

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

Ústav hygieny a technologie mléka

FAKULTA VETERINÁRNÍHO LÉKAŘSTVÍ

Ústav mikrobiologie a imunologie

**XII. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH
PRACOVNÍKŮ
S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ**

SBORNÍK



VFU Brno 2. 6. 2010

OBSAH

SEKCE A1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Kvalita srnčí zvěřiny Dominik P., Saláková A., Steinhauser L., Buchtová H.	11
Změny vlhkosti a vodní aktivity játrové paštiky a šunky během skladování v režimu teplot 8, 15 a 25 °C Klepáčová A., Hanák M.	14
Vliv přírodních antioxidantů na oxidaci tuků u trvanlivých fermentovaných salámů Pavlík Z., Saláková A., Kameník J., Buchtová H., Steinhauserová I.	17
Vliv složení modifikované atmosféry plynů na oxidační procesy svaloviny lososa Řičáňková B., Buchtová H.	20
Hodnocení zmasilosti u JUT prasat pomocí analýzy obrazu Randulová Z., Gallas L., Pospiech M., Štarha P., Tremlová B., Steinhauser L.	23
Oxidační změny ve svalovině bažanta obecného (<i>Phasianus colchicus</i> spp. <i>torquatus</i>) v závislosti na způsobu skladování Tománková J., Gallas L., Steinhauserová I.	26
Hodnocení mléka a mléčných výrobků z hlediska zastoupení vybraných mastných kyselin v dietě populace ČR Steinhauserová P.	29
Rezistentné enterokoky v surovom kravskom mlieku Bezeková J., Kročko M., Ducková V., Čanigová M.	32
Identifikace laktobacilů izolovaných z potravin pomocí PCR a MALDI-TOF MS Dušková M., Šedo O., Zdráhal Z., Karpíšková R.	35
Patogenní potenciál <i>L. monocytogenes</i> z potravin Gelbíčová T., Karpíšková R.	38
Stanovení vybraných mikrobiálních ukazatelů u syrového kravského mléka získaného z prodejních automatů Vaňáč V., Kopuncová M., Gelbíčová T., Trivedi K., Cupáková Š., Necedová L., Janštová B., Karpíšková R.	41
Charakteristika technologických a ochranných vlastností novoizolovaných laktobacilov Smetanková J., Sopčáková Z., Greif G., Greifová M.	44
Význam a aplikácia ochranných kyslomliečnych baktérií voči <i>Staphylococcus aureus</i> in vitro Sopčáková Z., Smetanková J., Greif G., Greifová M., Pálosová E.	47
Bacteriocin production by enterococci isolated from foodstuffs Trivedi K., Sedmíková R., Karpíšková R.	50
Redukcia mastitíd stafylokokovej etiológie v stáde dojníc Zigo F., Vasiľ M., Elečko J.	53

Studie odolnosti vybraných bakteriálních druhů izolovaných z potravinářského průmyslu vůči různým desinfekčním látkám Červinková D., Jaglič Z., Vlková H., Babák V.	56
--	----

SEKCE A2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ

Čaj a jeho účinky na lidské zdraví Ošťádalová M., Pažout V., Straka I.	59
Stanovení karotenů a xanthofylů v rajčatových kečupech Tauferová A., Tremlová B., Straka I., Pokorná J.	63
Rostlinné oleje jako významný zdroj mastných kyselin ve výživě nosnic Hudečková P., Straková E., Suchý P.	67
Krmivo rostlinného původu jako zdroj <i>Salmonella</i> Havana v chovech drůbeže Kopuncová M., Černý T., Karpíšková R.	70
Vliv čistého a surového glycerolu na užítkovost brojlerových kuřat Kroupa L., Suchý P., Straková E.	73
Vybrané parametre vnútorného prostredia u dojníc slovenského strakatého dobytká v období po otelení Lešková L., Tóthová C., Kováč G.	77
Vliv přípravku ZeoFeed jako krmné aditivum na užítkovost nosnic Macháček M., Straková E., Suchý P.	80
Změny v obsahu N-látek a tuku brojlerových kuřat v průběhu výkrmu Navrátil P., Suchý P., Straková E.	83
Možnosti ovlivnění hladin cholesterolu v séru Parák T., Suchý P., Macháček M., Bartošová L., Paráková L., Chalupová M.	87
Vplyv zinku na zdravie a produkciu brojlerových kurčiat Štofániková J., Šály J., Sezstáková E.	90

SEKCE B1: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE

Ovlivňují cyanotoxiny reprodukci ptáků? Damková V., Pikula J., Bandouchová H., Sedláčková J., Vitula F.	95
Antibiotická rezistence <i>Enterococcus</i> spp. u ferálních holubů Radiměšský T., Frolková P., Dolejská M., Švec P., Číková P., Čížek A., Literák I.	98
Stanovení koncentrace syntetických vonných látek v odpadních vodách z ČOV Brno – Modřice pomocí SPME Kubíčková K., Vávrová M., Zouhar L.	101
Vliv organických polutantů na jedince <i>Eisenia fetida</i> Provalilová I., Stoupalová M., Vávrová M., Beklová M.	104

SEKCE B2: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA

Elektrochemické stanovení akrylamidu Talašová H., Šucman E.	107
--	-----

SEKCE B3: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT

Úspěšnost' adopčního programu v útulku pre opustené zvieratá v Košiciach Kovács K., Takáčová J., Špalek M., Toropila M.	110
Bluetongue - entomologické, klinicko-biochemické a sérologické sledovania na farme oviec Lacková Z., Bireš J., Kočišová A.	113
Vývoj právnych úprav v oblasti ochrany zvierat v SR Takáčová J., Korim P., Kovács K.	117
Vliv vzdálenosti na vybrané biochemické ukazatele krevní plazmy při přepravě brojlerů na jatky Vošmerová P., Chloupek P.	121

SEKCE B4: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN

Toxicita hřebíčkového oleje pro ryby <i>Poecilia reticulata</i> a <i>Danio rerio</i> Doleželová P., Mácová S., Plhalová L., Svobodová Z., Pištěková V., Bedáňová I., Voslářová E.	124
Využití biochemických markerů kontaminace při testech toxicity na rybách Haluzová I., Blahová J., Havelková M., Modrá H., Šíroká Z., Svobodová Z.	127
Distribuce rtuti u pstruha duhového v průběhu larválního a juvenilního období Kenšová R., Kružiková K., Havránek J., Haruštiaková D., Svobodová Z.	130
Výskyt esterů kyseliny ftalové v chovatelských potřebách určených pro psy Kovářová J., Tluchořová L., Jarošová A., Svobodová Z.	133
Analýza melaminu v mase Novák P., Suchý P., Germuška R., Vlčáková M.	136
Vyhodnocení monitoringu výskytu léčiv v povrchových vodách v ČR Prášková E., Voslářová E., Pištěková V., Svobodová Z.	140
Stanovení akutní toxicity chemických látek pro okřehek menší (<i>Lemna minor</i>) pomocí mikrometody Soukupová I., Beklová M.	143
Akutní a subchronický účinek terbutrynu na danio pruhované (<i>Danio rerio</i>) Plhalová L., Mácová S., Haluzová I., Doleželová P., Slaninová A., Maršálek P., Svobodová Z., Pištěková V., Bedáňová I., Voslářová E.	146

SEKCE B5: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD

Prevalence výskytu <i>Paenibacillus larvae</i> ve vzorcích medu a měli ve spádové oblasti SVÚ Olomouc Bzdil J.	149
---	-----

Príčiny masových úhynov zimujúcich netopierov v urbanizovanom ekosystéme na území Slovenskej republiky Korytár Ľ., Ondrejková A., Ondrejka R., Beníšek Z., Prokeš M., Slepecká E., Súli, J.	152
Detekcia mikrosporídií u voľne žijúcich zvierat pomocou molekulových metód Malčeková B., Valenčáková A., Luptáková L., Molnár L., Ravaszová P.	155
Stanovení časných protilátek proti viru katarální horečky ovcí u volně žijících přežvýkavců Šperlová A., Zendulková D., Lamka J.	158

SEKCE C1: PATOBIOLOGIE

Vztah mezi expozicí virem psinky a vybranými parazitárními infekcemi u psů v severní Keni Hlaváč J., Sedlák K., Tesařová J., Albrechtová K., Modrý D.	163
Využití rekombinantního nestrukturálního proteinu viru PRRS k odlišení postinfekčních a postvaccinačních protilátek Janková J., Celer V.	166
Prevalence a fylogenetická analýza TT viru prasat v České republice a USA Jarošová V., Celer V., Pogranichnyi R.	169
Molecular detection of <i>Babesia caballi</i> in Jordanian Dromedaries Qablan M., Sloboda M., Modrý D.	172
Detekce oocyst <i>Toxoplasma gondii</i> ve vzorcích z vnějšího prostředí Neumayerová H., Koudela B.	174
Gastrointestinal parasites of indigenous and introduced primate species of Rubondo Island National Park, with special emphasis on <i>Blastocystis</i> sp. Petrášová J., Uzlíková M., Kostka M., Petřelková K.J., Huffman M.A., Mapua M.I., Bobáková L., Mazoch V., Singh J., Kaur T., Modrý D.	178
Záchyt <i>Mycoplasma bovis</i> ze zevního zvukovodu telat postižených zánětem horních cest dýchacích Pospíchalová J., Zendulková D., Rosenbergerová K., Pospíšil Z.	181
Genetická analýza virů influenzy prasat Rosenbergerová K., Lány P., Zendulková D., Pospíšil Z.	184
Sledovanie interakcií fungicídu azoxystrobin a ZnSO₄ na <i>Artemia franciscana</i> Špalek M., Falis M., Kovács K.	187

SEKCE C2: MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE

Laserová mikrodisekce tkáňově vázaných buněčných populací Chlastáková I., Janečková K., Dubská L., Doubek J., Matalová E.	190
<i>In-vivo</i> modely sepse u laboratorního potkana Janečková K., Scheer P.	193

Časoprostorové hodnocení proliferace a apoptózy při oseointegraci zubních základů	
Lungová V., Míšek I., Matalová E.	196
Fyziologické pH v kolonu šimpanzů (<i>Pan troglodytes</i>)	
Petrášová J., Profousová I., Geiger J., Mrázek J., Bolechová P., Modrý D.	199
Dynamika a vztahy biochemických parametrů v peripartálním období primiparních dojnic	
Pěnkava O.	202
Chlorambucil a fludarabin jako přípravný režim pro transplantaci kostní dřeně	
Tomenendálová J., Mayer J., Doubek M., Doubek J.	205
SEKCE C3: CHOROBY MALÝCH ZVÍŘAT	
Plazmatické koncentrace žlučových kyselin u leguána zeleného (<i>Iguana iguana rhinolopha</i>)	
Hrdá A., Knotková Z.	208
C-reaktivní protein u psů se syndromem systémové zánětové odpovědi	
Řeháková K., Uhríková I.	211
Aktuální problematika tumorů mléčné žlázy u fen	
Stavínohová R., Nečasánková M., Lorenzová J.	214
Testování pevnosti fixace segmentálního defektu femuru samotnou 4,5 LCP a v konstrukci plate and rod	
Urbanová L., Srnec R., Proks P., Stehlík L., Nečas A.	217
SEKCE C4: CHOROBY VELKÝCH ZVÍŘAT	
The effect of zinc supplementation in cows on the ruminal fermentation and biomass	
Panev A., Hauptmanová K., Pavlata L., Pechová A., Filípek J., Dvořák R.	220
Účinky salbutamolu podaného inhalačně v priebehu celkovej anestézie na systémovú a pľucnu hemodynamiku, mechanické vlastnosti pľúc a kyslíkovú bilanciu u koní	
Patschová M., Kabeš R., Krisová Š.	223
Vliv suplementace selenu u matek na stav zásobení kůzlat v období odstavu	
Ševčíková L., Pechová A., Pavlata L., Antoš D., Malá E., Páleníček T., Dvořák R.	227
Vliv suplementace různých forem Mn na jeho koncentrace v krvi koz	
Zvonareva E., Pechová A., Mišurová L., Hauptmanová K., Pavlata L., Dvořák R., Müller J., Dvořák Z.	230

SEKCE A

*Hygiena a technologie potravin
Výživa, dietetika hospodářských zvířat a hygiena
vegetálií*

Kvalita srnčí zvěřiny

Quality of Roe deer venison

Dominik Petr, Saláková Alena, Steinhauser Ladislav, Buchtová Hana

Abstract

Natural breeding of Roe deer provides a significant amount of highly valuable food every year. The raw venison is valuable, contains a considerable quantity of meat proteins, whereas its chemical composition is favorable for nutritional reasons. The aim of this study was to evaluate quality of Roe deer venison. Parameters were measured in meat from loin, leg and neck. Samples came from male roe deer (*Capreolus capreolus L.*) shot in area of Pardubice district (Czech Republic) in June 2009. Roe deer venison was found to have a low fat content and a high content of protein. The collagen content of venison was relatively low. Muscle texture properties was determined with the TPA (textura analysis profile) and found out that the venison from leg was toughest.

Klíčová slova: Srnec obecný, zvěřina, kvalita, bílkoviny, tuk, TPA

Úvod

Zvěřina představuje důležitou součást živočišných potravin (Rywotycki, 2003). Zvěřinu můžeme označit jako vysoce hodnotnou biopotravinu s nenahraditelnými chuťovými a dietetickými vlastnostmi (Vodňanský, 2007).

Čerstvá zvěřina je hodnotná, obsahuje značné množství bílkovin, zatímco její chemické složení je příznivé z výživového hlediska, hlavně z důvodu nízkého obsahu tuku (Konjević, 2008). Vedle základních složek se v malém množství také vyskytují další látky, jako vitamíny a minerální látky určující výživnou hodnotu masa (Rywotycki, 2003).

Zvěřina má jemnější strukturu svaloviny (převaha červených svalových vláken nad bílými), má druhově příjemné specifické pachové a chuťové vlastnosti. Zvěřina se skládá z křehkých vláken s pevnou konstrukcí. Jemnost zvěřiny je způsobená menší vláknitostí a nízkým obsahem vaziva (Belitz et al., 2009). Základním předpokladem vhodnosti a použitelnosti masa pro výživu lidí je jeho kvalita (Musilová et al., 2001).

Srnec obecný (*Capreolus capreolus L.*) patří v ČR mezi nejpočetnější volně žijící spárkatou (vysokou) zvěř (Nevoránek, 2004). Díky době lovu (16. 5. – 30. 9.) a kvalitě zvěřiny, oproti jiné vysoké zvěři, se s touto zvěřinou v ČR člověk setkává nejčastěji. Podle tělesných charakteristických rysů, je to náš nejmenší druh čeledi *Cervidae* o hmotnosti mezi 17 až 30 kg, s výškou v ramenech (kohoutek) až 80 cm a délkou těla 140 cm. Vyvržením uloveného kusu ubývá asi 1/4 hmotnosti (Konjević, 2008, Linnell et al., 1998). Srnec obecný se většinou loví pro zvěřinu v nižším věku (2 – 4 roky). Jsou to kusy, které nejsou v budoucnu hodnoceny jako trofejní. Cílem práce bylo zhodnocení kvality srnčí zvěřiny.

Materiál a metodika

Vzorky pro experiment byly získány ze srnčí zvěře (*Capreolus capreolus L.*), ulovené (střelené) v Pardubickém kraji. Z mnoha kusů, které byly dodány do závodu na zpracování zvěřiny, bylo vybráno 14 samců (srnců), ulovených (střelených) v červnu 2009. Výběr byl založen na následujících kriteriích: shodný věk zvířat (stáří 2 – 3 roky), hmotnost jednotlivých kusů (12 – 15 kg), čas usmrcení (střelení) a vyvržení – v průběhu

24 hodin, zdravotní stav (bez závad, znečištění), místo zásahu (bez mikrobiálního znečištění z trávicího traktu, bez porušení partií, které byly určeny pro výzkum) a čas od usmrcení do balení partií a následného zchlazení.

Z každého kusu srnčího (bez deky – kůže) byly odebrány vzorky svaloviny (cca 300 g) z těchto partií: krk, hřbet a kýta. Odebrané vzorky byly následně označené, vakuově zabalené a zchlazené na teplotu pod 7 °C do doby analýzy.

Pro stanovení obsahu vody (obsah sušiny) bylo použito gravimetrické stanovení, vzorek byl sušen se při teplotě 103 ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Obsah čistých bílkovin byl zjištěn metodou dle Kjeldala. Po vysrážení čistých bílkovin taninem a jejich oddělení proběhla mineralizace varem v kyselině sírové (teplota 420 °C) za přídavku katalyzátoru. Stanovení bylo provedeno na přístroji KJELTEC. Obsahu tuku byl stanoven extrakční metodou dle Soxhleta na přístroji SOXTEC, pro extrakci byl použit diethyleter. Stanovení celkového obsahu kolagenu je založeno na obsahu hydroxyprolinu. Intenzita zbarvení po reakci byla měřena na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm, obsah hydroxyprolinu byl odečten z kalibrační křivky a přepočítán na obsah kolagenu. Měření texturních parametrů masa (max. síla a soudržnost, maso tepelně opracované) - TPA (Texture Profiles Analysis) bylo provedeno na přístroji Instron 5544, měřily se válcové vzorky (výška 10 mm a průměr 12 mm), kde píst přístroje simuluje žvýkání a měří se závislost síly na čase nebo deformaci. Ztráty po tepelném opracování byly stanoveny jako rozdíl hmotností syrového masa a masa po tepelném opracování (70 °C, 60 minut). Výsledky byly podrobeny statistickému vyhodnocení pomocí programu Statistica CZ 7 firmy Statsoft Inc. (Česká republika). Pro stanovení rozdílů mezi jednotlivými partiemi byl použit Studentův t-test $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$.

Výsledky a diskuse

Naměřené hodnoty chemického složení srnčí zvěřiny jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z naměřených výsledků je patrné, že obsah tuku ve všech partiích je velmi nízký. Statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými typy svaloviny byly zjištěny mezi kýtou a hřbetem ($P \leq 0,01$) a hřbetem a krkem ($P \leq 0,01$). Také obsah kolagenu je ve všech partiích velice nízký. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi kýtou a krkem ($P \leq 0,001$) a hřbetem a krkem ($P \leq 0,001$). Oproti předešlým výsledkům je obsah čistých bílkovin vysoký ve všech partiích srnčího těla. Statisticky významné rozdíly byly zjištěny mezi kýtou a hřbetem ($P \leq 0,001$) a hřbetem a krkem ($P \leq 0,01$). U výsledků stanovení sušiny nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými partiemi.

Tabulka č. 1: Chemické složení srnčí zvěřiny

	Sušina [%]	Tuk [%]	Kolagen [%]	ČB [%]
Krk	24,43 ± 1,46	1,37 ± 0,80	2,14 ± 0,47	18,92 ± 1,13
Hřbet	24,95 ± 0,80	0,58 ± 0,43	0,50 ± 0,18	20,13 ± 0,62
Kýta	24,67 ± 0,81	1,27 ± 0,76	0,61 ± 0,14	19,17 ± 0,50

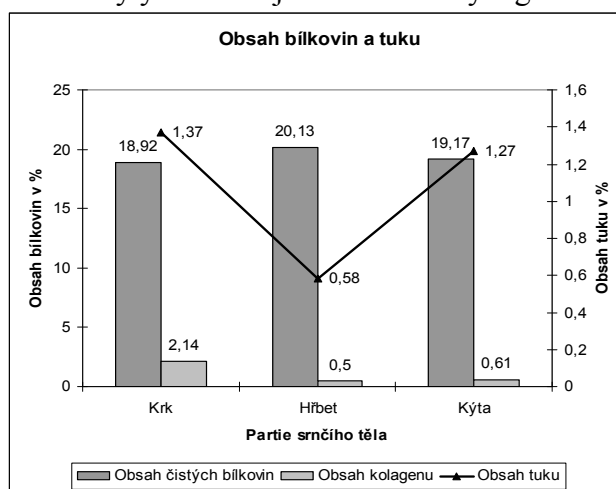
V tabulce č. 2 jsou uvedeny výsledky hodnocení ztrát při tepelném opracování a texturní parametry. Nejnižší ztráty při tepelném opracování byly zjištěny u svaloviny pocházející z hřbetu. Statisticky významné rozdíly byly mezi kýtou a hřbetem ($P \leq 0,001$) a hřbetem a krkem ($P \leq 0,001$). Maximální síla TPA byla nejvyšší u svaloviny pocházející z kýty, statisticky významný rozdíl byl mezi kýtou a hřbetem ($P \leq 0,01$),

z tohoto vyplývá, že zvěřina z kýty je nejtužší. U výsledků soudržnosti nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly.

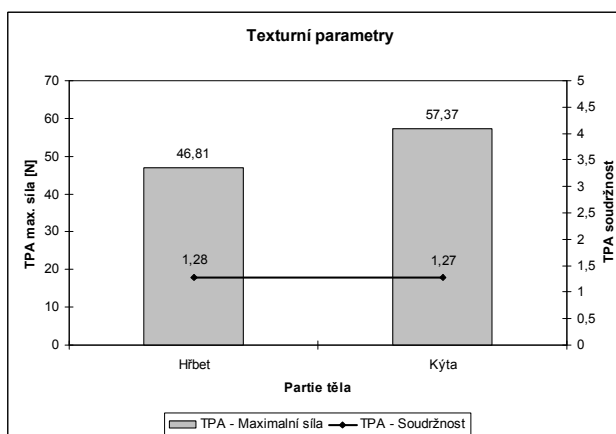
Tabulka č. 2: Texturní parametry a ztráty po tepelném opracování srnčí zvěřiny

	Ztráty po t. o. [%]	Max. síla [N]	Soudržnost [-]
Krk	37,25 ± 1,71	- -	- -
Hřbet	27,52 ± 2,80	46,81 ± 4,51	1,28 ± 0,02
Kýta	37,97 ± 3,01	57,37 ± 8,34	1,27 ± 0,01

Většina autorů všeobecně uvádí u zvěřiny vysoký obsah bílkovin a nízký obsah tuku. V našem pokusu byla tato fakta potvrzena, a z hlediska nízkého obsahu tuku a vysokého obsahu bílkovin se jako nejlepší jeví svalovina hřbetu u srnčí zvěře. Tyto výsledky jsou znázorněny v grafu č. 1. Texturní parametry a výsledné hodnoty maximální síly a soudržnosti pro svalovinu kýty a hřbetu jsou znázorněny v grafu č. 2.



Graf č. 1: Průkaz nízkého obsahu tuku a vyššího obsahu bílkovin



Graf č. 2: Texturní profilová analýza srnčí zvěřiny

Poděkování

Práce je součástí řešení výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6215712402.

Literatura k dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Ing. Petr Dominik, Ústav hygieny a technologie masa, VFU Brno, Palackého 1-3, Brno, 612 42, e-mail: H08014@vfu.cz, tel. +420 54156 2743

Změny vlhkosti a vodní aktivity játrové paštiky a šunky během skladování v režimu teplot 8, 15 a 25 °C

Moisture content and water activity changes of liver pate and ham during storage in the temperature range of 8, 15 and 25 °C

Klepáčová Alena, Hanák Miroslav

Abstract

The study presents determining the values of water activity and humidity in the sample liver pate and ham. Changes were observed water activities, depending on the temperature during storage and humidity changes. Water activity reflects the presence of water in food. This water is osmotically available and usable by microorganisms. The water activity is higher, the better the microorganisms can duplicate and cause damage to food. Water activity largely affect the organoleptic characteristics and shelf life of foods, reactions that occur during processing and storage of food, and resistance against microorganisms.

Klíčová slova: vodní aktivita, vlhkost, teplota, skladování, tepelně opracované masné výrobky

Úvod

Játrové paštiky a šunky řadíme do skupiny tepelně opracovaných masných výrobků – výrobek, u kterého bylo ve všech částech dosaženo minimálně tepelného účinku odpovídajícího působení teploty plus 70 °C po dobu 10 minut (vyhláška MZe 326/2001 Sb). Za mikrobiologickou stabilitu masných výrobků jsou odpovědné vnější a vnitřní faktory. Mezi vnější faktory můžeme zařadit hygienu při výrobě, dodržení hygieny při zpracování a technologii zpracování. Vnitřní faktory zahrnují parametry jako vodní aktivitu (a_w), pH, redox potenciál, obsah dusitanů a dusičnanů apod (Serra X., *et. all.*, 2005).

Měření vodní aktivity v mase a v masných výrobcích se stává stále důležitější, protože a_w má vliv na různé chemické reakce ve výrobku a také na růst a přežívání mikroorganismů. Snížení aktivity vody zlepšuje trvanlivost a bezpečnost masných výrobků. Výrobky se sníženou aktivitou vody jsou stabilnější a odolnější vůči mikroorganismům, které mohou způsobit kažení výrobku. Čerstvé maso má nejvyšší vodní aktivitu ($a_w = 0,99$). Při zpracování masa do masných výrobků a_w klesá především kvůli přidavku solí. Např. klobásy, jitrnice a jelita mají a_w 0,97 až 0,96, a_w masných výrobků jako je šunka se pohybuje mezi 0,92 – 0,80. Pro zachování trvanlivosti masných výrobků se používá sušení, kdy dochází ke snížení obsahu vody a vlhkosti. Používají se různé procesy, jako např. sušení horkým vzduchem, sušení ve vakuu nebo také mražení. Obsah vody v konečném produktu je 3 – 10% (Ruiz R., *et. all.*, 2005).

MAP v současné době patří k nejlepším technologiím balení a skladování potravin z pohledu zachování kvalitativních znaků čerstvosti. Hlavním plynem v technologii MAP je CO₂ (Nollet, Toldrá, 2006). Obalové materiály pro balení potravin v MAP musí vyhovovat kritériím, z nichž stěžejním je minimální propustnost pro permanentní plyny a vodní páru, odpovídající charakteru baleného produktu. V balící technologii je míra permeace vodních par, balících plynů (O₂, CO₂ a N₂) a těkavých aromatických plynů přes fólie (laminované, potahované apod.) velmi důležitá. Potravin s relativně vysokým obsahem vody jako např. maso mají tendenci difundovat páry do okolí, což má za následek ztrátu hmotnosti, zhoršení vzhledu a textury (Bernnam, 2006).

Materiál a metodika

Analyzovaným materiálem byly vzorky játrových paštik a šunek zakoupených v tržní síti. Cílem této práce bylo stanovit hodnoty a_w a vlhkosti jednotlivých vzorků při různých skladovacích teplotách a době skladování. Celkem bylo vyšetřeno 5 vzorků játrových paštik a 6 vzorků šunek. Navážky vzorků na stanovení a_w se pohybovaly kolem 7g. Vzorky byly skladovány v termostatech s regulovatelnou teplotou při 8, 15 a 25 °C. Vodní aktivita byla měřena ihned na začátku skladování u všech vzorků a poté u játrových paštik 4 a 8 den skladování a u šunek 3 a 7 den skladování.

Vodní aktivita se stanovovala pomocí přístroje Novasina a_w Sprint. Tento přístroj je určen pro stanovení a_w při předvolené a řízené teplotě. Měření vzorků probíhalo vždy duplicitně a výsledky se zprůměrovaly. Měření a_w získává na stále větším významu, přičemž na kvalitu měření jsou kladeny značné nároky: přesnost 0,01 a reprodukovatelnost 0,003.

Obsah vody (vlhkost) se stanovoval vážkově, vysoušením 3 – 5g analyzovaného vzorku při teplotě 102 ± 2 °C do konstantní hmotnosti. Obsahem vody se rozumí úbytek hmotnosti vzorku, vzniklý po vysušení vzorku uvedenou metodou, vyjádřený v procentech.

Výsledky a diskuse

Tab. č. 1 játrové paštiky

	Délka sklad. [dny]	t [°C]	a_w [-]	w [%]
Vzorek 8/8	0	8	0,971	24,7
	1	15	0,941	
	2	25	0,921	
Vzorek 8/9	0	8	0,944	36,08
	1	15	0,940	
	2	25	0,934	
Vzorek 8/10	0	8	0,923	
	1	15	0,919	
	2	25	0,918	
Vzorek 8/11	0	8	0,911	
	1	15	0,910	
	2	25	0,905	
Vzorek 8/12	0	8	0,938	
	1	15	0,936	
	2	25	0,930	

Tab. č. 2 šunky

	Délka sklad. [dny]	t [°C]	a_w [-]	w [%]
Vzorek 7/7	0	8	0,939	
	1	15	0,935	
	2	25	0,931	
Vzorek 7/8	0	8	0,95	
	1	15	0,942	
	2	25	0,939	
Vzorek 7/9	0	8	0,959	
	1	15	0,937	
	2	25	0,926	
Vzorek 7/10	0	8	0,936	23,67
	1	15	0,921	
	2	25	0,912	
Vzorek 7/11	0	8	0,943	24,7
	1	15	0,941	
	2	25	0,905	
Vzorek 7/12	0	8	0,951	
	1	15	0,946	
	2	25	0,939	

V tabulce č. 1 a 2 je znázorněna délka skladování, teplota skladování, stanovené hodnoty a_w a vlhkosti vzorků játrových paštik a šunek.

Z naměřených hodnot a_w vyplývá, že u vzorků játrových paštik a šunek při zvyšující se teplotě skladování klesá a_w z důvodu zvyšujícího se odparu vody. Potraviny skladované za vyšší teploty mají menší hodnoty a_w než za nižší, což je způsobeno intenzivnějším odparem vody z těchto potravin a dochází tak k vysoušení potravin během skladování. Pokles a_w je také dán délkou skladování a relativní vlhkostí okolního vzduchu potravin. V praxi to lze přirovnat k použití obalů s velmi nízkým bariérovým účinkem proti pronikání vlhkosti. Obecným důsledkem je potom možná negativní změna fyzikálních a sensorických vlastností potraviny. Rozdíl vodních aktivit u testovaných vzorků, například pro teploty 15 a 25 °C, dosahoval maximálně 0,05 na počátku měření a s dobou skladování se snižoval. Z uskutečněných měření také vyplývá, že význam teploty při skladování játrových paštik a šunek není zásadní z hlediska vodní aktivity.

Nejvyšší hodnoty a_w byly naměřeny vždy v 0 - 1tém dni, poté hodnoty a_w klesaly. Vlhkosti u játrové paštiky se pohybovaly v rozmezí 24 – 37% a u vzorku šunky 23 – 25%. Vliv skladování na obsah sušiny byl sledován pouze u vzorku játrové paštiky 8/8 a vzorku šunky 7/10. Na začátku skladování dochází k poklesu sušiny a zvyšuje se a_w . To znamená, že potravina se zvlhčuje a zvyšuje se tak obsah vody v potravine. V průběhu skladování dochází k vysušování vzorků a tím je způsoben úbytek vody v potravine. Při zvyšující se teplotě se zvyšuje i obsah sušiny ve vzorku. Z toho vyplývá, že při zvyšující se teplotě skladování se zvažuje odpar vody a obsah sušiny vzorku, ale aktivita vody se snižuje.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

Brennam, J., G., Food Processing Handbook, Weinheim: Wiley-VCH, 559 s., 2006, ISBN 103-527-30719-2

Nollet, L., M., L., Toldrá, F., Advanced Technologies For Meat Processing, Boca raton: CRC Press, 484 s., 2006, ISBN 1-57444-587-1

Ruiz-Ramirez, J., Serra, X., Arnau, J., Gou, P., Profiles of water content, water activity and texture in crusted dry – cured loin and in non-crusted dry-cured loin, Meat Science 69, 519 – 525, 2005

Serra, X., Ruiz-Ramirez, J., Arnau, J., Gou, P., Texture parameters of dry – cured ham m. biceps femoris samples dried at different levels as a function of water activity and water content, Meat Science 69, 249 – 254, 2005

Vyhláška Ministerstva zemědělství 326/2001 Sb. Ze dne 30 srpna 2001, oddíl 2 – masné výrobky

Kontaktní adresa

Mgr. Klepáčová Alena, e-mail: H08355@vfu.cz, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav hygieny a technologie mléka, Palackého 1/3, Brno 612 42

Vliv přírodních antioxidantů na oxidaci tuků u trvanlivých fermentovaných salámů

Effect of natural antioxidants on lipid oxidation of dry fermented sausages

Pavlík Zdeněk, Saláková Alena, Kameník Josef, Buchtová Hana, Steinhauserová Iva

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effect of addition of natural antioxidant on lipid stability of dry fermented sausages (Poličan). Sausages were made from pork back fat (stored at -18 °C for various time) and extract from *Rosmarinus officinalis* (rosemary) was added. Sausages were stored for 0, 21, 49, 77, 105, 133, 161, and 189 days. Thiobarbituric acid reacting substances (TBA) were measured. Addition of rosemary extract affected lipid oxidation.

Keywords: dry fermented sausages, TBA, natural antioxidant, rosemary, lipid oxidation

Úvod

Živočišné tuky, které jsou součástí fermentovaných masných výrobků, jsou náchylné k oxidaci molekulárním vzdušným kyslíkem a výrobky mohou být tímto způsobem při výrobě a skladování znehodnoceny (Balev et al., 2005). V minulosti byl již prokázán účinek přidavku některých ingrediencí na stabilitu tuků. Míru oxidace lipidů v masných výrobcích prokazatelně snižuje přídavek extraktu ze sezamového oleje a obdobně působí i nahrazení části živočišných tuků olivovým olejem. Antioxidační aktivitu vykazují také mnohé druhy bylin a koření. Dobře známé jsou například účinky majoránky nebo šalvěje. Při výrobě fermentovaných salámů byl prokázán antioxidační účinek přidavku papriky a česneku. Kombinace těchto ingrediencí má podle některých zdrojů stejný efekt jako aplikace klasických aditiv. V porovnání s ostatními druhy koření vyniká svými antioxidačními účinky hřebíček a rozmarýn (Vasavada et al., 2006). Cílem práce bylo ověřit antioxidační účinky rozmarýnu, použitého při výrobě trvanlivého fermentovaného salámu.

Materiál a metody

Testovaným trvanlivým fermentovaným salámem byl výrobek Poličan získaný přímo od výrobce. Receptura byla složená z 33 % vepřového masa, 33 % hovězího masa a 33 % vepřového hřbetního sádla. Do díla bylo přidáno 0,3 procenta dextrózy, startovací kultura, koření a 2,4 % dusitanové solící směsi. Směs byla naražena do fibrousových střev průměru 55 mm. Fermentace byla zahájena při teplotě 24 °C, po týdně klesla na 16 °C, při které vydržela až do konce zrání (3 týdny). Relativní vlhkost vzduchu byla nastavena na 94 %, po týdně na < 80 %.

Byly testovány dva druhy vzorků salámu. Kontrolní vzorek (ve výsledkové části označen písmenem K), vyrobený klasickou technologií, s výše uvedeným složením a pokusný vzorek (ve výsledkové části označen písmenem R). Do díla pokusného vzorku salámu byl přidán rozmarýnový extrakt určený pro použití v potravinářství. Jedná se o přírodní rozmarýnový extrakt s maltodextrinem jako nosičem a s doporučeným rozsahem dávkování 200 – 1000 ppm. Do díla bylo přidáno 0,08 % rozmarýnového extraktu. Obě skupiny vzorků byly rozděleny do šesti sérií podle

čerstvosti přidaného výrobního sádla. Do vzorků 0. série bylo přidáno sádlo čerstvé, do každé další série sádlo vždy po měsíci mrazírenského skladování. Všechny vzorky pocházely ze salámu zrajícího 21 dní, zabaleného do vakua a skladovaného při +15 °C. Sledovaným produktem oxidace lipidů byl malondialdehyd. Obsah malondialdehydu byl stanoven reakcí s kyselinou 2-thiobarbiturovou, destilační metodou (Castellini et al., 2002).

Výsledky a diskuze

Přídavek rozmarýnového extraktu ovlivnil oxidaci tuků. Hodnoty thiobarbiturového čísla (TBA) ukazují, že v 0. den, tedy v den zahájení pokusu s čerstvě uzrálým salámem, nebylo množství produktu oxidace ve vzorcích s rozmarýnovým extraktem v žádné sérii výrazně vyšší ve srovnání s kontrolními vzorky, naopak v 0., 1. a 5. sérii bylo zřetelně nižší. V průběhu skladování došlo v prvních týdnech u všech vzorků k nárůstu thiobarbiturového čísla, to potvrzuje také (Rohlík et al., 2010). Při dalším skladování docházelo ke kolísání hodnot thiobarbiturového čísla vlivem probíhajících procesů, jako je přechod tukových peroxidů na sekundární produkty oxidace. V poslední 189. den skladování byla hodnota thiobarbiturového čísla ve všech sériích nižší u vzorků s rozmarýnovým extraktem.

Tab. č. 1: Průběh hodnot TBA salámu Poličan v průběhu zrání a skladování

	0.den	21.den	49.den	77.den	105.den	133.den	161.den	189.den
0 K	1,39 ± 0,47	3,36 ± 0,56	1,80 ± 0,15	1,19 ± 0,10	1,51 ± 0,08	1,50 ± 0,28	2,12 ± 0,71	1,65 ± 0,31
1 K	0,83 ± 0,08	1,58 ± 0,15	1,30 ± 0,18	1,29 ± 0,20	1,34 ± 0,13	1,33 ± 0,15	1,20 ± 0,13	1,62 ± 0,22
2 K	0,63 ± 0,09	1,72 ± 0,10	1,68 ± 0,15	1,26 ± 0,17	1,27 ± 0,17	1,29 ± 0,28	2,01 ± 0,06	1,63 ± 0,07
3 K	1,07 ± 0,28	2,87 ± 0,31	2,46 ± 0,28	1,79 ± 0,20	1,58 ± 0,19	1,92 ± 0,11	1,70 ± 0,06	2,80 ± 0,79
4 K	0,86 ± 0,06	3,88 ± 0,62	2,17 ± 0,29	1,46 ± 0,25	1,59 ± 0,03	1,88 ± 0,07	2,85 ± 0,28	2,87 ± 0,34
5 K	0,85 ± 0,15	2,04 ± 0,12	1,57 ± 0,21	2,04 ± 0,23	1,73 ± 0,08	2,13 ± 0,55	2,17 ± 0,20	2,04 ± 0,22
	0.den	21.den	49.den	77.den	105.den	133.den	161.den	189.den
0 R	1,07 ± 0,18	2,86 ± 0,20	1,91 ± 0,08	1,34 ± 0,06	2,42 ± 0,18	1,53 ± 0,85	2,53 ± 0,47	*
1 R	0,62 ± 0,09	1,58 ± 0,15	1,86 ± 0,15	1,42 ± 0,08	1,78 ± 0,13	0,84 ± 0,36	1,18 ± 0,20	1,62 ± 0,22
2 R	0,69 ± 0,10	1,60 ± 0,06	1,40 ± 0,16	0,98 ± 0,21	1,07 ± 0,18	1,41 ± 0,37	2,01 ± 0,06	1,36 ± 0,05
3 R	1,17 ± 0,17	3,40 ± 0,48	2,43 ± 0,35	1,84 ± 0,41	1,66 ± 0,31	1,84 ± 0,15	1,99 ± 0,02	2,20 ± 0,72
4 R	0,85 ± 0,22	4,50 ± 0,81	2,29 ± 0,73	1,54 ± 0,12	1,98 ± 0,02	2,16 ± 0,05	2,85 ± 1,15	2,44 ± 0,29
5 R	0,43 ± 0,18	2,55 ± 0,10	1,56 ± 0,18	1,85 ± 0,09	1,83 ± 0,01	1,44 ± 0,13	1,90 ± 0,42	1,80 ± 0,11

Závěr

V našem pokusu jsme sledovali vliv přídavku rozmarýnového extraktu na oxidaci tuků v trvanlivém fermentovaném salámu Poličan. V den zahájení pokusu s čerstvě uzrálým salámem, nebylo množství produktu oxidace ve vzorcích s rozmarýnovým extraktem v žádné sérii výrazně vyšší, naopak v některých sériích bylo zřetelně nižší. V dalším průběhu skladování nedocházelo k výrazným odchylkám. V poslední 189. den skladování byla hodnota thiobarbiturového čísla ve všech sériích vzorků nižší právě u vzorků s rozmarýnovým extraktem. Zvolená metoda použitá pro hodnocení oxidačních procesů tuků (TBA) není zcela vhodná pro trvanlivé fermentované masné výrobky. Stanovení ovlivňují další produkty oxidace.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

BALEV, D. et al. (2005): A comparative study on the effect of some antioxidants on the lipid and pigment oxidation in dry-fermented sausages. *International Journal of Food Science and Technology*, 40, 977–983.

CASTELLINI, C., MUGNAI, C., DAL BOSCO, A (2002). Effect of organic production systém on broiler carcass and meat quality. *Meat Science*, vol. 60, p. 219 – 225.

ROHLÍK, B–A. et al. (2010) Využití přírodních antioxidantů v technologii trvanlivých salámů. *Maso*, 1, 18 – 22.

VASAVADA, M.N. et al. (2006): Evaluation of Garam Masala Spices and Phosphates as Antioxidants in Cooked Ground Beef. *Journal Food Science*, 71.

Kontaktní adresa

Mgr. Zdeněk Pavlík, Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: zpavlik.vfu@seznam.cz

Vliv složení modifikované atmosféry plynů na oxidační procesy tuků ve svalovině lososa (*Salmo salar* L.)

Influence of modified atmosphere gas on oxidation processes of lipid in tissue Salmon (*Salmo salar* L.)

Řičánková Blanka, Buchtová Hana

Abstract

The aim of the study was to evaluate oxidation changes of lipid in the meat of salmon (*Salmo salar* L.) packaged in modified atmosphere 80 % O₂ + 20 % CO₂ (experimental group) and to compare them with changes occurring in salmon samples packed by modified atmosphere 70 % N₂ + 30 % CO₂ (control group). Samples were stored at refrigerating temperature 2 ± 2 °C. Chemical analysis as determination of (Peroxide value) and malondialdehyde were conducted 1., 5., 7., 9., 12 and 14. day of storage.

The results of further analysis proved a negative influence modified atmosphere 80 % O₂ + 20 % CO₂ on oxidation processes that were less intense in samples packed in modified atmosphere 70 % N₂ + 30 % CO₂. It has been proved by a decreased (P > 0.01) peroxide content on the day 5., 9. 12. and 14. day of storage at the experimental samples.

Klíčová slova: *Losos obecný, peroxidové číslo, malondialdehyd, modifikovaná atmosféra*

Úvod

V České republice mají největší zastoupení v konzumaci ryb a rybích výrobků mořské ryby. Pravděpodobně je to z důvodu pestřejšího sortimentu výrobků z nich vyráběných a někdy i nižší cenové hladiny než u ryb sladkovodních. Díky svému příznivému chemickému složení je z mořských ryb dieteticky nejvíce ceněn losos obecný (*Salmo salar* L.).

Do České republiky jako vnitrozemského státu jsou čerstvé mořské ryby dodávány jeden až dva dny po jejich vylovení. Převážně se nabízejí a prodávají v šupinovém ledu vyrobeném z pitné vody při teplotě prostředí od -1 °C do +2 °C. Při tomto způsobu uchování jsou ryby v přímém kontaktu se vzduchem, kde se nachází cca 21 % vzdušného kyslíku. U ryb nebo jejich částí zejména těch, které jsou zbaveny kůže, dochází k intenzivnější oxidaci lipidů, která snižuje kvalitativní vlastnosti masa, jako je vůně, barva, struktura a nutriční hodnota.

Celosvětově stoupá trend používání nejrůznějších typů balení (vakuové, balení do modifikované atmosféry plynů MAP) prodlužující údržnost rybích produktů během skladování především potlačením proteolytických změn ve svalovině ryb a o inhibici oxidačních procesů tuků v důsledku absence kyslíku (De la Hoz et al., 2000).

Cílem práce bylo sledovat změny chemických parametrů, které mají vztah k oxidačním procesům tuků, u filetu lososa (*Salmo salar* L.) baleného do MAP 80 % O₂ + 20 % CO₂ (experimentální skupina) a porovnat je se změnami, ke kterým dochází u vzorků filetu lososa baleného do MAP 70 % N₂ + 30 % CO₂ (kontrolní skupina).

