overwhelming invasion by *P. destructans*.

We demonstrate that *P. destructans* is virulent for European bats under natural infection conditions. Because we do not also observe the morbidity and mortality associated with WNS in North America, it is likely that these outcomes of the disease are the result of yet unidentified determinants associated with the host, the agent and the environment. Our findings support the idea that inter-continental differences in bat mortality may not be due to differences in the pathogen itself (Warnecke et al., 2012). Furthermore, there is no support for the hypothesis that bat species in Europe are completely resistant to *P. destructans* infection (Warnecke et al., 2012; Wibbelt et al., 2013). Indeed, it is clear that natural fungal infection of European bats can result in severe lesions and not just a mild form restricted to the epidermis, as suggested in the latest pathological study (Wibbelt et al., 2013). The *M. myotis* we examined showed extensive skin infection, yet survived the hibernation season. While there can be little doubt that such extensive WNS infection must contribute to bat morbidity, we have no data on winter torpor pattern, hibernation behaviour or alteration in homeostasis for the specimens sampled; hence, our data cannot be directly aligned with the factors underlying mortality in North America (Warnecke et al., 2012, 2013). Host–pathogen interaction can

result in evolution of resistance or tolerance defence mechanisms against infection. Apart from resistance mediated by the immune system, hosts can tolerate a pathogen's presence by reducing its adverse effect on their fitness. While European bats seem tolerant of wing membrane infection, skin damage is linked to pathophysiology of WNS and mortality in American bats (Warnecke et al., 2013). Host fitness parameters plotted against pathogen burden distinguish between resistance and tolerance, bats sampled in the present study were not severely emaciated. Therefore, our data supports a lack of resistance to the infection.

While we cannot reach conclusions as to which attributes allow European bat species to survive *P. destructans* infection, our findings highlight the importance of inter-continental comparative studies on susceptibility, fungal load and transmission, total affected wing/body surface area, behavioural and physiological traits, hibernation environment and interplay between fungal pathogenic mechanisms and host defences in bat species.

Acknowledgements

Grant Agency of the Czech Republic (No. P506/12/1064), the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno (No. 32/2013/FVHE).

References

- BLEHERT, D. S., A. C. HICKS, M. BEHR, C. U. METEYER, B. M. BERLOWSKI-ZIER, E. L. BUCKLES, J. T. H. COLEMAN, S. R. DARLING, A. GARGAS, R. NIVER, J. C. OKONIEWSKI, R. J. RUDD, AND W. B. STONE, Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science* 2009, 323, 227.
- MARTINKOVA, N., P. BACKOR, T. BARTONICKA, P. BLAZKOVA, J. CERVENY, L. FALTEISEK, J. GAISLER, V. HANZAL, D. HORACEK, Z. HUBALEK, H. JAHELKOVA, M. KOLARIK, L. KORYTAR, A. KUBATOVA, B. LEHOTSKA, R. LEHOTSKY, R.K. LUCAN, O. MAJEK, J. MATEJU, Z. REHAK, J. SAFAR, P. TAJEK, E. TKADLEC, M. UHRIN, J. WAGNER, D. WEINFURTOVA, J. ZIMA, J. ZUKAL, AND I. HORACEK, Increasing incidence of *Geomyces destructans* fungus in bats from the Czech Republic and Slovakia. *PLoS ONE* 2010, 5, e13853.
- METEYER, C. U., E. L. BUCKLES, D. S. BLEHERT, A. C. HICKS, D. E. GREEN, V. SHEARN-BOCHSLER, N. J. THOMAS, A. GARGAS, AND M. J. BEHR, Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009, 21, 411–414.
- PIKULA, J., H. BANDOUCHOVA, L. NOVOTNY, C. U. METEYER, J. ZUKAL, N. R. IRWIN, J. ZIMA, AND N. MARTINKOVA, Histopathology confirms white-nose syndrome in bats in Europe. *J. Wildl. Dis.* 2012, 48, 207–211.
- PUECHMAILLE, S.J., G. WIBBELT, V. KORN, H. FULLER, F. FORGET, K. MUHLDOERFER, A. KURTH, W. BOGDANOWICZ, C. BOREL, T. BOSCH, T. CHEREZY, M. DREBET, T. GORFOL, A. J. HAARSMA, F. HERHAUS, G. HALLART, M. HAMMER, C. JUNGSMANN, Y. LE BRIS, L. LUTSAR, M. MASING, B. MULKENS, K. PASSIOR, M. STARRACH, A. WOJTASZEWSKI, U. ZOPHEL, AND E. C. TEELING, Pan-European distribution of white-nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) not associated with mass mortality. *PLoS ONE* 2011, 6, e19167.
- WARNECKE, L., J.M. TURNER, T.K. BOLLINGER, J.M. LORCH, V. MISRA, P.M. CRYAN, G. WIBBELT, D.S. BLEHERT, AND C.K.R. WILLIS, Inoculation of bats with European *Geomyces destructans* supports the novel pathogen hypothesis for the origin of white-nose syndrome. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 2012, 109, 6999–7003.
- WARNECKE, L., J.M. TURNER, T.K. BOLLINGER, V. MISRA, P. M. CRYAN, D.S. BLEHERT, G. WIBBELT, AND C.K. WILLIS, Pathophysiology of white-nose syndrome in bats: a mechanistic model linking wing damage to mortality. *Biol. Letters* 2013, 9, 20130177.
- WIBBELT, G., S.J. PUECHMAILLE, B. OHLENDORF, K. MÜHLDOERFER, T. BOSCH, T. GÖRFÖL, K. PASSIOR, A. KURTH, D. LACREMANS, AND F. FORGET, Skin lesions in European hibernating bats associated with *Geomyces destructans*, the etiologic agent of whitenose syndrome. *PLoS ONE* 2013, 8, e74105.
- Kontaktní adresa:** Jiří Brichta, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvířet, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, jiri.brichta@seznam.cz