Materiál a metodika

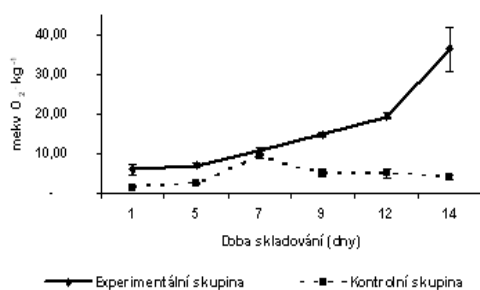
Čerstvé filety lososa (země původu: Norsko, farmový chov) hermeticky balené do termoizolační ochranné Al-fólie byly dodány českou velkoobchodní společností za podmínek dodržení chladového řetězce (-1 ± +2 °C). Další příprava vzorků,

skladování a laboratorní analýzy byly provedeny na Ústavu hygieny a technologie masa Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Celkem bylo analyzováno 32 kusů lososů (pravý filet). Prvních 16 kusů pravého filetu (experimentální vzorky) z každého kusu lososa bylo naporcováno na 6 segmentů (celkem 96 dílčích vzorků), každý segment byl zabalen do modifikované atmosféry plynů (80 % O₂ + 20 % CO₂) do fólie Amilen PA/PE 20/60. Kontrolní vzorky lososa byly připraveny obdobným způsobem z pravých filetů ryb číslo 17 až 32 (celkem 96 dílčích vzorků), každý segment byl zabalen za stejných podmínek do modifikované atmosféry plynů (70 % N₂ + 30 % CO₂). Vzorky byly uskladněny v chladírenské komoře s řízenou teplotou (+2 ± 2 °C). Laboratorní analýzy byly prováděny 1., 5., 7., 9., 12. a 14. den skladování. Celkem bylo vyšetřeno 192 dílčích vzorků. Oxidační produkty byly stanoveny destilační metodou (Castellini et al. 2002) a kvantifikovány jako ekvivalenty malondialdehydu (MDA). Obsah peroxidů (PV, Peroxide value) byl stanoven metodou podle ČSN ISO 3960 po extrakci tuku diethyletherem.

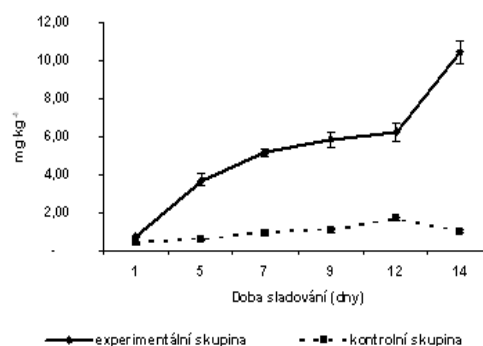
Složení MAP bylo ověřováno měřením plynu oxidu uhličitého (CO₂) před rozbalením vzorků na zařízení Check Mate (PBI Dansensor, Německo). Získané výsledky analýz sledovaných parametrů jsou vyjádřené jako průměrná hodnota ± SEM. Výsledné hodnoty byly statisticky vyhodnoceny jednofaktorovou analýzou ANOVA (Microsoft Office EXCEL 2003).

Výsledky a diskuse

Rybí tuky jsou významným zdrojem polynenasycených mastných kyselin. Jejich oxidace vede ke změně řady sensorických vlastností a ke snížení kvality rybiho masa (Finley and Shahidy 2001). Vznikají nestálé oxidační produkty, jako jsou aldehydy a ketony (Milo and Grosh 1996), způsobující i v malém množství výrazné sensorické odchylky. Za nejdůležitější produkty primární oxidace lipidů jsou považovány hydroperoxydy stanovované jako peroxidové číslo (PV). V našem experimentu probíhaly oxidační procesy intenzivněji u experimentální skupiny vzorků ve srovnání se vzorky kontrolními. Statisticky významně vyšší hodnoty ($P < 0,01$) peroxidového čísla (mekv O₂·kg⁻¹) byly u experimentální skupiny vzorků zaznamenány 5., 9., 12. a 14. den skladování (Graf 1). Nižší obsah peroxidů u kontrolní skupiny vzorků v porovnání s experimentální skupinou je v našem experimentu pravděpodobně způsoben minimální koncentrací kyslíku při použití MAP o složení 70 % N₂ + 30 % CO₂.



Graf 1 Obsah peroxidů ve svalovině lososa během skladování



Graf 2 Obsah malondialdehydu (MDA) ve svalovině lososa během skladování

Společně s PV patří mezi hlavní ukazatele stupně oxidace lipidů hodnota TBA (2-Thio- barbituric Acid) vyjadřující obsah malondialdehydu (Shahidy and Hong 1991).

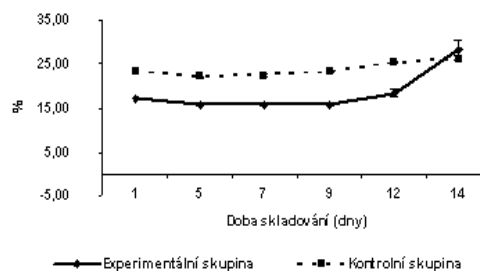
Hydroperoxydy podléhají následným změnám a degradacím. Jejich rozpad způsobuje vznik sekundárních produktů jako jsou pentanal, hexanal, 4-hydroxynonenal a malondialdehyd (Fernández et al. 1997). Obsah malondialdehydu ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) u experimentální skupiny byl po celou dobu experimentu ve srovnání s kontrolními vzorky vyšší (Graf 2). Statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) hodnot MDA byly zjištěny ve všech zkoumaných dnech.

Oxid uhličitý (CO_2) je hlavním inhibátorem růstu aerobní mikroflóry masa. Jeho různé koncentrace inhibují více či méně růst různých mikroorganismů, např. *Pseudomonas* spp. je inhibována 20 % CO_2 , zatímco *Schewanella* spp. snese dvojnásobnou koncentraci (López-Gálvez et al. 1995).

V našem experimentu se pohyboval obsah CO_2 (v %) u experimentální skupiny od $17,17 \pm 0,12$ do $28,23 \pm 2,24$ a od $23,42 \pm 0,20$ do $26,38 \pm 0,33$ u skupiny kontrolní. Statisticky významné rozdíly ($P < 0,01$) v obsahu CO_2 byly v jednotlivých dnech zaznamenány u obou typů balení již od prvního dne skladování (Graf 3).

Závěr

Složení plynů 80 % O_2 + 20 % CO_2 experimentální skupiny vzorků negativním způsobem ovlivnilo průběh sledovaných oxidačních procesů tuků. Důkazem je vyšší aktivita primárních a sekundárních peroxidačních změn, které jsme prokázaly v tuku extrahovaném ze svaloviny lososa (Graf 1 a 2).



Graf 3 Obsah CO_2 v modifikované atmosféře balení v průběhu skladování

Poděkování

Práce je součástí řešení výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6215712402.

Literatura

- CASTELLINI C, MUGNAI C, DAL BOSCO A 2002: Effect of organic production system on broiler carcass and meat quality. *Meat Sci* 60: 219-225
- DE LA HOZ LD, LÓPEZ-GÁLVEZ DE, FERNÁNDEZ M, HIERRO E, ORDÓÑEZ JA 2000: Use of carbon dioxide enriched atmospheres in the refrigerated storage (2°C) of salmon (*Salmo salar*) steaks. *Eur Food Res Technol* 210:179-188
- FERNANDÉZ J, PERÉZ-ÁLVAREZ JA, FERNANDÉZ-LOPÉZ, JA 1997: Thiobarbituric acid test for monitoring lipid oxidation in meat. *Food Chem* 59: 345-353
- FINLEY JW, SHAHIDI F 2001: The chemistry, processing and health benefits of highly unsaturated fatty acids: and overview. In SHAHIDI F, FINLEY JW (Eds.), *Omega-3 fatty acids, chemistry, nutrition and health effects* (pp. 2-11), ACS Symposium series 788m ACS Press.
- LOPÉZ-GÁLVEZ D, HOZ L, ORDÓÑEZ JA 1995: *Agric Food Chem* 43:483-490
- MILO C, GROSH W 1996: Changes in the odorants of boiled salmon and cod as affected by the storage of the raw material. *J. Agric. Food Chem* 44: 2366-2371
- SHAHIDI F, HONG C 1991: Evaluation of malondialdehyde as a marker of oxidative rancidity in meat products. *J Food Biochem* 15: 97-105
- Kontaktní adresa:**
Mgr. Blanka Řičánková
Ústav hygieny a technologie masa
FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno
e-mail: blanka.ricankova@gmail.com

Hodnocení zmasilosti u JUT prasat pomocí analýzy obrazu

Evaluation of carcass conformation of pigs using image analysis

¹Randulová Zdeňka, ¹Gallas Leo, ¹Pospiech Matej, ²Štarha Pavel,
¹Tremlová Bohuslava, ¹Steinhauser Ladislav

¹Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ²Vysoké učení technické v Brně

Abstract

Our work was focused on the possibility of image analysis using for the evaluation of carcass conformation in pigs. Legislation requires classification of individual pieces of farm animals into categories of SEUROP. The area of the cut of roast meat from cranial and caudal end was measured. The results indicate the relevance of the hypothesis about the applicability of this method.

Key words: SEUROP, VIA-method, image analysis

Úvod

V České republice je povinnost provádět klasifikaci jatečných zvířat zakotvena v zákoně č. 110/1997 Sb., ve znění pozdějších předpisů. Klasifikaci dále upravuje vyhláška Ministerstva zemědělství č. 194/2004 Sb., kterou doplňuje vyhláška Mze č. 324/2005 Sb. Od začátku roku 2009 se klasifikace JUT dospělých kusů skotu, prasat a ovcí řídí pravidly, která nalezneme v nařízení Rady (ES) č. 1234/2007. Na tento předpis navazuje nařízení Evropské komise č. 1249/2008 (Ivánek, 2009). Metody schválené pro třídění jatečně upravených těl prasat o hmotnosti 60 až 120 kg uvádí novelizované rozhodnutí Komise č. 1/2005/ES (Katina, 2009).

Základním principem klasifikace JUT prasat je objektivní určení obsahu libového masa nepřímo prostřednictvím pomocných ukazatelů – provádí se fyzické měření jedné nebo více anatomických částí (Katina, 2009). Na základě zjištěné síly svalové a tukové vrstvy v mm, v přesně definované lokalitě JUT, udá klasifikační aparatura podíl svaloviny v % hodnoceného JUT (Steinhauser a kol., 2000). Na základě výsledků klasifikace jsou JUT zatříděny do obchodních tříd S (60 % a více), E (55 % a více), U (50 % a více, ale méně než 55 %), R (45 % a více, ale méně než 50 %), O (40 % a více, ale méně než 45 %) a P (méně než 40 %) (Nařízení, 2007).

Jednotlivé způsoby hodnocení zmasilosti lze rozdělit na invazivní a neinvazivní. Mezi invazivní aparatury řadíme vpichové sondy. Do druhé skupiny patří tzv. dvoubodová metoda, ultrazvuk, VIA-metoda, AUTOFOM (Steinhauser a kol., 2000).

Mezi neinvazivní metody řadíme také metody založené na analýze obrazu (Brosnan and Sun, 2004). Tyto metody patří k rychlým a objektivním metodám, kdy hlavním úkolem je získání numerických dat z obrazu. Tím je umožněno detailní srovnávání různých vzorků, přesné zpracování získaných informací a různé způsoby vyjádření získaných výsledků. Výsledky měření mohou být vyjádřeny v pixelech nebo v jiných jednotkách (Manuál, 2000). Analýza obrazu je alternativou VIA-metody (Video-Image-Analysis). Při použití VIA-metody je hodnocen snímáný obraz určité partie získaný robustní videokamerou na konci porážecí linky na fixované vepřové pulte v bederní nebo hřbetní partii nebo pomocí dvou kamer v obou krajinách, následně počítač analyzuje jednak plochu a sílu vrstvy svaloviny a podkožního tukového vaziva. Výsledkem je podíl svaloviny v JUT důležitý pro zařazení do obchodní třídy SEUROP

(Steinhauser a kol., 2000). Tato technologie nabízí rychlé, automatické a objektivní posouzení jatečně upravených těl. Rius-Vilarrasa *et al.* (2009) a Doeschl-Wilson *et al.* (2005) popisují použití VIA-metody při třídění jatečně upravených těl do jednotlivých kategorií pro hovězí, vepřové a jehněčí. Využití analýzy obrazu při klasifikaci jatečných těl mladých býků popisuje ve svém článku Oliver *et al.* (2010).

Materiál a metodika

Pomocí programu pro analýzu obrazu (ACC verze 6.1, SOFO, ČR) bylo provedeno hodnocení zmasilosti u prasat zařazených do jednotlivých obchodních tříd (SEUROP) pomocí vpichové sondy. Jednalo se o 8 ks pečeně z JUT třídy S, 12 ks z třídy E a 11 ks z třídy U. Pro měření byly použity standardně oddělené vepřové pečeně. Pomocí digitálního fotoaparátu CANON EOS 450D jsme snímali plochu čerstvého řezu z kraniálního a kaudálního konce pečeně.

Nejprve byla změřena plocha celého řezu, následně se od této plochy odečetla plocha tuku a kosti na řezu. Pro vlastní vyhodnocení jsme použili údaje o ploše svaloviny v %. Výsledky byly hodnoceny programem STATISTICA.

Výsledky a diskuze

Výsledky analýzy obrazu jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Tabulka č.1: Změřená plocha svaloviny na řezu programem pro analýzu obrazu [%]

Snímek	S		E		U	
	Kraniální konec	Kaudální konec	Kraniální konec	Kaudální konec	Kraniální konec	Kaudální konec
1	69,89	69,57	64,80	69,97	51,56	62,94
2	69,31	68,29	54,21	58,41	49,25	59,41
3	57,32	69,50	62,95	60,81	41,57	52,06
4	61,95	65,82	60,51	60,91	48,71	61,14
5	58,09	55,88	64,60	64,24	52,14	61,70
6	64,30	76,45	64,56	64,20	43,83	59,42
7	58,03	70,19	60,97	66,99	52,54	60,35
8	68,59	69,90	61,51	67,04	51,35	59,84
9			62,99	64,23	58,37	56,94
10			51,86	56,83	52,72	52,63
11			67,97	69,93	55,90	58,40
12			64,73	65,95		
Průměr	63,44	68,20	61,81	64,13	50,72	58,62
Min	57,32	55,88	51,86	56,83	41,57	52,06
Max	69,89	76,45	67,97	69,97	58,37	62,94

U všech souborů dat jsme testovali normalitu rozložení (Kolmogorov-Smirnovův a Lillieforsův test). Pro porovnávání souborů výsledků v rámci jedné třídy jsme použili Studentův T-test. U třídy S a E se průkazně nelišily plochy svaloviny na kraniálním a kaudálním řezu. Oproti tomu byl prokázán tento rozdíl u třídy U ($P < 0,001$).

Analýzu variance (ANOVA) jsme použili pro zjištění rozdílů mezi všemi třemi analyzovanými třídami; a to pro kraniální a kaudální řez zvlášť. U obou řezů (kraniální a kaudální) byl prokázán statisticky průkazný rozdíl mezi jednotlivými třídami ($P < 0,001$).

Pomocí následného testování (HSD test při nestejném N) jsme prokázali statisticky průkazné rozdíly mezi třídami S a U ($P < 0,001$) a také mezi třídami E a U ($P < 0,001$); jak u kraniálního tak i kaudálního řezu. Mezi třídami S a E nebyl v daných parametrech zjištěn statisticky průkazný rozdíl.

Dosažené výsledky poukazují na to, že předpoklad o možnosti použití programu pro analýzu obrazu, tak jak uvádí Oliver *et al.* (2010), je oprávněný. Plocha svaloviny na kraniálním a kaudálním řezu vepřové pečeně koreluje s výslednou třídou při klasifikaci pomocí vpichové sondy.

Závěr

Metoda analýzy obrazu se ukazuje být vhodnou metodou pro hodnocení zmasilosti jednotlivých kusů jatečně upravených těl. Z dalších výsledků vyplývá, že plocha svaloviny jak na kraniálním, tak kaudálním řezu vepřové pečeně koreluje se zatříděním konkrétního JUT pomocí běžně používané vpichové metody.

Poděkování

Práce byla podporovaná Výzkumným záměrem MŠMT č. 6215712402 (Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin).

Literatura

- BROSMAN, T., SUN, D. W. Improving quality inspection of food products by computer vision – a review. *Journal of Food Engineering*, 2004, vol. 61, no. 1, p. 3 – 16.
- IVÁNEK, I. Klasifikace jatečně upravených těl jatečných zvířat v České republice probíhá podle SEUROP – systému, *Maso*, 2009, roč. 20, č. 1, s. 6 – 8.
- KATINA, J. Legislativní rámec klasifikace jatečně upravených těl prasat, skotu a ovcí v EU, *Maso*, 2009, roč. 20, č. 1, s. 9 – 13.
- MANUÁL. *Image structure and Object Analyser*, version 6.0. Příručka uživatele. 1. vyd. Brno : SOFO, Druckmüller, Štarha, 2004. 104 s.
- NAŘÍZENÍ RADY (ES) č. 1234/2007 ze dne 22. října 2007, kterým se stanoví společná organizace zemědělských trhů a zvláštní ustanovení pro některé zemědělské produkty, *Úřední věstník L 299*, 16/11/2007, s. 1 - 149.
- NAŘÍZENÍ KOMISE (ES) č. 1249/2008 ze dne 10. prosince 2008, kterým se stanoví prováděcí pravidla pro zavádění klasifikačních stupnic Společenství pro jatečně upravená těla skotu, prasat a ovcí a pro ohlašování jejich cen. *Úřední věstník L 337*, 16/12/2008, s. 3 - 30
- OLIVER, A., MENDIZABAL, J., A., RIPOLL, G., ALBERTÍ, P., PURROY, A. Predicting meat yields and commercial meat cuts from carcasses of young bulls of Spanish breeds by the SEUROP method and an image analysis system, *Meat Science*, 2010, vol. 84, num. 4, p. 628 - 633.
- RIUS-VILARRASA, E., BÜNGER, L., MALTIN, C., MATTHEWS, K., R., ROEHE, R. Evaluation of Video Image Analysis (VIA) technology to predict meat yield of sheep carcasses on-line under UK abattoir conditions, *Meat Science*, 2009, vol. 82, num. 1, p. 94 - 100.
- ROZHODNUTÍ KOMISE č. 2005/1/ES ze dne 27. prosince 2004, kterým se schvalují metody třídění jatečně upravených těl prasat v České republice. *Úřední věstník L 1*, 4/1/2005, s. 8 - 1.
- STEINHAUSER, L. a kol. *Produkce masa*. 1. vyd. Tišnov : Vydavatelství potravinářské literatury - Last Tišnov, 2000, 238 – 245.
- VYHLÁŠKA č. 194/2004 Sb. ze dne 23. dubna 2004, o způsobu provádění klasifikace jatečně upravených těl jatečných zvířat a podmínkách vydávání osvědčení o odborné způsobilosti fyzických osob k této činnosti, *Sbírka zákonů*, 2004, č. 64, s. 2937 - 2947.
- VYHLÁŠKA č. 324/2005 Sb. ze dne 17. srpna 2005, kterou se mění vyhláška č. 194/2004 Sb., o způsobu provádění klasifikace jatečně upravených těl jatečných zvířat a podmínkách vydávání osvědčení o odborné způsobilosti fyzických osob k této činnosti, *Sbírka zákonů*, 2005, č. 115, s. 5730 – 5734.

Kontaktní adresa

Mgr. Zdeňka Randulová (randulovaz@vfu.cz), Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, Brno 612 42.

Oxidační změny ve svalovině bažanta obecného (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) v závislosti na způsobu skladování

Oxidative changes in muscle of common pheasant (*Phasianus colchicus* spp. *torquatus*) depending on way of storage

Tománková Jana, Gallas Leo, Steinhauserová Iva

Abstract

The aim of study was determine measuring of lipid oxidation in breast muscle of common pheasant. Lipid oxidation was monitored during four weeks of storage in cold store and outdoor environment. Rate of lipid oxidation was determined by distillation method with 2-thiobarbituric acid. 2-thiobarbituric acid react with malondialdehyde (MDA) and they generate red condensing product. The level of absorbance is measured at 532 nm and it is converted to concentration of malondialdehyde. Malondialdehyde content during storage increase. Storage in outdoor environment is better for farm breeding pheasants. Pheasant female showed higher level of lipid oxidation than pheasant male.

Key words: 2-thiobarbituric acid, common pheasant, lipid oxidation, malondialdehyde,

Úvod

Zvěřina patří mezi maso bohaté na bílkoviny s vysokou biologickou hodnotou, která spočívá v obsahu minerálních látek, vitamínů a dalších biologicky aktivních látek. Dále mívá nízký obsah tuku. Tuk je nosičem celé řady sensoricky aktivních látek. Tuk zvěřiny obsahuje vyšší podíl nenasycených mastných kyselin. Vůně zvěřiny je druhově specifická.

Žluknutí je proces oxidace dvojných vazeb nenasycených mastných kyselin vzdušným kyslíkem. Výsledkem tohoto procesu jsou produkty, zejména aldehydy a ketony, které negativně ovlivňují chuť a vůni dané potraviny a také zdravotní stav konzumenta. Následkem pokročilé oxidace lipidů může být částečné nebo úplné znehodnocení potraviny.

Materiál a metody

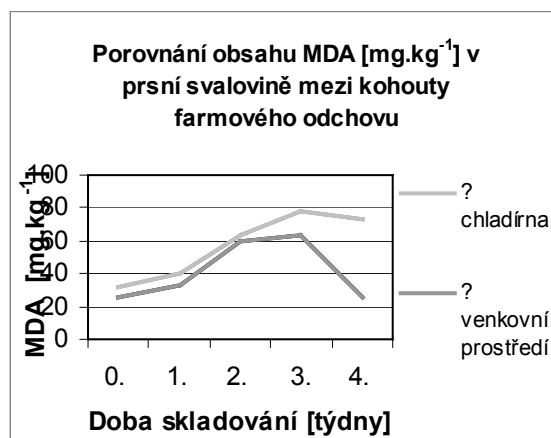
Materiál

Sto kusů bažantích kohoutů a sto kusů bažantích slepic ve věku pěti měsíců bylo rozděleno na dvě poloviny. Jedna polovina zvířat každého pohlaví byla skladována v chladárně při konstantní teplotě a druhá polovina ve venkovním prostředí. Vzorčky pro laboratorní analýzu prsní svaloviny byly odebírány u čerstvě usmrcených zvířat a následně v týdenních intervalech. Při každém odběru bylo analyzováno deset kusů bažantů z každé skupiny.

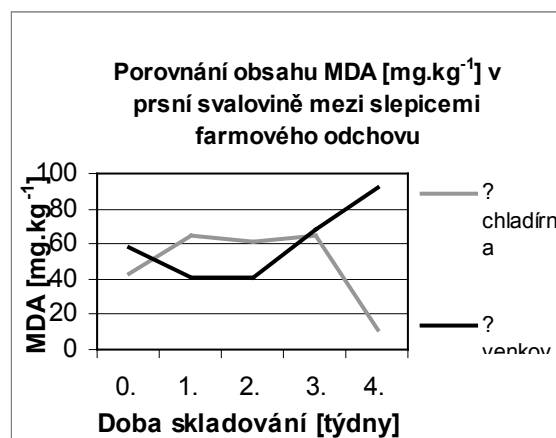
Metoda stanovení

Kyselina 2-thiobarbiturová reaguje s oxidačními produkty lipidů za tvorby červeně a žlutě zbarvených kondenzačních produktů. Měření bylo provedeno postupem dle Castellini et al., (2002). Obecně se uvádí, že metoda je vhodná ke sledování počátečních stádií žluknutí tuků a potravin obsahujících tuk, pokud tyto tuky obsahují polyenové mastné kyseliny. Výsledek měření byl přepočítán na obsah malondialdehydu.

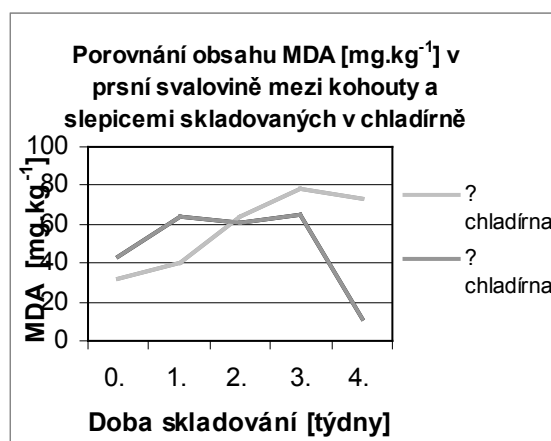
Výsledky a diskuse



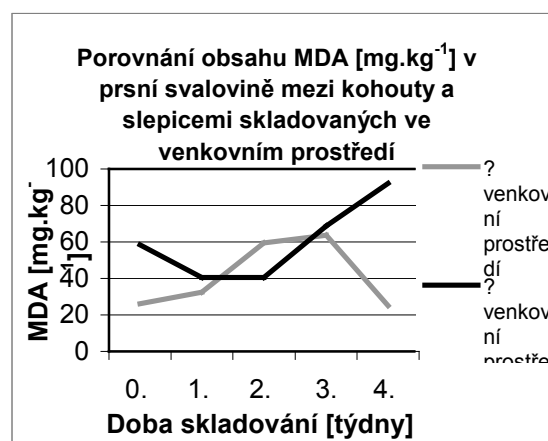
Graf č. 1.: Porovnání obsahu MDA [mg.kg⁻¹] v prsní svalovině mezi kohouty z farmového chovu skladovaných v chladírně a ve venkovním prostředí



Graf č. 2.: Porovnání obsahu MDA [mg.kg⁻¹] v prsní svalovině mezi slepicemi z farmového chovu skladovaných v chladírně a ve venkovním prostředí



Graf č. 3.: Porovnání obsahu MDA [mg.kg⁻¹] v prsní svalovině u kohoutů a slepic skladovaných v chladírně



Graf č. 4.: Porovnání obsahu MDA [mg.kg⁻¹] v prsní svalovině u kohoutů a slepic skladovaných ve venkovním prostředí

V prsní svalovině kohoutů z farmového chovu stoupal obsah malondialdehydu s délkou skladování. Statisticky průkazný rozdíl v obsahu malondialdehydu ($P < 0,001$) jsme zjistili po čtyřech týdnech skladování. Nižší míra oxidace lipidů se projevovala při skladování ve venkovním prostředí.

V prsní svalovině slepic skladovaných ve venkovním prostředí, mírně stoupala míra oxidace lipidů v závislosti na době skladování. Míra oxidace lipidů u slepic skladovaných v chladírně mírně klesla pouze ve 4. týdnu, což mohlo být způsobeno přeměnou lipidů na produkty již nereagující s TBA. Statisticky průkazný rozdíl mezi skladováním v chladírně a venkovním prostředí je v 1. týdnu ($P < 0,001$), v 2. týdnu se mírně snížil na ($P < 0,01$). Nejvýraznější statistický průkazný rozdíl vznikl ve 4. týdnu skladování ($P < 0,001$).

Při porovnání obsahu MDA mezi pohlavím byl u slepic skladovaných ve venkovním prostředí zjištěn výrazný nárůst koncentrace MDA od druhého týdne skladování. Při

skladování v chladírně byl u slepic nárůst koncentrace MDA již od prvního týdne, který se držel do vyčerpání reakčních produktů. Tato vyšší koncentrace MDA u slepic může být zapříčiněná vyšším obsahem tuku a rozdílným profilem mastných kyselin. Prsní svalovina kohoutů obsahuje nižší množství tuku, což by mohlo znamenat, že se oxidační produkty schopné reakce s kyselinou 2-thiobarbiturovou rychleji odbourají a přecházejí v látky s menší molekulovou hmotností, které s touto kyselinou již netvoří kondenzační produkty.

Závěr

Při porovnání dvou způsobů skladování farmově chovaných kohoutů a slepic se jako lepší jeví venkovní skladování u prsní svaloviny, což může být způsobeno příznivější teplotou pro zrání zvěřiny a nízkým podílem tuku ve vyšetřovaném materiálu. Skladování ve venkovním prostředí ovlivňuje roční období, počasí a povětrnostní vlivy. V průběhu čtyř týdnů venkovního skladování se střídaly vysoké teploty (až + 9 °C) v prvním týdnu, které postupně klesaly. V posledním období skladování klesla teplota až na - 4 °C, což mohlo způsobit zpomalení oxidace lipidů.

Poděkování

Práce je součástí řešení výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR MSM 6215712402.

Literatura

CASTELLINI, C., MUGNAI, C., DAL BOSCO, A (2002). Effect of organic production systém on broiler carcass and meat quality. *Meat Science*, vol. 60, p. 219 - 225

Seznam literatury k nahlédnutí u autora.

Kontaktní adresa

Mgr. Ing. Jana Tománková, Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: tomankova.janicka@seznam.cz

Hodnocení mléka a mléčných výrobků z hlediska zastoupení vybraných mastných kyselin v dietě populace ČR

Milk and milk products evaluation in the viewpoint of selected fatty acid representation in the Czech Republic population diet

Steinhauserová Pavla

Abstract

Milk and milk products (MP) are a very popular and traditional part of the Czech Republic inhabitant's diet. All animal products as well as milk and milk products are known as a main source of fat in the diet. The over intake and a bad choice of fat might play an adverse effect on the human health and might elevate the risk of serious diseases. But on the other side, fat is a basic and essential nutrient in the human diet. The fat quality and its health effect are greatly influenced by its fatty acid (FA) composition. The aim of this work was the evaluation of total fat content, the representation of 37 individual fatty acids and their group (SFA, MUFA, PUFA) and subgroup (ω 3 a *trans*-FA) in 20 types of selected milk products and milk. Also the ratio of SFA/MUFA/PUFA representation in these samples has been done.

Klíčová slova: mléko, mléčné výrobky, tuk, mastné kyseliny

Úvod

Mastné kyseliny (MK) jsou obvykle děleny dle počtu a polohy dvojných vazeb v uhlíkovém řetězci na nasycené SFA, mononenasycené (MUFA) a polynenasycené PUFA). SFA bez dvojných vazeb jsou vzhledem k zvyšování hladiny cholesterolu a předpokladu, že se podílí na cévních a srdečních onemocněních v dietě nežádoucí. MUFA obsahují v uhlíkovém řetězci jednu dvojnou vazbu a pokud nahradí v dietě SFA, působí na organismus příznivě. PUFA obsahují dvě a více dvojných vazeb a především u ω 3 MK je prokázán pozitivní vliv na lidský organismus - pomáhají snižovat hladinu cholesterolu a působí preventivně proti kardiovaskulárním onemocněním (KVD). Nenasycené *trans*-MK jsou v dietě nežádoucí vzhledem k faktu, že jsou spojovány s KVD, diabetes II. typu, alergiemi a dalšími zdravotními problémy (Ruprich a kol. 2005) a (EFSA Journal 2010).

Cílem této práce bylo zhodnotit vybraných 20 typů mléčných výrobků (MV) a mléka z hlediska množství tuku, zastoupení jednotlivých 37 MK a jejich skupin (SFA, MUFA, PUFA) a podskupin (ω 3 a *trans*-MK). Dále byl zhodnocen vzájemný poměr SFA/MUFA/PUFA zastoupení z celkového množství MK.

Materiál a metody

Jako primární zdroj dat jsem použila databázi („Paradox“) analytických výsledků pořízenou v rámci monitoringu dietární expozice, který je realizován na Státním zdravotním ústavu v Brně (Řehůrková I. 2002). Zpracována byla data z roku 2006/07, kdy bylo v definovaných vzorcích stanoveno celkové množství tuku a 37 individuů MK. Vzorky, které reprezentují tzv. „spotřební koš potravin“ populace ČR byly odebrány v tržní síti ČR, zpracovány, kombinovány do tzv. „kompozitních vzorků“, homogenizovány a analyzovány v souladu s koncepcí monitoringu dietární expozice (Ruprich a kol. 2008). Stanovení tuku a MK je prováděno v 87 typech potravin (vzorky byly ve dvouletém cyklu odebírány 4-16 x, za rok 2006 celkem 10 488 výsledků a rok 2007 10 336, celkem tedy proběhlo 20 824 analytických měření) metodou GC-FID.

V databázi byly obsaženy: naměřené koncentrace 37 MK, směrodatná odchylka průměru měření, mez stanovitelnosti (g/kg), celkový tuk (%) – pro 87 typů potravin, které byly v monitorovacím cyklu obsaženy Nx. Naměřená data byla seříděna dle typu vzorků, ty pak rozřazeny do skupin (např. maso a masné výrobky, mléko a mléčné výrobky, tuky a oleje, cukroviny, aj.). Pro jednotlivé typy potravin byl z příslušných výsledků vypočten aritmetický průměr, medián, směrodatná odchylka průměru.

Skupina mléka a mléčných výrobků obsahovala celkem 20 z 87 analyzovaných vzorků (viz tabulka č. 1) a celkem 4 712 analytických výsledků. Výběr vzorků respektuje spotřebu potravin populace ČR, některé vzorky (tzv. kompozitní vzorky) představují kombinaci příbuzných komodit – např. sýr tavený (= vysokotučný + nízkotučný + ochucený), smetanový a nízkotučný jogurt (= bílý + ochucený), mléčné kysané výrobky (= podmásli + acidofilní mléko + kefir) a mléko (= polotučné + odtučněné) (Ruprich a kol. 2008). U vzorků byl porovnán celkový obsah tuku a individuální zastoupení majoritních MK. Po té byly hodnoty pro jednotlivé MK sečteny dle charakteru jejich nasycení a vlivu na lidské zdraví do skupin SFA (17 individuí), MUFA (9), PUFA (11) a důležitých podskupin ω 3 MK (součet 18:3N3, 20:3N3, 20:5N3, 22:6N3) a *trans*-MK (součet 18:1N9T, 18:2N6T). Pro každý vzorek byl vypočten poměr SFA:MUFA:PUFA.

Tabulka č. 1: Zastoupení jednotlivých skupin a podskupin MK ve vybraných mléčných výrobcích a mléce, jejich procentuální zastoupení ze sumy MK a celkové množství tuku

POTRAVINA - VZOREK	%		(g/kg vzorku)						%
	N	TUK	SFA	MUFA	PUFA	Σ MK	<i>trans</i> - MK	ω 3 MK	
Máslo	8	82,4	535,5	222,4	24,8	782,7	16,60	1,1E-01	68 / 28 / 3
Máslo pomazánkové	8	31,2	201,0	97,4	13,8	312,3	12,01	2,1E-03	64 / 31 / 4
Smetana kysaná	4	29,2	79,7	30,5	5,0	115,2	2,65	8,8E-04	69 / 24 / 4
Sýr s plísní uvnitř	8	28,8	192,2	75,6	8,8	276,6	4,49	1,5E-03	69 / 27 / 3
Sýr s plísní na povrchu	8	25,1	172,7	62,2	7,2	242,2	3,41	2,6E-03	71 / 26 / 3
Sýr tvrdý Eidam	8	24,5	124,8	48,7	5,8	179,3	3,26	2,1E-02	70 / 27 / 3
Sýr tvrdý uzený	8	23,3	170,3	61,3	5,6	237,2	2,60	7,9E-04	72 / 26 / 2
Výživa ml. kojenecká	4	20,0	81,8	68,9	36,1	186,8	1,81	3,6E-04	44 / 37 / 19
Šlehačka	4	18,0	161,4	66,6	7,4	235,4	4,47	1,2E-03	69 / 28 / 3
Sýr tavený	8	17,4	116,6	45,5	6,5	168,5	3,24	1,3E-02	69 / 27 / 4
Krémy smetanové	4	12,5	80,9	32,9	4,9	118,7	2,66	3,3E-03	68 / 28 / 4
Sýr čerstvý	4	12,4	167,8	62,2	5,6	235,6	2,31	2,2E-03	71 / 26 / 2
Smetana	4	10,7	48,8	19,8	2,3	70,8	1,38	1,7E-03	69 / 28 / 3
Mléko zahuštěné	4	8,5	51,9	23,5	2,6	78,0	1,66	4,6E-05	66 / 30 / 3
Jogurty smetanové	8	6,3	45,1	15,1	1,7	61,8	0,82	8,0E-03	73 / 24 / 3
Tvaroh	4	4,0	26,0	10,9	1,4	38,3	0,84	1,2E-03	68 / 29 / 4
Dezerty tvarohové	4	2,8	17,1	7,2	1,0	25,3	0,51	8,5E-04	68 / 28 / 4
Výrobky ml. kysané	4	1,5	9,7	4,3	0,5	14,5	0,29	3,8E-04	67 / 30 / 3
Mléko	16	0,9	6,1	2,4	0,3	8,8	0,15	8,4E-03	69 / 27 / 3
Jogurty nízkotučné	4	0,3	0,7	0,3	0,1	1,1	0,02	6,6E-04	65 / 26 / 9

Poznámka: N = počet analyzovaných vzorků

Výsledky a diskuse

Naměřené hodnoty průměrného množství tuku v mléce a vybraných MV se pohybovaly ve velmi širokém rozmezí. Nejvíce tuku bylo naměřeno v másle (82,4 %), oproti tomu nejméně v mléce a nízkotučných jogurtech (0,9 % a 0,3 %). Z hlediska tučnosti sýrů dominovaly sýry s plísní na povrchu a uvnitř (25 - 29 % tuku).

Ze **SFA** převládala především kyselina palmitová (okolo 50 %), stearová a myristická (17 % a 15 %). Nejvíce zastoupené **MUFA** v mléce a MV představovala kyselina olejová (80 %), palmitolejová a elaidová (6 %), z **PUFA** převládala z 85 % kyselina linolová a 12,5 % kyselina linolenová.

Závěr

Procentuální zastoupení nežádoucích SFA ve vybraných MV a mléce bylo měřeno nad 60 % z celkového množství MK. Nejnižší zastoupení SFA a nejvyšší PUFA bylo naměřeno v mléčné kojenecké výživě, která měla nejvýhodnější poměr SFA/MUFA/PUFA. Dále pak byl výhodnější poměr SFA/MUFA/PUFA u nízkotučných jogurtů, u ostatních vzorků si byly poměry velice blízké. Největší množství *trans*-MK obsahovalo pomazánkové máslo, což je pravděpodobně dáno technologickým procesem výroby. Z výsledků je patrné, že mléko a MV mají ze všech MK stejně jako ostatní živočišné produkty významné zastoupení SFA, nelze ale opomenout, že jejich prostřednictvím jsou do organismu přiváděny důležité nutrienty.

Poděkování

Za poskytnutá data a možnost je analyzovat bych ráda poděkovala mému školiteli a zároveň garantovi monitoringu dietární expozice Doc. MVDr. Jiřímu Ruprichovi, CSc. Dále bych ráda poděkovala vedoucí laboratoří hygieny výživy a bezpečnosti potravin na SZÚ v Brně, RNDr. Ireně Řehůrkové, PhD., za veškerou nejen odbornou pomoc.

Literatura

RUPRICH, J. a kol. Zdravotní důsledky zátěže lidského organismu cizorodými látkami z potravinových řetězců v roce 2007: odborná zpráva za rok 2007, Praha: Státní zdravotní ústav, 2008 [cit. 2010-04-01].

Dostupné na WWW: <http://www.chpr.szu.cz/monitor/tds07c/tds07c.htm>.

RUPRICH, J. a kol. Informace VP pro potraviny ve věci: *trans*-MK v potravinách, Praha: Státní zdravotní ústav, 2005 [cit. 2010-04-01]. Dostupné na WWW: http://www.chpr.szu.cz/vedvybor/dokumenty/stanoviska/stan_2004_11_deklas_TFA_info1rev.pdf.

Řehůrková, I. Monitoring of the dietary exposure of the population to chemical substances in the Czech Republic: design and history, 2002. *Central European Journal of Public Health* 10, s. 174-179.

Scientific Opinion of Panel the Panel of Dietetic Products, Nutrition and Allergies on a request from the European Commission related to dietary reference values for fat. *The EFSA Journal*, 2010.

Kontaktní adresa

Pavla Steinhauserová, MVDr., studentka DSP programu, Státní zdravotní ústav Praha, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Steinhauserova@chpr.szu.cz

Rezistentné enterokoky v surovom kravskom mlieku Resistant enterococci in raw cow milk

Bezeková Jana, Kročko Miroslav, Ducková Viera, Čanigová Margita

Abstract

The aim of this work was to estimate the occurrence of enterococci in samples from the first milk streaks after udder hygiene, from the teat skin of the udder, from the teat-cup liner of the milking machines, from the milk of bulk tanks and from the milk of tankers. The predominant species isolated from the milk samples of bulk tanks was *Enterococcus faecalis* (85.71 %). From the tanker milk samples were prevalent isolates of *Enterococcus faecium*. The antibiotic resistance of enterococci isolates to ampicilin (4.25 %), erythromycin (6.38 %), gentamicin (10.64 %), tetracycline (17.02 %) and vancomycin (6.38 %) were determined.

Keywords: *enterococci, raw milk, antibiotic resistance*

Úvod

Enterokoky sú grampozitívne, katalázanegatívne, fakultatívne anaeróbne baktérie kokovitého tvaru, ktoré patria do skupiny baktérií mliečneho kysnutia (LAB) (Martín-Platero et al., 2009). Pôvodným stanovišťom enterokokov je intestinálny trakt ľudí a zvierat, odkiaľ sa môžu dostať do rôznych produktov a prostredia. Sú značne odolné k vonkajšiemu prostrediu a prirodzene rezistentné k mnohým antimikrobiálnym prípravkom a dezinfekčným prostriedkom (Giraffa, 2003). Dlhú dobu boli enterokoky považované za medicínsky nevýznamné mikroorganizmy, ale v posledných desaťročiach vystupujú ako nozokomiálne patogény spôsobujúce rozličné infekcie (Ducková et al., 2007). Vďaka nadmernému a veľakrát neuváženému používaniu antibiotík dochádza v poslednej dobe k významnému nárastu rezistencie baktérií, vrátane enterokokov, k predtým účinným antibiotikám (Šustáčková et al., 2004).

Cieľom práce bolo izolovať enterokoky zo vzoriek získaných zo sterov z ceckov, z gumových častí nástrčiek dojacích zariadení, z prvých strekov mlieka, bazénových vzoriek mlieka, z cisternových vzoriek mlieka a zo vzoriek zo zásobných tankov mlieka. Identifikovať jednotlivé izoláty enterokokov komerčnými a molekulárno-biologickými metódami a u identifikovaných enterokokov zistiť ich rezistenciu na vybrané typy antibiotík.

Materiál a metodika

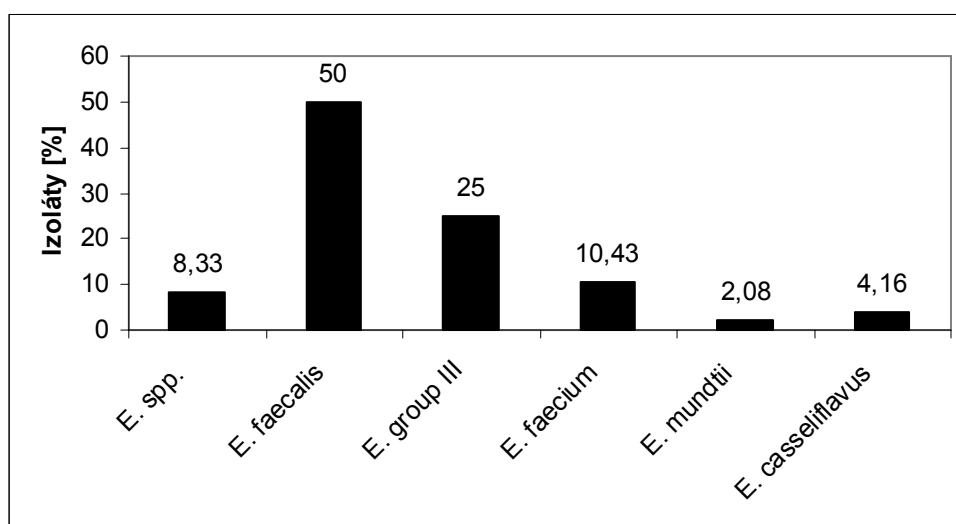
Odobraté vzorky sa vyšetrili štandardnou kultivačnou metódou. Počet enterokokov sa stanovoval na selektívnom diagnostickom médiu Slanetz-Bartley (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) kultiváciou pri teplote 37 ± 1 °C po 48 ± 2 hodinách kultivácie. Suspektné kolónie enterokokov vyrastených na Slanetz-Bartley agare sa podrobili rodovému potvrdeniu rastom na selektívnom žlč-eskulín-azidovom médiu (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) po 24 hodinách kultivácie pri teplote 37 ± 1 °C, negatívnym katalázovým a pozitívnym PYRA – testom (*Lachema*, Česká republika). Uskutočnilo sa potvrdenie príslušnosti ku G^+ baktériam. Potvrdené kmene sa druhovo identifikovali pomocou komerčného EN-COCCUS testu (*Lachema*, Česká republika). Izoláty enterokokov identifikované pomocou EN-COCCUS testu (*Lachema*, Česká republika) ako druh *E. faecalis* sa potvrdzovali pomocou PCR metódy. Teplotný profil sa nastavil podľa

Kariyama et al. (2000). Elektroforetická separácia DNA fragmentov sa uskutočnila v 2 % agarózovom géli pri 200 V, 180 mA, 15 min.

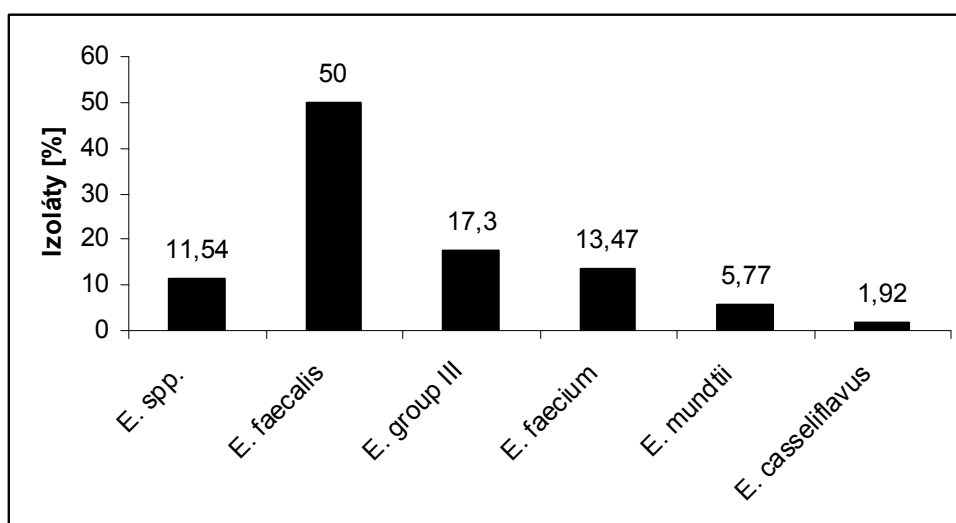
Identifikované kmene rodu *Enterococcus* sp. sa podrobili hodnoteniu rezistencie na antibiotiká diskovou difúznou metódou na Mueller Hinton agare (*HiMedia Laboratories*, India) s použitím nasledovných antibiotických diskov a koncentraciou: Ampicilín 10 mcg/disk, Erytromycín 15 mcg/disk, Tetracyklín 30 mcg/disk, Teikoplanin 30 mcg/disk, Gentamicin 10 mcg/disk a Vankomycín 30 mcg/disk (*HiMedia Laboratories*, India). Zaradenie jednotlivých kmeňov medzi rezistentné, stredne rezistentné a citlivé sa uskutočnilo podľa kritérií CLSI (2006).

Výsledky a diskusia

Výsledky týkajúce sa percentuálneho zastúpenia druhov rodu *Enterococcus* izolovaných z rôznych zdrojov v prvovýrobe a z rôznych vzoriek mlieka sú znázornené na obr. 1 a 2.



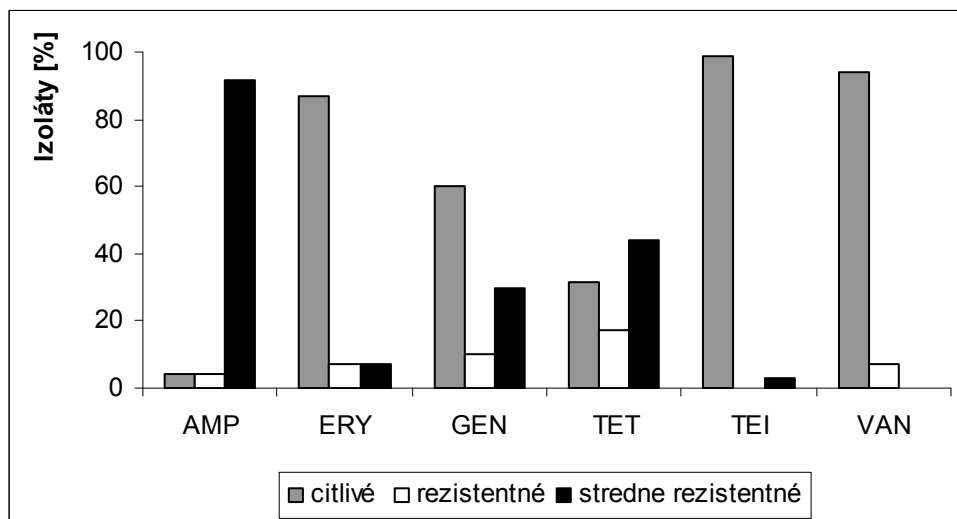
Obrázok 1: Percentuálne zastúpenie druhov *Enterococcus* izolovaných z rôznych zdrojov v prvovýrobe mlieka (n = 48).



Obrázok 2: Druhové zastúpenie enterokokov izolovaných z rôznych vzoriek mlieka (n=56).

Na veľmi častý výskyt druhu *Enterococcus faecalis* v mlieku poukazujú aj práce iných autorov, napr. Ziano (2006), Lukáčová (2009), Ryšánek et al. (2009).

Obr. 3 znázorňuje antibiotickú rezistenciu identifikovaných enterokokov. Najčastejšie sa zisťovala rezistencia na tetracyklín. Aj podľa Šustáčkovej et al. (2004) z typov získanej rezistencie u kmeňov *E. faecalis* izolovaných z mlieka prevažovala rezistencia k tetracyklínu. Medzi izolátmi enterokokov sa zistili tiež kmene rezistentné na vankomycín. Výskyt enterokokov rezistentných na vankomycín v mlieku potvrdili aj Javed et al. (2010).



Obrázok 3: Antibiotická rezistencia enterokokov izolovaných z rôznych druhov vzoriek mlieka.

Naše výsledky potvrdili, že rezistentné enterokoky sú prítomné v surovom mlieku a pri ich známej odolnosti je možné predpokladať, že by sa mohli dostať až do mliečnych výrobkov.

PodĎakovanie

Práca sa riešila za finančnej podpory grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/0410/09.

Literatúra

K dispozícii u autorov.

Kontaktná adresa

Jana Bezeková, Ing. Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, j.bezeková@pobox.sk

Identifikace laktobacilů izolovaných z potravin pomocí PCR a MALDI-TOF MS

Identification of lactobacilli isolated from food by PCR and MALDI-TOF MS

¹Dušková Marta, ²Šedo Ondrej, ²Zdráhal Zbyněk, ^{1,3}Karpíšková Renáta

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

²Oddělení funkční genomiky a proteomiky, Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita

³Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum laboratorních činností, OLHVBP Brno

Abstract

The aim of this study was to compare two methods for the species identification. 175 strains of lactobacilli isolated from milk and meat products (n = 139) were identified by genotypic and chemotaxonomic methods: the polymerase chain reaction (PCR) and the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Using the PCR method strains were differentiated into 10 species and into 16 species by MALDI-TOF MS. The total agreement of both methods has been observed in five species (*L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* a *L. sakei*).

Key words: *Lactobacillus* spp., species-specific PCR, MALDI-TOF MS profiling, milk products, meat products

Úvod

Rod *Lactobacillus* je početnou heterogenní skupinou, jejíž klasifikace se dynamicky mění. Mezi tradiční klasifikační metody patří biochemické testy, jejich spolehlivost a rozsah však mají omezené možnosti. Zejména řada izolátů z potravin je obtížně identifikovatelná. Z těchto důvodů se k druhovému zařazení využívají stále častěji metody alternativní. Díky molekulárně-biologickým metodám jsou neustále popisovány nové rozdíly mezi zástupci tohoto rodu (Giraffa *et al.*, 2010). Metoda MALDI-TOF MS, hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpce a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry), je vhodná pro rychlou identifikaci mnoha bakteriálních druhů. Tato metoda byla úspěšně aplikována i pro bakterie izolované z potravin (Mazzeo *et al.*, 2006).

Cílem této práce bylo srovnání výsledků druhové identifikace laktobacilů izolovaných z potravin získaných metodami PCR a MALDI-TOF MS.

Materiál a metody

Celkem bylo vyšetřeno 139 vzorků potravin. Jednalo se o vzorky z tržní sítě: masné (16) a mléčné výrobky (90) a výrobky z ovčího mléka z ekologické farmy na Valašsku (33). Izoláty (175) byly kultivovány na MRS agaru (Oxoid, GB) při 30 °C, 48 - 72 h, mikroaerofilně. U suspektních kolonií byla sledována morfolgie buněk mikroskopicky (Gramovo barvení), tvorba katalázy a oxidázy (JK Trading, CZ). Konfirmace izolátů laktobacilů byla provedena metodou PCR s rodově specifickými primery LbLMA 1-rev a R16-1 (Dubernet *et al.*, 2002). K druhové identifikaci byly použity druhově specifická PCR a skupinová PCR založené na detekci nukleotidových sekvencí rozdílných pro jednotlivé druhy laktobacilů, vyskytujících se v oblasti mezi geny pro 16S a 23S rRNA.

Druhově specifickou PCR bylo možno identifikovat 11 druhů laktobacilů: *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus*, *L. zeae* (Walter *et al.*, 2000), *L. curvatus*, *L. sakei* (Berthier and Ehrlich, 1998), *L. brevis* (Guarneri *et al.*, 2001), *L. paracasei* (Ward *et al.*, 1999) a skupinovou PCR 8 druhů: *L. delbrueckii*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. salivarius* (Song *et al.*, 2000).

Dále byly izoláty identifikovány chemotaxonomicky hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF MS. Bakteriální kmeny byly pro tuto analýzu připraveny podle standardního protokolu (Freiwald and Sauer, 2009). Analýza byla provedena na zařízení UltraFlex III a hmotnostní spektra byla zpracována pomocí softwaru BioTyper (Bruker Daltonics, D). Získaná hmotnostní spektra byla srovnána s databází MALDI-TOF MS profilů referenčních druhů z České sbírky mikroorganismů a s databází MALDI-TOF MS profilů dodaných společností Bruker Daltonics.

Výsledky a diskuse

Ze 175 izolátů laktobacilů se metodou PCR podařilo druhově identifikovat 114 kmenů a metodou MALDI-TOF MS 129 kmenů. Metodou PCR byly kmeny zařazeny do 10 druhů laktobacilů a metodou MALDI-TOF MS do 16 druhů. Shoda v druhové identifikaci mezi těmito dvěma metodami byla 89,47 %. U druhů *L. curvatus*, *L. delbrueckii*, *L. johnsonii*, *L. plantarum* a *L. sakei* byla identifikace shodná ve 100 %. Výsledky druhové identifikace laktobacilů metodami PCR a MALDI-TOF MS jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Výsledky druhové identifikace laktobacilů metodami PCR a MALDI-TOF MS, shoda obou metod.

<i>Lactobacillus</i> spp.	PCR: počet kmenů	MALDI-TOF MS: počet kmenů	Shoda [%]
<i>L. brevis</i>	8	7	87,5
<i>L. casei</i>	16*	0	0
<i>L. curvatus</i>	17	17	100
<i>L. delbrueckii</i>	5	5	100
<i>L. fermentum</i>	4	3	75,0
<i>L. johnsonii</i>	11	11	100
<i>L. paracasei</i>	18	17	94,4
<i>L. plantarum</i>	7	7	100
<i>L. rhamnosus</i>	38	29	76,3
<i>L. sakei</i>	6	6	100

* Zkřížená reakce *L. casei* a *L. paracasei* – kmeny zařazeny k druhu *L. paracasei*

Při srovnání hmotnostních spekter získaných analýzou MALDI-TOF MS s databází laktobacilů poskytnutou společností Bruker Daltonics se podařilo identifikovat 124 kmenů, a to jako zástupci 18-ti druhů laktobacilů. Shoda identifikace s PCR byla vyšší (94,74%), což může být dáno větším množstvím referenčních spekter typových a sbírkových kmenů laktobacilů v německé databázi.

Při identifikaci polymerázovou řetězovou reakcí existují u fylogeneticky příbuzných druhů, jako jsou *L. casei* × *L. paracasei*, *L. plantarum* × *L. paraplantarum* a *L.*

johnsonii × *L. gasseri*, zkřížené reakce a dochází k amplifikaci cílového produktu u obou druhů zároveň (Walter *et al.*, 2000; Ward *et al.*, 1999). Při analýze laktobacilů metodou MALDI-TOF MS se obtížně rozlišují druhy *L. casei* × *L. paracasei* × *L. zeae* × *L. rhamnosus*, případně *L. curvatus* × *L. fructivorans* a *L. gasseri* × *L. johnsonii*. Zástupci těchto druhů mají velmi podobná spektra a o jejich zařazení často rozhodují píky s nízkou intenzitou signálu.

Závěr

Hmotnostní spektrometrie se při druhové identifikaci bakterií izolovaných z potravin stále více prosazuje díky své úspěšnosti identifikace, ale také i díky jednoduchosti a rychlosti provedení. Avšak stejně jako při použití metody PCR nelze geneticky příbuzné druhy vždy spolehlivě rozlišit. Na základě výsledků uvedených v práci lze konstatovat, že polyfázní přístup a kombinace metod při druhové identifikaci laktobacilů se jeví jako nezbytný.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory výzkumného záměru MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“, MSM 0021622415 a LC 06034.

Literatura

- BERTHIER, F.; EHRLICH, S.D. Rapid species identification within two groups of closely related lactobacilli using PCR primers that target the 16S/23S rRNA spacer region. *FEMS Microbiology Letters*. 1998, vol. 161, no. 1, s. 97-106.
- DUBERNET, S.; DESMASURES, N.; GUEGUEN, M. A PCR-based method for identification of lactobacilli at the genus level. *FEMS Microbiology Letters*. 2002, vol. 214, no. 2, s. 271-275.
- FREIWALD, A.; SAUER, S. Phylogenetic classification and identification of bacteria by mass spectrometry. *Nature Protocols*. 2009, vol. 4, no. 5, s. 732-742.
- GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. *Research in Microbiology*. 2010. In Press, Corrected Proof, Available online 17 March 2010.
- GUARNERI, T.; ROSSETTI, L.; GIRAFFA G. Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using the polymerase chain reaction. *Letters In Applied Microbiology*. 2001, vol. 33, no. 5, s. 377-381.
- MAZZEO, M.F.; SORRENTINO, A.; GAITA, M.; *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for the discrimination of food-borne microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, no. 2, s. 1180-1189.
- SONG, Y.L.; KATO, N.; LIU, C.X.; *et al.* Rapid identification of 11 human intestinal *Lactobacillus species* by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, vol. 187, no. 2, s. 167-173.
- WALTER, J.; TANNOCK, G.W.; TILSALA-TIMISJARVI, A.; *et al.* Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, vol. 66, no. 1, s. 297-303.
- WARD, L.J.H.; TIMMINS, M.J. Differentiation of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*. 1999, vol. 29, no. 2, s. 90-92.

Kontaktní adresa

Mgr. Marta Dušková, Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ČR; e-mail: duskovam@vfu.cz

Patogenní potenciál *L. monocytogenes* izolovaných z potravin Pathogenic potential of *L. monocytogenes* isolated from foodstuffs

Gelbíčová Tereza, Karpíšková Renáta

Abstract

The aim of this study was to evaluate pathogenic potential of *L. monocytogenes* isolates from foods on the basis of virulence genes characteristics. Majority of tested isolates belonged to serotype 1/2a (54 %) and then to serotype 1/2b (23 %). All the strains carried virulence genes *prfA*, *hlyA*, *actA*, *plcA*, *plcB*, *inlA*, *inlB*, *inlC* and *inlJ*. Irrespective of the serotype or food type, all the tested *L. monocytogenes* strains showed the ability to induce listeriosis in humans.

Key words: serotyping, PCR, virulence genes, food

Úvod

L. monocytogenes je grampozitivní bakterie, dobře adaptovaná na saprofytický způsob života v půdě a rozkládající se vegetaci, a současně intracelulární patogen schopný vyvolat převážně alimentární onemocnění lidí i zvířat (Gray *et al.*, 2006). Přestože se u *L. monocytogenes* rozlišuje 13 různých sérotypů, za 98 % humánních listerióz jsou odpovědné izoláty sérotypu 1/2a, 1/2b, 1/2c a 4b (²Doumith *et al.*, 2004). S humánními případy listerióz podle řady autorů souvisí zejména sérotyp 4b (Farber and Peterkin, 1991; ²Doumith *et al.*, 2004; Hong *et al.*, 2007). Na základě těchto skutečností bývá diskutována otázka různého patogenního potenciálu jednotlivých genetických linií a sérotypů *L. monocytogenes*. Patogenita bakterií *L. monocytogenes* je dána jejich schopností penetrovat a množit se v různých typech hostitelských buněk. Klíčovými faktory virulence nezbytnými pro intracelulární cyklus *L. monocytogenes* jsou geny ostrůvku patogenity LIPI-1: pozitivně regulační faktor A (*prfA*), listeriolysin O (*hlyA*), fosfatidylinositol fosfolipáza C (*plcA*), fosfatidylcholin fosfolipáza C (*plcB*), zinek dependentní metaloproteáza (*mpl*), aktin polymerizující protein (*ActA*), a dále internaliny A a B (*inlA*, *inlB*) (Roberts and Wiedmann, 2003; Gray *et al.*, 2006).

Materiál a metodika

Vyšetřeno bylo 225 potravinových izolátů *L. monocytogenes* (tabulka č. 1) získaných v letech 2008 – 2009 v rámci činnosti NRL pro listérie (SZÚ–OLHVBP Brno) a monitoringu MZ ČR (MZSO projekt IV, <http://www.chpr.szu.cz/monitoring.htm>). Před provedením typizace byly izoláty *L. monocytogenes* vyočkovány na krevní agar (Bio-Rad, USA) a inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin za aerobních podmínek.

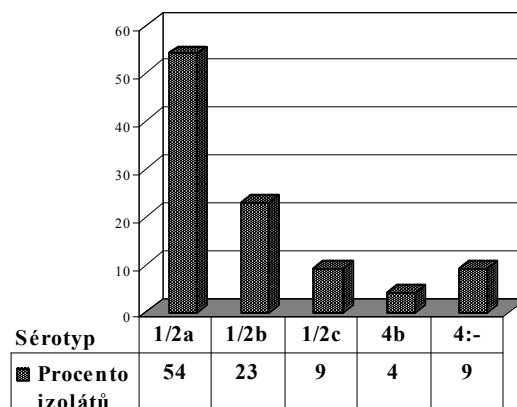
Sérotypizace byla provedena metodou sklíčkové aglutinace za použití komerčně dostupných antisér (DENKA SEIKEN, Japonsko). Výsledky sklíčkové aglutinace byly potvrzeny pomocí multiplex PCR (¹Doumith *et al.*, 2004).

K detekci genů virulence byla použita kombinace čtyř PCR: **1.** detekce *prfA* (D'Agostino *et al.*, 2004) a *plcA* (Jaradat *et al.*, 2002), **2.** *hlyA* (Aurora *et al.*, 2008) a *actA*, (Jaradat *et al.*, 2002), **3.** *plcB* (Jaradat *et al.*, 2002) a **4.** *inlA*, *inlC*, *inlJ* (Liu *et al.*, 2007) a *inlB* (Jaradat *et al.*, 2002). Pro všechny reakce byly použity primery syntetizované firmou GENERI BIOTECH (ČR), PPP polymeráza (Top-Bio, ČR) nebo Qiagen Multiplex PCR Kit (BIO-CONSULT, ČR).

Výsledky a diskuze

Tabulka č. 1: Původ a počet testovaných izolátů *L. monocytogenes*

Původ		Počet izolátů
Potraviny k přímé spotřebě	mléčné výrobky	20
	masné výrobky	115
	lahůdkářské výrobky	30
	rybí výrobky	6
	cukrářské výrobky	2
	zelenina	2
	drůbeží maso a droby	21
Potraviny určené k dalšímu zpracování	rybí maso	5
	vepřové maso	7
	mleté maso	5
	králíčí maso	3
	mražená zelenina	8
	droždí	1
CELKEM		225



Graf č. 1: Zastoupení sérotypů u potravinových izolátů *L. monocytogenes*

Tabulka č. 2: Distribuce genů virulence u kmenů *L. monocytogenes* různého původu a sérotypu

Původ kmenů	Sérotyp	Počet kmenů	Přítomnost genů ^{a)}								
			<i>prfA</i>	<i>hlyA</i>	<i>plcA</i>	<i>plcB</i>	<i>actA</i>	<i>inlA</i>	<i>inlB</i>	<i>inlC</i>	<i>inlJ</i>
Potraviny určené k dalšímu zpracování	1/2a	29	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2b	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2c	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4b	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4:-	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Potraviny k přímé spotřebě	1/2a	93	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2b	45	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	1/2c	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4b	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	4:-	16	+	+	+	+	+	+	+	+	+

^{a)}+ nebo – indikuje přítomnost či absenci genu u všech kmenů daného sérotypu

S výskytem v potravinách bývají obvykle spojovány izoláty *L. monocytogenes* sérotypu 1/2a (Hong *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2009). Rovněž v této práci zaujímal sérotyp 1/2a (54 %), mezi potravinovými izoláty dominantní postavení, zatímco sérová skupina 4 byla detekována jen ojediněle (graf č. 1).

U všech kmenů *L. monocytogenes* bylo detekováno celé spektrum testovaných genů virulence (tabulka č. 2). Podobně jako v naší práci byly prokázány geny *prfA*, *hlyA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, a také *inlA* a *inlB* u všech kmenů *L. monocytogenes* pocházejících z potravin i v dalších studiích (Jaradat *et al.*, 2002; ²Doumith *et al.*, 2004). Některými autory však byly detekovány i kmeny *L. monocytogenes* pocházející z potravin vyznačující se absencí některého ze základních genů virulence. Kaur *et al.* (2009) prokázal šest avirulentních izolátů *L. monocytogenes* z kozího masa a dva izoláty z buvolího mléka s delecí genu *prfA*, *hlyA*, *plcA* a *actA*. Chen *et al.* (2009) detekoval jeden kmen sérotypu 1/2b izolovaný z mořských plodů vyznačující se absencí genů *inlA* a *inlB*. Podle výsledků této i jiných studií jsou rovněž geny *inlC* a *inlJ*, jejichž funkce ve virulenci není zcela jasná, stabilní součástí genomu *L. monocytogenes*. I v případě těchto genů ale byly detekovány kmeny *L. monocytogenes* vyznačující se delecí některého z nich. Chen *et al.* (2009) detekoval jeden kmen sérotypu 4a izolovaný z mléka, který se vyznačoval nepřítomností obou genů a čtyři izoláty sérotypu 1/2a

z mořských plodů s absencí *inlJ*. Baktérie *L. monocytogenes* bez genů *inlC* a *inlJ* nejsou v pokusech na myších schopné vyvolat mortalitu (Liu *et al.*, 2007).

Primárním zdrojem listerióz jsou potraviny a na patogenní potenciál většiny potravinových izolátů *L. monocytogenes* poukazují i jiné studie (Neves *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2009). Ze srovnání výsledků u potravin určených k dalšímu zpracování a k přímé spotřebě je zřejmé, že druh potraviny ani její zpracování nemá vliv na přítomnost sledovaných genů virulence. Rozdíly v patogenním potenciálu *L. monocytogenes* nebyly zaznamenány ani mezi jednotlivými sérotypy, podobně jako ve studii, kterou uveřejnili Roche *et al.* (2009). V České republice však doposud nebyl zaznamenán jediný případ humánní listeriózy vyvolaný sérotypem 1/2c, přestože v potravinách se kmeny tohoto sérotypu vyskytují.

Závěr

Z výsledků této studie vyplývá, že všechny vyšetřované kmeny *L. monocytogenes* pocházející z potravin mají potenciál vyvolat onemocnění u lidí. Rozdíly v zastoupení testovaných genů virulence nebyly zaznamenány ani v závislosti na původu a sérotypu *L. monocytogenes*.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory VZ MŠMT MSM 6215712402 a projektu MSMT 2B08050.

Literatura

- AURORA, R., PRAKASH, A., PRAKASH, S., RAWOOL, DB., BARBUDDHE, SB. Comparison of PI-PLC based assays and PCR along with in vivo pathogenicity tests for rapid detection of pathogenic *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, 2008, vol. 19, no. 7, p. 641-647.
- D'AGOSTINO, M., WAGNER, M., VAZQUEZ-BOLAND JA., KUCHTA, T., KARPISOVA, R., HOORFAR, J., NOVELLA, S., SCORTTI, M., ELLISON, J., MURRAY, A., FERNANDES, I., KUHN, M., PAZLAROVA, J., HEUVELINK, A., COOK, N. A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model-towards an international standard. *Journal of Food Protection*, 2004, vol. 67, no. 8, p. 1646-1655.
- ¹DOUMITH, M., BUCHRIESER, C., GLASER, P., JACQUET, C., MARTIN, P. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, vol. 42, no. 8, p. 3819-3822.
- ²DOUMITH, M., CAZALET, CH., SIMOES, N., FRANGEUL, L., JACQUET, CH., KUNST, F., MARTIN, P., COSSART, C., GLASER, P., BUCHRIESER, C. New aspects regarding evolution and virulence of *Listeria monocytogenes* revealed by comparative genomics and DNA arrays. *Infection and Immunity*, 2004, vol. 72, no. 2, p. 1072-1083.
- FARBER, JM., PETERKIN PI. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 1991, vol. 55, no. 3, p. 476-511.
- GRAY, MJ., FREITAG, NE., BOOR, KJ. How the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes* mediates the switch from environmental Dr. Jekyll to pathogenic Mr. Hyde. *Infection and Immunity*, 2006, vol. 74, no. 5, p. 2505-2512.
- HONG, E., DOUMITH, M., DUPERRIER, S., GIOVANNACCI, I., MORVAN, A., GLASER, P., BUCHRIESER, C., JACQUET, CH., MARTIN, P. Genetic diversity of *Listeria monocytogenes* recovered from infected persons and pork, seafood and dairy products on retail sale in France during 2000 and 2001. *International Journal of Food Microbiology*, 2007, vol. 114, no. 2, p. 187-194.
- CHEN, J., LUO, X., JIANG, L., JIN, P., WEI, W., LIU, D., FANG, W. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiology*, 2009, vol. 26, no. 1, p. 103-111.
- JARADAT, ZW., SCHUTZE, GE., BHUNIA, AK. Genetic homogeneity among *Listeria monocytogenes* strains from infected patients and meat products from two geographic locations determined by phenotyping, ribotyping and PCR analysis of virulence genes. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, vol. 76, no. 1-2, p. 1-10.
- KAUR, S., MALIK, SVS., BHILEGAONKAR, KN., VAIDYA, VM., BARBUDDHE, SB. Use of phospholipase-C assay, in vivo pathogenicity assays and PCR in assessing the virulence of *Listeria* spp., 2009, article in press.
- LIU, D., LAWRENCE, ML., AUSTIN, FW., AINSWORTH, AJ. A multiplex PCR for species – and virulence – specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, vol. 71, no. 2, p. 133-140.
- NEVES, E., SILVA, AC., ROCHE, SM., VELGE, P., BRITO, L. Virulence of *Listeria monocytogenes* isolated from the cheese dairy environment, other foods and clinical cases. *Journal of Medical Microbiology*, 2008, vol. 57, no. 4, p. 411-415.
- ROBERTS, AJ., WIEDMANN, M. Pathogen, host and environmental factors contributing to the pathogenesis of listeriosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2003, vol. 60, no. 5, p. 904-918.
- ROCHE, SM., KEROUANTON, A., MINET, J., LE MONNIER, A., BRISABOIS, A., VELGE, P. Prevalence of low-virulence *Listeria monocytogenes* strains from different foods and environments. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, vol. 130, no. 2, p. 151-155.

Kontaktní adresa: Tereza Gelbíčová, Státní zdravotní ústav Praha, Palackého 3a, 61242 Brno, e-mail: gelbicova@chpr.szu.cz

Stanovení vybraných mikrobiálních ukazatelů u syrového kravského mléka získaného z prodejních automatů

Determination of selected microbiological parameters of raw cow's milk obtained from vending machines

¹Vaňáč Václav, ¹Kopuncová Monika, ²Gelbíčová Tereza, ¹Trivedi Krina,
¹Cupáková Šárka, ¹Necidová Lenka, ¹Janštová Bohumíra, ^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno
²Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum laboratorních činností, OLHVBP Brno

Abstract

The objective of this study was to evaluate microbiological quality of raw cow's milk obtained from different vending machines. Milk samples were collected every two weeks and processed within 24 hours. On the whole, 41 samples were examined. The samples were obtained from 12 vending machines during the period from January to April 2010. The samples were examined for the presence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* and for the enumeration of coagulase positive staphylococci, enterococci, *E. coli* (and VTEC) and *B. cereus*. No positive findings of *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes*, *B. cereus* and VTEC were found. *Salmonella* spp. was detected in 5 samples obtained from 4 farms. Enterococci were detected in 36 (87.8%), coagulase positive staphylococci were found in 26 (63.4%) some of them were enterotoxigenic and *E. coli* was confirmed in 25 (61.0%) of obtained milk samples. According to these results the consumption of raw cow's milk can represent potential risk for health of the consumers.

Keywords: *Campylobacter* spp., *Listeria monocytogenes*, coagulase positive staphylococci, enterococci, *E. coli*, VTEC, *B. cereus*, *Salmonella* spp., enterotoxines, PCR

Úvod

Od loňského roku je v České republice možný prodej syrového kravského mléka prostřednictvím prodejních automatů. S ohledem na nízké výkupní ceny mléka stoupá zájem ze strany farmářů o nový způsob distribuce syrového mléka přímo ke konečnému spotřebiteli. Zájem o tento produkt roste také ze strany spotřebitele.

Mléko doposud prodávané v tržní síti procházelo tepelnou úpravou (pasterací). Prodejní automaty jsou sice označeny nápisem „před konzumací převařit“, ale většina spotřebitelů se domnívá, že je konzumace syrového mléka stejně bezpečná jako mléka pasterovaného. Na webových stránkách se spotřebitel může dokonce dočíst, že všechny bakterie obsažené v mléce jsou zdraví prospěšné a může zde nalézt i recepty na přípravu domácích mléčných výrobků ze syrového mléka.

V zahraničí, kde jsou syrové mléko a výrobky z něj konzumovány častěji je v této souvislosti popisován sporadický i epidemický výskyt alimentárních onemocnění. Jedná se o např. kampylobateriózy, salmonelózy, listeriózy, onemocnění vyvolaná VTEC, *S. aureus*, klíšťovou encefalitidu, Q horečku.

Platná legislativa pro syrové kravské mléko z automatu zatím žádné parametry nestanovuje, a proto je nutné získat seriózní informace o jeho mikrobiální kvalitě. V současnosti nejsou k dispozici informace o výskytu patogenů v syrovém mléce ani na národní, ani na evropské úrovni. Pokud jsou vzorky syrového mléka odebírány

k laboratornímu vyšetření, jsou analýzy obvykle zaměřeny pouze na sledování přítomnosti původců mastitid.

Cílem této práce proto bylo stanovení vybraných ukazatelů zdravotní nezávadnosti mléka (patogenních a indikátorových mikroorganismů) a na jejich základě zjistit aktuální zdravotní rizika pro spotřebitele.

Materiál a metodika

Vzorky

Celkem bylo vyšetřeno 41 vzorků syrového kravského mléka získaného jednak opakovanými, ale i jednotlivými odběry z 12 mléčných automatů ve vybraných lokalitách Jihočeského a Jihomoravského kraje. Odběry probíhaly od 31.1.2010 do 6.4.2010. Vzorky byly po odběru uloženy do chladicí přepravky a transportovány přímo do laboratoře k mikrobiologickému vyšetření.

Metody

Vyšetření byla zaměřena na stanovení celkového počtu mikroorganismů (ČSN EN ISO 4833), počtu *E. coli* (ČSN EN ISO 16649-1), VTEC (ČSN EN ISO 16654), enterokoků (stanovení počtu na médiu S-B a průkaz po pomnožení v PPV, inkubace 37 °C po dobu 24 hodin), stanovení počtu koaguláza pozitivních stafylokoků (ČSN EN ISO 6888-1), počtu *B. cereus* (ČSN EN ISO 7937), průkaz *Campylobacter* spp. (ČSN EN ISO 10272-1), průkaz *L. monocytogenes* (ČSN EN ISO 11290-1), průkaz *Salmonella* spp. (ČSN EN ISO 6579).

Koaguláza pozitivní stafylokoky byly potvrzeny metodou multiplex PCR pro stanovení specifického fragmentu SA 442 (Martineau *et al.*, 1998). U takto potvrzených kmenů *S. aureus* bylo metodou PCR provedeno stanovení průkazu přítomnosti genů zodpovědných za tvorbu stafylokokových enterotoxinů A-J (Monday and Bohach, 1999; Lövseth *et al.*, 2004). U izolátů *Salmonella* spp. byla dále provedena sérotypizace a u kampylobakterů druhová identifikace metodou PCR (Bang *et al.*, 2002; Linton *et al.*, 1997; Winter *et al.*, 1998; Popoff, 2001). Konfirmace VTEC (detekce genů VT1 a VT2) byla provedena metodou PCR (Fagan *et al.*, 1999).

Výsledky a diskuse

Pro stanovení mikrobiologických kritérií v syrovém mléce nejsou uvedeny žádné legislativní limity s výjimkou limitu pro CPM uvedeného v Nařízení (ES) č. 853/2004 ve znění Nařízení (ES) č. 1161/2009 (klouzavý geometrický průměr max. $1,0 \cdot 10^5$ KTJ/ml⁻¹). Z celkového počtu 41 vzorků byla zjištěna průměrná hodnota CPM $1,5 \cdot 10^5$ KTJ/ml⁻¹. Tato zvýšená hodnota poukazuje na možné nesprávné zacházení se syrovým mlékem, např. nízkou hygienou při získávání mléka na farmě, jeho uchování při chladírenských teplotách, transportu a nebo nedostatečném chlazení ve výdejním automatu.

Hodnota počtu *E. coli* pouze pět krát (12,2 %) přesáhla detekční limit normy ($< 5 \cdot 10^0$ KTJ/ml⁻¹) a u těchto vzorků se počty pohybovaly s rozptylem hodnot od $2,0 \cdot 10^1$ do $1,6 \cdot 10^4$ KTJ/ml⁻¹. Z pomnožení byla přítomnost *E. coli* potvrzena u 25 (61,0 %) vzorků.

Enterokoky byly detekovány v 36 (87,8 %) vzorcích, počty enterokoků byly detekovány u 15 (36,6 %) vzorků, s maximálním počtem $1,6 \cdot 10^3$ KTJ/ml⁻¹.

S. aureus byl detekován u 26 (63,4 %) vzorků. Z tohoto množství přesáhla průměrná hodnota počtu *S. aureus* detekční limit u 14 (34,1 %) vzorků. Průměrná hodnota počtů byla $7,2 \cdot 10^3$ KTJ/ml⁻¹. V žádném ze vzorků nebyl detekován počet přesahující hodnotu $1,0 \cdot 10^5$ KTJ/ml⁻¹, která již může u konzumenta vyvolat onemocnění – stafylokokovou enterotoxikózu. Výskyt genů kódujících stafylokokové enterotoxiny (*ses*) byl prokázán u 20 (76,9 %) získaných izolátů. U mléka ze dvou farem (A a B) byl opakovaně zaznamenán specifický výskyt genů *seg* (7x) u farmy A a genů *sec* (4x) u farmy B.

Na čtyřech farmách byl prokázán výskyt *Salmonella* spp. následujících sérotypů: *S. Typhimurium* (2x), *S. Infantis* (1x) a *S. Bovismorbificans* (1x), z toho u jedné z farem opakovaně. Ostatní sledovaná patogenní agens (*Campylobacter* spp., *L. monocytogenes* VTEC, *B. cereus*) nebyla ve vyšetřovaných vzorcích prokázána.

Závěr

Přímá konzumace syrové mléka může představovat zdravotní riziko pro konzumenty a jeho prodej proto vyžaduje plnění všech požadavků SVP a SHP a stanovení vybraných mikrobiologických kritérií SVS pro tuto komoditu. Informace uvedené na mléčných automatech nejsou pro spotřebitele dostačující, kromě informace, že mléko je nutné převařit, by měla být také uvedena doba do kdy např. ihned po nákupu, dále teplota skladování (např. do 5 °C) a doba údržnosti (např. do 48 hodin). Nedodržení těchto zásad může u spotřebitelů po konzumaci neošetřeného nebo nesprávně ošetřeného a uchovávaného mléka docházet ke zdravotním komplikacím.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projekty VZ MŠMT MSM 6215712402 a 2B06048.

Literatura

- BANG, DD., WEDDERKOPP, A., PEDERSEN, K., MADSEN, M. Rapid PCR using nested primers of the 16S rRNA and the hippuricase (*hipO*) genes to detect *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*, 2002, vol. 16, no. 5, p. 359-369.
- FAGAN, PK., HORNITZKY, MA., BETTELHEIM, KA., DJORDJEVIC, SP. Detection of shiga-like toxin (*stx*₁ and *stx*₂), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, vol. 65, no. 2, p. 868-872.
- LINTON, D., LAWSON, AJ., OWEN, RJ., STANLEY, J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direkt from diarrheic samples. *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, vol. 35, no. 10, p. 2568-2572.
- 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, p. 3869-3872.
- MARTINEAU, PICARD, F.J., ROY, P.H., OUELLETTE, M., BERGERON, M.G. Specie-Specific and Ubiquitous-DNA-Based Assays for Rapid Identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 1998, vol. 36, no. 3, p. 618-623.
- 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, p. 3411-3414.
- WINTERS, DK., O'LEARY, AE., SLAVIK, MF. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods. *Letters in Applied Microbiology*, 1998, vol. 27, no. X p. 163-167.

Kontaktní adresa: Václav Vaňáč, Mgr., Fakulta veterinární hygieny a ekologie, VFU Brno, H09026@vfu.cz, vaclav.vanac@seznam.cz

Charakteristika technologických a ochranných vlastností novoizolovaných laktobacilov

Characteristics of technological and safety properties new isolated lactobacilli

Smetanková Jana, Sopčáková Zuzana, Greif Gabriel, Greifová Mária

Abstract

The aim of this study was antimicrobial activity of *lactobacilli* isolated from Slovak traditional cheep cheese „bryndza“. We tested technological (growth in diferent temperatures, pH values and concentrations of NaCl) and safety (production of low-organic acids and their inhibition against indicator bacteria and moulds) properties of two strains of *L. brevis*. We also observed the production of biogenic amines.

KLúčové slová: *laktobacily, antimikrobiálna aktivita, technologické vlastnosti*

Úvod

Mnohé kyslomliečne baktérie vykazujú inhibičný efekt proti rastu a produkcii toxínov ostatných prítomných baktérií. Jedná sa o efektívny nešpecifický kontrolný mechanizmus, ktorý je bežný u všetkých populácií v prostredí, vrátane potravín. Medzi také mechanizmy môžeme zahrnúť napr. kompetíciu o živiny alebo o miesto adhézie, tvorbu nepriaznivého prostredia. V potravinárstve tak môžeme tieto vlastnosti využiť na zvýšenie trvanlivosti a zdravotnej bezpečnosti potravín. Antimikrobiálne pôsobenie KMB, využívané na biokonzerváciu potravín zahrňuje produkciu organických kyselín, H₂O₂, CO₂, diacetylu alebo bakteriocínov (Konings a kol., 2000; Ross a kol., 2002; Charlier a kol., 2009).

Je teda snaha izolovať nové baktérie s technologickým významom, identifikovať ich pre možnosti ich využitia vo forme prídavných kultúr k tradične používaným priemyselným zákysovým kultúram ako bioochranu.

Cieľ práce

Sledovanie antibakteriálneho a antifungálneho účinku testovaných laktobacilov voči vybraným baktériám/plesniam za aeróbnych podmienok.

Sledovanie produkcie organických kyselín testovanými laktobacilmi v MRS bujóne za aeróbnych podmienok pri teplote 37 °C s využitím HPLC RID/UV metódy.

Sledovanie technologických vlastností a sledovanie tvorby biogénnych amínov testovaným laktobacilmi v MRS bujóne za anaeróbnych podmienok pri teplote 37 °C s využitím HPLC UV metódy.

Materiál a metódy

Testované mikroorganizmy: *L. brevis* (G3), *L. brevis* (G6)

Indikátorové baktérie: *Bacillus cereus* KPT (zo zbierky na OPT, FCHPT STU), *Bacillus subtilis* CCM 2216, *Escherichia coli* CCM 3988, *Listeria monocytogenes* NCTC 4886 (National Collection of Type Cultures, UK), *Pseudomonas aeruginosa* CCM 3955, *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Indikátorové plesne: *Alternaria alternata* KBM 2/91 (zo zbierky na OBM, FCHPT STU), *Aspergillus flavus* CCM F-108 (Czech Collection of Microorganisms, Brno), *Fusarium nivale* KBM 1/89, *Mucor racemosus* KBM 1/90, *Penicillium funiculosum* CCM F-161, *Rhizopus oryzae* KBM 1/90,

Kultivačné médiá: MRS bujón

Podmienky kultivácie: Vstupná koncentrácia mikroorganizmov 10^6 KTJ.cm⁻³. Stacionárna kultivácia mikroorganizmov bola realizovaná v aeróbných a anaeróbných podmienkach pri teplote 37 °C.

Sledovanie tvorby organických kyselín/biogénnych amínov metódou HPLC RID/UV.

Výsledky

Antimikrobiálna aktivita testovaných kmeňov *L. brevis* bola pozorovaná metódou podľa Magnussona (2003). Obidva kmene inhibovali rast *P. aeruginosa* a *S. aureus* na ploche viac ako 9% PM. Rast *B. cereus* a *L. monocytogenes* inhibovala iba vzorka G6 a u *B. subtilis* a *E. coli* bola inhibícia u oboch kmeňov rôzna. Antifungálna aktivita vzoriek G3 a G6 bola voči všetkým indikátorovým plesniam väčšia ako 4% plochy PM. *A. alternata* a *F. nivale* boli inhibované na ploche väčšej ako 15 %.

Produkcia organických kyselín tvorených *L. brevis* sa vyhodnotila pomocou HPLC s použitím RID detektora. Vzorky boli kultivované 72 h v aeróbných, resp. anaeróbných podmienkach pri 37°C. Namerané hodnoty sú uvedené v tabuľke č.1.

Tabuľka č.1: Tvorba organických kyselín a etanolu dvomi kmeňmi *L. brevis* (vzorka G3 a G6) v aeróbných i anaeróbných podmienkach

	Aeróbne podmienky				Anaeróbne podmienky			
	Kys. mliečna (g.dm ⁻³)	Kys. jantárová (g.dm ⁻³)	Kys. octová (g.dm ⁻³)	Etanol (g.dm ⁻³)	Kys. mliečna (g.dm ⁻³)	Kys. jantárová (g.dm ⁻³)	Kys. octová (g.dm ⁻³)	Etanol (g.dm ⁻³)
G3	14,070	0,265	1,244	0,395	6,870	0,899	1,283	3,226
G6	8,628	1,228	2,272	4,048	7,169	0,976	1,243	3,309

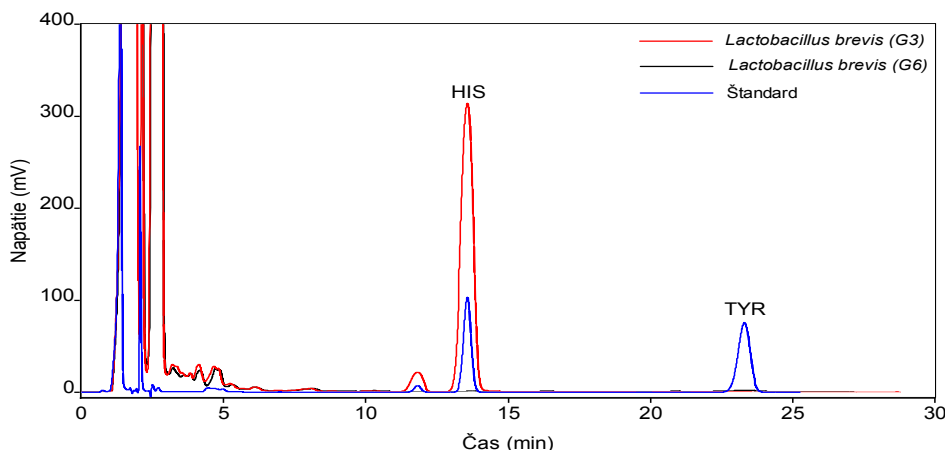
V rámci štúdia technologických vlastností bol pozorovaný rast *L. brevis* (vzorky G3 a G6) v rôznych kultivačných podmienkach. Výsledky sú uvedené v tabuľke č.2.