Vplyv bioklimatologických faktorov na zdravotný stav hibernujúcich netopierov

Effect of bioclimatological factors on the health of hibernating bats

¹Benkő Zoltán, ¹Ondrejková Anna, ¹Ondrejka Róbert, ¹Prokeš Marián, ²Korytár Ľuboš

¹Ústav epizootológie a preventívnej veterinárnej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

²Ústav hygieny zvierat a životného prostredia, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

Summary

Worldwide there are cave complexes, old mining tunnels, attics of buildings and other places that use bats as a place of refuge, hibernation and reproduction. There are located different species of bats, and each of these places has its own specific bioclimate. These places vary, depending on which altitude and in which climate zone they are located in. All these factors interact on the incidence of infectious diseases and the length of the bat hibernation. The result of adverse weather conditions, disease incidence of white nose syndrome, the originator of the mold *Pseudogymnoascus destructans*. Hibernation period of bats is often due bioclimatics shortened, resulting in an increased incidence of infectious diseases and also increased mortality.

Keywords: bats; bioclimate; hibernation; *Pseudogymnoascus destructans*

Úvod

Všetkých 28 druhov netopierov vyskytujúcich sa na území Slovenskej republiky patrí do skupiny chránených živočíchov podliehajúcich legislatívnej ochrane na národnej a medzinárodnej úrovni. Druhy netopierov, ktoré žijú na Slovensku vytvárajú často pomerne početné zoskupenia – letné reprodukčné kolónie, páriace zoskupenia na jeseň alebo aj niekoľkotisícové agregácie na zimoviskách. Veľkosť skupín je rozdielna u jednotlivých druhov. Netopierí rok začína v januári hlbokým zimným spánkom na bezpečných miestach, kde sú pomerne stabilne klimatické podmienky. Preberajú sa keď ustúpi zima - prevažne v marci alebo apríli. Niekoľkokrát sa preberajú spontánne aj počas zimy, aby doplnili zásoby vody alebo niečo ojedinele aj ulovili. Ak sú podmienky na zimovisku nevhodné, netopiere sa prebudia a preletia na iné. V tomto období sú veľmi zraniteľné a citlivé na vyrušovanie náchylné na ochorenia. Jar, v období od marca do apríla, je charakteristická migráciou na miesta reprodukcie, kde sa zoskupujú takmer výlučne samice. Samčekovia v tomto čase sú zväčša oddelene v malých skupinkách. Mláďatá sa rodia v júni a júli, pričom samičky môžu mať jedno, príp. dve mláďatá do roka. Mláďatá krmia mliekom a čoskoro začnú už sami lietať a loviť hmyz. V septembri je už mláďa na nerozoznanie od dospelého jedinca. V jeseni sa zasa zoskupujú kvôli páreniu. U viacerých druhov sa samec pári s viacerými samicami v takzvanom háreme. Sú to veľmi špecifické prispôbenia ako prekonať v rámci reprodukčného cyklu nepriaznivé obdobie (1).