Tabuľka č.2: Rast *L. brevis* (vzorka G3 a G6) v rôznych kultivačných podmienkach

	Teplota (°C)					pH			Koncentrácia NaCl (%)		
	15	25	30	37	45	5,7	6	9	2	4	6,5
G3	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-
G6	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-

+ - dobrý rast; +/- - spomalený rast; - - žiadny rast

Tvorba biogénnych amínov (histamín a tyramín) testovanými kmeňmi *L. brevis* kultivovanými za anaeróbných podmienok je znázornená na obrázku 1.



Obr.1.: Chromatogramy dansylderivátov štandardov histamín (HIS), tyramín (TYR) a supernatantov po anaeróbnej kultivácii *Lactobacillus brevis* (G3 a G6) pri 37 °C

Záver

Záverom možno konštatovať, že oba testované kmene *L. brevis* (vzorka G3 a G6) v rôznych kultivačných podmienkach rástli resp. rástli veľmi dobre. Inhibujúcou bola jedine 4% a 6,5% koncentrácia NaCl pre vzorku G3. Vzorky *L. brevis* netvorili tyramín a histamín tvorila iba vzorka G3. Tvorba organických kyselín sa potvrdila aj antimikrobiálnou aktivitou voči indikátorovým mikroorganizmom. Inhibícia sa neprejavila iba u vzorky G3 voči *B. cereus* a *L. monocytogenes*.

PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom APVV 0158/2007. Naše podĎakovanie patrí Dr. Kuchtovi z VUP BA za vypožičanie kmeňov testovaných laktobacilov.

Literatúra

- Magnusson, J.: Antifungal activity of lactic acid bacteria. Doctor'sdissertation. Swedish University of Agricultural Sciences, *Department of Microbiology*. Uppsala, 2003, s.7-31.
- Ross, R.P.; Morgan, S.; Hill, C. Preservation and fermentation: past, present and future. *International Journal of Food Microbiology*, 2002, 7, s. 3-16.
- Konings, W. N.; Kok, J., Kuipers; O.P., Poolman, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Current Opinion Microbiology*, 2000, 3, s. 276-282.
- Charlier C.; Cretenet, M.; Even, S.; Le Loir, Y. Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 2009,131, s. 30-39.

Kontaktná adresa

Ing. Jana Smetanková, e-mail: jana.smetankova@stuba.sk, FCHPT-STU Bratislava, Ústav biotechnológie a potravinárstva, Oddelenie potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, SR

Význam a aplikácia ochranných kyslomliečnych baktérií voči *Staphylococcus aureus in vitro*

The meaning and application of protective lactic acid bacteria against *Staphylococcus aureus in vitro*

Sopčáková Zuzana, Smetanková Jana, Greif Gabriel, Greifová Mária,
Pálosová Eszter

Abstract

The aim of this thesis was to study competing growth of *Staphylococcus aureus* and selected lactic acid bacteria (Laktoflora, Delvotec MT-53, ZS-25) with the addition of protective cultures isolated from raw sheep's milk (*Lactobacillus rhamnosus* - 123). The next measurements were oriented to protective effect of commercial culture - LC 705 (*Lactobacillus rhamnosus*). The lactic acid bacteria are able to inhibit the growth of pathogens with pH decreasing. The initial level of contamination *S. aureus* was 10^3 CFU per ml. We detected that the growth inhibition of *Staphylococcus aureus* with mixed cultures Laktoflora – 123 (1:2) and ZS25 – 123 (1:1) was the largest of all.

Kľúčové slová: *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, smotanová kultúra

Úvod

Staphylococcus aureus patrí medzi grampozitívne patogénne baktérie. Je pôvodcom širokej škály rôznych ochorení od povrchových poranení až po život ohrozujúcu septikémiu (1).

Principiálne sa nachádza na pokožke a mukózných membránach teplokrvných zvierat (2). *Staphylococcus aureus* môže rásť v rôznych podmienkach prostredia a je častým kontaminantom potravín. Kontaminácia *S. aureus* môže pochádzať zo surovín (napr. mastitídne mlieko), z výrobného zariadenia (napr. biofilmu na povrchu zariadenia) alebo ľudskou činnosťou (napr. kýchanie, kašeľ) počas prípravy potravín a manipuláciou s nimi. Za vhodných podmienok produkuje enterotoxíny, ktoré zapríčiňujú alimentárne otravy (1).

Baktérie mliečneho kysnutia sú schopné rásť v mlieku, preto sa mliekarenstve využívajú pri výrobe fermentovaných mliečnych výrobkov. Antagonistický účinok mliečnych baktérií sa spája hlavne s koncovými produktami fermentácie, ako sú kyselina mliečna, kyselina octová, diacetyl, peroxid vodíka, enzýmy alebo s produkciou bakteriocínov (2). Kyselina mliečna je hlavný metabolit zodpovedný za významné zmeny pH v ich okolí počas rastu a súčasne pôsobí aj proti mnohým mikroorganizmom (4). Kombinácia týchto faktorov obmedzuje množenie nežiaducich mikroorganizmov (baktérie spôsobujúce kazenie alebo patogénne mikroorganizmy). Kyslomliečne baktérie (KMB) teda nepochybne zohrávajú úlohu pri podpore bezpečnosti potravín.

Cieľ práce

Sledovať kompetíciu rastu *Staphylococcus aureus* a vybraných kyslomliečnych baktérií (Laktoflora, Delvotec MT-53, ZS25) s prídavkom ochrannej kultúry izolovanej zo surového ovčieho mlieka (*Lactobacillus rhamnosus* 123) a porovnať jej účinok s komerčnou ochrannou kultúrou *Lactobacillus rhamnosus* LC 705.

Materiál a metódy

Kultivačné médium: UHT mlieko (1,5 % tuk)

Mikroorganizmy:

Staphylococcus aureus CCM 4516 (Brno, ČR)

Delvotec MT – 53 (DSM, Holandsko) - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*, *Streptococcus thermophilus*

Smotanová kultúra Laktoflora (Milcom a.s., Praha) - *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*,

ZS25 – dva kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (VÚM, Žilina)

Lactobacillus rhamnosus 123 (izolovaný zo surového ovčieho mlieka)

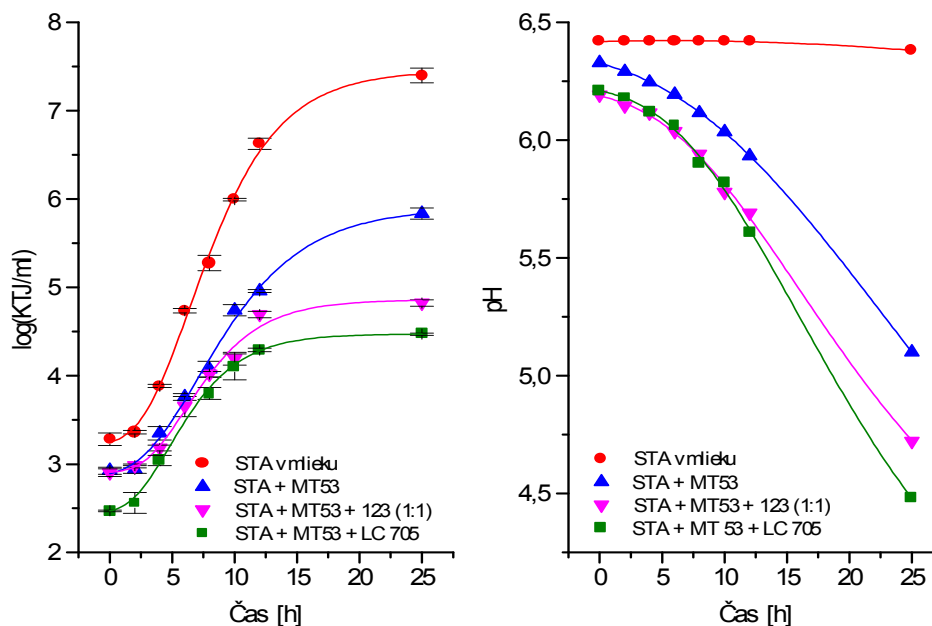
Lactobacillus rhamnosus LC 705 (Danisco Niebüll, SRN)

Metódy: Zried'ovacia kultivačná metóda, Baird – Parker agar (MERCK, Darmstadt,DE)

Podmienky kultivácie: 30 °C

Výsledky a diskusia

V modelovom prostredí UHT mlieka sme sledovali dynamiku rastu *S.aureus* v spoločnej kultúre s Laktoflora, Delvotec MT-53, ZS25 a následne aj s ochrannou kultúrou *L. rhamnosus* izolovanou (123) a komerčnou (LC705). Výsledky pokusov kultivačných stanovení počtov *S.aureus* s rôznymi prídavkami ochranných kultúr v mlieku pri 30 °C sú znázornené rastovými krivkami. Prvý modelový pokus bol zameraný na sledovanie rastu samotnej kultúry *S. aureus* po inokulácii mlieka so vstupnou koncentráciou 10^3 KTJ/ml.



a,

b,

Obr.1 a, Grafické znázornenie priebehu rastových kriviek *S. aureus* v mlieku pri 30 °C bez prídavku a s prídavkami ochranných kultúr MT53, 123 a LC 705

b, Grafické znázornenie poklesu pH hodnoty pri kultivácii *S. aureus* v mlieku pri 30 °C bez prídavku a s prídavkami ochranných kultúr MT53, 123 a LC 705

Koncentrácia pridaných kultúr bola v počte 10^7 KTJ/ml. Počas experimentov sa okrem rastu *S. aureus* sledovali aj zmeny pH hodnôt mlieka. Po 25 hodinách kultivácie vzrástol počet *S. aureus* na hodnotu 7,4 log poriadku.

Z obr. 1a si možno všimnúť, že pri spoločnej kultivácii *S. aureus* a kultúry MT53 bola zaznamenaná inhibícia *S. aureus*, pri prídavku ochrannej kultúry 123 (v pomere 1:1) bola inhibícia výraznejšia a pri prídavku ochrannej kultúry LC 705 (1:1) bola pozorovaná najväčšia inhibícia rastu tohto patogénneho mikroorganizmu. Na obr. 1 b je znázornený pokles hodnôt pH v jednotlivých situáciách rastu. Najvýraznejší pokles pH hodnoty (4,5) nastal pri vzájomnej kultivácii *S. aureus* s MT 53 a LC 705.

Medzi ďalšie najúčinnnejšie testované kombinácie spôsobujúce inhibíciu *S. aureus* patrí Laktoflora + 123 (1:2) a ZS25 + 123 (1:1). *S. aureus* bol najmenej inhibovaný pri použití iba jedného druhu ochrannej kultúry (*S. aureus* + MT53, *S. aureus* + Laktoflora, *S. aureus* + ZS25) (výsledky nie sú tu uvedené, bližšie informácie v prezentácii).

Záver

Z výsledkov tejto práce vyplýva, že dynamika množenia *S. aureus* v mlieku bola ovplyvnená druhovým zastúpením baktérií mliečného kysnutia, ich obsahom, aktivitou a prídavkom ochrannej kultúry. Prídavok špeciálnych druhov a kmeňov baktérií mliečného kysnutia môže spomaliť rast kontaminujúcich mikroorganizmov a predĺžiť tak trvanlivosť produktu, resp. zabezpečiť jeho zdravotnú bezchybnosť.

Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom APVV 0158/2007.

Literatúra

1. Charlier, C. – Cretenet, M. – Even, S. – Le Loir, Y.: Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria. International Journal of Food Microbiology, 2008, s.1-8.
2. Bajúsová, B. – Valík, L. – Liptáková, D. – Medveďová, A.: Rastové parametre kmeňov *Staphylococcus aureus* izolovaných z ovčieho mlieka a hrudkového syra. In: Sborník přednášek semináře „Mléko a sýry 2006“, Praha, 2006, s.115-119. ISBN 80-7080-620-6.
3. Bajúsová, B. – Valík, L. – Liptáková, D. – Medveďová, A.: Vplyv baktérií mliečného kysnutia na rast *Staphylococcus aureus* v mlieku. In: Sborník přednášek semináře „Mléko a sýry 2007“, Praha, 2007, s.95-98. ISBN 978-80-7080-661-6.
4. Eklund, T.: The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. International Journal of Food Microbiology, 1, 1984, s.179-185.

Kontaktná adresa

Ing. Zuzana Sopčáková, Oddelenie potravinárskej technológie, Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika, Email: zuzana.sopcakova@stuba.sk

Bacteriocin Production by Enterococci Isolated from Foodstuffs

¹Trivedi Krina, ¹Sedmíková Radka, ^{1,2}Karpíšková Renata

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

²Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum laboratorních činností, OLHVBP Brno

Abstract

In some foodstuffs enterococci are used to extend shelf life and improve the hygienic safety of foodstuffs because they produce several antimicrobial substances such as bacteriocins (enterocins). 252 enterococci strains isolated from different foodstuffs were studied to characterize their bacteriocin producing activity against *Staphylococcus aureus*, methicilin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Listeria monocytogenes*, and *Listeria innocua*. Bacteriocin activity of *E. faecalis* was found to be higher in comparison with *E. faecium*, the highest bacteriocin has been observed in enterococci isolated from milk. In general bacteriocins produced by *E. faecalis* were inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* in 60% of strains, *Listeria innocua* in 48%, MRSA in 45% and *Listeria monocytogenes* in 31%.

Key words: enterococci, bacteriocins, foodstuffs

Introduction

Enterococci are the bacteria which play an important beneficial role in the production of various traditional fermented food products in Europe and may also be successfully used as probiotics (Franz *et. al.*, 2003). The presence and growth of enterococci in fermented foods such as cheeses and sausages results in organoleptically unique products, which contribute to the local cuisine and heritage of the region (Franz *et. al.*, 2003). In addition, due to interlinked European and worldwide markets, these cheeses are widely distributed and are internationally considered as delicacies.

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria are antimicrobial peptides or proteins, which can be used as natural food preservatives to enhance the shelf life and safety of food products (De Vyust *et. al.*, 2000). Many enterococci have also the capability to produce bacteriocins (enterocins) responsible for the inhibition of narrow range of strains closely related to the producer and in some instances, endowed with a broad spectrum of antibacterial activity (Sabi *et. al.*, 2008). Bacteriocins have become a subject of great interest since they are frequently active against several Gram-positive, food-borne pathogens such as *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Clostridium botulinum* (Martin-Platero *et. al.*, 2009). For this reason their use as biopreservatives in foods has been suggested (Martin-Platero *et. al.*, 2009).

The purpose of the present study was to look for the bacteriocin-producing enterococcal strain isolated from foodstuffs of different origin against gram positive food-borne pathogens.

Materials and methods

Isolation of enterococci and species identification:

252 enterococci strains isolated from various foodstuffs and stored at -75 °C in 20% glycerol medium originated from the strain collection of Department of Hygiene and Milk Technology (University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno). The samples were resuscitated on the Slanetz Bartley medium (Hi media, India) at 37 °C for 24 hours. Species specific identification of enterococci was carried out using the PCR

method based on the genus specific section of the *sod A* gene encoding the enzyme manganese-dependent-superoxide dismutase (Jackson *et. al.* 2004).

Antimicrobial activity of enterococci:

Five µl drops of an overnight culture of the strains were spotted onto plates containing 10 ml of GM-17 agar (M-17 plus 1% glucose) medium dissolved in 0.1 M pH 7.2 sodium phosphate buffer (GM-17-B). Plates incubated at 37 °C for 18-24 h the plates were overlaid with 1 ml of Brain Heart Infusion broth (BHI, Hi media, India) inoculated (2% Mcfarland density) with an overnight culture of the indicator strains *Staphylococcus aureus* SA CCM 4223 (CCM, Masaryk University, Brno, Czech Republic), methicilin resistant *Staphylococcus aureus* S15 MRSA (own isolate), *Listeria monocytogenes* LM CCM 4699 and *Listeria innocua* CCM 4030 and incubated once more at 37 °C for 18-24 h to allow the growth of indicator strain. The appearance of clear inhibition zone around the strain spot indicated the production of any inhibitor substance active against the indicator strain.

Results and discussion

The production of antimicrobial substances against *Staphylococcus aureus*, MRSA, *Listeria innocua* and *Listeria monocytogenes* was tested. Detailed information on the results of experiment is shown in Table 1. *E. faecalis* was found to be more active in production of bacteriocins irrespective of its origin than *E. faecium*. Strains of *Staphylococcus aureus* and MRSA were found to be more sensitive to bacteriocins than *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*.

Table 1: Production of bacteriocin by *E. faecalis* and *E. faecium* isolated from various foodstuffs and it's activity on selected Gram positive bacteria:

Origin	Species (number of isolates)	Total number of strains producing bacteriocins (%)			
		<i>S. aureus</i> *	MRSA*	<i>L. monocytogenes</i> *	<i>L. innocua</i> *
Milk and milk products (100 isolates)	<i>E. faecalis</i> (50)	41 (41)	30 (30)	13 (13)	21 (21)
	<i>E. faecium</i> (50)	32 (32)	15 (15)	12 (12)	09 (9)
	Total	73 (73)	45 (45)	25 (25)	30 (30)
Meat and meat products (76 isolates)	<i>E. faecalis</i> (38)	20 (26.3)	18 (23.68)	21 (27.63)	32 (42.10)
	<i>E. faecium</i> (38)	21 (27.63)	12 (15.78)	10 (13.15)	05 (6.57)
	Total	41 (53.94)	30 (39.47)	31 (40.78)	37 (48.68)
Vegetable and fruit origin (76 isolates)	<i>E. faecalis</i> (38)	15 (19.73)	09 (11.84)	05 (6.57)	07 (9.21)
	<i>E. faecium</i> (38)	13 (17.10)	06 (7.89)	02 (2.63)	06 (7.89)
	Total	28 (36.84)	15 (19.73)	7 (9.21)	13 (17.10)

* - tested strains

Enterocin-producing strains have also been isolated previously from food-stuffs (Elotmani *et. al.*, 2002). Here, many enterococci strains are found to be producing bacteriocins against various food-borne pathogens, mainly the Gram positive ones. Thus, the present study could be of interest in the bio control of food borne pathogens.

Conclusion

In conclusion, results from the present study suggest that the bacteriocin-producing enterococci could be used to improve the safety of traditional fermented foods of different origin where enterococci commonly occur. The selective use of this bacteriocinogenic strains may improve the microbiological quality of such foods.

Acknowledgments

This study was supported by project VZ MŠMT MSM 6215712402.

References

De VUYST L., CALLEWAERT R., HUGAS M.. Competitiveness and bacteriocin production of Enterococi in the production of Spanish-style dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 2000, vol. 57, p. 33-42.

ELOTMANI F., REVOL-JUNELLES A.M., ASSOBBHEI O, MILLIERE J.B. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raib, a Moroccan traditional fermented milk. *Curr. Microbiol*, 2002, vol. 44, p. 10-17.

FRANZ M.A.P.C., STILES M. E., SCHLEIFER H. K., HOLZAPFEL W. H. Enterococci in foods- a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, vol. 88, p. 105-122.

JACKSON C.H. , FEDORKA-CRAY P.J. , BARETT J. B. (2004): Use of genus and species-specific multiplex PCR for identification of Enterococci. *J. Clin. Microbiol.* , 2004, vol. 42, no.8, p. 3558-3565.

MARTIN-PLATERO A.M., VALDIVIA E., MAQUEDA M., MARTINEZ-BUENO M. Characterization and safety evaluation of enterococci isolated from Spanish goats' milk cheeses. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, vol. 132, p. 24-32.

SABIA C., De NIEDERHAUSERN S., GUERRIERI E., MESSI P., ANACARSO I., MANICARDI G., BONDI M. Detection of bacteriocin production and virulence traits in vancomycin-resistant enterococci of different sources. *Journal of Applied Microbiology* , 2008, vol. 104, p. 970-979.

Address

M.Sc., Krina Trivedi, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno Palackého 1/3, 612 42 Brno, email: H07315@vfu.cz.

Redukcia mastitíd stafylokokovej etiológie v stáde dojníc Reduction of staphylococcal mastitis in herd dairy cows

Zigo František, Vasil' Milan, Elečko Juraj

Abstract

This study focuses on reduction occurrence of mastitis realized anti-mastitis methods in herd 178 dairy cows. Realization anti-mastitis methods reduced in examined herd occurrence mastitis induced of bacteria *Staphylococcus* sp. from 38.5 % in 11.1 %, occurrence mastitis induced of bacteria *Streptococcus* sp. were reduced from 9.0 % in 3.0 %, occurrence mastitis induced of bacteria *Bacillus* sp., *Arcanobacterium* sp., *Proteus* sp., *Rhodococcus* sp. from 7.4 % in 0.1 % and occurrence mastitis induced of bacteria *E. coli* and from family *Enterococcus* sp. was markedly invariable. During of the year has been after the four complex examinations herd treated 62 dairy cows by Synulox LC intramammary application, which was therapeutic effectiveness from 75.0 % in 100.0 % depending on pathogens induced of mastitis.

Key words: mastitis in dairy cows, staphylococci, streptococci, *Arcanobacterium pyogenes*, anti-mastitis methods, treatment mastitis

Úvod

V etiológii mastitíd dojníc baktérie *Staphylococcus* sp.. zaberajú významné miesto. Vo Fínsku a iných krajinách sa koagulázo–negatívne stafylokoky podieľajú na environmentálnych mastitídach dojníc až 50 % (Pitkälä a kol., 2004). Na Slovensku problém environmentálnych mastitíd po roku 2000 narastá. Prv to boli hlavne zápaly vemena vyvolané zárodkami *Streptococcus uberis*, *Escherichia coli* a baktériami z čeľade *Enterobacteriaceae*. Ostatných rokoch v etiológii environmentálnych mastitíd dojníc dominujú koagulázo–negatívne stafylokoky a zvýšil sa výskyt mastitíd vyvolaných *Arcanobacterium pyogenes* a *Streptococcus dysgalactiae* (Vasil', 2006).

Cieľom práce bolo v chove dojníc s voľným ustajnením a dojením v dojárni sledovať efekt uplatnených protimastitídnych opatrení na redukcii výskyt mastitíd vyvolaných baktériami *Staphylococcus* sp.

Materiál a metódy

Sledovania boli vykonané v stáde o priemernom počte 178 dojníc ustajnených voľne v 2 rekonštruovaných kravínoch (K 96) a dojených v dojárni zariadením Westfalia tandem 2 x 4 (Bönen, Germany) s brakovaním 17 % a dopĺňaním vysokoteľnými jalovicami.

Pred započatím sledovania boli zistené technologické a prevádzkové nedostatky. Dezinfekcia a čistenie ustajňovacích priestorov bolo nepravidelne, rovnako aj deratizácia a dezinfekcia sa nevykonávala takmer vôbec. Hygienický program dojenia sa nevykonával správne, pritom najčastejšie nedostatky boli v nedokonalom v umývaní a osušení vemena, neskorom ponáraní koncov ceckov po vydojení. Kontrola používaných koncentrácií dezinfekčných roztokov sa nevykonávala. Výpadok v používaní jednorazových utierok sa nahrádzal nedostatočným počtom plátových utierok tak na umývanie ako aj na osušenie vemena. Klinické prípady mastitíd sa liečili intramamárne, antibiotikami bez určenia pôvodcu a predchádzajúceho stanovenia citlivosti. Bakteriologická kontrola účinnosti liečby sa nevykonávala. Normou požadovaný počet somatických buniek v bazénovej vzorke (400 000.1 ml⁻¹) mlieka určeného pre dodávku do mliekárne chovateľ zabezpečoval tým, že selektoval dojnice.

Selekciu dojníc vykonával na základe výsledkov NK-testu, celé stádo vyšetruoval v týždenných intervaloch. Dojnice vykazujúce pozitívnu reakciu pri vyšetrení NK-testom na 2+, čo len v jednej štvrti vemena, dojil zvlášť a mlieko likvidoval (tento postup uplatňoval aj počas nášho sledovania).

Na začiatku sledovania boli prijaté opatrenia v oblasti čistoty, dezinfekcie ustajňovacích priestorov, pravidelnosti dezinfekcie a deratizácie, kontroly správnej funkcie dojacieho zariadenia, kontroly denného, týždenného, mesačného čistenia a dezinfekcie dojacieho zariadenia. Zaviedla liečba dojníc v zasušení.

Výskyt mastitíd sme sledovali rok v trojmesačných intervaloch. Pri komplexnom vyšetrení všetkých laktujúcich dojníc v stáde bolo vemenom každej dojnice vyšetrené klinicky, sekrét každej laktujúcej mliečnej žľazy bol vyšetrený NK-testom a z vemena každej dojnice bola za aseptických podmienok odobratá individuálna vzorka mlieka na bakteriologické vyšetrenie. Po prvom komplexnom vyšetrení dojníc sa liečilo 18 dojníc, po druhom 10 dojníc, po treťom 23 dojníc a po štvrtom 11 dojníc prípravkom Synulox LC susp. a. u. v. (Pfizer AH, Taliansko). V období medzi komplexnými vyšetreniami stáda sa realizovala „rýchla“ liečba klinických prípadov mastitíd. Voľba antibiotického prípravku vychádzala z výsledkov citlivosti pôvodcov k antibiotikám, ktoré boli stanovené pri komplexnom vyšetrení stáda.

Výsledky

Tabuľka 1 Výskyt baktérií *Staphylococcus sp.* v individuálnych vzorkách mlieka laktujúcich dojníc v stáde o priemernom počte 178 kráv počas piatich vyšetrení vykonaných v štvrtročných intervaloch

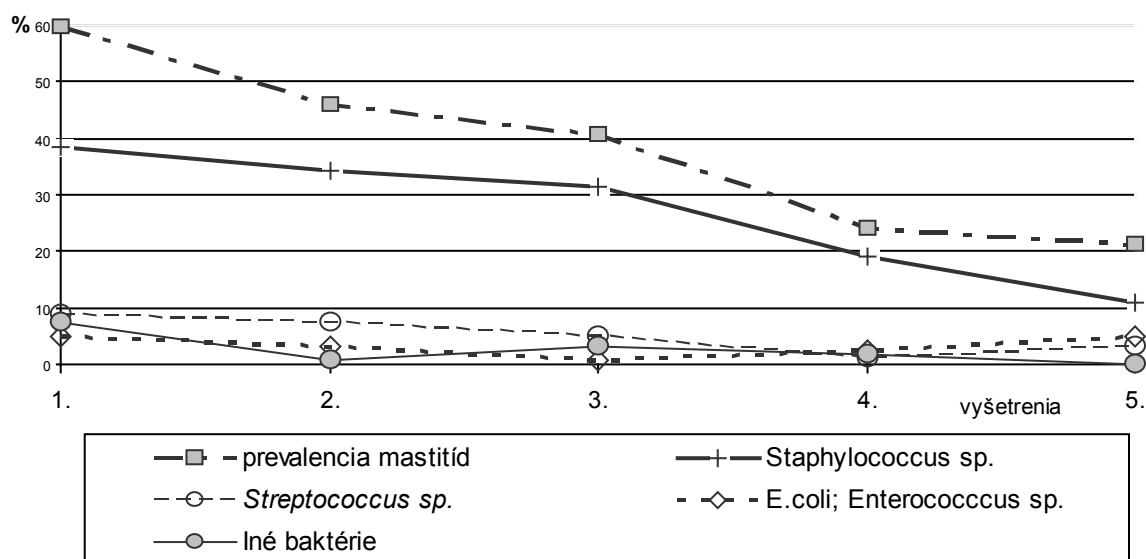
Poradie vyšetrení chovu	I.		II.		III.		IV.		V.	
Vyšetrené vzorky mlieka	122		120		121		116		118	
Izolované baktérie	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<i>Staphylococcus sp.</i>	47	38,5	41	34,2	38	31,4	22	19,0	14	11,1
<i>Streptococcus sp.</i>	11	9,0	9	7,5	6	5,0	1	0,9	4	3,1
<i>E.coli+Enterococcus sp.</i>	6	4,9	4	3,3	1	0,8	3	2,6	6	5,1
Iné baktérie	9	7,4	1	0,8	4	3,3	2	1,7	1	0,1
Celkom	73	59,8	55	45,8	49	40,5	28	24,1	25	21,1

Iné baktérie - (*Bacillus sp.*; *Arcanobacterium sp.*; *Proteus sp.*; *Rhodococcus sp.*)

Z výsledkov uvedených v tabuľke 1 vyplýva, že uplatňované protimastitídne opatrenia redukovali výskyt mastitíd stafylokokovej etnológie v sledovanom stáde z 38,5 % na 11,1 %, výskyt mastitíd vyvolaných baktériami *Streptococcus sp.* z 9,0 % na 3,0 %. Výskyt mastitíd vyvolaných skupinou baktérií *Bacillus sp.*, *Arcanobacterium sp.*, *Proteus sp.*, *Rhodococcus sp.* z 7,4 % na 0,1 %, pritom výskyt mastitíd vyvolaných *E. coli* a baktériami z čeľade *Enterococcus sp.* sa výrazne nemenil.

Redukcia výskytu dojníc s intramamárnou infekciou vemena v stáde o 38,7 % je zhodná s predchádzajúcimi výsledkami. Zistené zastúpenie etiologických pôvodcov environmentálnych mastitíd dojníc je takmer zhodné s tým, ktoré udávajú Waage a kol. (1999).

Graf 1 Dynamika výskytu patogénnych baktérií počas piatich vyšetreniach stáda o priemernom počte 178 dojníc vyšetovaných v štvrtročných intervaloch



Pod'akovanie

Táto práca bola podporovaná projektom APVV-0629-07, projektom VEGA1/0384/08 a projektom APVT-20-025604

Literatúra

Pitkälä, A., Haveri, M., Pyörälä, S., Mylly, V., Honkanen-Buzalski, T.: Bovine Mastitis in Finland 2001- Prevalence, Distribution of Bacteria, and Antimicrobial Resistance. J. Dairy Sci., vol. 87, 2004, no. 8, p. 2433-2441

Vasíľ, M. Etiologické aspekty environmentálnych mastitíd v dvoch chovoch dojníc s rozdielnym spôsobom dojenia. Mliekárstvo, vol. 37, 2006, no. 3, p. 23-28

Waage, S., Mørk, T., Røros, A., Aasland, D., Hunshamar, A., Ødegaard, S. A.: Bacteria Associated with Clinical Mastitis in dairy Heifers. J. Dairy Sci., vol. 82, 1999, no. 4, p. 712-719.

Kontaktná adresa

MVDr. ZIGO František, Ústav chovu zvierat, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, vasil'@uvm.sk

Studie odolnosti vybraných bakteriálních druhů izolovaných z potravinářského průmyslu vůči různým desinfekčním látkám

A study of resistance of selected bacterial species originating from the food industry to different disinfectant agents

Červinková Dana, Jaglič Zoran, Vlková Hana, Babák Vladimír

Abstract

In this study we have tested the efficacy of disinfection agents against bacterial isolates originating from the food industry (dairy and meat) and obtained from food contact surfaces within 2 h after sanitation. Representatives of Gram-positive bacteria (22 isolates of *Staphylococcus aureus* and 65 isolates of *Staphylococcus epidermidis*) and Gram-negative bacteria (30 isolates of *Klebsiella* spp. and 74 isolates of *Escherichia coli*) were included. Disinfectant agents were tested on both planktonic and biofilm cells (56 biofilm-positive isolates). Selected disinfection agents were the following: benzalkonium chloride (quaternary ammonium salt), sodium hypochlorite, chloramine B (halogens) and peracetic acid (oxidising agent). The disinfectants were tested in tryptone soy broth in two-fold dilution range by using the standard microbroth dilution method. For planktonic cells the minimum inhibitory concentrations (P-MICs) and minimum bactericidal concentrations (P-MBCs) were determined. For biofilms the minimum biofilm inhibitory concentrations (B-MICs) and minimal biofilm bactericidal concentrations (B-MBCs) were determined. The highest variability in susceptibility was observed with benzalkonium chloride (between the isolates of the same species as well as between those of different species). These results are especially noticeable between Gram-positive and Gram-negative bacteria (Gram-positive bacteria were substantially more susceptible). P-MICs of benzalkonium chloride were also lower than P-MBCs. For other disinfectants P-MICs and P-MBCs were very similar. For all disinfectants B-MBCs were significantly higher than B-MICs, P-MICs and P-MBCs. A high resistance of biofilms to disinfectant agents observed in this study shows on a necessity for testing of disinfectants also on biofilms.

Keywords: food hygiene, chemical agents, sanitation, resistance, disinfection, milk

Úvod

Adheze mikroorganismů na povrch výrobních zařízení může být potenciálním zdrojem patogenů v potravinách, což je patrné ve zpracovatelském průmyslu (Giaouris a Nychas 2006). Některé mikroorganismy (například rody *Klebsiella*, *Pseudomonas* a *Staphylococcus*) produkují exopolymery a mohou tak také fixovat další mikroorganismy, které mohou přežít ve formě smíšeného biofilmu (Sasahara a Zottola 1993). Použití desinfekcí je neoddelitelnou součástí sanitačního postupu v potravinářském průmyslu. Nicméně, v průběhu času byla pozorována zvyšující se rezistence k desinfekčním látkám mezi různými bakteriálními druhy. Bylo zpozorováno, že *Listeria monocytogenes* a *Enterobacter aerogenes* nebo rody *Bacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Escherichia* a *Klebsiella* přežívají čištění a desinfekci (Gunduz a Tuncel 2006). Mikroby rostoucí v podobě biofilmu se svými vlastnostmi zásadně liší od mikrobů rostoucích planktonicky. Na rozdíl od volných, planktonicky rostoucích bakterií jsou bakterie v biofilmu nesrovnatelně lépe chráněny před nepříznivými podmínkami prostředí, což může přispět k větší odolnosti biofilmu k desinfekčním látkám v porovnání s planktonními buňkami (Lewis 2001; Carpentier a Cerf 1993).

Materiál a metody

V této studii byli testováni zástupci Gram-negativních bakterií (74 izolátů *Escherichia coli* a 30 izolátů *Klebsiella spp.*) a Gram-pozitivních bakterií (22 izolátů *Staphylococcus epidermidis* a 65 izolátů *Staphylococcus aureus*). Mikroorganismy byly získány z povrchů, které jsou v kontaktu s potravinami v mlékárenském a masném výrobním závodě, v průběhu dvou hodin po desinfekci. Testované dezinfekční látky byly následující: benzalkonium chlorid (kvarterní amonná sůl), chloramin B, chlornan sodný (skupina halogenů) a kyselina peroctová (oxidační činidlo). Účinnost desinfekce byla testována v trypton sojovém bujónu (TSB) standardní mikrodiluční metodou (ve dvojkové ředící řadě). Desinfekce byly testovány jak na planktonních buňkách, tak i na biofilmových buňkách (biofilmy byly tvořeny v TSB v mikrotitračních destičkách při 37°C během 48 hod). Po inkubaci planktonních buněk nebo biofilmů v přítomnosti dezinfekčních látek (37°C; 18 – 20 hod) byly stanoveny u planktonních buněk minimální inhibiční koncentrace (P-MIC) a u biofilmových buněk minimální biofilm inhibiční koncentrace (B-MIC). Po neutralizaci desinfekce odpovídajícím neutralizačním roztokem, byla suspenze planktonních buněk přenesena do čerstvého TSB a inkubována přes noc (37°C) pro stanovení minimální baktericidní koncentrace (P-MBC). Pro stanovení minimální biofilm baktericidní koncentrace (B-MBC), byly biofilmy (po neutralizaci desinfekce) inkubovány přes noc (37°C) v čerstvém TSB.

Výsledky a diskuze

Tabulka č. 1

μl/ml	<i>Staphylococcus epidermidis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	planktonní	biofilm	planktonní	biofilm
BC	2,44 - 9,76 ^a	19,76- 156,25 ^b	2,44- 9,76	39,06 - 78,13
	4,88 - 19,53 ^c	>1250 ^d	4,88 - 19,53	>1250
NaClO	2031-4062	2031-4062	2031-4062	2031-4062
	2031-4062	> 97500	4062	> 97500
Cl-B	437-875	875-1750	875	875
	875	>7000	875	>7000
PA	625	625-1250	625	625-1250
	625-1250	>40000	625-1250	>40000
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella spp.</i>	
	planktonní	biofilm	planktonní	biofilm
BC	19,53 - 39,06	19,53 - 39,06	19,53 - 78,13	19,53 - 39,06
	39,06 - 156,25	>1250	39,06 - 156,25	>1250
NaClO	2031-4062	2031-4062	1015 - 2031	2031-4062
	2031-4062	> 97500	1015 - 2031	> 97500
Cl-B	875	875	437-875	875
	875-1750	>7000	437 - 875	>7000
PA	625-1250	625-1250	625	625-1250
	625-1250	>40000	625-1250	>40000

BC – Benzalkonium chloride; NaClO – Chlornan sodný; Cl-B – Chloramin B; PA – Kyselina peroctová
^a – Minimální inhibiční koncentrace (P-MIC); ^b – Minimální biofilm inhibiční koncentrace (B-MIC); ^c – Minimální baktericidní koncentrace (P-MBC); ^d – Minimální biofilm baktericidní koncentrace (B-MBC)

Tabulka č. 1 shrnuje výsledky studie. Je vidět, že planktonní Gram-pozitivní bakterie jsou citlivější k benzalkonium chloridu, než Gram-negativní bakterie. I v dánské studii byla potvrzena vyšší citlivost *Staphylococci* k benzalkonium chloridu, Gram-negativní bakterie byly taktéž odolnější (Aarestrup 2004). Dále byly v naší studii u benzalkonia chloridu zjištěny vyšší hodnoty B-MIC než hodnoty P-MIC, ale pouze u Gram-pozitivních bakterií. U Gram-negativních bakterií tento rozdíl nebyl pozorován. U ostatních preparátů (chloraminu B, chlornanu sodného a kyseliny peroctové) byly hodnoty P-MIC, P-MBC i B-MIC v podobném rozmezí. U všech preparátů byly hodnoty B-MBC výrazně vyšší, než hodnoty B-MIC, P-MIC a P-MBC. Stejně jako Carpentier 1993 a Costerton 1995 jsme potvrdili, že biofilm je mnohem více odolný k antimikrobním látkám než volně rostoucí buňky.

Závěr

V této studii bylo prokázáno, že planktonní formy Gram-pozitivních bakterií jsou citlivější k benzalkonium chloridu než planktonní formy Gram-negativních bakterií. Hodnoty B-MIC (s výjimkou benzalkonia chloridu u Gram-pozitivních bakterií) byly srovnatelné s hodnotami P-MIC. Nicméně, u všech preparátů byly hodnoty B-MBC výrazně vyšší než B-MIC, P-MIC a P-MBC. Tento výsledek ukazuje na nutnost, aby byly desinfekční látky vždy testované i na biofilmech.

Poděkování

Podpořeno MZe projektem 0002716202 a MŠMT projekty 2B08074 a AdmireVet ED 0006/01/01.

Literatura

- AARESTRUP, F. M., HASMAN H. (2004): Susceptibility of different bacterial species isolated from food animals to copper sulphate, zinc chloride and antimicrobial substances used for disinfection. *Veterinary Microbiology*, **100**: 83-89.
- CARPENTIER B., CERF O. (1993): Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. *Journal of Applied Bacteriology*, **75**: 499-511.
- COSTERTON J. W., LEWANDOWSKI Z., CALDWELL D., KORBERT D. R., LAPPIN SCOTT (1995) Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **45**: 711-745
- GIAOURIS, D. E., NYCHAS E. G. (2006): The adherence of *Salmonella enteritidis* PT4 to stainless steel: The importance of the air-liquid interface and nutrient availability. *Food Microbiology*, **23**: 747-752.
- GUNDUZ G.T., TUNCEL G. (2006): Biofilm formation in an ice cream plant. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **89**: 329-336.
- LEWIS, K. (2001): Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **45**: 997-1007.
- SASAHARA K.C., ZOTTOLA E.A. (1993): Biofilm formation by *Listeria monocytogenes* utilizes a primary colonising microorganism in flowing systems. *Journal of Food Protection*, **56**: 1022-1028.

Kontaktní adresa

Dana Červinková, Mgr., cervinkova@vri.cz, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 70, 621 00 Brno

Čaj a jeho účinky na lidské zdraví

Tea and their Influence on Human Health

Ošťádalová Martina, Pažout Vladimír, Straka Ivan

Abstract

Tea is the most widely consumed beverage in the world, second only to water. Tea contains many components, which are now in the interest of diverse studies, mainly in term of health benefits. According to many studies tea has antioxidant properties and can acts in reduction of carcinogenic diseases, especially in digestive tract, skin, etc. Consuming of tea is adherent to prevention of cardiovascular disease and next neurodegenerative diseases, including stroke. Tea may be potentially important in food industry and also pharmacy as treatment option for diseases of civilization.

Keywords: *tea, fermentation, antioxidant properties, anticarcinogens properties, anti-inflammatory properties, antimicrobial properties*

Úvod

Čaj je velmi populární nealkoholický nápoj na světě. Má socio-ekonomickou a kulturní důležitost v zemích Asie, Afriky, a severní Ameriky. Konzumace čaje je datována již před 5 tisíci lety, od starověké Číny a Indie. Tradičně se čaj pil pro zlepšení krevního oběhu, eliminaci toxinů a zlepšení rezistence k onemocnění. Čaj se vyrábí z listů čajovníku, které musí být po sklizni zpracovány. Nejdůležitějším krokem technologie zpracování čajových listů je fermentace. Fermentace je proces, kterým dochází k oxidaci nebo uvolňování přítomných látek (většinou fenolické povahy) za vzniku různých derivátů, které mají vliv zejména na výslednou senzoryckou hodnotu čaje. Fermentace tedy ovlivňuje výsledný druh čaje a kvalitu čajových substituentů. Podle fermentace se čaje rozdělují na několik druhů: nefermentovaný (zelený, bílý), částečně fermentovaný (oolong čaj) a plně fermentovaný (černý čaj) [1, 3, 14].

Prospěšné účinky čaje a čajových substituentů

V poslední době se řeší otázka zdraví prospěšných látek v čaji a vede se řada výzkumů, které by prokázaly objektivní výsledky a tak potvrdily možné zdravotně prospěšné účinky, jako je prevence proti mnoha civilizačním chorobám, zlepšení duševní činnosti, apod. Tyto výzkumy vychází zejména z vlastností mnoha látek, jako jsou polyfenoly (obsaženy hlavně v zelených listech čajovníku a v nefermentovaných čajích) a obecně flavonoidní látky (zejména flavonoly a flavonoidní barviva, obsaženy ve fermentovaných čajích). Dále se jedná o karotenoidní barviva, methylxantiny, apod. Uvedené látky vykazují zejména antioxidační a protizánětlivé účinky, které mohou ovlivňovat činnost a stav většiny soustav lidského těla. Tyto účinky byly potvrzeny v mnoha výzkumech, které se prováděly zejména na zvířecích modelech, kde byla zjištěna široká aktivita proti mnoha civilizačním chorobám. Výsledky na lidských modelech nejsou v mnoha studiích shodné. Rozdílnost mezi studii na živočišných a lidských modelech může být dána i tím, že dávky čajů ve zvířecích modelech jsou významně vyšší než ty, které jsou konzumovány člověkem a experimentální podmínky jsou optimalizovány pro detekci daného efektu [5].

Antioxidační účinky čaje

Čaj obsahuje mnoho potenciálních antioxidantů, ke kterým patří dnes velmi diskutované polyfenoly, resp. katechiny, dále pak flavonoidy a jejich barviva a také karotenoidy. Jeden z mechanismů jejich antioxidační aktivity je schopnost vychytávání volných radikálů a tím dochází k inhibici oxidace a následnému poškození buněk [1, 6]. Podle mnoha studií přítomnost výše uvedených látek hraje důležitou roli v antikarcinogenních a protizánětlivých účincích, což vede také k prevenci proti kardiovaskulárním onemocněním, včetně aterosklerózy, dále pak gastritidy a jiných onemocnění spojených s trávicím traktem, jako jsou záněty sliznice střev, konečníku, apod. Dále pak se účastní v redukci revmatické artritidy, neurodegenerativních onemocnění, diabetes mellitus, aj. [1, 5, 6, 14, 15].

Protikarcinogenní účinky

Jistá antikarcinogenní prevence čajů dostává v posledních letech značné pozornosti. Inhibiční aktivita čajů a čajových substituentů proti vývoji karcinogenů byla demonstrována v mnoha studiích. Kdy největší význam měly studie zaměřené na karcinogenezi kůže, žaludku, střev, konečníku a mléčné žlázy [1, 3, 8, 10, 12]. Bylo zjištěno, že na tyto účinky mají vliv polyfenolické látky ze zeleného čaje katechiny a flavonoidní látky, obsažené zejména v černém čaji, jako jsou čajová barviva theaflaviny a thearubiginy a nebo flavonoly jako je myricetin, quercetin a nebo kaempferol a v neposlední řadě karotenoidní barviva [6]. Kolektiv Reese (2007) popisuje silnou spojitost redukce rizika karcinomu šupinatých buněk kůže a pravidelné konzumaci čaje [10]. Dalším příkladem může být výzkum Juga a kol. (2007), kteří popisují inhibici tvorby tumoru mléčné žlázy v závislosti na příjmu zejména černého čaje [5]. Inhibice vzniku karcinomů trávicího traktu a vylučovací soustavy je velmi často sledována a diskutována. Tak například kolektiv Marcela (2004) vysvětluje, že čajové polyfenoly mají schopnost redukovat N-nitroso komponenty a potlačují cyklooxygenázu a syntézu oxidu dusnatého. Tím výrazně snižují přeměnu mutagenů na karcinogeny. K dalším významným účinkům těchto polyfenolů patří úprava střevní mikroflóry (zvýšuje růst bifidobakterií a lactobacilů), což vede k prevenci chronické gastritidy, která může být příčinou vzniku karcinomu, zejména tlustého střeva [1, 3, 7, 8]. Podobné účinky popisuje například McKay (2002) ve své práci z pohledu karcinogeneze močového měchýře a ledvin. Popisuje, že s častým a vysokým příjmem zeleného čaje dochází k redukci rizika nejen karcinogenity výše uvedených orgánů, ale také se významně snižuje riziko vzniku ledvinových kamenů [5, 8, 10].

Další účinky čaje a čajových substituentů

Konzumace čaje a jeho vliv na kardiovaskulární onemocnění je sledováno již dlouho a stále vznikají nové a nové poznatky, kterými lze prokázat redukci vzniku srdečně cévních onemocnění a následně **ateriosklerózy**. Tyto schopnosti jsou připisovány polyfenolům v zeleném čaji a ve velké míře flavonoidním sloučeninám v čaji černém. Podobné účinky popisuje ve své práci kolektiv Dufresna (2001), kteří potvrzují, že polyfenoly pravděpodobně redukuje produkci superoxidů v buňkách a flavonoidy z černého čaje chrání oxidaci LDL a tak ovlivňují metabolismus cholesterolu, což významně redukuje i srdečně-cévní onemocnění. Dále došli k závěru, že čajová aminokyselina theanin a flavonoidy mohou potenciálně přispívat k redukci hypertenze, trombogeneze a tím příznivě ovlivňují stav cév a srdeční činnosti. Navíc podle kolektivu Fräsera (2007) mohou být potenciálními substituenty, kteří výrazně snižují riziko mozkových příhod [2, 3, 4, 8, 15]. K dalším neméně významným účinkům čaje

na nervovou soustavu patří jeho povzbudivý, a dlouhotrvající účinek, který vede k duševní rovnováze a soustředěnosti. Tento účinek ovlivňují methylxantiny, které se díky vazbě na theanin a polyfenoly uvolňují rovnoměrně a pomaleji než u kávy. V poslední době se kofein a čajové polyfenoly zkoumají jako potenciální komponenty redukující vznik Parkinsonovy choroby, což prokazují zejména v jejich účasti na produkci dopaminu [2, 12, 13].

Antimikrobiální aktivita

V neposlední řadě se mnoho výzkumných kolektivů zabývalo také antimikrobiální aktivitou čajových nálevů. Účinnější antimikrobiální aktivitu vykazuje čaj zelený a oolong. Je to dáno vyšším obsahem antimikrobiálních látek - katechinů, čajových polyfenolů, včetně proanthokyanidů. Tolerance bakterií na polyfenolické látky se vyvíjí podle rodu bakterií a struktury polyfenolických sloučenin. Polyfenoly mohou inhibovat růst patogenů, včetně *Staphylococcus aureus*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, atd. Podle studie Almajana a kol. (2008), který sledoval inhibiční efekt polyfenolů, byla nejsilnější inhibice nalezena proti kmenu *Bacillus cereus* a druhým nejcitlivějším kmenem byl *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*. Obecně lze tedy inhibiční efekt polyfenolů přiřadit zejména na gram pozitivní bakterií, hlavně z důvodu rozdílného složení buněčné stěny, oproti bakteriím gram negativním [1, 3, 9]. Antimikrobiální účinky, zejména katechinů zeleného čaje, popisuje také práce Dufresna a kol. (2001), který navíc potvrzuje inhibiční efekt na růst bakterií, způsobujících zubní kaz a zodpovědných za onemocnění týkající se ozubice [1, 3, 9].

Závěr

Čaj jako nápoj obsahuje řadu chemických látek, které mohou být využity pro léčivé účinky v lékařství, ale i pro užití v potravinářství (čajový extrakt jako alternativa pro zvýšení stability potravin nebo přirozený doplněk stravy, apod.). Poslední dobou se čajem, jeho obsahovými složky a jejich účinností zabývá mnoho výzkumů, které potvrzují, že spousta z nich hraje důležitou roli v podpoře zdraví a zlepšení lidského zdravotního stavu. Většina výzkumů je založena na testování účinků na méně vhodných zvířecích modelech a proto většinu nynějších a budoucích studií bude nutno ještě objasnit a převést na lidské modely. Důležité je zjistit přesný mechanismus účinků chemických látek v čajích, po případě absorpci, metabolismus a případně i možnou toxicitu sledovaných čajových komponentů.

Literatura

1. Almajano, M., P., et al. Antioxidant and antimicrobial activities of tea infusion. *Food Chemistry*, 2005, vol. 108, p. 55 - 63.
2. Bruneton, J. *Pharmacognosy*. 2. edit. Paris: Lavoiser, 2001, .1119 p. ISBN:1-898293-63-7.
3. Dufresne, Ch., J., Farnworth, E., R.: A review of latest research findings on the health promotion properties of tea. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 2001, vol. 12, p. 404 - 421.
4. Fraser, M., L., et al. Green tea and stroke preventive: Emerging evidence. *Complementary Therapies Medicine*, 2007, vol. 15, p. 46 - 53.
5. Ju, J., et al. Inhibition of carcinogenesis by tea constituents. *Seminars in Cancer Biology*, 2007, vol. 17, p. 395 - 402.

6. Luczaj, W., Sjrzydlewska, E. Antioxidative properties of black tea. *Preventive Medicine*, 2005, vol. 40, p. 910 - 918.
7. Marcel, W., L., et al. Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system. *European Journal of Pharmacology*, 2004, vol. 500, p. 177 - 185.
8. Mc Kay, S., L., et al. The Role of Tea in Human Health: An Update. *Journal of the American College of Nutrition*, 2002, vol. 21, p. 1 - 13.
9. Negi, P., S., et al. Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chemistry*, 2003, vol. 80, p. 393 - 398.
10. Rees, J., R., et al. Tea consumption and basal cell and squamous cell skin cancer: Results of a case-control study, *J Am Acad Dermatol*, 2007, p. 782 - 785.
11. Sumpio, E., B, et al. Green Tea the „Asian Paradox“ and Cardiovascular Disease. *Elsevier Inc.* 2006. ISSN:1072-7515.
12. Tan, E., K. , et al. Dose-depend protective effect of coffee, tea, and smoking in Parkinson's disease a study in ethnic Chinese. *Journal of the Sciences*, 2006, vol. 216, p. 163 - 197.
13. Pan, T., et al. Effects of green tea polyfenols on dopamine uptake and on MPP⁺ - induced dopamine neuron injury. *Life Sciences*, 2003, vol. 72, p. 1073 - 7083.
14. Wang X., Ch., et al. Genotypic variation of beta-carotene and lutein contents in tea germplams *Camellia sinensis (L.) O. Kuntze.* *Journal of Food Composition and Analysis*, 2010, vol. 23, p. 9 - 14.
15. Wheeler, D., S., Wheeler, W., J. The medicinal Chemistry of Tea. *Drug Development Research*, 2004, vol. 61, p. 45- 65.

Kontaktní adresa

Ing. Martina Ošťádalová, Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno, Česká republika, e-mail: m.ostadalova@gmail.com

Stanovení karotenů a xanthofylů v rajčatových kečupech

Determination of Carotenes and Xanthophylls in Tomato Ketchups

Tauferová Alexandra, Tremlová Bohuslava, Straka Ivan, Pokorná Jana

Abstract

Tomato ketchup is nowadays a popular food product that could be in some circumstances health-beneficial and sometimes thanks to its nutritional profile it is labeled as a functional food. The essential nutritional benefit of tomato products generally is that they contain carotenoids naturally occurring in tomatoes. The goal of our experimental study was to determine the content of selected carotenoids, particularly lycopene, β -carotene, β -carotenone ξ -carotene, phytofluene, phytoene, lutein and lutein-5,6-epoxide in various kinds of tomato ketchups available on local market. As the method of determination UV-VIS spectroscopy was selected.

Keywords: carotenoid, carotenes, xanthophylls, tomato, ketchup, health benefit

Úvod

Rajčatový kečup je v současné době oblíbenou potravinou, která může být za určitých okolností zdraví prospěšná a někdy je také díky svému nutričnímu profilu označována za funkční potravinu. Základní surovinou pro výrobu rajčatového kečupu je protlak z rajčat.

Rajče (*Solanum lycopersicum*) je v celosvětovém měřítku jedním z nejdůležitějších druhů zeleniny. Současnou tendencí ve světě je zvyšování spotřeby rajčat. Jsou považovány za hlavní zdroj lykopenu – červeně zbarveného karotenoidu, který je spojován s řadou pozitivních vlivů na zdraví (Slimestad and Verheul, 2009).

Cílem naší experimentální práce bylo stanovení obsahu vybraných karotenoidů, konkrétně lykopenu, β -karotenu, β -karotenonu ξ -karotenu, fytofluenu, fytoenu, luteinu a luteinu-5,6-epoxidu v různých druzích kečupů dostupných na tuzemském trhu.

Literární přehled

Hlavním nutričním přínosem rajčatových produktů obecně je obsah karotenoidů přirozeně se vyskytujících v rajčatech (Rajchl *et al.*, 2010). V lidském organismu karotenoidy plní několik důležitých biologických funkcí. Nejvíce studovaným nutričním přínosem je jejich role prekurzorů vitamínu A. Karotenoidy také sehrávají důležitou roli pro zdraví tím, že působí jako antioxidanty chránící buňky a tkáň před poškozujícími efekty volných radikálů. Při konzumaci rajčat přirozeně obsahujících lykopen dochází v organismu člověka ke snížení biosyntézy cholesterolu, jak uvádí Preedy (2008). Lutein, který je oxidačním produktem β -karotenu, pravděpodobně chrání sítnici, je důležitý v prevenci šedého zákalu, koronárních onemocnění srdce a infarktu. Mezi další zdravotní přínosy karotenoidů patří například povzbuzení funkce imunitního systému, ochrana před úpalem a inhibice rozvoje některých typů rakoviny, zejména rakoviny trávicího traktu a rakoviny prostaty (Maiani *et al.*, 2009; Britton *et al.*, 2009; Benner *et al.*, 2007).

Jak uvádí někteří autoři, termální opracování rajčat může v rozporu s běžně přijímaným názorem ještě zvýšit nutriční hodnotu rajčat a celkovou antioxidační aktivitu a obsah dostupného lykopenu v rajčatech, a to díky tomu, že ve srovnání s jinými přírodními antioxidanty v rostlinných pletivech, karotenoidy jsou relativně tepelně odolné a

nedochází k jejich degradaci ani po intenzivním nebo delším tepelném opracování v průběhu procesu sterilizace nebo vaření (Dewanto *et al.*, 2002; Rajchl *et al.*, 2010).

Více studií již bylo věnováno stanovení karotenoidů v rajčatech. Na našem ústavu začínáme s chemickou analýzou karotenoidů (karotenů a xantofylů) v rajčatových kečucech.

V současné době existuje více metod pro stanovení obsahu karotenoidů v potravinách. Některé studie popisují využití kapalinové chromatografie spojené s hmotnostní spektrometrií (Frenich *et al.*, 2005; Rodríguez-Bernaldo de Quirós *et al.*, 2005), jiné popisují metodu UV-VIS spektroskopie (Britton *et al.*, 1995).

Materiál a metody

Pro stanovení byly použity dvě série vzorků kečupů náhodně vybraných ze sítě velko- i maloobchodu. První série obsahovala kečupy Otma, Heinz, Tesco, Clever, Kaufland, Deroni a Pagusa. Druhá série se skládala ze vzorků kečupů Pagusa, Hochmann, Kand, Hellmann's, Otma, Spak a Hamé. Kečupy byly uskladněny podle návodů popsanych na příbalovém letáku od výrobce. Otevřeny byly bezprostředně před analýzou.

Příprava vzorků spočívala v navázení určitého množství (0,1 g až 1,0 g) od každého druhu kečupu. Ve všech případech bylo ke vzorku napipetováno 10 ml organického rozpouštědla. Používali jsme chloroform, etanol a vysokovroucí petroléter. Vzorky jsme míchali 5 min. na třepače a pak je nechali 5 min. sedimentovat.

Za metodu analýzy byla zvolena UV-VIS spektroskopie. K analýze jsme použili přístroj CECIL CE 7210. Přepočtení naměřené absorbance na aktuální koncentrace byl proveden podle přepočítavacích faktorů a návodů v monografii G. Brittona *et al.* (1995).

Statistická analýza byla provedena pomocí programu Unistat verze 5.6 a zaměřena především na průzkumovou analýzu a analýzu jednorozměrných dat podle teoretických principů autorů Melouna a Militkého (2006).

Výsledky a diskuze

Tabulka č. 1: Obsah karotenoidů v kečucech, rajčatové šťávě a rajčatech v µg/100 g

	lykopen	β - karoten	β - karotenon	ξ - karoten	fytoen	fytofluen	lutein	lutein-5,6-epoxid
Průměr^{1,2,3}	124.7	76.0	170.0	89.8	9.7	35.2	720.0	59.7
odchylna^{1,2,3}	101.3	58.1	40.0	63.9	4.5	23.9	40.0	89.7
variační koeficient^{1,2,3}	81.2	76.4	23.5	71.2	46.4	67.9	5.6	150.5
kečup	1 900 – 26 200 ⁴	320 ⁵	-	-	-	-	-	-
rajčatová šťáva	2 642.7 ⁶	272.8 ⁶	-	-	-	-	50 ⁶	-
rajče	7 050 ^{7*} /85 0-13 600 ⁴	3 680 ^{7*}	-	750 ^{7*}	4 060 ^{7*}	2 220 ^{7*}	-	-

¹Tauférová *et al.*, 2009, ^{2,3}Tauférová *et al.*, 2010A, B, ⁴Lugasi *et al.*, 2003, ⁵Maiani *et al.*, 2009,

⁶Sánchez-Moreno *et al.*, 2006, ⁷Fraser *et al.*, 1994, * in µg/100 ml

Na základě uvedených výsledků z naší laboratoře a z odborných publikací jmenovaných autorů je možno uvést, že výsledky měřené u kečupů v tuzemské síti se statisticky liší od výsledků zahraničních autorů. Jedná se o komerčně jiné výsledky, jejichž důvodem mohou být jiné odrůdy rajčat používané v tamějších kečucech (Tauférová *et al.*, 2009).

Statistickou analýzou bylo zjištěno, že mezi jednotlivými vzorky je jak v množství jednotlivých analytů, tak v celkovém obsahu vybraných karotenoidů statisticky významný rozdíl, což je pravděpodobně způsobeno použitím odlišných surovin při výrobě. Námi naměřené hodnoty obsahu karotenoidů u vzorků kečupu byly ve většině případů výrazně nižší ve srovnání s hodnotami naměřenými dalšími autory u pasterovaných rajčatových šťáv a také přezrálých rajčat. Poukazuje to na skutečnost, že podíl rajčat v komerčních kečupech je nižší ve srovnání s obecným předpokladem (Taufarová *et al.*, 2010B).

Závěr

V budoucnu bychom se chtěli blíže zabývat stanovením xanthofylů, které jsou oxidovanými produkty karotenů. Hlavním cílem je zjištění, v jakém stádiu oxidace se tyto látky v rajčatovém kečupu nachází. Na základě tohoto zjištění je možné ověřit, zda kečup nebyl skladován buď příliš dlouho, nebo nevhodným způsobem v přítomnosti vzdušného kyslíku. Takové informace jsou užitečné zejména pro výrobce rajčatových kečupů, případně i pro konzumenty, a to zejména v souvislosti s informacemi o pozitivních fyziologických účincích jednotlivých látek a nebo jejich skupin na organismus člověka.

Analýza by měla být dostatečně přesná a její metody by měly být ověřené srovnáním s metodami normativními. Tohoto cíle doposud naším dosavadním studiem nebylo dosaženo dostatečně objektivním způsobem, a proto máme v úmyslu pokračovat ve studiu karotenoidů v kečupech a pracovat na upřesnění metody.

Poděkování

Práce byla podpořena finančními prostředky z projektu IGA 75/2010/FVHE.

Literatura

- BENNER, M., LINNEMAN, A.R., JONGEN, W.M.F., FOLSTAR, P. An explorative study on the systematic development of tomato ketchup with potential health benefits using the Chain Information Model. *Trends in Food Science & Technology*, March 2007, vol. 18, no. 3, p. 150-158.
- BRITTON, G., Liaaen-Jensen, S., Pfander, H. *Carotenoids*. Vol 1B. *Spectroscopy*. Bern: Birkhäuser Verlag, 1995. 325 p. ISBN 3-7643-2909-2.
- BRITTON, G., LIAAEN-JENSEN, S. and PFANDER, H. *Carotenoids*. Vol 5. *Nutrition and Health*. Bern : Birkhäuser Verlag, 2009, 431 p. ISBN 978-3-7643-7500-3.
- DEWANTO, V., WU, X., ADOM, K., LIU, R. H. Thermal Processing Enhances the Nutritional Value of Tomatoes by Increasing Total Antioxidant Activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, May 2002, vol. 50, no. 10, p. 3010–3014.
- FRENICH, G., TORRES, H., VEGA, B., VIDAL, M., BOLANOS, P. Determination of Ascorbic Acid and Carotenoids in Food Commodities by Liquid Chromatography with Mass Spectrometry Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, September 2005, vol. 53, no. 19, p. 7371–7376.
- LUGASI, A., BÍRÓ, L., HÓVÁRIE, J., SÁGI, K., BRANDT, S., BARNA, E. Lycopene content of foods and lycopene intake in two groups of the Hungarian population. *Nutrition Research*, August 2003, vol. 23, no. 8, p. 1035-1044.
- MAIANI, G., CASTÓN, M., CATASTA, G., TOTI, E., GONI, CAMBRODÓN, I., BYSTED, A., GRANADO-LORENCIO, F., OLMEDILLA-ALONSO, B., KNUTHSEN, P., VALOTI, M., BÖHM, V., MAYER-MIEBACH, E., BEHSNILIAN, D., SCHLEMMER, U. Carotenoids:

Actual knowledge on food sources, intakes, stability and bioavailability and their protective role in humans. *Molecular Nutrition & Food Research*, September 2009, vol. 53, no. S2, p. 194-218.

MELOUN, M. – MILITKÝ, J. Kompendium statistického zpracování dat. 2. vyd. Praha: Academia Praha, 2006. 982 s. ISBN 80-200-1396-2.

PREEDY, V. Lycopene : nutritional, medicinal and therapeutic properties. 1. ed. Enfield, NH: Science Publication, 2008. 451 p. ISBN: 9781578085385.

RAJCHL, A., VOLDŘICH, M., ČÍŽKOVÁ, H., HRONOVÁ, M., ŠEVČÍK, R., DOBIÁŠ, J., PIVOŇKA, J. Stability of nutritionally important compounds and shelf life prediction of tomato ketchup. *Journal of Food Engineering*, 2010, vol. XX, no. X, p. XXX-XXX.

RODRÍGUEZ-BERNALDO DE QUIRÓS, A., COSTA, H. Analysis of carotenoids in vegetable and plasma samples: A review. *Journal of Food Composition and Analysis*, March 2006, vol. 19, no. 2-3, p. 97-111.

SÁNCHEZ-MORENO, C., PLAZA, L., DE ANCOS, B., CANO, P. Nutritional characterisation of commercial traditional pasteurised tomato juices: carotenoids, vitamin C and radical-scavenging capacity. *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, no. 4, p. 749-756.

SLIMESTAD, R. – VERHEUL, M. Review of flavonoids and other phenolics from fruits of different tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, June 2009, vol. 89, no. 8, p. 1255-1270.

TAUFEROVÁ, A., TREMLOVÁ, B., STRAKA, I. Výskyt lykopenu v rajčatech a rajčatových kečupech na tuzemském trhu. In *Sborník XXXVI. Semináře o jakosti potravin a potravinových surovin „Ingrový dny“*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2009, s. 41.

TAUFEROVÁ, A., TREMLOVÁ, B., STRAKA, I., POKORNÁ, J. Výskyt biologicky aktivních karotenoidů v rajčatových kečupech. In *Hygiena alimentorum XXXI*. Štrbské Pleso, Slovenská republika: Univerzita veterinárskeho lekárstva v Košiciach, 2010A, p. XX-XX.

TAUFEROVÁ, A., TREMLOVÁ, B., STRAKA, I., POKORNÁ, J. Occurrence of Carotenoid Pigments in Tomato Ketchups. In *6th International Congress on Pigments in Food*. Budapest, Hungary: Hungarian Chemical Society, 2010B, p. XX-XX.

Kontaktní adresa

Ing. Alexandra Tauferová, Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, Česká republika, e-mail: tauferovaa@vfu.cz

Rostlinné oleje jako významný zdroj mastných kyselin ve výživě nosnic

Plant oils as an important source of fatty acids in layer nutrition

Hudečková Petra, Straková Eva, Suchý Pavel

Abstract

In the experiment, we compared four types of plant oils. The objective of the study was to assess their effect on layer performance and selected egg parameters. The oils (soybean, sunflower, rapeseed and flaxseed) were added to the feed mixtures of layers. Each month, values of live weight and feed intake were recorded and the laid eggs were analyzed. Layers given a diet with rapeseed oil had the highest values of live weight, on the contrary, layers given a diet with flaxseed oil had the lowest live weight. Layers fed a diet with soybean oil had the highest feed intake. We also found differences in egg weight and yolk weight between the experimental groups which were most notable when feeding the diet with flaxseed oil.

Keywords: plant oils, layers, fatty acids, eggs, egg weight, yolk

Úvod

Chov drůbeže je v ČR rozvinutým odvětvím živočišné výroby založeným na produkci jatečné drůbeže a konzumních vajec. Vejce jsou nedílnou a oblíbenou součástí lidské výživy. Jsou zdrojem esenciálních mastných kyselin a obsahují i množství vitamínů a minerálních látek. V posledních letech se klade velký důraz na kvalitu a bezpečnost živočišných produktů. Proto by krmivo, jímž jsou nosnice krmeny, mělo obsahovat co nejméně antinutričních látek a musí mít odpovídající množství vitamínů a minerálů pro správnou skladbu vejce i pevnou skořápku.

Významným zdrojem mastných kyselin v těchto krmných směsích může být přídavek rostlinného oleje. Mezi nejpoužívanější patří sojový, slunečnicový, řepkový a lněný. (Cobos a kol., 1995) Bylo zjištěno, že dietou lze ovlivnit poměr nasycených a nenasycených mastných kyselin ve vaječném žloutku. (Milinsk a kol., 2003; Szycik, 2005; Alvarez a kol., 2005).

Mastné kyseliny významně ovlivňují řadu fyziologických pochodů. Za nejdůležitější jsou považovány kyseliny řady n-3 a n-6 a také jejich poměr. Byl zjištěn vliv na imunitu, esenciální mastné kyseliny jsou důležité pro rozvoj thymu. (Straková a kol., 2008)

Materiál a metodika

K provedení biologického pokusu bylo nakoupeno 120 nosnic hybridní kombinace Isa Brown. Krmení bylo realizováno pomocí komerčně vyráběných kompletních krmných směsí (KS pro kuřice a KS pro nosnice N1). Nosnice byly chovány v klecové technologii v akreditované experimentální stáji s řízeným světelným, teplotním, zoohygienickým a krmně-technologickým režimem. Nosnice byly rozděleny do čtyř skupin. Do diety první skupiny byl přidán komerčně vyráběný sojový olej (SO), do krmné směsi druhé skupiny olej slunečnicový (SLO), ve třetí skupině byl použit olej řepkový (ŘO) a v poslední, čtvrté skupině, byl v dietě podán olej lněný (LO). Množství oleje přidávané do KS bylo u všech skupin totožné a to 1,5 kg oleje na 50 kg KS. V průběhu experimentu byla v měsíčních intervalech zaznamenávána živá hmotnost

nosnic a spotřeba krmné směsi a ve stejném intervalu byla analyzována snesená vejce. U vajec se sledovala hmotnost, dále hmotnost skořápky, žloutku, bílku a barva vajec.

Výsledky

Tab 1. Průměrná živá hmotnost nosnic za všechny sledované měsíce

měsíc snášky	živá hmotnost nosnic (kg)			
	SO	SLO	ŘO	LO
1.	1,639	1,643	1,694	1,604
2.	1,697	1,655	1,741	1,642
3.	1,762	1,784	1,832	1,743
4.	1,849	1,926	1,931	1,860

Tab. 2 Průměrná spotřeba krmné směsi na nosnici a den za všechny sledované měsíce

měsíc snášky	spotřeba KS (kg)/nosnice/den			
	SO	SLO	ŘO	LO
1.	0,112	0,109	0,111	0,109
2.	0,112	0,106	0,110	0,110
3.	0,118	0,117	0,117	0,111

Tab. 3 Průměrné hodnoty sledovaných ukazatelů v rámci analýzy vajec

Analýza vajec						
měsíc snášky	olej	hmotnost vejce (g)	barva	hmotnost skořápky (g)	hmotnost žloutku (g)	hmotnost bílku (g)
1. měsíc	SO	52,7	6	5,6	11,7 ^A	35,5 ^A
	SLO	53,0 ^{AB}	6	5,8	12,4 ^{ABC}	34,8
	ŘO	52,1 ^A	7	5,9	11,3 ^B	34,9
	LO	51,4 ^B	7	5,7	11,7 ^C	34,1 ^A
2. měsíc	SO	56,0	5	5,7	13,3	36,7
	SLO	56,7	6	6,0	13,6 ^B	36,1
	ŘO	55,4	6	6,0	13,5 ^{Ba}	35,8
	LO	55,3	6	6,1	13,7 ^a	35,6
3. měsíc	SO	59,4 ^A	5	6,5	15,0 ^{AC}	37,9
	SLO	58,9 ^B	5	6,5	15,2 ^{BD}	37,2
	ŘO	59,1 ^C	5	6,6	14,4 ^{AB}	38,1 ^A
	LO	58,0 ^{ABC}	5	6,3	14,8 ^{CD}	36,8 ^A
4. měsíc	SO	62,1	5	7,0	15,8 ^A	39,4
	SLO	61,0 ^a	5	6,9	15,9 ^B	38,2
	ŘO	60,3	5	6,8	15,6 ^C	37,6
	LO	60,3 ^a	5	7,0	15,9 ^{ABC}	37,4

Statistické rozdíly se počítaly pro každý měsíc zvlášť. Stejná písmena velká (A,A) – hladina významnosti ($P \leq 0,01$), stejná písmena malá (a,a) – významnost ($P \leq 0,05$). Různá písmena (A,B; a,b) – nesignifikantní rozdíly.

V hmotnosti vajec (Tab. 3) byly zaznamenány statisticky vysoce významné rozdíly ($P \leq 0,01$) mezi dietou se slunečnicovým olejem (SLO) a lněným olejem (LO) (1. a 3. měsíc snášky). V rozdílech hmotnosti žloutku byly vysoce signifikantní rozdíly mezi skupinami krmenými slunečnicovým a řepkovým olejem (ŘO), dále mezi dietami se

slunečnicovým a lněným olejem a rovněž mezi sojovým (SO) a lněným olejem. Rozdíly statisticky vysoce významné ve hmotnosti žloutku vykazovala 4. skupina (LO) oproti všem ostatním pokusným skupinám (ve 4. měsíci snášky). Signifikantní rozdíly na hladině významnosti $P \leq 0,01$ ve hmotnosti bílku byly zaznamenány v 1. měsíci snášky mezi skupinami krmenými sojovým a lněným olejem. Mezi řepkovým a lněným olejem byly statisticky vysoce významné rozdíly ve 3. měsíci snášky.

Závěr

Cílem práce bylo zkoumat rozdílný vliv různých diet na vejce užitkových nosnic. Porovnávaly se rostlinné oleje jako významný zdroj mastných kyselin ve výživě hospodářských zvířat. V pokusu se používal olej sojový, slunečnicový, řepkový a lněný. Dosažené výsledky ukazují, že oleje mají vliv na hmotnost vejce a hmotnost žloutku. Největší rozdíly, oproti ostatním třem skupinám, byly zaznamenány u použití diety se lněným olejem i když statisticky významné nebo vysoce významné rozdíly je možno pozorovat i mezi dalšími pokusnými skupinami. Nejvyšší hmotnosti, ve všech sledovaných měsících, dosahovaly nosnice krmené dietou s přídatkem řepkového oleje. Nejmenší hmotnosti (1., 2., 3. měsíc) naopak dosáhly nosnice krmené krmnou směsí se lněným olejem. Největší spotřeba krmné směsi byla zaznamenána u diety se sojovým olejem

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Výzkumného záměru MŠMT 6215712402.

Literatura

- ALVAREZ, C., GARCIA-REBOLLAR, P., CACHALDORA, P., MENDEZ, J., DE BLAS, J.C. Effects of dietary conjugated linoleic acid and high-oleic sunflower oil on performance and egg quality in laying hens, *British Poultry Science*, 2005, vol. 46, no. 1, p. 80 – 86
- COBOS, A. a kol. Dietary modification and hen strain dependence of egg yolk lipids, *Food Research International*, 1995, no.1, p. 71 – 76
- MILINKS, M.C., MURAKAMI, A.E., GOMES, S.T.M., MATSUSHITA, M., SOUZA, N.E. Fatty acid profile of egg yolk lipids from hens fed diets rich in n-3 fatty acid, *Food chemistry*, 2003, vol. 83, no. 2, p. 287 – 292
- STRAKOVÁ, E., SUCHÝ, P., HERZIG, I., STAŇA, J., ZEHNÁLEK, P. Dietetický význam mastných kyselin ve výživě zvířat a člověka, *Veterinářství*, 2008, no. 11, p. 708 – 712
- SZYMCIK, B. Effects of dietary conjugated linoleic acid isomers and vitamin E on fatty acid composition and cholesterol content of hen egg yolks, *Journal of Animal and Feed Sciences*, 2005, vol. 14, no. 1, p. 109 – 123

Kontaktní adresa

Mgr. Petra Hudečková, VFU Brno, FVHE, Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, Palackého1/3, 612 42 Brno, e-mail: hudeckovap@vfu.cz

Krmivo rostlinného původu jako zdroj *Salmonella* Havana v chovech drůbeže

Plant feed as a source of *Salmonella* Havana in poultry farms

¹Kopuncová Monika, ²Černý Tomáš, ^{1,3}Karpíšková Renáta

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

²Státní veterinární ústav Praha

³Státní zdravotní ústav, Praha, Centrum laboratorních činností, OLHVBP Brno

Abstract

The aim of this study was to determine on the molecular level the relationship between the incidence of salmonella in poultry farms and feed used – rapeseed scrap. *Salmonella* strains were obtained in 2009 from the NRL for *Salmonella* SVS SVÚ Prague and SZÚ Brno. After the verification of the serotype and determination of resistance to antimicrobial agents a macrorestriction analysis was performed in strains tested. A total of 16 strains has been examined, out of which 11 were from poultry faeces or farm environment and 5 from the feed. In all strains *Salmonella* serotype Havana of identical pulsotype has been confirmed, as well as sensitivity to all of the 17 tested antimicrobials. Epidemiological link between the isolates from poultry and feed – rapeseed scrap has thus been demonstrated.

Keywords: rape scrap, serotyping, resistance to antimicrobials agent, macrorestriction analysis

Úvod

Salmonelóza patří ve vyspělých zemích světa k významným zoonózám s alimentární cestou přenosu. Česká republika je v rámci Evropské unie zemí se stále nejvyšším výskytem tohoto onemocnění, což je dáno zejména důsledným systémem sběru epidemiologických dat. Nejdůležitějším rezervoárem salmonel je hrabavá drůbež. Mezi nejčastější sérotypy vyskytující se u drůbeže v Evropské unii patří dle četnosti *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Paratyphi B* var. Java, *S. Virchow*, *S. Hadar*, *S. Livingstone*, *S. Mbandaka*, *S. Senftenberg*, *S. Bredeney* (The EFSA Journal, 2009). Existuje několik cest, kterými mohou být salmonely šířeny uvnitř chovů drůbeže (Nayak *et al.*, 2004). Drůbež může být infikována vertikálně (transovariálně) nebo horizontálně kontaminovanou podestýlkou, krmivem nebo vodou. Jedním z možných zdrojů salmonel pro drůbež mohou být také vnější parazité drůbeže a ostatní hmyz, hlodavci a další volně žijící savci a ptáci (Poppe, 2000). Krmiva mohou být kontaminována salmonelami buď během sklizně, jejich zpracování nebo skladování (Maciorowski *et al.*, 2006).

Materiál a metodika

Bakteriální kmeny salmonel

Celkem bylo vyšetřeno 16 kmenů, 11 pocházelo z drůbeže (nosnice a brojleři) nebo prostředí farem a 5 z krmiva (řepkový šrot, krmná směs nosnic). Kmeny pocházely z NRL pro salmonely Státního veterinárního ústavu Praha a SZÚ Praha, pracoviště Brno. Kmeny byly izolovány v průběhu let 2005-2009.

Sérotypizace salmonel

Sérotypizace byla provedena rychlou sklíčkovou aglutinací s antisérou firmy Bio-Rad, k jednotlivým sérotypům byly zařazeny podle Kauffman-Whiteova schématu (Poppo, 2001).

Rezistence k antimikrobiálním látkám

Rezistence byla sledována diskovou difuzní metodou na Mueller-Hintonově agaru (OXOID Ltd., UK) a vyhodnocována podle kritérií uvedených v CLSI (CLSI, 2006). K testování byly použity disky sedmnácti antimikrobiálních látek (OXOID Ltd., UK): ampicilin (AMP, 10 µg), amoxicilin (AMC, 30 µg), cefotaxime (CTX, 30 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), streptomycin (S, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), gentamycin (CN, 10 µg), apramycin (APR, 15 µg), sulphonamidy (SU, 300 µg), sulfomethoxazol/trimetoprim (SXT, 25 µg), trimetoprim (W, 5 µg), tetracyklin (TE, 30 µg), nalidixová kyselina (NA, 30 µg), ciprofloxacin (CIP, 5 µg), enrofloxacin (ENR, 5 µg), colistin (CT, 10 µg).

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)

Makrorestrikční analýza s použitím endonukleázy *Xba*I (BioLabs, UK) byla provedena podle protokolu PulseNet Europe (2002).

Výsledky a diskuse

U všech izolátů byl potvrzen sérotyp *Salmonella* Havana a citlivost ke všem testovaným antimikrobiálním látkám. Metodou makrorestrikční analýzy byl u všech kmenů zjištěn shodný pulzní profil označený jako SH-Xba-1.

Poprvé byl sérotyp *Salmonella* Havana popsán na Kubě (Corbelo and Martínez Cruz, 1941). Tento sérotyp byl spojován s drůbeží a zejména krmnými doplňky pro drůbež (Soerjadi-Liem and Cumming, 1984; Bensink, 1979; Yoshimura *et al.*, 1979). V České republice se sérovar *Salmonella* Havana poprvé vyskytl na Blanensku v roce 2005 v chovu brojlerů. Další ojedinělé výskyty byly zaznamenány v letech 2006 a 2007 v lokalitě Brno venkov u brojlerů. V roce 2009 bylo zaznamenáno několik ohniskových výskytů v chovech nosnic produkujících konzumní vejce v okresech Ústí nad Orlicí, Svitavy, Šumperk a Břeclav. Na Blanensku byl výskyt tohoto sérotypu zjištěn opakovaně také v chovu brojlerů (v letech 2005 a 2009). Ve všech případech z roku 2009 byla prokázána přímá souvislost s v chovech používaným krmivem a primárně kontaminovaným řepkovým šrotem. Přestože epizootologická data z let 2005-2007 nejsou k dispozici, je pravděpodobné, že se nákaza šířila ze stejného zdroje.

Závěr

Molekulárně-biologické metody jsou vhodným nástrojem nejen pro provádění epidemiologických studií, sledování zdroje kontaminace v potravinách, ale i v prvovýrobě (chovu potravinových zvířat). Studie potvrdila přímou souvislost výskytu *Salmonella* Havana v chovech drůbeže v České republice se zkrmovaným krmivem obsahujícím řepkový šrot.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena z grantového projektu VZ MŠMT MSM 6215712402.

Literatura

BENSINK J. C., *Salmonella* contamination of meat and bone meal, *Australian Veterinary Journal*, 1979, vol. 55, p. 13-15

Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Ninth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute document M2-A9 [ISBN 1-56238-586-0]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Halley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006

CORBELO A., MARTÍNEZ CRUZ J. A., Historia de la Salmonella havana, *Archivos de Medicina Infectiosa* 10, 1941, 170-179

<http://www.pulsenet-europe.org/> Standardized protocol for molecular subtyping of *Listeria monocytogenes* by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). PulseNet Europe, 2002, 10 p.

MACIOROWSKI K.G. , HERRERA P., KUNDINGER M. M., RICKE S. C., Animal feed production and contamination by foodborne Salmonella, *Journal of Consumer Protection and Food Safety*, 2006, p. 197-209

NAYAK R., STEWART T., WAND R.F., LIN J., CERNIGLIA C.E., KENNEY P.B., Genetic diversity and virulence gene determinant of antibiotic resistant Salmonella isolates from preharvest turkey production sources, *International Journal of Food Microbiology*, 2004, vol. 91, p. 51-62

POPPE C., *Salmonella* in Domestic Animals, C. Wray and A. Wray, Editors, , CAB International , 2000, *Salmonella* infections in the domestic fowl, p. 2000

POPOFF, M.Y. Antigenic formulas of the Salmonella serovars, *WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Salmonella*, 8th edition, 2001

SOERJADI-LIEM A.S., CUMMING R.B., Studies of the incidence of Salmonella carries in broiler flock entering a poultry processing plant in Australia, *Poultry Science*, 1984, vol. 63, p. 892-895

The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonose and Zoonotic Agents in the European Union in 2007, *The EFSA Journal* 2009, 223

YOSHIMURA H., NAKAMURA H., SATO S., Incidence of salmonellae in animal feed ingredients in Japan, *National Institute of Animal Health Quarterly*, 1979, vol. 19, p. 107-113

Kontaktní adresa

MVDr. Monika Kopuncová, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, Brno, 612 42, H09020@vfu.cz

Vliv čistého a surového glycerolu v dietě na užítkovost brojlerových kuřat

The effect of pure and raw glycerol in diet on production parameters of broiler chickens

Kroupa Leo, Suchý Pavel, Straková Eva

Abstract

The experiment involved 180 one-day-old meat type ROSS 308 hybrid combination broiler chickens. In feeding mixtures for experimental groups of chickens, 50 % of soybean oil was replaced with pure or raw glycerol at a ratio of 1:2. On 15 and 40 day of fattening, chickens of both genders in the experimental groups fed by feeding mixtures containing glycerol showed significantly higher ($P \leq 0.05$; $P \leq 0.01$) average live weight as compared to the control group. Differences between average carcass weight in the control and experimental groups were highly significant ($P \leq 0.01$). There were no significant differences between the control and experimental groups in slaughter yield. The inclusion of glycerol did not have negative effect on the health state of chickens.

Keywords: rapeseed oil methylester, live weight gain, feed conversion, slaughter yield

Úvod

První zmínky o použití glycerolu ve výživě hospodářských zvířat se objevují v 60. a 70. letech minulého století. Z tohoto období jsou i práce zabývající se využitím glycerolu ve výživě drůbeže a jeho vliv na reprodukci (NEVILLE et al. 1971, WESTFALL and HOWARTH 1976). O využití glycerolu v dietách určených k výživě kuřat referují RENNER and ELCOMBE (1964), resp. CAREW and FOSS (1974). Vliv glycerolu na syntézu glukózy u vykrmovaných kuřat sledovali EMMANUEL et al. (1983), na aktivitu lipogenních enzymů a syntézu mastných kyselin LIN et al. (1976). Většina novějších prací považuje za optimální obsah glycerolu v krmné směsi pro brojlerová kuřata 5 -10 % (SIMON et al. 1996, BARTECZKO and KAMINSKI 1999, CERRATE et al. 2006). Při této hladině glycerolu byl zaznamenán pozitivní vliv na užítkovost a nebyl pozorován negativní vliv na konverzi krmiva a zdravotní stav kuřat. Dávka 25 % glycerolu byla již doprovázena patologickými změnami na orgánech a měla negativní dopad na užítkovost brojlerových kuřat (SIMON et al. 1997). DOZIER et al. (2008) doložili, že zdánlivá ME glycerolu je brojlerovými kuřaty efektivně využívána a může být významným energetickým zdrojem v jejich dietách.

Cílem pokusu bylo, při náhradě 50 % sojového oleje „čistým“ nebo „surovým“ glycerolem v poměru 1:2, sledovat vliv na ukazatele produkce, jateční hodnotu a zdravotní stav brojlerových kuřat.

Materiál a metoda

Do pokusu bylo zařazeno 180 jednodenních kuřat, která byla rozdělena podle pohlaví na kontrolní skupinu C1 a C2 (30 ♀ a 30 ♂) a dvě pokusné skupiny GLY-P1 a GLY-P2 (30 ♀ a 30 ♂) a GLY-R1 a GLY-R2 (30 ♀ a 30 ♂). Kuřata byla krmena v souladu s technologickým postupem pro hybrida kombinace ROSS 308. V průběhu experimentu byly kuřatům podávány tři typy sypkých krmných směsí. Do 14. dne věku směs pro předvýkrm (BR 1), od 15. do 30. dne věku směs pro výkrm (BR 2) a od 31. do 40. dne věku směs pro dokrm (BR 3). U krmných směsí určených pro pokusné skupiny kuřat

bylo 50 % sojového oleje nahrazeno glycerolem v poměru 1:2, u skupiny GLY-P čistým glycerolem, u skupiny GLY-R surovým glycerolem.

V průběhu experimentu byl individuálním vážením brojlerů sledován vývoj jejich hmotnosti 1., 15., 30. a 40. den věku a vypočítán průměrný denní přírůstek hmotnosti v jednotlivých fázích výkrmu a za celý výkrm. Byla sledována spotřeba krmných směsí, která sloužila k výpočtu konverze krmiva. Průběžně po celý pokus byl sledován zdravotní stav a zaznamenáván úhyn kuřat. Po poražení kuřat bylo provedeno jateční opracování, zjištěna hmotnost jatečně opracovaného těla (HJOT) a vypočítána výtěžnost jatečně opracovaného těla (VJOT), jako podíl jatečně opracovaného těla k živé hmotnosti kuřete. Výsledky byly zpracovány matematicko-statistickými metodami za použití programu UNISTAT for Excel verze 5.6, s využitím mnohonásobného porovnání Tukey-HSD. Rozdíly mezi průměrnými hodnotami byly testovány na hladině významnosti $P \leq 0.01$ a $P \leq 0.05$ (NS není signifikantní).