Materiál a metódy

V roku 2014 sme spolu s členmi SON (Spoločnosť pre ochranu netopierov na Slovensku) na základe výnimky MŽP SR pre UVLF v Košiciach a pre členov organizácie SON vykonávali monitoring výskytu a praktickú ochranu netopierov v oblasti bankských štôlní v okrese Banská Štiavnica. Zároveň sme vykonali monitoring výskytu ochorenia Syndrómu bieleho nosa, merania teploty a vlhkosti vzduchu pomocou Analógového vlasového vlhkomera s teplomera Koch 45207.

Monitoring sa vykonával v starých bankských dielach v Štiavnických vrchoch na katastrálnych územiach miest a obcí Hodruša - Hámre, Voznica, Svätý Anton a Banská Štiavnica. Ako

lokality odchyty sme vybrali nasledovné banské diela – Štôľňa Anton, Banište - Kopanice (Hodruša – Hámre), Dedičná štôľňa (Voznica), Jurajova štôľňa (Svätý Anton) a baňa Šopfer (Banská Štiavnica).

Každý jedinec bol klinicky prehladnutý, identifikovaný, zaevidovaný a zdokumentovaný.

Výsledky

Informácie a výsledky získané z monitoringu starých banských diel ako aj počty a druhy sledovaných jedincov sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Zhrnutie výsledkov

Miesto	Dátum	Teplota (°C)	Vlhkosť (%)	Počet	Druhy	Prítomnosť plesňových povlakov
Štôľňa Anton	13.12.2014	7	85	15	Myotis myotis	Neg.
				7	Barbastella barbastellus	
Banište - Kopanice	13.12.2014	6	95	5	Myotis myotis	Neg.
Dedičná štôľňa	14.12.2014	5	92	20	Myotis myotis	Neg.
				8	Barbastella barbastellus	
Jurajova štôľňa	14.12.2014	8	95	9	Myotis myotis	Neg.
				6	Plecotus auriculatus	
Baňa Šopfer	14.12.2014	5	90	22	Myotis myotis	Neg.
				10	Rhinolophus hipposideros	

Diskusia

Najviac prípadov ochorenia *White nose syndrome (WNS)* je pozorovaných v Severnej Amerike, kde bolo ochorenie aj prvý krát popísané a odkiaľ sa pravdepodobne rozšírilo. WNS bol prvýkrát zaznamenaný v roku 2006 na netopieroch z jaskyne Howes Cave v štáte New York, USA (2).

Už v roku 2013 americkí chiropterológovia napočítali 113 premorených lokalít od chladnejších oblastí Kanady až po teplé oblasti USA na juhu v Alabame (3).

Pseudogymnoascus destructans je psychrofilný druh plesne s optimálnym rastom v laboratórnych podmienkach pri teplote 4 – 14°C (4).

Podľa Bucklesa a Ballmanna je optimálne teplotné rozmedzie pre rast plesne *P. destructans* v laboratórnych podmienkach od 4 do 10°C. Toto rozmedzie je podobné sezónnym teplotám na zimoviskách netopierov, kde môže rásť celoročne a tak vytvárať rezervoár nákazy. Rast plesne sa zastaví, ak teplota prostredia vystúpi nad 20°C (5).

Rhinolophus hipposideros je zvláštny druh, pretože žije a hibernuje výlučne osamelo, počas hibernácie visí voľne na exponovaných miestach, krídlými membránami si zakrýva hornú časť tela. Je schopný hibernovať aj pri vyšších teplotách, ale vyžaduje stabilnú mikroklímu. *R. hipposideros* je tiež najhojnejším sledovaným druhom v zime. Predpokladaný počet týchto netopierov na českých zimoviskách je viac ako 50% zo všetkých netopierov (nepublikované)

údaje, Slovenská spoločnosť pre ochranu netopierov). Z hľadiska životného prostredia, hustoty a schopnosti prenosu nákazy patrí *Rhinolophus* medzi zanedbateľné druhy (6).

Záver

Celkovo sme zdokumentovali 102 jedincov rôznych druhov insektivorných netopierov. Ani na jednom z nich sme nezaznamenali prítomnosť povlakov plesne *Pseudogymnoascus destructans*, aj keď podmienky pre rast plesne boli ideálne. Všetky banské diela mali optimálne klimatické podmienky pre hibernáciu netopierov a neboli zaznamenané žiadne výrazné klimatické výkyvy. Z výsledkov nemožno presne určiť, že sa dané ochorenie v nami vybratých lokalitách nevyskytuje, nakoľko sme nemohli fyzicky zrealizovať dokumentáciu všetkých jedincov na danom mieste.

Podakovanie

Táto práca bola vytvorená s podporou projektu APVV – 0605-12 a VEGA 1/0591/15 .

Literatúra

1<http://www.netopiere.sk/netopiere/socialny-zivot/>

2BLEHERT, D. S., et al.; Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen?, Science. 2009, vol. 323, no. 5911, s. 227.

3<http://www.vedaprozivot.cz/sd/novinky/hlavni-stranka/140603-spatne-zpravy-pro-netopyry.html>

4CHATURVEDI, V., et al.; Morphological and molecular characterizations of psychrophilic fungus *Geomyces destructans* from New York bats with White Nose Syndrome (WNS). PLoS ONE .2010, vol. 5, no. 5, e10783. doi:10.1371/journal.pone.0010783

5BLEHERT, D. S., et al.; Bat white-nose syndrome: An emerging fungal pathogen?, Science. 2009, vol. 323, no. 5911, s. 227.

6ZUKAL, J.; White-Nose Syndrome Fungus: A Generalist Pathogen of Hibernating Bats, PLoS ONE. Published: September 29, 2014, DOI: 10.1371/journal.pone.0108714

Kontaktná adresa: Zoltán Benkő MVDr., Ústav epizootológie a preventívnej veterinárnej medicíny, Katedra epizootológie a parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, zoltan.benko@student.uvlf.sk

Výskyt vybraných zoonotických bakterií u plazů, drobných savců a ptáků

Occurrence of selected zoonotic bacteria in reptiles, mammals and birds

¹Tomáščíková Zuzana, ²Barazorda Romero Silvia, ²Knotek Zdeněk, ¹Karpíšková Renáta

¹ Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

² Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

Zoonotic bacterial pathogens causing gastrointestinal diseases in humans, e. g. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, enterotoxigenic and verotoxigenic *Escherichia coli*, has been isolated from many sources including exotic animals. In this study, the occurrence of these zoonotic pathogens was monitored in exotic animals (reptiles, guinea pigs, rabbits, ferrets, and exotic birds) kept in households. The samples of nasal and rectal swabs were collected and further investigated using the reference methods (ČSN EN ISO). From 87 examined animals (66 reptiles, 18 mammals and 3 birds) 13 strains of *Salmonella* spp. (in 10 animals), 2 enterotoxigenic *Escherichia coli* strains (in 2 animals) and 3 strains of *Staphylococcus aureus* (in 3 animals) were isolated. The obtained isolates of *Salmonella* spp. belonged to several different serotypes. The results of this study confirm that exotic animals, especially reptiles kept as pet animals pose an important source of zoonotic bacteria, mainly *Salmonella* spp.

Keywords: *Salmonella* spp.; *Listeria monocytogenes*; *Campylobacter* spp.; *Staphylococcus aureus*; *Escherichia coli*; ETEC; VTEC

Úvod

V domácnostech jsou často chována zvířata exotických druhů, která mohou být osídlena různými baktériemi, včetně původců zoonóz. Při úzkém kontaktu lidí se zvířaty hrozí riziko přenosu patogenů mezi zvířetem a majitelem, což může následně vést k rozvoji onemocnění. V rámci naší studie jsme u exotických zvířat sledovali přítomnost vybraných zoonotických bakterií způsobujících zejména gastrointestinální onemocnění člověka. Konkrétně se jednalo o bakterie *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., enterotoxigenní (ETEC) a verotoxigenní (VTEC) kmeny *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) a *Listeria monocytogenes* (*L. monocytogenes*). Studie zaměřující se na detekci a charakterizaci těchto agens u exotických zvířat chovaných v zajetí byly v minulosti realizovány v různých zemích (např. Piasecki a kol., 2014, Espinosa Gongora a kol., 2012). Podobná studie však dosud nebyla v rámci České republiky zpracována. Screening výskytu těchto patogenů byl proveden u souboru plazů, drobných savců a ptáků chovaných v domácnostech a na Klinice chorob ptáků, plazů a drobných savců Veterinární a farmaceutické univerzity Brno.