Výsledky a diskuse

Vyšší průměrnou hmotnost dosahovala kuřata pokusných skupin, a to jak u slepiček, tak i u kohoutků. 15. den výkrmu byla průměrná hmotnost u slepiček kontrolní skupiny 0.311 ± 0.087 kg u kohoutků 0.329 ± 0.084 kg, u pokusných skupin (GLY-P a GLY-R) u slepiček 0.413 ± 0.046 kg a 0.410 ± 0.036 kg i u kohoutků 0.429 ± 0.036 kg a 0.427 ± 0.051 kg. Mezi skupinou kontrolní a pokusnými byl prokázán statisticky významný ($P \leq 0.01$) rozdíl. 30. den výkrmu byly rozdíly mezi průměrnými hodnotami živé hmotnosti kontrolní a pokusných skupin statisticky nevýznamné, i když trendy byly zachované. Na konci pokusu, 40. den výkrmu, byla hmotnost slepiček kontroly 2.033 ± 0.342 kg, u pokusné skupiny GLY-P 2.224 ± 0.186 a u skupiny GLY-R 2.185 ± 0.160 kg, rozdíl mezi C a GLY-P byl statisticky vysoce průkazný ($P \leq 0.01$), mezi skupinou C a GLY-R statisticky průkazný ($P \leq 0.05$). U kohoutků byl rozdíl mezi průměrnou hodnotou živé hmotnosti skupiny C (2.317 ± 0.438 kg) a skupinou GLY-P (2.577 ± 0.262 kg) a skupinou GLY-R (2.555 ± 0.287 kg) statisticky průkazný ($P \leq 0.05$). Dosažené výsledky jsou v souladu s poznatky SIMON et al. (1996), BARTECZKO and KAMINSKI (1999), CERRATE et al. (2006) and DOZIER et al. (2008). Náhrada sojového oleje glycerolem v testovaných krmných směsích měla pozitivní vliv na růstovou intenzitu vykrmovaných kuřat, která se projevila zvýšením průměrných denních přírůstků u pokusných skupin kuřat, a to jak u slepiček, tak u kohoutků. U slepiček pokusných skupin byla oproti kontrole na konci výkrmu vyšší živá hmotnost o 9.4 a 7.5 %. U kohoutků pokusných skupin byla na konci výkrmu vyšší živá hmotnost o 11.2 a 10.3 % oproti kontrole. Nebyl prokázán podstatný rozdíl v intenzitě růstu pokud byl použit čistý nebo surový glycerol.

Celková spotřeba krmné směsi za 40 dnů výkrmu byla u slepiček 3.619 kg (C1), 4.003 kg (GLY-P1) a 3.977 (GLY-R1), u kohoutků 4.008 kg (C2), 4.484 (GLY-P2) a 4.548 kg (GLY-R2), tedy vyšší u pokusných kuřat. Konverze krmiva byla u slepiček 1.78 kg (C1) a 1.80 kg (GLY-P1) a 1.82 (GLY-R1), u kohoutků 1.73 kg (C2), 1.74 kg (GLY-P2) a 1.78 kg (GLY-R2). Zvýšená intenzita růstu a vyšší hmotnost kuřat byly provázány i zvýšenou spotřebou krmiva a mírně sníženou konverzí krmných směsí u pokusných skupin kuřat.

Za pozitivní vliv 50% náhrady sojového oleje glycerolem lze pokládat statisticky průkazně vyšší hmotnost jatečně opracovaného těla u kuřat pokusných skupin, což úzce souvisí i s jejich průkazně vyšší živou hmotností. Mezi pokusnými skupinami s čistým a

surovým glycerolem v dietě nebyly shledány průkazné rozdíly. Rozdíly mezi průměrnou hmotností jatečně opracovaného těla u skupiny kontrolních kuřat a skupinami pokusných kuřat byly vysoce průkazné ($P \leq 0.01$). Kohoutci vykazovali obecně vyšší hmotnost jatečně opracovaného těla ve srovnání se slepičkami.

Výsledky jatečního zpracování kuřat dokládají, že ve výtěžnosti jatečně opracovaného těla nejsou rozdíly mezi kontrolou a pokusnými skupinami. Přes vyšší hmotnost jatečně opracovaného těla kuřat pokusných skupin nebyly rozdíly jateční výtěžnosti mezi skupinami průkazné. Námi dosažené průměrné hodnoty jateční výtěžnosti u brojlerových kuřat ROSS 308 se pohybovaly v rozmezí 71.73 – 72.61 % a jsou srovnatelné s poznatky NOVÁKOVÁ (1991), SKŘIVAN and TŮMOVÁ (1990). Vyšší hodnoty jateční výtěžnosti kolem 74 % uvádí ŠAFUJ et al. (2001), naopak nižší hodnoty uvádějí např. ZELENKA et al. (1989) 65.16 % (slepičky) a 70.56 % (kohoutci).

Pozitivně lze hodnotit i zdravotní stav kuřat. Kuřata kontrolní, ani pokusných skupin nevykazovala v průběhu experimentu klinické příznaky onemocnění. Jak zjistili SIMON et al. (1997) teprve hladina 25 % glycerolu byla doprovázena patologickými změnami na orgánech a měla negativní dopad na užitkovost brojlerových kuřat. Úhyn byl minimální, a to u kuřat ve věku do 5 dnů šlo o kongenitální vady. U slepiček skupiny C byl zaznamenán úhyn jednoho kuřete, stejně jako u pokusné skupiny GLY-P. U kohoutků kontrolní skupiny byl zaznamenán jeden úhyn, stejně jako u skupiny GLY-R.

Na základě provedeného experimentu lze dojít k závěru, že glycerol získaný při zpracování řepkového semene je a v budoucnosti bude vhodnou energetickou komponentou v krmivech určených pro výkrm kuřat.

Poděkování

Práce vznikla jako součást Výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

- Barteczko J, Kaminski J (1999): The effect of glycerol and vegetable fat on some physiological indices of the blood and excess of fat in broiler carcasses. *Annals of Warsaw Agricultural University, Animal Science* **36**: 197-209
- Carew LB, Foss DC (1974): Glycerol in diet of chicks. *Poultry Science*, **53** (5): 1907-1907
- Cerrate S, Yan F, Wang Z, Coto C, Sacakli P, Waldroup PW (2006): Evaluation of glycerine from biodiesel production as a feed ingredient for broilers. *International Journal of Poultry Science* **5** (11): 1001–1007
- Dozier WA; Kerr BJ; Corzo A; Kidd MT; Weber TE; Bregendal K (2008): Apparent metabolizable energy of glycerin for broiler chickens. *Poultry Science* **87**: 153-153. Suppl. 1
- Emmanuel B, Berzins R, Robblee AR (1983): Rates of entry of alanine and glycerol and their contribution to glucose synthesis in fasted chickens. *British Poultry Science* **24** (4): 565-571
- Lin MH, Romsos DR, Leveille GA (1976): Effect of glycerol on lipogenic enzyme-activities and on fatty-acid synthesis in rat and chicken. *Journal of Nutrition* **106** (11): 1668-1677
- Neville WJ, MacPherson, JW, Reinhart B (1971): The contraceptive action of glycerol in chickens. *Poultry Science* **50** (5): 1411-1415
- Nováková S (1991): Jakost jatečné drůbeže a drůbežího masa. VŠZ Brno. 81 s
- Renner R, Elcombe A (1964): Factors Affecting Utilization of Carbohydrate free diets by Nutrition. 2. Level of Glycerol. **84** (4): 327-330

Simon A, Bergner H, Schwabe M. (1996): Glycerol-feed ingredient for broiler chickens. Archives of Animal Nutrition-Archiv Fur Tierernahrung **49** (2): 103-112

Skřivan M, Tůmová E (1990): Jatečná užitkovost pětítýdenních až osmitýdenních kohoutků Hybro, Ross 208 a ROSS PM 3. Živočišná Výroba **35**, 12:1049-1257

Šafuj P, Příbyl J, Soukupová Z (2001): Vývoj užitkovosti brojlerů ve výkrmových testech za období 1984 až 1997. Náš chov **61**, 1: 36-37

Westfall FD, Howarth B (1976): Effect of time of glycerol deposition on fertility of chickens. Poultry Science 55 (5): 2105-2106.

Zelenka J, Elnsabbach MT, Lazar V (1989): Růst, konverze krmiva a jatečný rozbor kuřat vykrmovaných do vysoké hmotnosti. Živočišná Výroba **34**: 989-996

Kontaktní adresa

MVDr. Leo Kroupa, VFU Brno, FVHE, Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, Palackého1/3, 612 42 Brno, e-mail: leo.kroupa@centrum.cz

Vybrané parametre vnútorného prostredia u dojníc slovenského strakatého dobytká v období po otelení

Selected metabolic parameters in slovak spotted dairy cows in the postpartal period

Lešková Lenka, Tóthová Csilla, Kováč Gabriel

Abstract

In the study blood sampling in 197 dairy cows of slovak spotted breed and their crossbreeds was carried out at the dairy farm near Kosice. Cows were divided into the groups according to the period after calving. Serum levels of energy, lipid, protein, haematological and mineral metabolism (glucose, TG - triglycerides, TL - total lipids, TCH - total cholesterol, NEFA – non-esterified fatty acids, BHB - β -hydroxybutyrate, TB - total bilirubin, TIg - total immunoglobuline, TP – total protein, albumin, creatinin, urea, haemoglobin, PCV, leukocytes, erythrocytes, MCV, Ca, Mg, P, Na, K, Cl, Cu, Fe, Zn, Se) and activity of selected enzymes (AST, GGT, ALP, CPK, LDH) were examined. Average numbers (x), standard deviations (sd) and also percentage of animals with altered levels for each group were assessed. We have detected the most severe alterations outside the reference range in the levels NEFA, TG, TB, TIg, LDH, Cu, Fe, Zn.

Keywords: dairy cows, metabolism, postpartal period

Úvod

U dojníc je obdobie krátko po telení považované za fázu reprodukčného cyklu, kedy najčastejšie dochádza k zvýšenému výskytu produkčných, reprodukčných porúch, tráviacich, metabolických a infekčných ochorení.

Keďže prísun energie krmivom po otelení je nedostačujúci na pokrytie energetických potrieb organizmu v dôsledku produkcie mlieka, dojnice vstupujú do stavu tzv. negatívnej energetickej bilancie (Grummer a kol., 2004). Ku kompenzácii tohto stavu dochádza odbúravaním telových rezerv, zásobného tuku v tukovom tkanive – lipomobilizáciou za uvoľnenia NEFA ako zdroja energie (Kokkonen a kol., 2005). Pri prehlbovaní negatívnej energetickej bilancie sa z tukového tkaniva uvoľňuje čoraz viac NEFA a zároveň stúpa hladina ketónových látok reprezentovaná betahydroxybutyrátom, čo vedie k riziku vzniku subklinickej alebo klinickej ketózy (Duffield, 2000).

Materiál a metódy

V práci boli použité vzorky krvi odoberané punkciou *v. jugularis* od 197 dojníc plemena slovenský strakatý dobytok a ich krížencov na farme PD Nová Bodva v mesačných intervaloch v období január 2008 až január 2009. Dojnice boli rozdelené do 6 skupín v závislosti na dobe od otelenia: 1. skupina (n = 39) – 1 týždeň *p. p.*; 2. skupina (n = 36) – 2 týždne *p. p.*; 3. skupina (n = 42) – 3 týždne *p. p.*; 4. skupina (n = 28) – 4 týždne *p. p.*; 5. skupina (n = 20) – 5 týždňov *p. p.*; 6. skupina (n = 32) – 6 a viac týždňov *p. p.*

TP, albumín, kreatinín, močovina, BHB, NEFA, TG, TCH, P, Cl, AST, GGT, ALP, CPK, LDH boli stanovované komerčne dostupnými kitmi spoločnosti Randox na automatickom analyzéri Alizé (Lisabio); TIg boli stanovované spektrofotometricky využitím zink-sulfátového testu; stanovenie hladiny TB a TL bolo realizované klasickou metódou a stanovovanie Ca, Mg, Na, K, Cu, Zn, Fe a Se plameňovou atómovou

absorbčnou spektrofotometriou (analyzér Analyst 100, Perkin Elmer). Hb, Hk, Leu, Ery, MCV boli hodnotené automatickým analyzérom Animal Blood Counter (Trigon).

Štatistické hodnotenie sledovaných parametrov bolo vykonané stanovením priemerných hodnôt (\bar{x}) a smerodajných odchýlok (sd) v jednotlivých skupinách. V rámci jednotlivých skupín bolo stanovené percento výskytu zvýšených a znížených hodnôt daných parametrov v porovnaní s referenčným rozpätím laboratória Kliniky prežúvavcov UVLF v Košiciach.

Výsledky a diskusia

Parametre najviac sa odchyľujúce od referenčného rozpätia sú uvedené v tabuľke jako priemerné hodnoty a smerodajné odchýlky (sd) spolu s percentuálne vyjadreným výskytom zvýšených/znížených hodnôt v rámci skupiny.

Ukazovateľ	Glu mmol/l	TG mmol/l	NEMK mmol/l	LDH μkat/l	Bi μmol/l	Cig U ZST	Cu μmol/l	Fe μmol/l	Zn μmol/l
Ref.rozpätie	2,5-4,2	0,17-0,51	0,10-0,35	11-45	do 5,13	18-26	12,6-18,9	21,5-32,7	12,2-30,0
1. skupina									
priemer	3,98	0,13	0,47	46,10	7,08	24,65	12,76	19,39	15,84
sd	0,514	0,123	0,242	9,927	3,677	3,840	3,100	3,697	11,042
% ↑	28,2	2,6	59	56,4	69,2	41	-	-	15,4
% ↓	-	82,1	2,6	-	-	2,6	46,2	66,7	56,4
2. skupina									
priemer	4,00	0,13	0,45	46,86	7,90	26,84	10,47	20,85	11,02
sd	0,549	0,091	0,341	9,276	4,897	4,996	2,390	3,688	2,789
% ↑	30,6	-	50	50	66,7	58,3	-	-	2,8
% ↓	-	75	5,6	-	-	5,6	72,2	44,4	66,7
3. skupina									
priemer	3,97	0,12	0,45	49,65	8,01	29,21	11,89	19,98	12,61
sd	0,377	0,063	0,322	9,888	3,899	4,143	2,249	2,853	7,462
% ↑	28,6	-	45,2	61,9	81	73,8	-	-	2,4
% ↓	-	81	2,4	-	-	-	57,1	64,3	71,4
4. skupina									
priemer	4,08	0,14	0,36	47,36	6,39	31,19	11,69	20,27	12,17
sd	0,407	0,068	0,232	7,228	2,683	3,216	2,368	2,865	4,328
% ↑	28,6	-	50	60,7	64,3	92,9	-	-	-
% ↓	-	71,4	10,7	-	-	-	67,9	57,1	64,3
5. skupina									
priemer	4,03	0,11	0,43	48,64	7,67	30,09	10,61	20,20	10,88
sd	0,469	0,041	0,305	7,506	4,215	5,365	1,505	2,321	3,604
% ↑	30	-	45	70	90	80	-	-	-
% ↓	-	95	5	-	-	-	90	70	65
6. skupina									
priemer	4,54	0,16	0,25	46,43	4,76	30,87	11,72	19,92	18,92
sd	0,424	0,120	0,141	10,098	1,999	4,633	2,824	3,078	11,983
% ↑	71,9	3,1	12,5	62,5	53,1	84,4	-	-	25
% ↓	-	65,6	3,1	-	-	-	56,3	62,5	43,8

Sérová koncentrácia NEFA a BHB po otelení je dôležitým ukazovateľom, pretože odráža stupeň lipomobilizácie (Pullen, 1990) a následný výskyt zdravotných porúch spojených s popôrodných obdobím, ako sú napríklad steatóza pečene, ketóza, zadržanie lôžka alebo dislokácia slezu (Dyk a kol., 1995). Djokovic a kol. (2007) popisujú pozitívnu koreláciu medzi hladinou lipidov v pečeni a NEFA v krvi a negatívnu koreláciu medzi obsahom lipidov v pečeni a koncentráciou glukózy, TG a TCH v krvi a predpokladajú, že tieto parametre sú dobrým indikátorom steatózy pečene u dojnic v popôrodnom období.

Oikawa a kol. (1997) popisujú zvýšenú koncentráciu NEFA a zníženú koncentráciu TG a TCH spolu s ďalšími zmenami pri výskyte syndrómu uľahnutia kráv a pri mliečnej horúčke.

Aktivita LDH, aj keď je považovaná za nešpecifický enzým, môže byť nápomocná pri detekcii niektorých porúch pečene (napr. akútne pečňové zlyhanie, hepatitída, obštrukčný ikterus).

Čo sa týka hladiny TIg, naše výsledky sú v rozpore so zistením Lacetera a kol. (2005), ktorí zaznamenali u pretučných dojníc po pôrode príznaky imunopresie.

Zistené karence minerálov s najväčšou pravdepodobnosťou nemajú žiadny vzťah k popôrodnému obdobiu a zdravotným poruchám v tomto období a sú primárne dôsledkom nevyrovnanej kŕmnej dávky.

Záver

Napriek dobrému zdravotnému stavu a produkcii sme zaznamenali zmeny v hodnotách niektorých parametroch, čo mohlo byť spôsobené subklinicky prebiehajúcimi ochoreniami. Sledovanie daných ukazovateľov môže byť užitočné obzvlášť pri skorom odhaľovaní niektorých ochorení v popôrodnom období, ktoré môžu neskôr negatívne ovplyvniť produkčné a reprodukčné ukazovatele. Je dôležité presvedčiť chovateľov o dôležitosti metabolického skriningu ako súčasť prevencie a stádovej diagnostiky.

Literatúra

Djokovic, R., Samanc, H., Jovanovic, M., Nicolice, Z.: Blood concentrations of thyroid hormones and lipids and content of lipids in the liver in dairy cows in transition period. *Acta Vet Brno*, 76, 4, 2007, s. 525 – 532.

Duffield, T.: Subclinical ketosis in lactating dairy cows. *Vet Clin N Am-Food A*, 2000, 16, s. 231-253.

Dyk, P., B.: The association of prepartum non-esterified fatty acids and body condition with peripartum health problems on 95 Michigan dairy farms. M.S. Thesis, Michigan State Univ., East Lansing, 1995.

Grummer, R., R., Mashek, D., G., Hayirli, A.: Dry mater intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin N Am-Food A*, 20, 2004, s. 447–470.

Ingvartsen, K., L., Dewhurst, R., J., Friggens, N., C.: On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. *Livest Prod Sci*, 73, 2003, s. 277–308.

Kokkonen, T., Taponen, J., Anttila, T., Syrjala-Qvist, L., Delavaud, C., Chilliard, Y., Tuori, M., Tesfa, A., T.: Effect of body fatness and glucogenic supplement on lipid and protein mobilization and plasma leptin in dairy cows. *J Dairy Sci*, 88, 2005, s. 1127–1141.

Lacetera, N., Scalia, D., Bernabucci, U., Ronchi, B., Pirazzi, D., Nardone, A.: Lymphocyte functions in overconditioned cows around parturition. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88, 2010-2016.

Pullen, D., L., Liesman, J., S., Emery, R., S.: A species comparison of liver slice synthesis and secretion of triacylglycerol from nonesterified fatty acids in media. *J Anim Sci*, 68, 1990, s. 1395–1399.

Kontaktná adresa

MVDr. Lenka Lešková, Klinika prežúvavcov UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, SR; lennina03@azet.sk

Vliv přípravku ZeoFeed jako krmné aditivum na užitkovost nosnic **Influence of ZeoFeed as feed additives on performance of layers**

Macháček Miroslav, Straková Eva, Suchý Pavel

Abstract

Feeding by the diet with feed additives is one of the ways how to ensure healthy animals for production of quality and safe animal products. One of feed additives is also ZeoFeed which contain clinoptilolit. In the experiment were compared two groups of eggs of layers. To the diet for experimental group was added ZeoFeed in an amount of 1 %. We noticed: weight of eggs, intensity of egg yield, quantity of eggs and consumption of mixture per layer and per formation of one egg and also consumption of mixture for formation of 1 kg of egg mass, weight of eggshell, egg-yolk and glair, solidity of eggshell and the color of yolk. We even noticed positive influence to quantity of eggs and consumption of feed. Differences of other values have no statistic importance.

***Keywords:** feed additives, zeolites, clinoptilolit, egg, yolk weight, solidity of eggshell, consumption of feed mixture*

Úvod

Moderními selekčními postupy se zvýšila produkce vajec. Nezáleží ovšem jen na množství vyprodukovaných vajec, ale také na jejich kvalitě.

Krmiva pro nosnice mohou kromě živin obsahovat i látky nebezpečné, které se prostřednictvím vajec dostávají do potravního řetězce. Jednou z cest, jak tomu zabránit, je použití krmných aditiv. Do skupiny krmných aditiv zařazujeme i přírodní zeolity na bázi klinoptilolitu, které se pro svoje pozitivní působení přidávají do krmných směsí. Klinoptilolity mají schopnost selektivně vyměňovat vlastní kationy za ionty z prostředí. Pozitivně působí na konverzi krmiva a snášku vajec (Acosta a kol., 2005, Olver, 1997), vážou mykotoxiny (Suchý, 2006; Harvey a kol., 1993; Skalicka a Makoova, 1999, Rizzi a kol., 2003) a jsou i schopny eliminovat těžké kovy (Tape a kol, 2004).

Naše práce měla za úkol zjistit, jaký vliv na vybrané ukazatele vajec má přídavek krmného aditiva na bázi klinoptilolitu ZeoFeed.

Metodika

K provedení biologického pokusu bylo použito 120 nosnic hybridní kombinace Isa Brown. Nosnice byly rozděleny do dvou skupin, a to na 60 nosnic kontrolních a 60 nosnic pokusných. Krmení bylo realizováno pomocí komerčně vyráběných kompletních krmných směsí N1 (první polovina snášky) a N2 (druhá polovina snášky). Nosnice byly chovány v klecové technologii v akreditované experimentální stáji.

Byl připraven jeden typ krmné směsi stejného živinového složení s tím rozdílem, že krmná směs určená pro pokusnou skupinu obsahovala klinoptilolit v podobě krmného aditiva ZeoFeed, a to v dávce 1 %. Krmná směs a voda byla nosnicím podávána ad libitum.

Sledované ukazatele v průběhu experimentu:

- denní produkce vajec (počet a hmotnost)
- kvalitativní parametry vajec (ve čtyř týdenních intervalech – 60 kusů pokusných a 60 kusů kontrolních): hmotnost vejce (g), hmotnost bílku (g), hmotnost žloutku (g), hmotnost skořápky (g), pevnost skořápky (N), barva žloutku (barevná stupnice La Roche)

Výsledky

Tab. 1 Vybrané ukazatele - nosnice

v/nosnice – počet snesených vajec na 1 nosnici

skupina	v/nosnice (ks)	IS (%)	PVH/nosnici (g)	KS/den (g)	KS/vejce (g)	KS/kg v.h. (g)
ZeoFeed	288,57	91,62	18945,1	126,22	137,58	2095,61
Kontrola	283,04	89,87	18772,61	127,92	141,7	2136,49

IS – intenzita snášky

PVH/nosnici – produkce vaječné hmoty na 1 nosnici

KS/den – spotřeba krmné směsi na 1 nosnici za den

KS/vejce – spotřeba krmné směsi na 1 vejce

KS/kg v.h. – spotřeba krmné směsi na produkci 1 kg vaječné hmoty.

Tab. 2 Sledované parametry vajec

ukazatel		skupina	n	x	Sn-1	sx	v	t
hmotnost vejce (g)	Σ	Zeofeed	30	67,39	4,579	0,836	6,79	0,456
		Kontrola	30	66,84	4,768	0,87	7,13	
pevnost vejce (N)	Σ	Zeofeed	30	32,11	5,67	1,035	17,66	0,592
		Kontrola	30	32,94	5,186	0,947	15,74	
barva žloutku	Σ	Zeofeed	30	4,58	0,553	0,101	12,07	0,069
		Kontrola	30	4,59	0,576	0,105	12,55	
hmotnost skořápky (g)	Σ	Zeofeed	30	7,27	0,55	0,1	7,56	0,32
		Kontrola	30	7,22	0,659	120	9,13	
hmotnost žloutku (g)	Σ	Zeofeed	30	17,52	1,859	0,339	10,61	0,179
		Kontrola	30	17,6	1,6	0,292	9,09	
hmotnost bílku (g)	Σ	Zeofeed	30	42,6	3,478	0,635	8,16	0,616
		Kontrola	30	42,01	3,93	0,718	9,35	

Počet snesených vajec byl průměrně vyšší u pokusné skupiny, rovněž intenzita snášky byla u této skupiny vyšší. Nosnice pokusné skupiny spotřebovaly méně krmiva a nižší spotřeba krmiva byla zaznamenána i při tvorbě vajec. Vejce kontrolní skupiny sice měla průměrně pevnější skořápku, než vejce skupiny pokusné, rozdíly však nebyly statisticky významné. Zaznamenali jsme vyšší průměrnou hmotnost vajec pokusné skupiny a to o

0,8 %, nebyl to ale rozdíl významný. Rovněž v barvě žloutku, hmotnosti skořápky a hmotnosti bílku jsme nezaznamenali statisticky významné rozdíly mezi pokusnou a kontrolní skupinou.

Závěr

V práci byla porovnávána vejce pokusné a kontrolní skupiny. Do krmné směsi pokusné skupiny byl přidán přípravek ZeoFeed a to v množství 1 %. V pokusu se sledoval také vliv ZeoFeedu na intenzitu snášky a spotřebu krmné směsi na nosnici a na tvorbu jednoho vejce. Z výsledků výzkumu vyplívá, že přidavek krmného aditiva ZeoFeed do krmné směsi v množství 1 % pozitivně ovlivňuje počet snesených vajec a spotřebu krmiva. Rozdíly v ostatních zkoumaných parametrech nebyly statisticky průkazné.

Poděkování

Práce vznikla jako součást Výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“

Literatura

ACOSTA, A., DIEPPA, O., LON-WO, E. Effect of the natural zeolite (Clinoptilolite) and of the different Frediny schemes on the productive performance of broilers. *Cuban journal of agricultural science*, 2005, vol. 39, no. 3, p. 311-316.

HARVEY, R.B. et al. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler-chickens. *Avian Diseases*, 1993, vol. 37, p. 67 – 73.

OLVER, M.D. Effect of feeding clinoptilolite (zeolite) on the performance of three strains of laying hens. *British Poultry Science*, 1997, vol. 38, p. 220-222.

RIZZI, L. et al. Aflatoxin B1 and clinoptilolite in feed for laying hens : effects on egg quality, mycotoxin residues in livers, and hepatic mixed- function oxygenase activities. *J. Food Prot.*, 2003, vol. 66, p. 860-865.

SKALICKA, M.; MAKOOVA, Z. Elimination of aflatoxin B-1 in broiler chicks by clinoptilolite. *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy*, 1999, vol. 43, p. 211 – 219.

SUCHÝ, P. et al.. The effect of a clinoptilolite-based feed suplement on the performance of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*, 2006, vol. 51, no.4, p. 168-173.

TEPE, Y. et al.. Protective effect of clinoptilolite on lead toxicity in common carp *Cyprinus carpio*. *Fresenius Environmental Bulletin*, 2004, no. 13, p. 639-642.

Kontaktní adresa

MVDr. Miroslav Macháček, VFU Brno, FVHE, Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, Palackého1/3, 612 42 Brno, e-mail: machacekm@vfu.cz

Změny v obsahu dusíkatých látek a tuku těla brojlerových kuřat v průběhu výkrmu

Changes in the content of nitrogen-containing substances and fat in broiler chickens during fattening

Navrátil Petr, Suchý Pavel, Straková Eva

Abstract

The objective of the paper was to monitor changes in the content of nitrogen-containing substances and fat in ROSS 308 broiler chickens during the period of fattening (1 – 40 day), at the interval of 5 days. The results of the experiment showed that during this period, the content of dry matter increased, from 254,80 to 393,88 g/kg in hens and from 253,90 to 359,19 kg in cockerels. During the first 10 days of fattening, there has first been a decrease in the content of nitrogen-containing substances in hens (160,30 – 147,70 g/kg) and cockerels (156,4 – 144,20 g/kg), with the following increase until the end of the fattening period, to 168,59 g/kg in hens and 171,49 g/kg in cockerels. At the beginning of fattening, until day 5, the fat content decreased from 70,30 to 42,50 g/kg in hens and from 67,40 to 40,80 g/kg in cockerels. Then, its content was gradually increasing until the end of the period, to 179,50 g/kg in hens and 150,52 g/kg in cockerels. Different tendencies were observed for the dry matter of chickens' bodies – the nitrogen-containing substances markedly decreased (629,12 – 428,98 g/kg in hens and 615,99 – 477,34 g/kg in cockerels), whereas the fat content in dry matter markedly increased (178,27 – 454,63 g/kg in hens and 178,48 – 418,74 g/kg in cockerels). The majority of these changes were highly significant ($P \leq 0,01$) or significant ($P \leq 0,05$).

Keywords: *fattening chickens, changes in chemical composition, dry matter, nitrogen-containing substances, fat*

Úvod

V současné době prakticky neexistují vědecké podklady o změnách ve složení těla brojlerových kuřat, ke kterým dochází v průběhu výkrmu, které jsou velmi důležité pro optimalizaci krmných směsí. Z tohoto pohledu lze považovat tuto práci za pilotní studii. U brojlerových kuřat byl sledován chemismus pouze ve svalovině, jak uvádějí Suchý et al. (2002), kteří dospěli k závěru, že prsní svalovinu lze charakterizovat vyšším obsahem proteinů (22,5 – 22,7 %), vyšším obsahem sušiny (25,8 – 26,0 %) a nižším obsahem tuku (2,1 – 2,5 %). Naopak stehenní svalovinu lze charakterizovat vyšším obsahem sušiny (28,5 – 28,6 %) a tuku (8,9 – 9,3 %). Chemickou analýzou jednotlivých tkání mladých kuřat se zabývali Mavromichalis et al. (2000). Autoři uvádějí obsah sušiny celého těla 31,3 %, protein 19,3 % a obsah lipidů (% sušiny) byl mezi 25 a 30 %. Obsah tuku závisí na mnoha faktorech. Především je to druh zvířete, tělesný stav, věk, pohlaví a anatomický původ masa (Klíma, 1996). Samostatné jednotlivé části jatečně opracovaného těla mají rozdílný obsah tuku. Jak uvádí Matušovičová (1986), u drůbeže obsahuje více tuku svalovina stehenní než svalovina prsní. Podle Simeonovové (1999) obsahuje stehenní svalovina více tuku. Matušovičová (1986) prokázala statisticky významnou negativní korelaci mezi obsahem tuku a bílkovin ve svalovině.

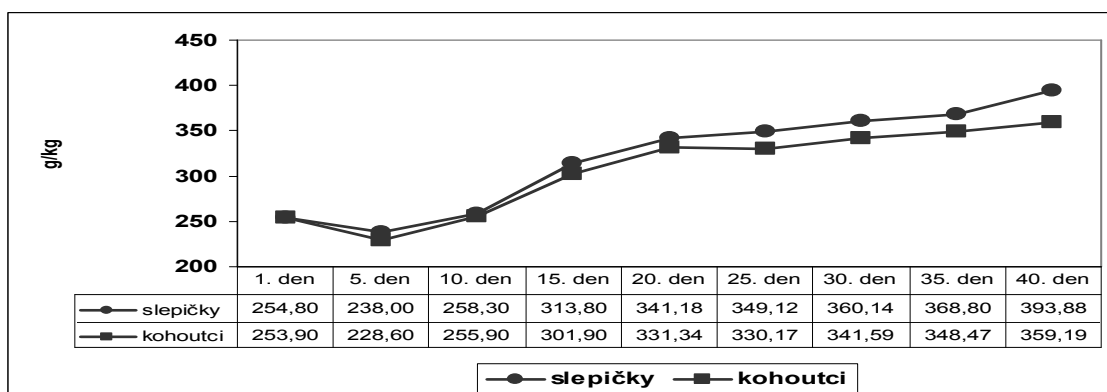
Materiál a metody

Cílem předložené práce bylo charakterizovat změny v obsahu dusíkatých látek a tuku v celém těle kuřat v pěti denních intervalech v průběhu výkrmu. Experiment byl realizován v pokusné akreditované stáji Ústavu výživy, zootechniky a zoohygieny,

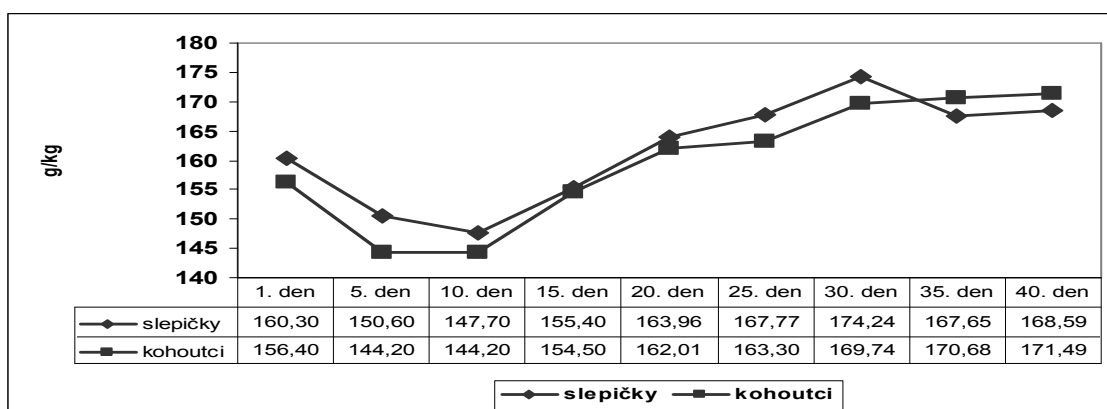
Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Byly vytvořeny 2 skupiny sexovaných kuřat Ross 308, a to skupina 100 slepiček a skupina 100 kohoutků. V průběhu výkrmu dostávala kuřata obou pohlaví identické krmné směsi BR1, BR2 a BR3. V 1. dnu a následujících pěti denních intervalech (5., 10., 15., 20., 25., 30., 35. a 40. den) bylo po vyláčení, vždy poraženo od každého pohlaví 10 jedinců. Jejich těla byla kompletně homogenizována v kutru, homogenizát byl zvážen a vysušen a po vysušení následně homogenizován pomletím na formu vhodnou k dalším analýzám. V rámci experimentu byl v těle kuřat stanoven obsah sušiny, obsah dusíkatých látek ($N \times 6,25$) a obsah tuku. Sušina byla stanovena po vysušení vzorku při $105^\circ C$ za předepsaných podmínek. Dusík byl stanoven dle Kjeldahla na analyzátoru Buchi (firma Centec automatika, spol. s.r.o.). Obsah hrubého tuku přístrojem ANKOM^{XT10} Fat Analyzer (firma O.K. SERVIS BioPro). Dosažené výsledky byly zpracovány statistickým programem Unistat CZ verze 5.6 for Excel, ve kterém bylo provedeno vyhodnocení průměrných hodnot a jejich rozdílů mnohonásobným porovnáním pomocí testu Turkey-HSD, na hladině významnosti $P \leq 0.01$ a $P \leq 0.05$.

Výsledky a diskuze

Z výsledků je zřejmé, jak dokumentuje graf 1, že v průběhu výkrmu dochází ke zvyšování obsahu sušiny v těle kuřat. Její obsah koresponduje s údaji, které uvádějí Mavromichalis et al. (2000).



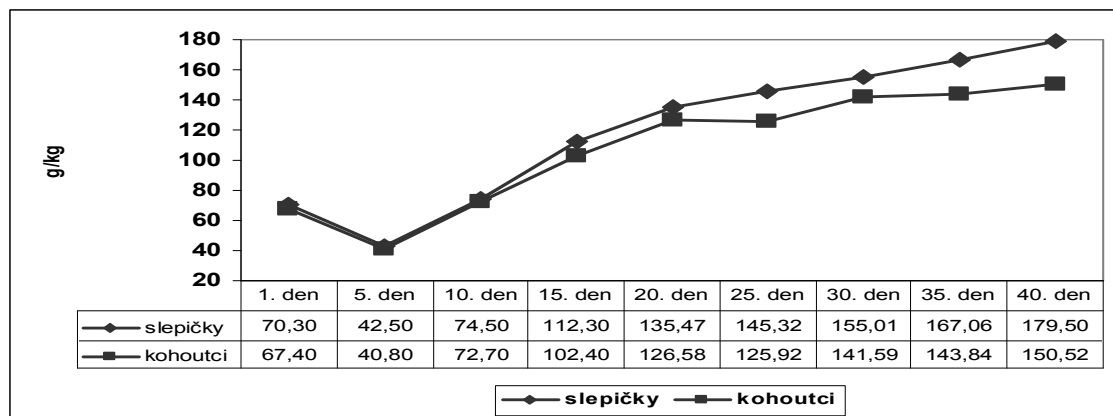
Graf 1. Změny v obsahu sušiny v těle vykrmovaných kuřat



Graf 2. Dynamika změn NL v těle vykrmovaných kuřat

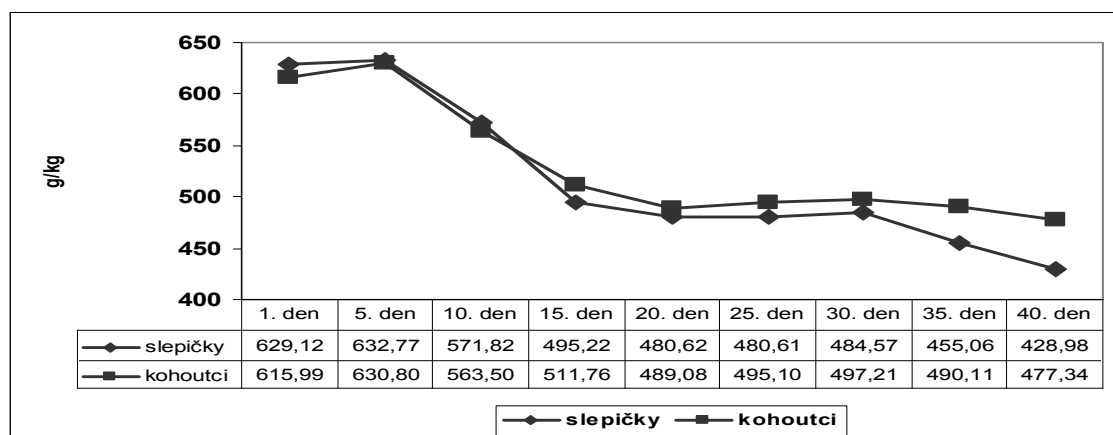
U obsahu dusíkatých látek (NL) dochází nejprve k poklesu, a to do 10. dne věku kuřat. U slepiček obsah NL se v jejich těle v průběhu výkrmu postupně zvyšuje až do 30. dne s následným poklesem do konce výkrmu. U kohoutků na rozdíl od slepiček obsah NL v jejich těle se neustále zvyšuje až do konce výkrmu, jak dokumentuje graf 2. Hodnoty obsahu NL u celého těla kuřat jsou pochopitelně nižší, než u čisté svaloviny uvádějí Mavromichalis et al. (2000) nebo Suchý et al. (2002).

U obsahu celkového tuku v těle kuřat jsme dospěli k závěru, že jeho obsah v těle kuřat se v průběhu výkrmu zvyšuje, jak dokumentuje graf 3. Uvedené změny jsou v souladu ze závěry, které uvádí Klíma 1996.



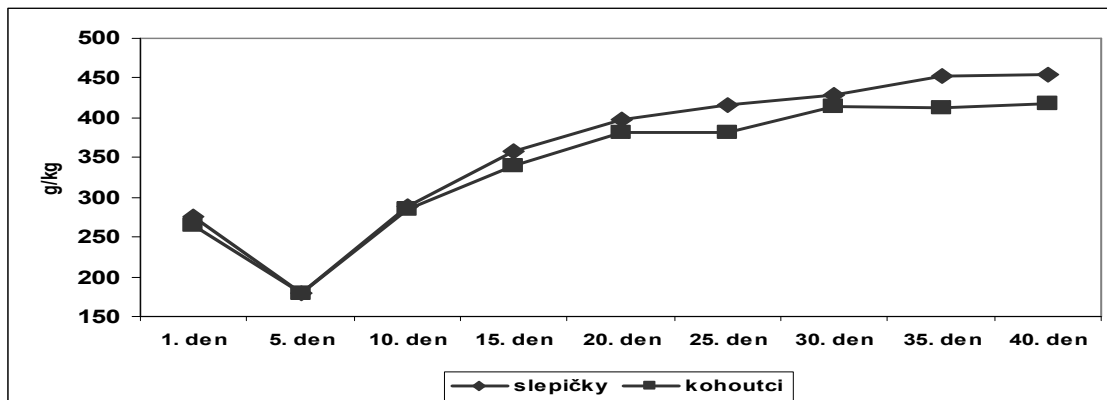
Graf 3. Dynamika změn obsahu tuku v průběhu výkrmu kuřat

Rozdílnou závislost ve změně NL lze pozorovat v tělesné sušině (graf 4), kdy od 5. dne výkrmu nastal u kuřat výrazný pokles NL do 20. dne výkrmu. U slepiček k výraznému poklesu NL v sušině jejich těla došlo ještě následovně od 30. dne, až do konce výkrmu. U kohoutků byl tento pokles méně výrazný.



Graf 4. Změny v obsahu NL v sušině těla vykrmovaných kuřat

U obsahu tuku v sušině těla slepiček i kohoutků po výrazném poklesu do 5. dne věku se jeho obsah v průběhu následujícího období výkrmu až do konce výkrmu kontinuálně zvyšoval. Od 10. dně věku slepičky v sušině těla ukládaly více tuku ve srovnání s kohoutky (graf 5).



Graf 5. Dynamika změn obsahu tuku v sušině těla vykrmovaných kuřat

Z výsledků vyplývá, že se vzrůstajícím obsahem tuku v sušině těla klesá obsah NL. Na tuto závislost upozorňuje i Matušovičová (1986), která uvádí, že existuje statisticky významná negativní korelace mezi obsahem tuku a bílkovin.

Poděkování

Práce vznikla jako součást Výzkumného záměru MŠMT ČR MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

Klíma D (1996) Živočišné tuky. In Maso, č. 6, s. 3-5

Matušovičová E (1986) Technológia hydinárskeho priemyslu. Bratislava: Príroda, 1. vydání, s. 393

Mavromichalis I, Emmert JL, Aoyagi S, Baker DH (2000): Chemical Composition of Whole Body, Tissues, and Organs of Zouny Chickens. Journal of Food Composition and Analysis, vol. 13, no. 5, p. 799-807

Simeonová J (1999) Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů. Brno: MZLU s. 247

Suchý P, Jelínek P, Straková E, Hucl J (2002): Chemical composition of muscles of hybrid broiler chickens during prolonged feeding. Czech journal of Animal Science, vol. 47, no. 12, p. 511-518

Kontaktní adresa

Ing. Petr Navrátil, VFU Brno, FVHE, Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, Palackého1/3, 612 42 Brno, e-mail: petr.navratil@sano.cz

Možnosti ovlivnění hladin cholesterolu v séru

Possibilities of influencing cholesterol levels in plasma

**Parák Tomáš, Suchý Pavel, Macháček Miroslav, Bartošová Ladislava,
Paráková Lenka, Chalupová Marta**

Abstract

Dyslipidemia is one of factors leading to the increased morbidity and mortality due to cardiovascular causes. Administration of hypolipidemics in combination with dietary precautions represents the main method how to at least slow down this unfavourable tendency. Despite the indisputable significance of decreasing the cholesterol concentrations in animal food, pharmacotherapy of dyslipidemia is often necessary. Hypolipidemics are chosen according to the dyslipidemia type. Nowadays, statins have a dominant position thanks to their broad indication and especially effectiveness both in monotherapy as well as in combination with other hypolipidemics. From the safety perspective, there was established a correlation between the administration of statins and the development of side effects, which can have impact on their position in the pharmacotherapy.