Materiál a metody

U každého zvířete byly provedeny dva výtěry odběrovými tampony – u savců z nozder a rekta, u plazů a ptáků z kloaky a dutiny ústní. Po odběru byly tampony vloženy do transportního média dle Amiese (Copan, Itálie). Spektrum vyšetřovaných patogenů zahrnovalo u rektálních/kloakálních výtěrů celkem pět patogenů (*Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*), u nasálních/orálních výtěrů byla vyšetřována přítomnost *L. monocytogenes* a *S. aureus*. Vzorby byly na přítomnost *Salmonella* spp. vyšetřovány v souladu s normou ČSN ISO 6579. Suspektní kolonie byly konfirmovány metodou skličkové aglutinace za použití komerčních antisér (Denka Seiken, Japonsko, BioRad, Francie). Pozitivní zvířata byla vyšetřena opakovaně (jedno opakování). Spolu s nimi byly vyšetřeny stěry z prostředí terárií a zvířata, která byla při prvním vyšetření negativní, ale obývala stejnou ubikaci jako pozitivní případy. Podle normy ČSN ISO 4831 byly vzorky dále

vyšetřeny na přítomnost *E. coli*. Enterotoxigenní kmeny byly identifikovány metodou multiplex PCR – detekce genů LT a STa (Alexa a kol., 1997). Vyšetření na přítomnost *S. aureus* bylo provedeno podle modifikované normy ČSN ISO 6888. Stěry byly po pomnožení v pufrované peptonové vodě vyočkovány na médium Baird Parker a suspektní kolonie byly potvrzeny metodou multiplex PCR – detekce genu SA 442 (Martineau a kol., 1998). Detekce *Campylobacter* spp. byla provedena podle modifikované normy ČSN ISO 10272, u *L. monocytogenes* pak podle ČSN ISO 11290-1.

Výsledky

Výtěry byly získány od 87 zvířat, z toho 66 plazů, 18 savců a 3 exotických ptáků. Z vyšetřovaných patogenů byly zachyceny bakterie rodu *Salmonella* spp., ETEC a *S. aureus*. *Salmonella* spp. byla detekována u 10 zvířat (11,5 % ze všech zvířat). Opakovanými vyšetřeními těchto zvířat bylo získáno celkem 13 izolátů. Všechny tyto izoláty pocházely od plazů a náležely k různým sérotypům (Tab. 1). Opakovaně bylo vyšetřeno 8 zvířat. Ve stěrech z prostředí terárií byly zachyceny 2 izoláty salmonel sérotypu *S. II 40:g,t:-* a *S. Fluntern*.

Tabulka 1: Přehled získaných izolátů salmonel a jejich sérotypů

č.	Původ izolátu	Počet izolátů	Kód chovatele	První vyšetření/ sérotyp	Druhé vyšetření/ sérotyp
1.	Želva vroubená	1	A	<i>S. II 1,13,23:z29:1,5</i>	negativní
2.	Gekončík noční	2	A	<i>S. II 40:g,t:-</i>	<i>S. Tennessee</i>
3.	Gekončík noční	2	A	<i>S. Fluntern</i>	pozitivní, dosud neurčeno
4.	Gekončík noční	2	A	<i>S. Fluntern</i>	pozitivní, dosud neurčeno
5.	Želva nádherná	1	A	<i>S. Enteritidis</i>	negativní
6.	Gekončík noční	1	A	negativní	pozitivní, dosud neurčeno
7.	Gekončík noční	1	A	negativní	<i>S. II 6,8:g,m,t:1,7</i>
8.	Gekončík noční	1	A	negativní	<i>S. II 6,7:g,m,t:e,n,x</i>
9.	Agama vousatá	1	B	pozitivní, dosud neurčeno	neprovedeno
10.	Želva zelenavá	1	B	pozitivní, dosud neurčeno	neprovedeno
11.	Stěr z terária T2	1	A	<i>S. II 40:g,t:-</i>	neprovedeno
12.	Stěr z terária T5	1	A	<i>S. Fluntern</i>	neprovedeno

Dále byly izolovány 3 kmeny *S. aureus* (ze 3 savců - morčat) a 2 izoláty ETEC ze 2 plazů. *L. monocytogenes*, ani *Campylobacter* spp. nebyly u vyšetřovaných zvířat detekovány.

Diskuse

Screening výskytu vybraných patogenů byl proveden u různých druhů exotických zvířat chovaných v zajetí. Největší část studie představovali plazi vzhledem k častému nosičství zoonotických patogenů, především salmonel (Piasecki a kol., 2014). Počet plazů pozitivních na přítomnost *Salmonella* spp. v naší studii (15,2 %) byl ve srovnání s dostupnými studiemi nižší. V Polsku bylo pozitivních 32,6 % zvířat (Piasecki a kol., 2014), v Německu a Rakousku 54,1 % zvířat (Geue a Löschner, 2002). Metoda průkazu salmonel byla v obou případech shodná s přístupem užitým v naší studii (EN ISO). Rozdíly v prevalenci salmonel napříč studiemi lze vysvětlit vyšším počtem vyšetřovaných zvířat, která pocházela z různých zdrojů. Dále lze zohlednit, že v naší studii byl odebírán pouze výtěr a v zahraničních studiích trus. U odběru trusu je vyšší pravděpodobnost záchytu patogena, díky většímu množství vyšetřovaného materiálu. Protože jsou salmonely schopné šířit se s trusem infikovaných (kolonizovaných) zvířat do prostředí (Bauwens a kol., 2006), provedli jsme také stěry z terárií, ve kterých byla chována zvířata s potvrzeným vylučováním salmonel. Sérotyp získaný z prostředí terária T2 (*S. II 40:g,t:-*) se lišil od sérotypu získaného od dvou pozitivních

zvířat z tohoto terária (*S. Fluntern*). Je známo, že jeden plaz může být nositelem více sérotypů současně (Seibeling a kol., 1975), pozitivní jedinci tedy mohli nést i sérotyp izolovaný z prostředí, který se ovšem nepodařilo v tomto případě detekovat. Tuto teorii podporuje také nález dvou různých sérotypů (*S. II 40:g,t:-* a *S. Tennessee*) u jednoho z plazů. Opakovaná vyšetření ukázala, že z 5 pozitivních zvířat (nesoucích sérotypy *S. II 1,13,23:z29:1,5*; *S. Fluntern*; *S. II 40:g,t:-* a *S. Enteritidis*) byla 3 zvířata při druhém vyšetření opět pozitivní. Jedno z těchto zvířat vylučovalo při druhém vyšetření jiný sérotyp (*S. Tennessee*), než při prvním vyšetření (*S. II 40:g,t:-*). U dalších dvou z těchto zvířat se sérotyp získaný opakovaným vyšetřením dosud nepodařilo určit. Tři původně negativní jedinci (chovaní v teráriu společně s pozitivními), byli při druhém vyšetření pozitivní. Dvě z těchto zvířat vylučovaly sérotypy *S. II 6,8:g,m,t:1,7* a *S. II 6,7:g,m,t:e,n,x*, tyto se neshodovaly se sérotypy získanými od ostatních zvířat z tohoto terária (*S. II 40:g,t:-*; *S. Tennessee*; *S. Fluntern*). U třetího zvířete nebyl sérotyp dosud určen. Tyto výsledky odpovídají předpokladu, že je *Salmonella* spp. vylučována trusem infikovaných zvířat nepravidelně (Geue a Löschner, 2002). Toto tvrzení dále podporuje skutečnost, že ve stěru z terária T5 byla izolována *Salmonella* spp., ačkoliv zvířata z této ubikace (celkem 6) byla negativní, tedy byla vyšetřena pravděpodobně v období nevylučování patogena. Lze z tohoto odvodit, že pro detekci salmonel u plazů je nutné více než jedno vyšetření. Dále tyto výsledky poukazují na skutečnost, že plazi mohou být nositeli rozmanitého spektra sérotypů salmonel (Pasmans a kol., 2008). *S. aureus* byl izolován z nasálních výtěrů tří morčat. Zvířata obývala společnou ubikaci, patogena si tak mohla předávat přímým kontaktem. Studie provedená v Kodani u savců i plazů udává 40,4% prevalenci *S. aureus* u savců, přičemž tato je srovnatelná s prevalencí *S. aureus* v humánní populaci. Plazi byli v této studii negativní, což indikuje, že pravděpodobně nejsou přirozenými hostiteli této bakterie (Espinosa Gongora a kol., 2012). Také v naší studii nebyl *S. aureus* detekován u žádného z plazů. Dalším z izolovaných patogenů byla ETEC získaná z kloakálních výtěrů dvou plazů. Prevalence ETEC byla studována u exotických zvířat v Jižní Africe, kde byl identifikován jeden kmen u ptáka (Mtshali a kol., 2012). Nízkou prevalenci v naší i africké studii lze vysvětlit tím, že ETEC kmeny mají variabilní schopnost vázat se na enterocyty různých druhů zvířat (Zhang a kol., 2006). *L. monocytogenes* a *Campylobacter* spp. nebyly v naší studii detekovány. Z dostupných zdrojů však vyplývá, že se u exotických zvířat vyskytují, např. 11,5% prevalence *L. monocytogenes* u plazů v Německu (Weber a kol., 1993), nebo 44,8% prevalence *Campylobacter* spp. u plazů v Nizozemsku (Gilbert a kol., 2014).