Klíčová slova: *dyslipidemie, statiny, fibráty, cholestyramin, ezetimib, kyselina nikotinová*

Úvod

Kontrola dyslipidemie (dále DLP) je jedním z několika preventivních opatření s cílem snížení mortality a morbidity z kardiovaskulárních příčin. Vedle kontroly dyslipidemie je to kontrola hypertenze, diabetu, zanechání kouření a prevence obezity. Základ terapie DLP představuje soubor dietních opatření, směřující ke snížení příjmu cholesterolu potravou. Jednou z cest je snížení koncentrace cholesterolu v potravinách, o čemž jsme referovali na minulé konferenci.

Farmakoterapie DLP

U mnoha pacientů se ale neobejdeme bez podávání hypolipidemik v kombinaci s dietou. Registrovaná hypolipidemika –statiny, fibráty, ezetimib a cholestyramin jsou indikována v monoterapii nebo v kombinované léčbě v závislosti na typu DLP. Z hlediska praktického i terapeutického jsou DLP děleny na tři skupiny: izolovaná hypercholesterolemie, izolovaná hypertriglyceridemie a kombinovaná hyperlipidemie. Tyto základní typy se mohou kombinovat se sníženou nebo zvýšenou koncentrací HDL-cholesterolu. Individuální volba léčivé látky ze skupiny hypolipidemik je prováděna dle klinických charakteristik zpravidla po vyčerpání nefarmakologických možností korigovat DLP (Vaverková et al 2007).

Statiny blokují HMG-CoA reduktázu (3-hydroxy-3-methylglutarylkoenzym A reduktázu) v hepatocytech dochází k útlumu syntézy cholesterolu, a tím k indukci tvorby LDL-receptorů. Statiny také mírně snižují Tg (v závislosti na jejich dávce) a mírně zvyšují HDL-C (nezávisle na dávce). Statiny mají i další účinky: přispívají ke stabilizaci aterosklerotického plátu, zlepšují funkci cévního endotelu, zvyšují syntézu oxidu dusnatého, některé statiny omezují riziko trombogeneze.

Tabulka 1. Doporučené základní denní dávky jednotlivých statinů

atorvastatin	fluvastatin	lovastatin	pravastatin	rosuvastatin	simvastatin
10,00 mg	40,00 mg	20,00 mg	20,00mg	5,00 mg	10,00 mg

Klinické studie jednoznačně potvrzují signifikantní redukci rizika v primární i sekundární prevenci kardiovaskulárních onemocnění u pacientů léčených statiny v porovnání s placebem. V tomto smyslu nejsou prokazatelné rozdíly mezi jednotlivými statiny.

Ze závěrů metaanalýzy 113 randomizovaných klinických studií (Helfand M et al, 2006) hodnotících statiny vyplývá, že:

- Pro pacienta s požadovanou redukcí LDL-C do 35% k dosažení cílové hladiny jsou efektivní všechny statiny.
- Pro pacienta s požadovanou redukcí LDL-C od 35 do 50% k dosažení cílové hladiny je efektivní *atorvastatin* 20,00mg a více, *lovastatin* 80,00mg, *rosuvastatin* 10,00mg a více a *simvastatin* 20,00mg a více.
- vysoce účinné statiny,
 - *atorvastatin* 80,00mg/den a *rosuvastatin* 20,00mg/den a více redukují LDL-C o 50% a více

Tabulka 2. Ekvipotentní dávky jednotlivých statinů z hlediska snížení LDL-C(%)

atorvastatin	fluvastatin	lovastatin	pravastatin	rosuvastatin	simvastatin
	40,00mg	20,00mg	20,00mg	--	10,00mg
10,00mg	80,00mg	40,00-80,00mg	40,00mg	--	20,00mg
20,00mg	--	80,00mg	80,00mg	5,00 nebo 10,00mg	40,00mg
40,00mg	--	--	--	--	80,00mg
80,00mg	--	--	--	20,00mg	--
--	--	--	--	40,00mg	--

Fibráty aktivují receptory typu alfa aktivované peroxisomovým proliferátorem (PPARalfa) a následkem toho je zvýšená lipolýza a eliminace částic bohatých na triglyceridy z plazmy aktivací lipoprotein-lipázy a snížením tvorby apoproteinu CIII. Aktivace PPARalfa také vyvolává zvýšení syntézy apoproteinů AI a AII. Tyto účinky vedou ke snížení VLDL a LDL frakcí, triglyceridů a ke zvýšení HDL frakce.

Cholestyramin je ve vodě nerozpustný iontoměnič, který se po p.o. podání neabsorbuje; ve střevě se na něj naváží žlučové kyseliny a ve formě nerozpustného komplexu se vyloučí stolicí, namísto aby se zpětně absorbovaly ze střeva, jak je tomu za normálních okolností. Tím se snižují hladiny volného cholesterolu i cholesterolu nízkodenzitních lipoproteinů v séru. *Cholestyramin* může ovšem vázat i některé jiné anionty než žlučové kyseliny. Vyvázaní žlučových kyselin ve střevě může snížit absorpci tuků i např. vitaminů v tukých rozpustných.

Ezetimib patří mezi hypolipidemické látky nové skupiny, které selektivně inhibují intestinální absorpci cholesterolu a příbuzných rostlinných sterolů. Molekulárním cílem ezetimibu je přenašeč sterolu, Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1), který je odpovědný za intestinální absorpci cholesterolu a fytosterolů. Je indikován u primární hypercholesterolemie, homozygotní familiární hypercholesterolemie a u homozygotní sitosterolemie. Je podáván jako přídatná terapie k dietě nebo v kombinaci se statiny.

Kyselina nikotinová modifikuje profil plazmatických lipidů ne zcela objasněnými mechanismy. Inhibuje uvolňování volných mastných kyselin z tukové tkáně, což může přispívat ke snížení plazmatických LDL-C, TC, VLDL-C, apo B, TG a Lp(a), stejně jako ke zvýšení HDL-C a apo A-I, což všechno je spojeno s nižším kardiovaskulárním

rizikem. Dále inhibuje lipogenezi a způsobuje relativní posun v distribuci podtříd LDL od malých, denzních (nejvíce aterogenních) LDL částic k větším LDL částicím. Je podávána v kombinaci s **laropiprantem**, který je účinným a selektivním antagonistou DP₁ je tedy účinný při omezování symptomů zrudnutí indukovaných kyselinou nikotinovou.

Bezpečnost léčby statiny

Mezi statiny není obecně významný rozdíl v četnosti nežádoucích účinků na poměrný pokles LDL-C. Riziko nežádoucích účinků (především **rhabdomyolýza**) je největší zejména u metabolizace cestou izoenzymu cytochromu P-450 3A4 (tento enzym metabolizuje cca 50% všech léčivých látek). Z tohoto hlediska lze za nejrizikovější považovat *simvastatin*, *lovastatin* a v menší míře též *atorvastatin*. Naopak nejmenší riziko interakcí představuje *rosuvastatin* a *fluvastatin*, který je cca ze 75% metabolizován izoenzymem cytochromu P-450 2C9. *Pravastatin* je hydrofilní a není metabolizován v klinicky signifikantní míře systémem cytochromu P450 vůbec; přesná metabolická cesta není popsána. Na základě hlášení nežádoucích účinků získaných **po registraci** a údajů z odborné literatury dospěla pracovní skupina pro farmakovigilanci (PhVWP) Výboru pro humánní léčivé přípravky (CHMP) Evropské lékové agentury **k závěru, že existuje příčinná souvislost mezi užíváním statinů a těmito nežádoucími účinky: poruchy spánku, ztráta paměti, sexuální poruchy, deprese a intersticiální pneumopatie**. Hodnocení se týkalo se těchto statinů: atorvastatin, fluvastatin, lovastatin, pravastatin, simvastatin, a rosuvastatin.

Závěr

Přes velmi rozšířenou farmakoterapii DLP zůstává i nadále klíčovým problémem snížení příjmu cholesterolu potravou a s tím související snaha o snížení koncentrace cholesterolu v potravinách živočišného původu. K tomuto cíli směřuje náš další výzkum

Literatura

EDWARDS JE, MOORE RA: Statins in hypercholesterolaemia: A dose-specific meta-analysis of lipid changes in randomised, double blind trials. BMC Fam Pract. 2003; 4: 18.

HELFAND M, CARSON S, KELLEY C: Drug Class Review on HMG-CoA Reductase Inhibitors (Statins). Final Report, August 2006; www.ohsu.edu/ohsedu/research/policycenter [cit. 2010-04-25]

PARÁK T, MACHÁČEK M, SUCHÝ P, STRAKOVÁ E: Vliv dietárního zinku na hladinu plazmatického cholesterolu. Sborník XI.konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí, 2009: 69-71.

SUCHOPÁR J, PROKEŠ M: Výsledky projektu GOLD. Remedica 18,5,2008:374-84

VAVERKOVÁ H, SOŠKA V, ROSOLOVÁ H, ČEŠKA R, CÍFKOVÁ R, FREIBERGER T, PÍTHA J, POLEDNE R, ŠTULC T, URBANOVÁ Z, VRÁBLÍK M: Doporučení pro diagnostiku a léčbu dyslipidemií v dospělosti, vypracované výborem České společnosti pro aterosklerózu. Cor et Vasa 2007;49(3):Kardio

www.sukl.cz/modules/medication/search.php [cit. 2010-04-25]

Kontaktní adresa

MUDr. Tomáš Parák, Ústav humánní farmakologie a toxikologie FaF VFU Brno, Brno, Palackého 1/3, parakt@vfu.cz

Vplyv zinku na zdravie a produkciu brojlerových kurčiat

Effect of zinc supplementation on health and production in broiler chicken

Štofániková Jana, Šály Ján, Sesztáková Edina

Abstract

Zinc has been shown to be a required nutrient for many species of animals and is believed to be essential for all. Recent studies in the nutrition of poultry have demonstrated a relatively high requirement for zinc. The purpose of this study was to investigate the effect of zinc supplementation on health and production in broiler chicken. Body weight, food consumption, some selected hematological, biochemical parameters and mechanical properties of bones were evaluated. The study has shown that zinc supplementation is of practical importance for broiler chicken.

Kľúčové slová: zinok, brojler, hmotnostné prírastky, kosť, pevnosť

Úvod

V literatúre bola zistená značná nejednotnosť pri uvádzaní optimálneho obsahu zinku v krmive pre hydinu. Jantošovič a kol. (1998) udávajú rozpätie 30-60 mg.kg⁻¹ krmnej zmesi, podľa Wanga a kol. (2002) je optimálna hladina diétného zinku 68 mg.kg⁻¹, podľa Huanga a kol. (2007) až 84 mg.kg⁻¹. Keďže štandardné krmivá nie vždy dostatočne kryjú potrebu zinku pre hydinu, zamerali sme sa na sledovanie možností zlepšenia niektorých produkčných ukazovateľov u brojlerov prídavkom zinku do krmiva. Bol sledovaný aj vplyv prídavkov zinku na vybrané hematologické a biochemické parametre, ako aj mechanické vlastnosti kostí, ktoré sú základnými parametrami odrážajúcimi štruktúru a funkciu kosti.

Materiál a metódy

Ako pokusné zvieratá boli použité brojlery hybridu Ross 308 od 2. do 42. dňa veku. Kurčatá boli vo veku 2 dni odvážené, rozdelené do šiestich skupín- 3. kontrolných a 3. pokusných, a umiestnené v experimentálnych priestoroch kliniky. Kontrolné skupiny tvorilo 59 kusov zvierat, pokusné 54 brojlerov. Kontrolné skupiny boli kŕmené komerčnou kompletnou kŕmnom zmesou HYD 01 do 14. dňa veku a potom až do konca experimentu kŕmnom zmesou HYD 02 ad libitum. V oboch bolo deklarované množstvo zinku 50 mg.kg⁻¹ kŕmnej zmesi. Brojlerom pokusných skupín bol do týchto kŕmnych zmesí pridaný zinok vo forme oxidu zinočnatého v množstve 50 mg/kg ž.hm. Telesná hmotnosť u kurčiat bola sledovaná v týždňových intervaloch. V týždňových intervaloch bolo z kontrolných aj pokusných skupín náhodne vybraných po 10 kusov zvierat, ktoré boli klinicky vyšetrené, zaznamenali sa prírastky ich hmotnosti, spotreba kŕmnej zmesi a boli od nich odobrané vzorky krvi na hematologické a biochemické vyšetrenie. Následne po eutanázii dekapitáciou boli brojlery pitvou vyšetrené na zistenie prípadných zmien na vnútorných orgánoch. Pri pitve boli zároveň od brojlerov odobrané tibiotarzy na vyšetrenie ich mechanických vlastností. Ich testovanie bolo uskutočnené na skúšobnom trhacom stroji pre skušky v ťahu. Pri rýchlosti zaťažovania 6,1 mm.min⁻¹ bola použitá sila od 1 kN po 40 N a vzdialenosť podpier od 25 do 60 mm v závislosti od veľkosti kostí. Priehyb kostí bol snímaný a registrovaný na záznam s 10-násobným zväčšením. Medza pružnosti (Re), pevnosť v ohybe (Rm) a lomové napätie (R1) boli

vyhodnotené zo zaťažujúceho diagramu. Výsledky boli spracované v štatistickom programe GraphPad Prism 5 a štatistická významnosť bola určená nepárovým t-testom.

Výsledky a diskusia

V pokuse bol zaznamenaný pozitívny vplyv zinkových prídavkov na klinický stav zvierat. Patologické zmeny na vnútorných orgánoch zistené neboli. V prvých štyroch fázach experimentu bola u kurčiat pokusnej skupiny priemerná telesná hmotnosť signifikantne vyššia ako u zvierat v kontrolnej skupine (Tab. 1) a vyššie hmotnostné prírastky zvierat pokusnej skupiny v prvých dvoch týždňoch vykazovali takisto štatistickú významnosť. Yu *et al.* (2005) pozorovali podobný vplyv zinkových prídavkov do krmiva brojlerov. Hudson *et al.* (2004) udávajú, že spotreba a konverzia krmiva prídavkami organického zinku ovplyvnené nie sú, čo sa zhoduje s výsledkami v našom experimente. Nebol potvrdený ani výrazný vplyv prídavkov zinku na hematologické a biochemické parametre napriek tomu, že viacerí autori ich ovplyvnenie zinkom uvádzajú. Rozdiely medzi hodnotami erytrocytov, leukocytov, heterofilov, bazofilov, lymfocytov, monocytov ani hemoglobínu neboli štatisticky významné. Preukazné rozdiely boli iba v hodnotách hematokritu na 21. deň a v hodnotách eozinofilov na 7. deň pokusu. Z biochemických parametrov boli signifikantné rozdiely medzi kontrolnými a pokusnými skupinami sledované na 28. a 42. deň v obsahu vápnika, na 21. deň v obsahu horčíka, na 35. deň v aktivite ALP a vo veku 42. dní v aktivite AST. Hodnoty fosforu, ALT a celkových proteínov v krvnom sére nevykazovali žiadne štatisticky významné zmeny. Underwood a Suttle (1999) uvádzajú, že zmeny zinkových hladín v krvnom sére sa objavujú až po dlhodobejšej deficiencii alebo prebytku v krmnej dávke. V našom pokuse bol obsah zinku v krvi pokusných zvierat už od 7. dňa vyšší ako u kontrolných so štatisticky významnými rozdielmi na 7. a 35. deň (Tab.2) a vo všetkých fázach zvýšený aj nad referenčné maximum $29,55 \mu\text{mol.l}^{-1}$, ktoré pre kurčatá udávajú Yur *et al.* (2002). Hodnoty medze pružnosti, pevnosti v ohybe a lomového napätia sa v prvých troch týždňoch pokusu pohybovali u oboch skupín na približne rovnakej úrovni. Od 28. dňa došlo u pokusnej skupiny u všetkých troch ukazovateľov k ich vzostupu oproti kontrole s maximálnymi hodnotami na 35. deň. Štatisticky významné rozdiely boli zaznamenané na 35. deň a 42. deň (Tab. 3).

Tab. 1 Porovnanie priemernej telesnej hmotnosti (g)

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	x	104,8	202	484,4	880,6	1470	1970
	SD	0,0172	0,0388	0,0848	0,0813	0,1670	0,2194
	n	10	10	10	10	9	10
P	x	110,4	250,4*	604,2**	1025**	1511	2040
	SD	0,0103	0,0382	0,0669	0,0836	0,1915	0,2348
	n	10	10	10	10	4	10

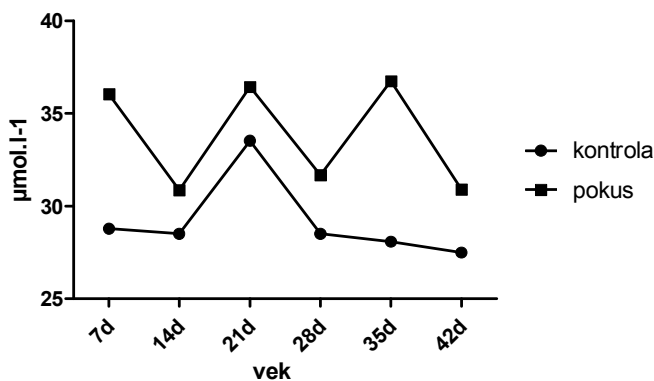
Tab. 2 Porovnanie priemerného obsahu zinku v krvnom sére brojlerov v jednotlivých etapách pokusu ($\mu\text{mol.l}^{-1}$)

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	Zn	28,78	28,50	33,53	28,50	28,08	27,49
	SD	3,775	6,815	7,040	6,239	4,645	3,517
	N	10	10	10	10	9	10
P	Zn	36,06 **	30,87	36,44	31,68	36,75 *	30,91
	SD	5,943	9,518	11,880	5,529	5,822	5,942
	n	10	10	10	10	4	10

Tab. 3 Porovnanie vybraných ukazovateľov mechanických vlastností kostí u brojlerov v jednotlivých etapách pokusu (Mpa)

		7.deň	14.deň	21.deň	28.deň	35.deň	42.deň
K	Re	61,00	61,68	58,60	84,14	94,27	86,46
	SD	10,04	10,17	11,12	9,996	18,71	29,28
	Rm	73,82	79,29	77,60	93,08	100,2	93,33
	SD	9,885	11,89	13,27	11,95	20,56	29,54
	Rl	42,64	51,68	51,78	76,14	80,93	72,44
	SD	12,65	13,96	19,98	22,65	35,22	25,52
	n	10	10	10	10	9	10
P	Re	64,00	57,86	59,85	96,23	117,8**	98,65
	SD	7,983	8,121	15,80	36,89	19,66	27,20
	Rm	76,68	75,70	84,09	104,0	126,7*	106,2
	SD	9,094	10,29	18,41	37,89	32,56	26,39
	Rl	42,88	46,15	61,46	79,89	114,1*	92,58*
	SD	10,23	16,32	24,33	43,10	19,92	28,57
	n	10	10	10	10	4	10

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ štatistická významnosť medzi pokusnými skupinami a kontrolou (t- test)



Graf 1 Hladiny sérového zinku u brojlerov v jednotlivých etapách pokusu (µmol.l⁻¹)

Záver

Sledovaný bol vplyv prídavkov zinku do krmiva na hmotnostné prírastky, spotrebu krmiva, vybrané hematologické, biochemické parametre a mechanické vlastnosti kostí brojlerových kurčiat. Výsledky našich vyšetrení ukázali, že prídavky zinku do krmiva mali pozitívny vplyv na klinický stav zvierat a do 4. týždňa odchovu aj pozitívny vplyv na telesnú hmotnosť a hmotnostné prírastky brojlerových kurčiat. Zníženie spotreby krmiva prídavkom zinku nebolo preukázané. Hematologické a biochemické parametre boli signifikantne ovplyvnené len v určitých fázach pokusu. Zinok v krvi pokusných skupín vykazoval počas celého experimentu vyššie hodnoty ako u kontrolných a bol zvýšený aj nad referenčné maximum. Medza pružnosti, pevnosť v ohybe a lomové napätie boli prídavkami zinku ovplyvnené, čo potvrdzuje vplyv zinku na biomechanickú kompetenciu kostného tkaniva.

Pod'akovanie

Táto práca bola podporená projektom VEGA 1/4389/07 a VEGA 1/0590/09.

Literatúra

K dispozícii u autorov.

Kontaktná adresa

Štofaničková Jana, MVDr., Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF Košice, Komenského 73, 04181 Košice, Slovenská republika, jana.stofanikova@centrum.sk

SEKCE B

Veterinární ekologie

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

Veřené veterinářství a ochrana zvířat

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat zoologických
zahrad*

Ovlivňují cyanotoxiny reprodukci ptáků? Do cyanotoxins influence avian reproduction?

Damková Veronika, Pikula Jiří, Bandouchová Hana, Sedláčková Jana,
Vitula František

Abstract

There are no studies focused on the reproductive effects of chronic exposure of birds to cyanotoxins. The present study was aimed at evaluation of the response of Japanese quails to cyanobacterial biomass administered in feed for 6 weeks using parameters of reproduction of a total of 16 control and 16 experimental pairs. There was no mortality both in control and exposed adults during the present study. Nor did the birds show any clinical signs of intoxication. A total of 824 and 821 eggs were laid by control and exposed birds, respectively, during the eight-week study period. Eggs laid by exposed hens had lower weight than in controls. Egg viability, hatchability, and the effect of hatching in control and experimental birds were 79.6 ± 9.3 and $86.8 \pm 8.2\%$ ($p < 0.05$), 83.2 ± 12.6 and $90.1 \pm 9.3\%$, and 65.2 ± 17.7 and $77.7 \pm 15.2\%$ ($p < 0.05$), respectively. There was also a statistically significant difference in the number of 14-day old survivors per hen per day in control and experimental birds (0.38 ± 0.02 and 0.43 ± 0.01 %, respectively). The lower weight of eggs produced by exposed parental hens was not reflected in their biological quality. On the contrary, reproductive parameters in exposed birds were better than in the control group.

Klíčová slova: křepelka japonská, cyanobakteriální biomasa, chronická expozice, oplozenost, líhivost, efekt líhivosti

Úvod

V důsledku eutrofizace povrchových vod se stávají sinice závažným celosvětovým problémem (Marvan and Marsalek, 2004), protože produkují toxické sekundární metabolity – cyanotoxiny (Carmichael, 1992). Tyto látky mohou ovlivňovat široké spektrum živočichů (bezobratlí i obratlovci) ať už při kontaktu povrchu těla s vodou kontaminovanou sinicemi a jejich toxiny nebo po požití této vody. Působení cyanotoxinů je připisována řada otrav zvířat (Duy et al., 2000). Cyanotoxiny mohou hrát významnou roli i v mortalitě volně žijících ptáků (Chittick et al., 2002).

Vliv cyanotoxinů na volně žijící ptáky, dříve zdokumentovaný pouze na základě nepřímých důkazů, byl ověřen na základě cílených experimentálních studií, v nichž byly využity aviární testy toxicity s následným hodnocením účinků různých dávek cyanotoxinů na modelový organismus (Paskova et al., 2008, Skocovska et al., 2007). Testy však ukázaly, že každodenní aplikace enviromentálně relevantních dávek cyanobakteriální biomasy s obsahem mikrocystinu po dobu 10 a 30 dní, neměla za následek žádnou mortalitu. V přirozených podmínkách mohou být ptáci vystaveni účinkům cyanotoxinů po mnohem delší dobu než 10 a 30 dní, jak tomu bylo ve výše uvedených akutních a subakutních experimentech. Nicméně doposud nebyly provedeny žádné studie zaměřující se na posouzení a vyhodnocení účinků cyanotoxinů na reprodukci.

Cílem této práce bylo studium subletálních účinků cyanobakteriální biomasy na modelovém organismu křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*) s ohledem na zdravotní dopady, a biochemické a reprodukční odpovědi tohoto ptačího druhu.

Materiál a metodika

Ověření účinku cyanobakteriální biomasy bylo prováděno na dospělých jedincích křepelky japonské (*Coturnix coturnix japonica*). Do pokusu byli zařazeni mladí dospělí jedinci v začátku snášky. Jedinci byli náhodně rozděleni do párů a následně umístěni do chovných klecí. Celkem bylo využito 64 experimentálních ptáků (32 samců, 32 samic) tj. 16 párů experimentálních a 16 párů kontrolních. Po 14 denní aklimatizaci byl zahájen samotný pokus v délce trvání 6 týdnů prováděný dle metodiky OECD 206. Experimentální zvířata měla permanentně k dispozici kompletní krmnou směs s přísadkou lyofilizované cyanobakteriální biomasy v koncentraci odpovídající dávkám použitým v předchozích experimentech (stanoveno na základě průměrné denní spotřeby krmiva na ptáka). Kontrolním zvířatům bylo podáváno stejné krmivo bez přísadky cyanobakteriální biomasy. U všech párů byl denně prováděn sběr vajec, jejich označení a zvážení. Vejce byla skladována v adekvátních podmínkách, 2x denně naklápěna a 1x týdně nasazena do líhně, kde se nechala líhnout za přesně definovaných podmínek. U všech vajec následně byla posuzována oplozenost, líhivost a tloušťka skořápky. Po uplynutí 6 týdenní expozice byl u všech exponovaných i kontrolních jedinců proveden odběr krve pro biochemické vyšetření. U vylíhlých kuřat byla sledována hmotnost po vylíhnutí a následně hmotnost po 14 denním odchovu, úhyny a případné malformace. Experiment byl prováděn v souladu s vyhláškou č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a podle zákona č. 312/2008 Sb., na ochranu zvířat proti týrání.

Výsledky a diskuse

Prioritním cílem experimentu bylo zhodnocení účinků chronické expozice cyanobakteriální biomasou o přesně definovaném obsahu cyanotoxinů na reprodukční parametry křepelky japonské. Jedná se o svého druhu první studii. V průběhu testu nebyla zaznamenána žádná mortalita. Ptáci nevykazovali žádné klinické příznaky intoxikace. Nebyly zjištěny žádné rozdíly v tělesné hmotnosti mezi kontrolními a exponovanými rodičovskými ptáky. Biochemické vyšetření plazmy odhalilo trojnásobně vyšší množství laktátdehydrogenázy u exponovaných rodičovských párů v porovnání s kontrolní skupinou. Tato skutečnost je v souladu s předchozími výsledky testu akutní a subakutní expozice (Skocovska et al., 2007). Při porovnávání hmotnosti orgánů exponovaných a kontrolních zvířat bylo zjištěno, že po dvouměsíční expozici cyanobakteriální biomasou došlo u samců ke změně hmotnosti sleziny, která byla 1,17krát těžší. Nicméně při porovnání hmotnosti sleziny u exponovaných i kontrolních samic nebyly zjištěny žádné rozdíly. Takahasi and Kaya (1993) uvádí, že po intraperitoneální aplikaci mikrocystinů došlo u křepelky japonské k úhynům a zvětšení sleziny. Může se jednat o reakci na antigen, jež se projevila kumulací lymfocytů ve slezině. Nicméně vzhledem ke způsobu podání v našem experimentu se o přímé dráždění cizorodou látkou nejedná a mechanismus zvětšení sleziny tedy může být jiný. Příčiny rozdílu hmotnosti sleziny mezi samci a samicemi zatím nejsou známy. V průběhu osmitýdenního testu snesly kontrolní a exponované samice celkem 824 a 821 vajec, přičemž v obou skupinách byla průměrná denní snáška na slepici 0,91. Vejce exponovaných ptáků měla statisticky průkazně nižší hmotnost v porovnání s kontrolními. Stejně výsledky byly zjištěny při porovnávání hmotnosti kuřat po vylíhnutí a následně u kuřat 14 dní po vylíhnutí. Nicméně nižší hmotnost vajec exponovaných samic neznamenal jejich nižší biologickou kvalitu. Nebyly zjištěny rozdíly v tloušťce skořápky. Naopak při hodnocení reprodukčních ukazatelů vykazovali exponovaní ptáci lepší výsledky než kontrolní. U vajec experimentálních ptáků byla

prokázána nižší ranná a pozdní embryonální úmrtnost než tomu bylo u vajec kontrolních ptáků, nicméně rozdíly nebyly statisticky významné. Žádné rozdíly nebyly zjištěny v rámci životaschopnosti 14 denních kuřat a kuřata nevykazovala žádné klinické příznaky intoxikace nebo jiné abnormality. Oplozenost vajec snesených kontrolními a experimentálními ptáky byla $79,6 \pm 9,3$ a $86,8 \pm 8,2$ %. Líhivost dosáhla hodnoty u kontrolních párů $83,2 \pm 12,6\%$ a u experimentálních párů $90,1 \pm 9,3\%$, zatímco efekt líhnutí byl u kontrolních párů $65,2 \pm 17,7\%$ a u experimentálních párů $77,7 \pm 15,2\%$. Statisticky významné rozdíly ($p < 0,05$) byly zjištěny při porovnání oplozenosti a celkového efektu líhnutí. Statisticky významný byl také rozdíl ($p < 0,05$) v počtech přeživších 14 denních kuřat na slepici a den u kontrolních a experimentálních ptáků ($0,38 \pm 0,02$ a $0,43 \pm 0,01$ %). Výsledky získané v rámci studie jsou velmi překvapivé. Na základě získaných výsledků můžeme konstatovat, že přestože jsme očekávali spíše negativní dopad, jedinci exponovaní cyanobakteriální biomasou vykazovali lepší reprodukční výsledky než jedinci kontrolní. I když o toxicitě cyanobakterií není pochyb, nelze vyloučit ani fakt, že cyanobakteriální biomasa může obsahovat i některé biologicky aktivní látky, které mohou potencionálně stimulovat reprodukci, jako je tomu v případě fytoestrogenů rostlin.

Literatura

- CARMICHAEL, W.W. Cyanobacterial secondary metabolites-the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 1992, vol. 72, no. 6, 445-459.
- DUY, T.N., LAM, P.K.S., SHAW, G.R., CONNELL, D.W., 2000. Toxicology and risk assessment of freshwater cyanobacterial (blue-green-algal) toxins in water. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 163, 113-186.
- CHITTICK, E., PUSCHNER, B., WALSH, M., GEARHART, S., ST LEGER, J., SKOCELAS, E., BRANCH, S., 2002. Blue-green algae microcystin toxicosis in captive Chilean flamingos. *Proceeding of the American Association of Zoo Veterinarians*, Milwaukee, 115-116.
- MARVAN, P., MARSALEK, B., 2004. Nutrients and their realisation in water ecosystem. In: Marsalek, B., Halouskova, O. (Eds.). *Cyanobacteria*, January 21, 2004, Brno, Czech Republic, pp. 79-84.
- PASKOVA, V., ADAMOVSKY, O., PIKULA, J., SKOCOVSKA, B., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J., BABICA, P., MARSALEK, B., HILSCHEROVA, K.: Detoxification and oxidative stress responses along with microcystins accumulation in Japanese quail exposed to cyanobacterial biomass. *Science of the Total Environment*, 2008, 398: 34-47.
- SKOCOVSKA, B., HILSCHEROVA, K., BABICA, P., ADAMOVSKY, O., BANDOUCHOVA, H., HORAKOVA, J., KNOTKOVA, Z., MARSALEK, B., PASKOVA, V., PIKULA, J.: Effects of cyanobacterial biomass on the Japanese quail. *Toxicon*, 2007. 49, 793-803.
- TAKAHASHI, S., KAYA, K., 1993. Quail spleen is enlarged by microcystin RR as a blue-green algal hepatotoxin. *Natural Toxins* 1 (5), 283-285.

Kontaktní adresa

Mgr. Veronika Damková, Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3 612 42 Brno, e-mail: damkovav@vfu.cz

Antibiotická rezistence *Enterococcus* spp. u ferálních holubů Antibiotic-resistant *Enterococcus* spp. in feral pigeons

¹Radiměřský Tomáš, ¹Frolková Petra, ¹Dolejská Monika, ²Švec Pavel,
¹Číková Petra, ³Čížek Alois, ¹Literák Ivan

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika

²Česká sbírka mikroorganismů, Oddělení experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Tvrdého 2, 602 00 Brno, Česká republika

³Ústav mikrobiologie a imunologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika

Abstract

Feral pigeon are considered as risk species for spreading in the environment antimicrobial resistant - enterococci. Cloacal swabs of feral pigeons collected in the city of Brno in 2006 were cultivated for enterococci. A total of 143 enterococci were isolated and identified. Resistances were determined by *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO*, *aac(6')aph(2'')*, *ant(4')-Ia*, *aph(3')-IIIa*, *erm A*, *ermB*, *pbp5*, *vanA*, *van B*, *vanC1* and *van C2/C3* genes.

Klíčová slova: *Enterococcus*, antibiotická rezistence, ferální holub

Úvod

Antimikrobiální látky se používají k léčbě a prevenci zvířecích a humánních nemocí. S používáním antimikrobiálních látek se vyvinula u mikroorganismů také rezistence k těmto látkám (Singer *a kol.* 2003). Rezistence na antibiotika u lidí a zvířat byla zjištěna u některých rodů a druhů bakterií. Mezi nejznámější zástupce gram pozitivních bakterií patří zástupci rodu *Enterococcus* (Willems *a kol.* 2005). Výskyt antibiotické rezistence úzce souvisí s využitím antibiotické terapie (Singer *a kol.* 2003). Problém antimikrobiální rezistence se dotýká nejen hospodářských zvířat, ale také volně žijících živočichů, kteří nejsou přímo zasaženi antibiotickou terapií (Literák *et al.* 2007; Dolejska *et al.* 2008). Potenciální rezervoár rezistentních bakterií mezi volně žijícími ptáky v blízkosti člověka je holub domácí (*Columba livia* forma domestica) (Hudec *a Stastny* 2005). V posledních letech byl zjištěn fakt, že enterokoky jsou schopny rychle získávat rezistenci k antibiotikům (Aerestrup *a kol.* 2000). Tato schopnost dělá z enterokoků jakožto zástupce gram-pozitivních bakterií přímý indikátor výskytu antibiotické rezistence u bakterií kolonizujících zvířata a člověka.

Materiál a metody

Vzorky z holubů byly odebírány v brněnských lokalitách Tuřany a Chrlice, v období od ledna do března 2006. Byly prováděny kloakální výtěry pomocí sterilních tamponů u 247 holubů. Vzorky byly pomnoženy v peptonové vodě (Oxoid, UK) při 37 °C přes noc a následně kultivovány na Columbia agaru s antibiotickými suplementy – 10 mg l⁻¹ colistinu a 10 mg l⁻¹ kyseliny nalidixové a zároveň na Slanetz-Bartley agaru (Oxoid). Rodová identifikace byla provedena pomocí PCR a rodově specifických primerů, druhová specifikace byla provedena pomocí rep-PCR. Antibiotická citlivost u bakterií rodu *Enterococcus* byla stanovena diskovou difuzní metodou (CLSI 2008). Celkem bylo testováno 6 druhů antibiotik: ampicilin (10µg), tetracyklin (30µg), gentamicin (10µg), vancomycin (30µg), erytromycin (15µg) a streptomycin (10µg). Byly testovány geny rezistence k ampicilinu *pbp5*, k tetracyklinům *tetM*, *tetO*, *tetK* a *tetL*, ke

gentamicinu *ant(4')-Ia*, *aac(6')aph(2'')* a *aph(3')-IIIa*, k vankomycinu *vanA*, *vanB*, *vanC1* a *van C2/C3*, k erytromycinům *erm A*, *ermB* a *mefA/E*.

Výsledky

S využitím rep-PCR bylo jednoznačně identifikováno 143 izolátů enterokoků: *E. faecalis* (36 izolátů, 25%, n=143), *E. faecium* (27, 19%), *E. durans* (19, 13%), *E. hirae* (17, 12%), *E. mundtii* (17, 12%), *E. gallinarum* (12, 8%), *E. casseliflavus* (12, 8%), *E. columbae* (3, 2%). Rezistence k jednomu či více antibiotikům byla prokázána u 45 (31%, n=143) izolátů. Druhové zastoupení rezistentních izolátů bylo následující: *E. faecalis* (19 izolátů), *E. faecium* (7), *E. durans* (8), *E. hirae* (7), *E. gallinarum* (2) a *E. casseliflavus* (2). Nejčastější rezistence k antibiotikům byla k tetracyklinům (28 izolátů, = 20%), následována rezistencí ke gentamicinu a erytromycinu (13, = 9%) a (12, = 9%). Také byla zjištěna rezistence k ampicilinu a vankomycinu (v obou případech 4, = 3%). Rezistence k tetracyklinu byla nejčastěji způsobena genem *tet M*, kombinace dvou genů byla zjištěna v jednom případě. Všechny izoláty rezistentní k erytromycinu byly pozitivní na gen *ermB*. Rezistence ke gentamicinu byla způsobena geny *ant(4')-Ia* a/nebo *aac(6')aph(2'')*, tři izoláty byly negativní pro všechny testované geny. Rezistence k vankomycinu byla způsobena geny *vanA* nebo *vanC1*. Rezistence k ampicilinu byla způsobena genem *pbp5* pouze v jednom případě ze čtyř.

Diskuse

Mezi enterokoky z ferálních holubů v Brně převažovaly druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, naproti tomu *E. columbae* se vyskytoval v minoritním podílu. Enterokoky ferálních holubů byly studovány také v Belgii a bylo zjištěno, že *Enterococcus columbae* je dominantní ve střevě holubů, zatímco *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum* a *E. casseliflavus* jsou minoritní (Baele a kol. 2002). Rozdíly mezi naší a belgickou studií mohou být vysvětleny skutečností, že naše vzorky byly před selektivní kultivací na pevných půdách pomnožovány v peptonové vodě, což mohlo způsobit selektivní pomnožení druhů *E. faecalis* a *E. faecium*, které rychleji rostou na rozdíl od karboxyfilních *E. columbae*, které rostou na selektivních půdách pro enterokoky špatně (Svec a Devriese 2009). V naší studii byla prevalence enterokoků k antimikrobiálním látkám vysoká, nejvyšší prevalence byla k tetracyklinům. Rezistence k tetracyklinům u enterokoků také převládá u lidí a zvířat v České republice (Kolar a kol. 2002) a v ostatních evropských zemích (Aarestrup a kol. 2000). Tato rezistence je nejčastěji spojena s genem *tetM*, (Aarestrup a kol. 2000), který byl také objeven u našich izolátů (78% izolátů rezistentních k tetracyklinům pozitivních na gen *tetM*). Získaná rezistence ke glykopeptidům je způsobena různými mechanismy. V Evropě převládají geny *vanA* a *van B* u vankomycin rezistentních enterokoků. Rezervoár těchto genů i lidí je nejčastěji *E. faecalis* (Willems a kol. 2005). My jsme získali 3 izoláty (2%) *E. faecalis* mající gen rezistence *vanA*. V České republice jsou u lidí a zvířat nejčastější geny rezistence *vanA* u *E. faecium* a *vanB* u *E. faecalis* (Kolar a kol. 2002)

Závěr

Zdroje rezistentních enterokoků pro ferální holuby je nutné hledat v prostředí, kde se tyto holubi vyskytují – urbánní, suburbánní, zemědělské prostředí. Kolonizace jejich střevního traktu rezistentními enterokoky může mít původ v kontaminovaných odpadcích, kterými se holubi přizívují nebo jimiž jsou cíleně přikrmováni, a ve fekálně znečištěné vodě (zdroje fekálního znečištění povrchových vod mohou být humánní i

animální), kterou pijí. Uvažovat je nutné i s možností selektivního účinku antibiotických reziduí, s nimiž se holubi hypoteticky mohou setkat v prostředí. V zemědělských objektech chovu zvířat se synantropní ferální holubi mohou jistě dostat i k medikovaným krmným směsím používaným v prevenci či terapii infekčních onemocnění hospodářských zvířat. Pak by selektivní účinek přijatých antibiotik byl jistě významný. Naše studie ukázala, že *Enterococcus* spp. je rezistentní k různým antimikrobiálním látkám jako jsou tetracyklin, gentamycin a vankomycin. Toto zjištění je alarmující, zvláště když geny rezistence se snadno přenáší do dalších bakterií. Ferální holubi proto mohou být považováni za druhy rizikové z hlediska šíření rezistentních bakterií v prostředí.

Poděkování

Tato studie byla podpořena granty MSM6215712402 a MSM0021622416 Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky.

Literatura

Aarestrup, F.M., Agerso, Y., Gerner-Smidt, P., Madsen, M. and Jensen, L.B. (2000) Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn Microbiol Infect Dis* **37**, 127-137.

Baele, M., Devriese, L.A., Butaye, P. and Haesebrouck, F. (2002) Composition of enterococcal and streptococcal flora from pigeon intestines. *J Appl Microbiol* **92**, 348-351.

Dolejska, M., Senk, D., Cizek, A., Rybarikova, J., Sychra, O. a Literak, I. (2008) Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Res Vet Sci* **85**, 491-494.

Hudec K. and Stastny K. (2005) *Fauna ČR. Ptaci-Aves 2/II*. Prague: Academia Press.

Kolar, M., Pantucek, R., Bardon, J., Vagnerova, I., Typovska, H., Valka, I. a Doskar, J. (2002) Occurrence of antibiotic-resistant bacterial strains isolated in poultry. *Vet Med (Praha)* **47**, 52-59.

Literak, I., Vanko, R., Dolejska, M., Cizek, A. and Karpiskova, R. (2007) Antibiotic resistant *Escherichia coli* and *Salmonella* in Russian rooks (*Corvus frugilegus*) wintering in the Czech Republic. *Lett Appl Microbiol* **45**, 616-621.

Singer, R.S., Finch, R., Wegener, C., Bywater, R., Walters, J. a Lipsitch, M. (2003) Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. *Lancet Infect Dis* **3**, 47-51.

Svec, P. a Devriese, L.A. (2009) Genus I. *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud 1903) Schleifer and Kilpper-Bälz 1984, 32^{VP}. V *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, The Firmicutes* eds. De Vos, P., Garrity, G.M., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.H. and Whitman, W.B. pp. 594-607. New York: Springer.

Willems, R.J., Top, J., van Santen, M., Robinson, D.A., Coque, T.M., Baquero, F., Grundmann, H. a Bonten, M.J. (2005) Global spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* from distinct nosocomial genetic complex. *Emerg Infect Dis* **11**, 821-828.

Kontaktní adresa

Mgr. Petra Frolková, p.frolkova@seznam.cz, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta hygieny a veterinární ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42- Brno

Stanovení koncentrace syntetických vonných látek v odpadních vodách z ČOV Brno – Modřice pomocí SPME

Determination of synthetic fragrances using SPME method in the wastewater treatment plant Brno – Modřice

Kubíčková Kristýna, Vávrová Milada, Zouhar Libor

Abstract

Musk compounds are synthetic fragrances commonly used as fragrant constituents of detergents, soaps, cosmetics, personal care products, industrial plasticizers, air fresheners etc. This study was focused on the nine synthetic fragrances – musk xylene, musk ketone, musk ambrette, musk tibeten, musk moskene, galaxolide, tonalide, phantolide and traseolide. Till now, only limited knowledge concerning the distribution of musk compounds in the environment, food chains and in the organisms is available. The aim of this study was the method optimisation for the determination of selected fragrances using SPME method in the aquatic environment, especially in wastewater. The identification and quantification of musk compounds was carried out by high-resolution gas chromatography - mass spectrometry (HRGC/MS).

Klíčová slova: syntetické vonné látky, odpadní voda, ČOV, SPME, GC/MS,

Literární přehled

Pojem „nový“ environmentální polutant označuje antropogenní kontaminanty, které jsou uvolňovány do životního prostředí již po celá desetiletí. Jedná se především o perzistentní organické polutanty (POPs), kam se v posledních letech řadí také polybromované retardátory hoření, léčiva, detergenty a rovněž přípravky pro osobní hygienu (Kotyza aj., 2009). Syntetické vonné látky (musk sloučeniny) obsažené v produktech osobní hygieny, v detergentech a dalších přípravcích jsou nepolární, lipofilní kontaminanty, se schopností kumulace v jednotlivých složkách životního prostředí. Musk sloučeniny se obvykle dělí do čtyř základních skupin; na lineární, makrocyclické, polycyclické a nitromusk sloučeniny (Červený, 1999).

Analýza detergentů a kosmetických přípravků prováděná v 90. letech minulého století odhalila, že galaxolid a tonalid jsou vzhledem k dobrým chemickým vlastnostem nejčastěji používanými polycyclickými musk sloučeninami. Jejich koncentrace v kosmetických přípravcích se podle získaných výsledků pohybovaly v rozmezí od 0,5 do 520 mg/kg (Rimkus, 2004; Mogensen et al., 2004). Některé látky ze skupiny nitromusk sloučenin vykazují neurotoxigenní, mutagenní a karcinogenní vlastnosti. Musk xylen je mimo jiné absorbován trávicím traktem, je deponován v tukové tkáni a vylučován mateřským mlékem. Musk ambrette se vyznačuje fotosenzitivními vlastnostmi (Nematu et al., 2000).