Závěr

Výsledky studie potvrzují, že exotická zvířata chovaná v domácnostech mohou být rezervoárem zoonotických bakterií, zejména salmonel.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem LO1218, MŠMT v rámci programu NPU I. Poděkování náleží i Mgr. Petře Myškové, Ing. Markétě Auerové a MUDr. Daniele Dědičové, CSc. za sérotypizaci detekovaných izolátů salmonel.

Literatura

Seznam literatury je k dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Zuzana Tomáščíková, MVDr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i. Hudcova 296/70. Brno 621 00, H14391@vfu.cz

Klíšť lužní (*Haemaphysalis concinna*) – podceňovaný vektor?

Haemaphysalis concinna – underestimated vector?

Rybářová Markéta, Široký Pavel

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

Summary

Haemaphysalis concinna is in the Czech Republic present only in area of South Moravia. It inhabits humid lowlands along rivers and deciduous forests. Its occurrence has seasonal peaks – adults are most common from April to September, according to outdoor temperature. It is known vector of many tick borne diseases. We tested 87 *H. concinna* for presence of tick-borne pathogens during our study. Ticks were collected by flagging during 2009 – 2011 on different localities in the South Moravia. Surveyed pathogens – *Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. – are causative agents of diseases of domestic animals and also have a zoonotic potential. We carried out diagnostic PCR; species determination was done by sequencing and consecutive BLAST analysis. We confirmed presence of *Anaplasma phagocytophilum* in 11 ticks (12,6 %) and presence of *Babesia* similar to *B. canis* in two ticks (2,3 %). We did not confirmed presence of *Theileria* spp.

Keywords: *Haemaphysalis concinna*; *Anaplasma phagocytophilum*; *Babesia*; anaplasmosis; babesiosis; theileria

Úvod

Vzhledem ke stoupající incidenci klíšťaty přenosných onemocnění jsme se v rámci této studie zaměřili na epidemiologicky opomíjený druh klíštěte vyskytujícího se na území České republiky a na patogeny, které může přenášet. Klíšť lužní (*Haemaphysalis concinna*) se v České republice vyskytuje pouze v oblasti jižní Moravy, kde obývá vlhké nížinné biotopy zejména v okolí listnatých lesů v povodí řeky Moravy. Vyskytuje se sezónně, vrchol aktivity dospělců se nachází mezi dubnem a zářím v závislosti na okolní teplotě. Jeho hostitelské spektrum je podobné spektru sympatricky se vyskytujícího klíštěte obecného (*Ixodes ricinus*). V rámci diagnostiky jsme se zaměřili na tři patogeny, které způsobují onemocnění domácích i hospodářských zvířat a zároveň mají zoonotický potenciál.

Anaplasma phagocytophilum způsobuje akutní horečnaté onemocnění člověka i zvířat, zejména psů, přežvýkavců a koní. Tato bakterie napadá granulocyty a nemoc může být fatální (Stuen et al. 2013). Rod *Babesia* zahrnuje protozoární parazity, kteří napadají erythrocyty a způsobují hemolytické onemocnění zvířat i lidí. Zoonotický potenciál mají v Evropě tři zástupci, konkrétně *B. divergens*, *B. microti* a *B. sp. EU1*. Všechny tři jsou přenášeny klíštětem obecným (Kjemtrup a Conrad 2000). Theilerie napadají leukocyty a theilerioza se popisuje hlavně u skotu (Bishop et al. 2004).

Materiál a metody

V rámci studie jsme vyšetřili 87 klíšťů lužních. Tato klíšťata byla navlajkována z vegetace v průběhu let 2009 až 2011 na území jižní Moravy. Extrakci DNA jsme provedli metodou alkalické hydrolýzy. Její princip spočívá ve vaření rozdrčených klíšťat v roztoku hydroxidu amonného (Rijpkema et al. 1996).

Pro zjištění přítomnosti anaplasem jsme použili metodu nested PCR, která amplifikuje cca 430 bp dlouhý úsek genu pro 16S rRNA (Majláthová et al. 2011). Babesie jsme detekovali taktéž metodou nested PCR, která amplifikuje cca 790bp dlouhý úsek genu pro 18S rRNA (Jefferies et al. 2007). Pro diagnostiku theilerií jsme zvolili PCR pro amplifikaci cca 620bp

dlouhého úseku genu pro 18S rRNA (Fuehrer et al. 2013). Pozitivní PCR produkty jsme přečistili komerčním kitem Gel/PCR DNA Fragment Extraction Kit DF100 (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) a poslali na sekvenaci (Macrogen, Nizozemí). Získané sekvence genů jsme upravili v programu Mega6 (Tamura et al. 2013) a následnou druhovou determinaci jsme provedli porovnáním s databází GenBank v programu BLAST (Altschul et al. 1990).

Výsledky

PCR a následná BLAST analýza potvrdily přítomnost *A. phagocytophilum* v 11 *H. concinna* (12,6 %) a přítomnost izolátu geneticky blízkého *B. canis* ve dvou *H. concinna* (2,3 %). Přítomnost zástupců rodu *Theileria* jsme nepotvrdili.

Diskuse

Přestože *A. phagocytophilum* nebyla v klíštích popsána, její přítomnost ještě nemusí nutně znamenat schopnost klíštěte tímto patogenem infikovat své hostitele. Přítomnost parazita blízkého *B. canis* je zajímavá z hlediska hostitelské specifity na úrovni vektora, protože přirozeným vektorem *B. canis* je piják lužní (*Dermacentor reticulatus*) (Kubelová et al. 2011). Zároveň na území ČR doposud nebyla přítomnost tohoto parazita popsána, takže není pravděpodobné, že by se klíšť nasál na infikovaném hostiteli. U tohoto izolátu bude vhodné diagnostiky doplnit ještě amplifikací celého genu pro 18S rRNA pro definitivní druhové určení.

Závěr

Přestože je klíšť lužní opravdu minoritním druhem klíštěte na území ČR a jeho areál výskytu je omezený pouze na jižní Moravu, neměl by být přehlížen jako potenciální vektor závažných onemocnění. Námi potvrzení parazité by mohli být tímto klíštětem přenášeni a ohrožovat tak nejen zvířata v domácích a hospodářských chovech, ale i člověka.

Poděkování

Studie byla částečně financována z projektu IGA VFU, projekt číslo 11/FVHE/2014.

Literatura

- ALTSCHUL, Stephen F., Warren GISH, Webb MILLER, Eugene W. MYERS a David J. LIPMAN, 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* [online]. 5.10., roč. 215, č. 3, s. 403–410.
- BISHOP, R., A. MUSOKE, S. MORZARIA, M. GARDNER a V. NENE, 2004. Theileria: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology*. roč. 129 Suppl, s. S271–283.
- FUEHRER, Hans-Peter, Nora BIRO, Josef HARL, Hanna L. WORLICZEK, Christoph BEIGLBÖCK, Robert FARKAS, Anja JOACHIM a Georg G. DUSCHER, 2013. Molecular detection of Theileria sp. ZS TO4 in red deer (*Cervus elaphus*) and questing Haemaphysalis concinna ticks in Eastern Austria. *Veterinary Parasitology* [online]. 8.11., roč. 197, č. 3–4, s. 653–657.
- JEFFERIES, R., U. M. RYAN a P. J. IRWIN, 2007. PCR–RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology* [online]. 15.3., roč. 144, č. 1–2, s. 20–27.
- KJEMTRUP, A. M. a P. A. CONRAD, 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *International Journal for Parasitology* [online]. 11., roč. 30, č. 12–13, Thematic Issue: Emerging Parasite Zoonoses, s. 1323–1337.
- KUBELOVÁ, Michaela, Emil TKADLEC, Marek BEDNÁŘ, Eva ROUBALOVÁ a Pavel ŠIROKÝ, 2011. West-to-east differences of Babesia canis canis prevalence in Dermacentor reticulatus ticks in Slovakia. *Veterinary Parasitology* [online]. 25.8., roč. 180, č. 3–4, s. 191–196.

MAJLÁTHOVÁ, Viktória, Igor MAJLÁTH, Bronislava VÍCHOVÁ, Ivana GUL'OVÁ, Markéta DERDÁKOVÁ, Edina SESZTÁKOVÁ a Branislav PET'KO, 2011. Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* [online]. 11., roč. 11, č. 11, s. 1447–1451.

RIJPKEMA, S., D. GOLUBIĆ, M. MOLKENBOER, N. VERBEEK-DE KRUIF a J. SCHELLEKENS, 1996. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental & Applied Acarology*. 1., roč. 20, č. 1, s. 23–30.

STUEN, Snorre, Erik G. GRANQUIST a Cornelia SILAGHI, 2013. *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 22.7., roč. 3.

TAMURA, Koichiro, Glen STECHER, Daniel PETERSON, Alan FILIPSKI a Sudhir KUMAR, 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* [online]. 1.12., roč. 30, č. 12, s. 2725–2729.

Kontaktní adresa: Markéta Rybářová, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, Brno 612 42. Rybarova.marketa@gmail.com

Editace:	Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	XVII. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	161
Vydání:	1.
Rok vydání:	2015
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-758-9