Tato studie byla zaměřena na sledování devíti vybraných musk sloučenin v odpadních vodách odebraných na ČOV Brno - Modřice. Pro analýzu bylo vybráno 5 zástupců polycyclických musk sloučenin (galaxolid HHCB, tonalid AHTN, traseolid, phantolid,) a 4 zástupci nitromusk sloučenin (musk xylen MX, musk keton MK, musk tibeten, musk mosken, musk ambrette). Izolace sledovaných analytů ze vzorku odpadní vody byla provedena pomocí SPME (solid phase microextraction); sledované analyty byly následně desorbovány a stanoveny pomocí GC-MS.

Materiál a metodika

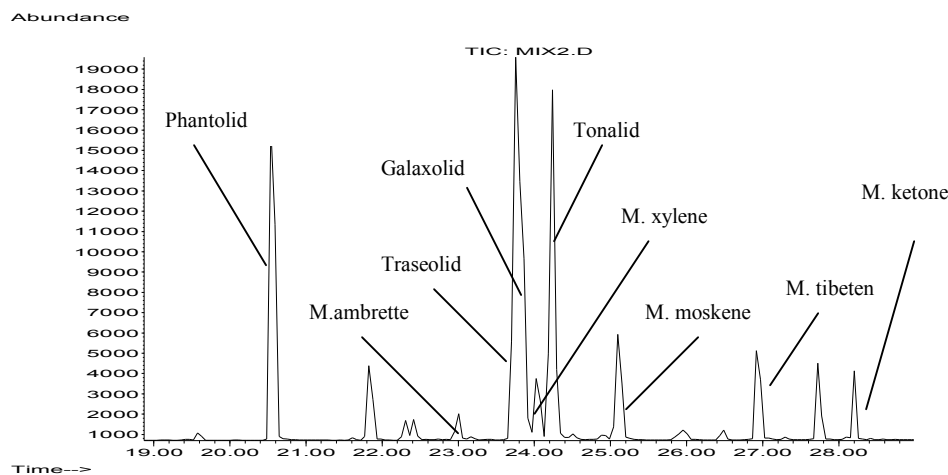
V průběhu jednoho měsíce byly analyzovány vzorky odpadní vody z městské ČOV v Brně-Modřicích. Byly odebrány 24 hodinové vzorky surové, mechanicky přečištěné odpadní vody na přítoku do ČOV a vzorky přečištěné vody vypouštěné do recipientu. Odpadní vody byly po převezení do laboratoře ihned zpracovány. Vzorek přefiltrované surové a odtokové vody byl napipetován do vialky. Tento krok byl opakován dvakrát. Do jedné vialky byl přidán standardní přírůstek musk sloučenin. Následně byla provedena izolace analytu ze vzorků vody s využitím přímé SPME (viz. Tabulka 1). Po uplynutí doby sorpce byly analyty z vlákna desorbovány. K jejich identifikaci a kvantifikaci byla použita GC-MS (viz. Tabulka 2). Každá dvojice vzorků surové i odtokové odpadní vody byla analyzována třikrát. Plochy píků jednotlivých musk sloučenin (viz. Graf 1.) byly vyhodnoceny metodou standardního přírůstku. Pro jednotlivé musk sloučeniny byly vytvořeny kalibrační křivky a byly vypočteny mez detekce a mez stanovitelnosti.

Tabulka 1: Podmínky SPME

Vlákno	PDMS/DVB, 65 μm
Provedení	Direkt SPME
Objem roztoku	16 ml
Teplota	80 $^{\circ}\text{C}$
Ustálení rovnováhy	5 min
Expoziční čas	30 min
Rychlost míchání	900 ot./min.

Tabulka 2: Podmínky GC-MS analýzy

Teplota a režim injektoru	250 $^{\circ}\text{C}$, splitless
Tlak plynu v injektoru (he)	116 kPa
Průtok nos. plynu injektorem	28,5 ml/min
Průtok nos. plynu kolonou	0,8 ml/min
Rychlost plynu v koloně	40 cm/sec
Doba analýzy	36 min
Teplota transferline	280 $^{\circ}\text{C}$
Teplota iont. zdroje	230 $^{\circ}\text{C}$
Teplota kvadrupolu	150 $^{\circ}\text{C}$
Režim analyzátoru	SIM



Graf 1. Chromatogram sledovaných musk sloučenin

Výsledky a diskuze

Z tabulky 3 vyplývá, že vlivem mechanicko-biologického čištění odpadních vod dochází ke snížení obsahu musk sloučenin v přečištěné odpadní vodě vypouštěné do recipientu. Avšak i po přečištění obsahuje voda nezanedbatelné koncentrace syntetických vonných látek, které přechází do vodního ekosystému. Průměrný průtok odpadní vody na ČOV Brno-Modřice byl v měsíci únoru 113 557 m^3/den . Z hodnoty průtoku bylo vypočteno přibližné množství musk sloučenin vypouštěných do recipientu.

Ze získaných výsledků jednoznačně vyplývá, že nejvíce se v odpadní vodě vyskytují polycyklické musk sloučeniny galaxolid a tonalid, což je logické vzhledem k jejich širokému spektru použití. Z nitromusk sloučenin nebyly v odpadních vodách detekovány musk tibeten a musk mosken. Musk ambrette byl detekován ve velmi nízkých koncentracích, ve většině případů ležely hodnoty pod mezí stanovitelnosti případně pod mezí detekce dané metody.

Tabulka 3: Průměrné koncentrace musk v únoru 2010 (ng/l) a účinnost čištění ČOV Brno.

Název	Přítok	Odtok	Účinnost
PH	3,170	1,984	37,43 %
TRAS	33,48	13,88	58,55 %
HHCB	2765	1231	55,48 %
AHTN	422,8	136,1	67,80 %
MX	40,39	5,220	87,07 %
MK	89,85	54,72	39,10 %
AMB	3,784	nd (0,600)	84,67 %

Tabulka 4: Průměrné množství musk vypuštěných z ČOV Brno do recipientu.

Název	g/den	g/únor
PH	0,2253	6,533
TRAS	1,576	45,70
HHCB	139,8	4 054
AHTN	15,46	448,3
MX	0,5928	17,19
MK	6,214	180,2
AMBRET	0,0659	1,910

Závěr

Pro stanovení musk sloučenin v odpadních vodách byla využita sorpčně desorpční metoda SPME. SPME je jednoduchá metoda šetřící životní prostředí, protože k izolaci analytu nejsou používána vesměs žádná organická rozpouštědla.

Ze získaných výsledků vyplývá, že jedním z důležitých vstupů syntetických vonných látek do vodního ekosystému je vypouštění přečištěných odpadních vod do vodních toků. Nejvíce jsou zatíženy oblasti situované v blízkosti ČOV, kde se kumulují poměrně vysoké koncentrace musk sloučenin. V odpadních vodách odebraných na ČOV Brno-Modřice byly zjištěny nejvyšší koncentrace pro musk sloučeniny s polycyklickou strukturou, jmenovitě pro galaxolid a tonalid; vzhledem k jejich širokému spektru použití to bylo možné předpokládat. I přes skutečnost, že používání nitromusk sloučenin do přípravků osobní hygieny je značně omezováno, byly v přečištěných odpadních vodách detekovány jednotky až desítky ng/l.

Poděkování

Studie byla zpracována za finančního přispění IGA VFU (č. projektu 193/2009/FVHE) a projektu MŠMT ČR, výzkumný záměr č. MSM 6215712402.

Literatura

- Kotyza, J. a kol.: Léčiva – „Nový“ environmentální polutant. *Chemické Listy*, 2009, roč. 103, s. 540-547.
- Červený, L.: Syntetické vonné a chuťové látky. *Chemické listy*, 1999, roč. 93, č. 7, s. 412-420.
- Neamtu, M., Siminiceanu, I., Kettrup, A.: Kinetics of nitromusk compounds degradation in water by ultraviolet radiation and hydrogen peroxide. *Chemosphere*, 2000, vol. 40, pp. 1407-1410.
- Rimkus, G.G.: *The Handbook of Environmental Chemistry – Synthetic Musk Fragrances in the Environment*, Birkhäuser, 2004, p. 338.
- Mogensen, B. B., Pritzl, G., Rastogi, S., Glesne, O., Hedlund, B., Hirvi, J., Lundgren, A., Sigurdsson, A.: *Musk Compounds in the Nordic Environment*. Nordic Council of Ministers. Copenhagen, 2004

Kontaktní adresa

Kristýna Kubíčková, Mgr., VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno; e-mail: H06303@vfu.cz

Vliv organických polutantů na jedince *Eisenia fetida* Influence of organic pollutants on individual *Eisenia fetida*

Provalilová Iva, Stoupalová Michaela, Vávrová Milada, Beklová Miroslava

Abstract

The natural balance between production and degradation of PAHs was disrupted in 19 and 20 century, mainly due to industrial revolution and the growing use of fossil fuels. As a consequence, nowadays there is a presence of polycyclic hydrocarbons in all aspects of the environment.

In the body of living organisms while the supply of polyaromatic substances is increased then these substances are not capable of biotransformation and are stored in cells. During the process of their storing into the organisms, significant role plays lipophilicity of compounds and fat content in the target tissues of organisms.

Key words: *Polyaromatic hydrocarbons, bioaccumulation, contamination, transmis*

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou organické sloučeniny přítomné v přírodním prostředí. Kromě toho jsou výsledkem i antropogenní zátěže. Přítomny jsou ve všech složkách životního prostředí. V terestrickém ekosystému se kumulují zejména v půdě. Pro studium znečištění půdního prostředí se z půdních organismů jeví jako ideální kroužkovci (žížaly). Nepříznivé účinky chemikálií v půdním prostředí se mohou projevit přímo (např. snížením reprodukce, mortalitou, aj.) nebo nepřímo bioakumulací polutantů ve tkáních žížal, což může vést k akumulaci toxických látek prostřednictvím potravního řetězce.

Cílem studie bylo zjistit vztah mezi půdní kontaminací a půdními organismy zastoupenými žížalou hnojní (*Eisenia fetida*). Žížaly jsou nejen vhodným bioindikátorem pro studium antropogenních účinků na půdní systém, ale mají i klíčové postavení v přenosu polutantů v potravních řetězcích. Vzhledem k tomu, že ke kontaminaci půdního prostředí byly použity polycyklické aromatické uhlovodíky, které jsou nerozpustné ve vodě; cílem studie bylo také ověření vhodnosti organického rozpouštědla.

Materiál a metodika

Pro rozpuštění standardu (směs 45 PAHs) jsme ověřovali dvě rozpouštědla, a to methanol a hexan. Rozpouštědla v množství 50 ml byla aplikována do 150 g umělého substrátu. Po dostatečném odpaření rozpouštědel (48 hodin) bylo do každé nádoby přidáno 350 g zbylého substrátu + 170 ml destilované vody. Na povrch takto ošetřeného substrátu byly dány žížaly v počtu 10 jedinců. V průběhu testu, který trval 14 dní, nedošlo k mortalitě žížal vlivem žádného z použitých rozpouštědel; vzhledem k rychlejšímu odpařování hexanu jsme pro další testy zvolili hexan.

Vliv polycyklických aromatických uhlovodíků na žížalu *Eisenia fetida* byl posuzován na základě testu provedeného podle metodiky OECD č.207 („Earthworm Acute Toxicity Tests“, 4 April 1984). Dospělé žížaly ve stádiu alespoň dva měsíce s viditelným opaskem (clitellum) o hmotnosti větší než 200 mg byly vystaveny po dobu 14 dní účinku PAHs rozpuštěných v hexanu, který byl aplikován do definovaného substrátu v koncentracích 20, 40, 60 $\mu\text{g}/\text{kg}$ suché půdy. Současně byly na stejnou dobu vloženy

žížaly do substrátu bez přítomnosti testované látky – kontrola. Do každé koncentrační řady a kontroly bylo vloženo 10 omytých a zvážených dospělých žížal. Nádoby byly uzavřeny víčkem s větracím otvorem a umístěny v digestoři s umělým kontinuálním osvětlením. Po 14 dnech byl test ukončen. Žížaly byly omyty a zváženy.

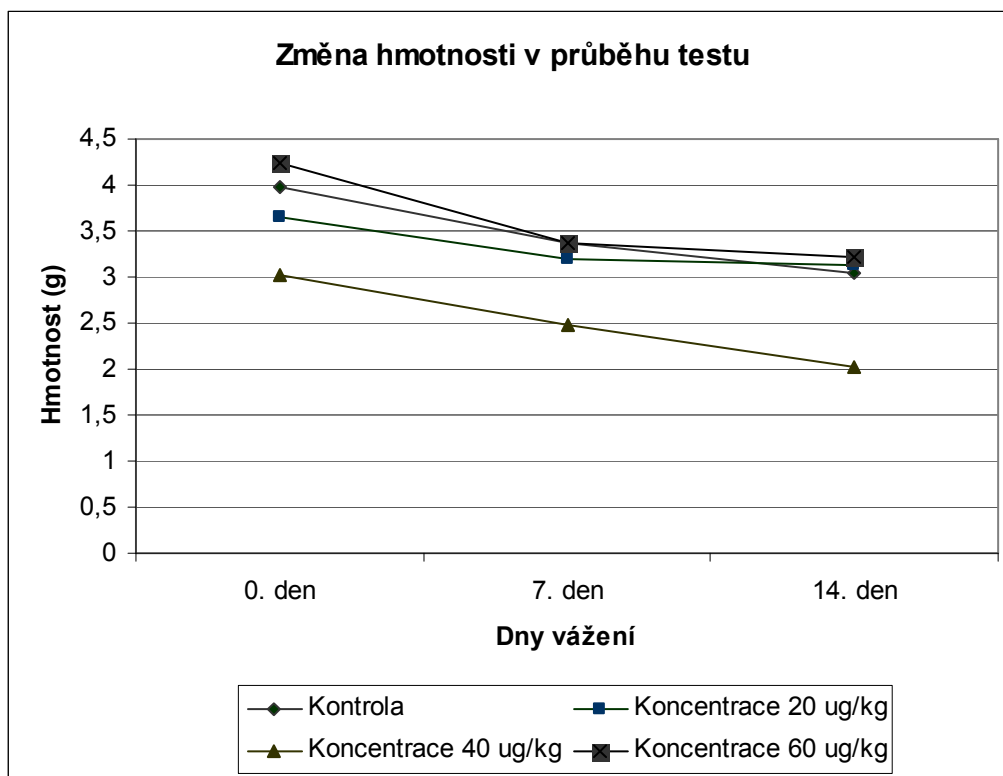
Biodostupnost polycyklických aromatických uhlovodíků byla sledována na základě stanovení obsahu PAHs v tkáni žížal a v použitém substrátu, do kterého byly příslušné koncentrace aplikovány.

Extrakce PAHs

Vzorky půdy a tkáně žížal byly dehydratovány, homogenizovány a posléze extrahovány pomocí dichlormethanu jako extrakčního činidla. U substrátu byla stanovena sušina vážkovou metodou. Vzhledem k možnému rozkladu sledovaných analytů byla zvolena extrakce za studena na třepačce, provedena 3 x, vždy po dobu 45 minut. Po každé extrakci byl kapalný podíl zfiltrován přes síran sodný, bezvodý, vyžíhaný a aktivovaný při teplotě 130°C. Takto získané extrakty byly odpařeny do sucha, odparek byl rozpuštěn ve 2 ml hexanu a následně přečištěn pomocí kolonové chromatografie na sloupci silikagelu. Přečištěný extrakt byl odpařen do sucha a získaný odparek byl rozpuštěn v 1 ml isooktanu.

Vlastní stanovení PAHs bylo provedeno pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí na přístroji Agilent Technologies 6890N s hmotnostním detektorem MSD Agilent 5973.

V průběhu testu nebyla u pokusných i kontrolních žížal zaznamenána mortalita. Pokles hmotnosti žížal, ke kterému došlo v průběhu testu u všech žížal je patrný z grafu.



Graf 1 Změna hmotnosti jedinců v průběhu testu

Vyhodnocení chemické analýzy

Protože se jednalo o pilotní studii, nebylo možné u vzorků provést paralelní stanovení. I přesto lze u takto získaných výsledků pozorovat nárůst hodnot sumy PAHs v souvislosti s probíhající kontaminací.

U vzorků žízála byly stanoveny tyto hodnoty pro sumy PAHs: 321,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 419,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 629,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

U vzorků půd byly zjištěny následující hodnoty sumy PAHs 41,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 220,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 384,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Diskuse, výsledky, závěr

Pro schopnost vysoké perzistence PAHs v životním prostředí a negativní dopad na jeho složky jsou tyto organické polutanty považovány za typické představitele perzistentních organických polutantů (POPs), s výraznou schopností vázat se na pevné sorbenty a kumulovat se v živých organismech (bioakumulace). V prostředí se vyskytuje také velké množství jejich derivátů, nejčastěji halogen-, sulfo-, amino-, a nitro- deriváty. Nutno si však uvědomit, že jednotlivé PAH mají odlišné vlastnosti, pouze některé z nich jsou mutagenní, karcinogenní či toxické.

Půda je těmito látkami znečišťována především v důsledku suché a mokré depozice pocházející z atmosféry. PAHs se poměrně silně váží na půdní organickou hmotu, zejména na půdu bohatší na humus. Odbourávání PAHs v půdách způsobují hlavně mikroorganismy, částečně jsou odstraňovány větrnou erozí z povrchu, vypařováním z půdy, případně může docházet i k rozkladu slunečním zářením.

Z výsledků chemických analýz jednoznačně vyplývá, že PAHs jako lipofilní kontaminanty mají větší afinitu ke tkáním než k půdě.

Poděkování

Děkuji za spolupráci, pomoc a přípravu příspěvku všem spoluautorům. Tato práce byla provedena s podporou projektu MŠMT ČR č. 6215712403

Literatura

JELÍNKOVÁ, G. *Zhodnocení metod stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků v životním prostředí*. Brno: VUT, 2003. 32 s. Bakalářská práce

KOCOUREK, V., HAJŠLOVÁ, J. *Nitrované polycyklické uhlovodíky (nitroPAH): environmentální karcinogeny*. Praha: Výzkumný ústav rostlinné výroby, 2004, 40 s.

METODIKA OECD č.207 („Earthworm Acute Toxicity Tests“, 4 April 1984).

HAJŠLOVÁ, J. A KOL. *Minimalizace cizorodých látek v potravinách a hodnocení jejich vlivu na zdraví člověka*. Praha: VŠCHT, 1992. 126 s. Projekt E 3.1.26 FVŽP ČR.

VÁVROVÁ, M. *Využití bioindikátorů při hodnocení starých zátěží terestrického ekosystému*. Brno: VUT v Brně, 2004. 104 s. Publikace zpracovaná v rámci HS pro Ministerstvo zemědělství ČR.

Kontaktní adresa

Mgr. Iva Provalilová, Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42, Brno, e-mail: proviva@seznam.cz

Elektrochemické stanovení akrylamidu Electrochemical determination of acrylamide

Talašová Helena, Šucman Emanuel

Abstract

A new electrochemical method for determination of acrylamide in food was described. A complex of acrylamide with Ni^{2+} ions is suitable for electrochemical determination in alkaline media. Measurements were carried out using polarographic equipment in three-electrode configuration with hanging mercury drop electrode as the working electrode. The pH of alkaline buffer was checked and the pH=10,0 was found to be the optimum. The influence of concentration of Ni^{2+} was investigated. The optimal concentration of Ni^{2+} was 500 $\mu\text{mol/l}$. The peak maximum appeared at the potential of $-0,23$ V. Peak heights were a function of acrylamide concentrations and of deposition time.

The other optimised voltammetric parameters were found as follows: Deposition potential $-0,6$ V, Final potential $-0,1$ V, Scan rate 10 mV/s, Deposition time 120 s (or more).

The voltammetric method seems to be suitable for determination of acrylamide.

Klíčová slova: akrylamid, voltametrie, potraviny

Úvod

V roce 2002 byla prokázána přítomnost akrylamidu v potravinách a akrylamid byl zařazen mezi endogenní kontaminanty potravin. Hlavní cestou tvorby akrylamidu při tepelné úpravě potravin je Maillardova reakce, která zahrnuje složitý soubor reakcí tzv. neenzymového hnědnutí. Jde o reakce mezi aminoskupinou a karbonylovou skupinou při teplotě nad 100 °C.¹ Na vzniku akrylamidu se podílí asparagin a přednostně fruktóza (méně glukóza). Mezi nejrizikovější potraviny patří smažené produkty z brambor (hranolky, brambůrky aj.), chleba a další cereální potraviny. Akrylamid se nachází také v kávě a v nepatrném množství i v pečeném mase. V syrových nebo vařených potravinách nebyl akrylamid nalezen³.

Akrylamid je látka s neurotoxickými a mutagenními účinky s afinitou k pohlavnímu aparátu. Řadí se do skupiny potenciálních karcinogenů u člověka, a jeho karcinogenní účinek je prokázán u laboratorních zvířat.⁴

Ke stanovení akrylamidu v potravinách se běžně používají separační metody, z nichž nejpoužívanější jsou plynová chromatografie a kapalinová chromatografie.⁵

Akrylamid může ve vodném prostředí tvořit komplexy s ionty přechodných kovů. Principem elektrochemického stanovení akrylamidu je elektrodopozice komplexu akrylamid-kov na povrchu měrné elektrody při jejím vhodném potenciálu. Po elektrodopozici je na pracovní elektrodu vkládán měnící se potenciál, přičemž se měří proud protékající měrnou elektrodou.

Závislost proudu na potenciálu má tvar píku, jehož poloha určuje kvalitu a výška resp. plocha píku kvantitu analyzované látky.

Cíl

Cílem práce je vytvoření metodiky elektrochemického stanovení akrylamidu v potravinách a krmivech. Je třeba najít a optimalizovat základní parametry měření. Lze

předpokládat, že elektrochemické stanovení bude rychlejší a levnější než dosud používané metod plynové nebo kapalinové chromatografie.

Experimentální část

Všechna měření byla prováděna na přístroji Autolab (Eco Chemie, Holandsko), s elektrodovým systémem VA Stand 663 (Metrohm, Švýcarsko) v 3-elektrodovém zapojení s pracovní visící rtuťovou kapkovou elektrodou. Celé zařízení je řízeno softwarem Nova 1.5 (Eco Chemie, Holandsko). Na přípravu všech roztoků byla použita ultračistá voda, jejíž specifická vodivost je $<1 \mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$. Pro odstranění rozpuštěného kyslíku byl používán argon (Linde Technoplyn a.s., ČR). Rtuť byla v čistotě pro polarografii (Merck, SRN). Jako standard Ni^{2+} byl použit roztok Astatol o koncentraci $1,000 \pm 0,005 \text{ g/l}$ (Analytika, ČR). Všechny ostatní použité chemikálie byly čistoty Suprapur (Merck, SRN).

Bylo proměřeno elektrochemické chování řady přechodných kovů v prostředí amoniakálního pufru o různém pH v přítomnosti akrylamidu. Pro voltametrické stanovení se ukázal jako nejlepší nikl.

Dále bylo hledáno nejvhodnější pH amoniakálního pufru. Provedli jsme sérii měření, ve které jsme proměřili následující rozmezí hodnot pH: 8,5; 9,0; 9,5; 10,0 a 10,5 při době elektrodepozice $T_d=120 \text{ s}$ a $T_d=300 \text{ s}$ a při konstantní koncentraci $c_{\text{Ni}^{2+}}=500 \mu\text{mol/l}$. Při pH=10,0 vytváří akrylamid dobře vyvinutý pik s maximem při $-0,23 \text{ V}$. Výška maxima píku vzrůstala s koncentrací akrylamidu od $0,5 \mu\text{mol/l}$ do $10 \mu\text{mol/l}$. Při nižším pH byly naměřeny píky v oblasti $-0,25 \text{ V}$, ale s nižšími hodnotami proudů v maximu píku. Při pH=10,5 byl pik akrylamidu špatně vyvinutý.

V amoniakálním pufru o pH=10,0 jsme dále hledali optimální koncentraci Ni^{2+} v rozmezí $50 \mu\text{mol/l}$ až $500 \mu\text{mol/l}$. Doba elektrodepozice byla 120 s a 160 s a koncentrace akrylamidu $10 \mu\text{mol/l}$. Koncentraci Ni^{2+} $500 \mu\text{mol/l}$ jsme vyhodnotili jako nejlepší. Na voltamogramu byl jasně patrný pik v potenciálové oblasti $-0,25 \text{ V}$.

Dalšími zkoumanými parametry byly: potenciál elektrodepozice E_d , počáteční E_i a koncový E_f potenciál měření. Byly nalezeny tyto optimální hodnoty: $E_d=-0,6\text{V}$, $E_i=-0,6 \text{ V}$ a $E_f=-0,1 \text{ V}$. Rychlost změny potenciálu SR při přechodu od E_i po E_f byla $\text{SR}=10 \text{ mV/s}$. Na maximum výšky píku má vliv i doba elektrodepozice. Při jejím prodlužování výška píku stoupá. Výsledky jsou znázorněny na Obr. 1 (závislost výšky píku na koncentraci) a na Obr. 2 (závislost výšky píku na době depozice) při pH 10,0. Se zvyšující se koncentrací akrylamidu v měřeném roztoku a s prodlužující se dobou elektrodepozice výška píku roste. Tím byl vytvořen základní předpoklad pro vypracování komplexní metodiky stanovení.

Závěr

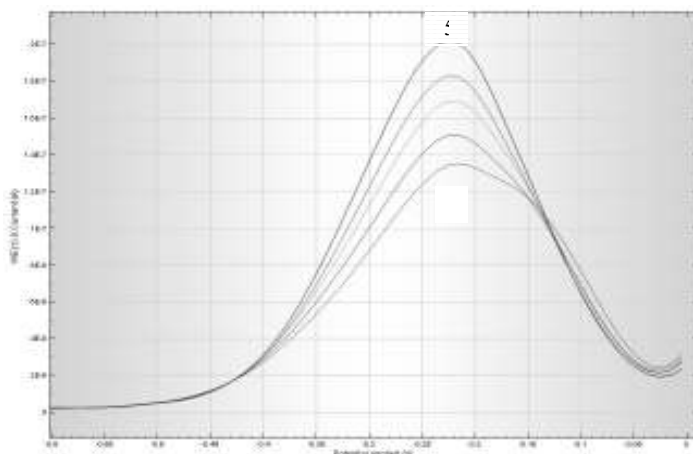
Voltametrická metoda se jeví jako vhodná ke stanovování koncentrace akrylamidu v potravinách a krmivech. Další výzkum zaměříme na nalezení vhodného způsobu přípravy vzorků. Ověříme správnost výsledků měřením referenčních materiálů, určíme mez detekce a mez stanovitelnosti elektrochemické metody. Bude třeba také hledat teoretické vysvětlení struktury komplexu akrylamidu s ionty Ni^{2+} a popsat jeho elektrochemické chování.

Literatura

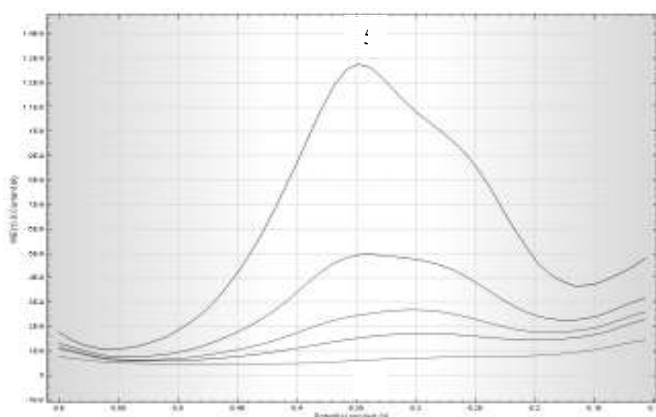
1. Stadler, R.; Scholz, G. Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanism of formation, and potential strategies of control. *Nutrition reviews*, December 2004, vol. 62, no. 12, p.449-467
2. Blank, I. Current status of acrylamide research in food: Measurement, safety assessment, and formation. *Ann.N.Y. Acad. Sci.*, 2005, vol. 1043, p. 30-40. Becalski, A.; Lau, B.; Lewis, D. et al. Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modeling. *Journal of agricultural and food chemistry*, January 2003, vol. 51, p. 802-808.
3. Parzefall, W. Minireview on the toxicity of dietary acrylamide. *Food and Chemical Toxicology*, April 2008, vol. 46, p. 360-1364. ISSN: 0278-6915.
4. Taeymans, D.; Wood, J.; Ashby, P. et al. A review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical reviews in food and nutrition*, 2004, vol. 44, p. 323-347

Kontaktní adresa

MVDr. Helena Talašová, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav biochemie, chemie a biofyziky, Palackého 1/3, 612 42 Brno, talasovah@vfu.cz



Obr. 1 Závislost výšky píku na koncentraci akrylamidu ($E_d=E_i=-0,6$ V; $E_r=-0,1$ V; $T_d=120$ s; $SR=10$ mV/s; koncentrace akrylamidu $\mu\text{mol/l}$ pro křivky: 1– 0,5; 2 – 1; 3 – 2; 4 – 5; 5 – 10)



Obr. 2 Závislost výšky píku na době elektrodepozice ($E_d=E_i=-0,6$ V; $E_r=-0,1$ V; $SR=10$ mV/s; koncentrace akrylamidu $c=1,0$ $\mu\text{mol/l}$; pro křivky: $T_d=1-60$ s; 2 – 120 s; 3 – 180 s; 4 – 300 s; 5 – 600 s)

Úspešnosť adopčného programu v útulku pre opustené zvieratá v Košiciach

Succession of adoption program in shelter for abandoned animals in Košice

¹Kovács Kamil, ²Takáčová Jana, ¹Špalek Milan, ¹Toropila Michal

¹Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie UVLF – Košice

²Ústav súdneho a verejného veterinárskeho lekárstva a ekonomiky UVLF – Košice

Abstract

The shelter for abandoned animals in Košice was established by civil association called: Union of the mutual help of people and dogs. One of the association's aims is reduction of the numbers of unwanted, abused and stray dogs in Košice. Since 2005 til 2009, totally 1600 dogs were admitted in the shelter and of them 1433 were presented to new owners.

Key words: shelter, unwanted, abused, stray dog, adoption program

Úvod

V rámci SR predstavuje súčasnú právnu úpravu v oblasti prevádzkovania útulkov zákon NR SR o veterinárnej starostlivosti č. 39/2007 Z.z. a z neho vyplývajúca vyhláška č. 123/2008 o podrobnostiach o ochrane spoločenských zvierat a o požiadavkách na karanténne stanice a útulky pre zvieratá.

Podľa § 10 tejto vyhlášky útulok pre zvieratá slúži na držbu odchytených túlavých zvierat po ukončení vyšetrení, testov a preventívnych opatrení vylučujúcich chorobu prenosnú na iné zviera alebo na človeka, vykonaných v karanténnej stanici zvierat a nechcených zvierat.

Útulok pre opustené zvieratá v Košiciach bol založený Úniou vzájomnej pomoci ľudí a psov, ktorá vznikla v roku 2001. Samotný útulok v Košiciach bol ale v rokoch 2001 až 2004 prevádzkovaný iba za provizórnych podmienok, takže o útulku v zmysle, v akom ho popisuje súčasná právna úprava platná v SR, môžeme hovoriť až od roku 2005.

Materiál a metodika

Na základe získaných evidenčných údajov, vedených v útulku pre opustené zvieratá v Košiciach, sme spravili vyhodnotenie úspešnosti adopčného programu v rámci rokov 2005 až 2009, pričom sme skúmali údaje spojené s touto problematikou, najmä z hľadiska percentuálnej úspešnosti umiestňovania psov z útulku k ich novým majiteľom.

Výsledky a diskusia

Je známe, že útulky v Slovenskej republike prevádzkujú mestá, súkromné podnikateľské subjekty či súkromní veterinári lekári a samozrejme Sloboda zvierat a iné neziskové organizácie (Bugarský a kol. 2009). Neziskovou organizáciou je aj Únia vzájomnej pomoci ľudí a psov (U.V.P), ktorá prevádzkuje útulok pre opustené zvieratá v Košiciach.

U.V.P vznikla už v roku 2001, ale až do konca roku 2004 fungovala snaha tohto združenia o pomoc opusteným psom len na fáze dobrovoľnosti a v provizórnych domácich podmienkach.

Až v roku 2005, po získaní vyhovujúceho pozemku v blízkosti obce Haniska pri Košiciach, sa začal budovať samotný útulok zo všetkými náležitostiami nevyhnutnými na jeho prevádzku, ako sú napríklad : zdroj pitnej vody, dostatok koterco, sklad krmív a s tým súvisiace neškodné odstraňovanie biologického odpadu, zabezpečené poskytovanie odborných veterinárnych činností a sú samozrejme vedené aj príslušné evidenčné záznamy o všetkých zvieratách umiestnených v tomto zariadení.

Kapacita útulku v súčasnosti postačuje celkovo pre 50 psov, ale v blízkej budúcnosti má v pláne U.V.P zväčšiť kapacitu útulku tak, aby postačovala celkovo pre 200 psov. V rokoch 2005 až 2009 bolo do útulku celkovo prijatých 1600 psov. Jednalo sa o psi túlavé, opustené, alebo psi, pri ktorých bolo podozrenie na ich týranie predchádzajúcim majiteľom.

Len pre porovnanie, v kalendárnom roku 2005 to bolo 252 psov a v roku 2009 už 382 psov. Z tohto počtu prijatých psov, bolo k novým majiteľom umiestnených 1433 psov, čo predstavuje takmer 90 % -tnú úspešnosť adopcie. V roku 2005 to bolo celkovo 228 psov a pre porovnanie v roku 2009 sa jednalo o 336 psov. Prehľad príslušných údajov v rámci spomínaného časového obdobia zobrazuje tabuľka č. 1

Tabuľka č. 1

	Počet prijatých psov (ks)	Počet psov umiestnených k novým majiteľom (ks)
rok 2005	252	228
rok 2006	276	252
rok 2007	312	278
rok 2008	378	339
rok 2009	382	336

K zníženiu počtu psov je potrebné predovšetkým znížiť celkový počet túlavých a nechcených zvierat v útulku a to znížením počtu novo-prijatých psov a naopak stálym zvyšovaním počtu psov, ktorí sú umiestňovaní k novým majiteľom. Pri adopcii, okrem výberu správneho psa k novému majiteľovi, je treba zohľadniť aj riziko výskytu zoonóz, pretože psov z útulkov si osvojujú aj ľudia z horších sociálnych podmienok, ktorí majú sklon nedodržiavať všeobecné hygienické normy (Hromada a kol., 2003). Zvýšeniu úspešnosti adopcie významne napomohlo VZN mesta Košice č. 71/2009, podľa ktorého sa ročná sadzba dane za psa znižuje o 50 % , v prípade že ide o psa prevzatého práve z útulku. Toto zníženie dane si možno v rámci mesta Košice tiež uplatniť, ak ide o psa sterilizovaného, pričom samozrejme táto sterilizácia následnou redukciou reprodukcie vlastne zabráni zvýšeniu počtu nechcených psov, respektíve šteniat v oblasti mesta a tým aj v útulku.

Dôkazom tejto skutočnosti je aj to, že za posledné obdobie došlo k nárastu žiadostí nových majiteľov psov z útulku o ich sterilizáciu. Aktuálne to predstavuje cca 70 % zo všetkých psov umiestnených v tomto zariadení.

Záver

Ako ukazujú nami získané evidenčné údaje, došlo v priebehu rokov 2005 až 2009 v útulku pre opustené zvieratá v Košiciach k nárastu v priemernom ročnom počte novoprijatých psov, čo poukazuje na problém výskytu túlavých či nechcených zvierat v oblasti mesta Košice.

V tomto kontexte je samozrejme treba oceniť snahu U.V.P o zníženie týchto čísel prostredníctvom umiestňovania psov k novým majiteľom v rámci adopčného programu a taktiež organizovaním rôznych akcií, či už na propagáciu kynológie ako takej, alebo zvyšovanie povedomia laickej verejnosti o význame útulku pre mesto Košice.

Prínosom do budúcnosti je tiež súčasná snaha o zvýšenie kapacity útulku, ktorá pomôže aspoň zmierniť problém koncentrácie psov v tomto zariadení.

Ale treba povedať, že všetky tieto aktivity nemôžu v konečnom dôsledku nahrádzať úlohu samotných majiteľov či chovateľov psov, ktorých povinnosťou je starostlivosť o ich vlastné zvieratá.

Literatúra

Zákon NR SR o veterinárnej starostlivosti č. 39/2007 Z.z. v znení zákona NR SR č. 99/2008 Z.z.

Vyhláška MP SR č. 123/2008 o podrobnostiach o ochrane spoločenských zvierat a o požiadavkách na karanténne stanice a útulky pre zvieratá.

Bugarský, A., Takáčová, D., Korim, P.: Prevádzkovanie útulkov z hľadiska súčasnej právnej úpravy, elektronický zborník z konferencie "Manažment miest a obcí vo vzťahu k chovu psov, iných domácich, lesných a exotických zvierat - čistota verejných priestranstiev", Nízke Tatry - Jasná, 2009.

Hromada, R., Mojžišová, J., Pošiváková, S., Michalková, Z., Hipíková, V., Beňová, K., Falis, M., Paulík, Š., Bajová, V.: Ukazovatele nešpecifickej imunity u túlavých psov. Ochrana zvierat a welfare 2003, VFU Brno, ISBN 80-7305-472-8, s. 73-75, 2003.

Všeobecne záväzné nariadenie mesta Košice č. 71/2009 o miestnych daniach.

www.uvplp.sk

Kontaktná adresa

MVDr. Kamil Kovács, Ústav biologie, zoologie a radiobiologie, katedra genetiky a biologie, UVLF Košice, Komenského 73, Košice, 041 81, SR, e-mail: kovacs@uvm.sk

Bluetongue - entomologické, klinicko-biochemické a sérologické sledovania na farme oviec

Bluetongue - entomological, clinically-biochemical and serological survey on sheep farm

Lacková Zuzana, Bireš Jozef, Kočišová Alica

Abstract

Monitoring of BT including entomological survey, clinically-biochemical examinations and serological diagnostics was realized since January to December 2009. Entomological survey consisted of capturing midges and their classification. Clinical examination of animals was carried out monthly. Biochemical examination of blood consisted of hematological profile, activity of enzymes (ALP, AST, GGT, CPK), concentration of total bilirubin, total protein, albumin, creatinin, total immunoglobulins, urea, beta-hydroxybutyrate and minerals (Ca, P, Fe, Cu, Zn). Serological examination for the detection of anti-BTV antibodies (vp 7 protein) was carried out using ELISA method. During year 2009 in the sheep farm totally 10 443 midges were captured. Of them *Pulicaris* complex was 3,9 %, *Obsoletus* complex was 78,5 % and *Nubeculosus* complex were 0,3 %. Of other non-transmitting *Culicoides* species were 17,3 %. The peak in seasonal dynamics was in weeks 21., 30.-33. and 41. We diagnosed no clinical symptoms characteristic for BT. During laboratory diagnostics we have noticed increase of CPK and total immunoglobulins, decrease of creatinine, Cu and Zn. Clinical findings and alterations in detected parameters pointed to the chronic parasitosis, mastitis and nutritional imbalances. During serological diagnostics no anti-BTV antibodies were detected.

KLúčové slová: *bluetongue, surveillance, ovce*

Úvod

Katarálna horúčka oviec je transmisívna orbivírusová choroba oviec a ostatných domácich a voľne žijúcich prežúvavcov prenášaná pakomárikmi *Culicoides*. Pôvodne bola choroba modrý jazyk považovaná za ochorenie afrického kontinentu. Do Európy sa prvýkrát preniesla v roku 1943. Hlavné nákazové prepuknutia v krajinách strednej a západnej Európy nastali v roku 2006. Od tohto obdobia začala byť nákaza zdravotným a ekonomickým problémom chovateľov hovädzieho dobytku, oviec a kôz.

Materiál a metodika

Monitoring katarálnej horúčky oviec pozostávajúci z entomologických sledovaní, klinicko-biochemických vyšetrení zvierat a sérologickej diagnostiky sa realizoval v období od januára 2009 do decembra 2009 na farme oviec (356 m n. m.).

Entomologický prieskum pakomárikov sa zabezpečoval odchytom pakomárikov 1 krát v týždni lapača hmyzu (model JW1212). Samotný zber hmyzu prebiehal podľa návodu výrobcu zariadenia. Spracovanie vzoriek a následná diagnostika bola robená na Ústave parazitológie UVL, metódami podľa Goffredo a Meiswinkel (2004), Delécolle (1985), Rawlings (1996), Braverman a Mumcuoglu (2008).

Klinické vyšetrenie oviec sa robilo v mesačných intervaloch na základe klinickej obhliadky stáda, klinického vyšetrenia chorých zvierat a údajov súkromného veterinárneho lekára a chovateľa.

Laboratórne vyšetrenie sa realizovalo v mesačných intervaloch od 10 bahníc a 5 plemenných baranov plemena merino. Jednotlivé hematologické parametre (Hb, Er,

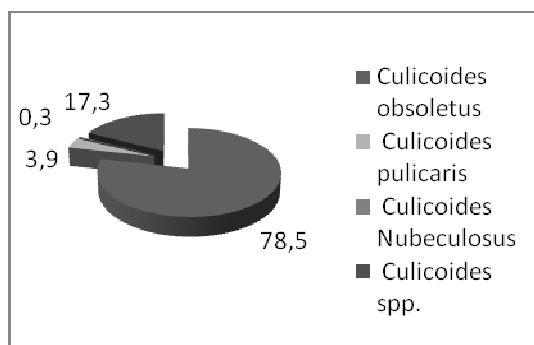
Htk, Lc) boli robené na hematologickom analyzátore ABC Vzt 16, diferenciálny krvný obraz klasicky, aktivita enzýmov (AST, ALP, GGT, CPK), CB, ALB, kreatinín, CIg, U, BHB, P na spektrofotometrickom analyzátore ALIZÉ, NEMK spektrofotometrickou metódou, Ca, Fe, Cu, Zn metódou atómovej absorpčnej spektrofotometrie (AAS-AAAnalyst 100 Perkin Elmer), CBi na spektrofotometri SPECOL 211.

Serologické vyšetrenia boli vykonané v Referenčnom laboratóriu pre diagnostiku katarálnej horúčky oviec v Štátnom veterinárnom ústave v Zvolene. Vyšetrenie protilátok proti vírusu choroby modrého jazyka (vp 7 proteín) sa vykonávalo ELISA metódou (ID VET Kit for detection of anti-VP7 antibodies by competitive ELISA).

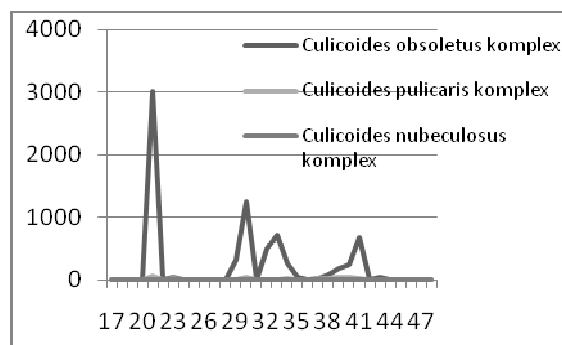
Výsledky

Entomologický prieskum:

V roku 2009 bolo na farme oviec odchytených 10 443 ks pakomárikov. 78,5 % (8 200 ks) odchytených pakomárikov tvorili zástupcovia komplexu *Obsoletus*, 3,9 % (406 ks) komplex *Pulicaris* a 0,3 % (29 ks) komplex *Nubeculosus*. Z iných druhov pakomárikov neprenášajúcich vírus BT sa odchytilo 1 808 ks (17,3 %)(obr. 1). Ako prezentujeme na obr. 2, z hľadiska sezónnej dynamiky, sme zaznamenali prvý vrchol v 21. týždni a ďalšie boli pozorované v 30.-33. týždni a v 41. týždni.



Obr. 1 Zastúpenie jednotlivých druhov *Culicoides*



Obr. 2 Sezónna dynamika jednotlivých komplexov *Culicoides*

Klinické a laboratórne vyšetrenie:

Pri klinickom sledovaní oviec sme nepozorovali klinické symptómy charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. Z iných chorôb boli u oviec v sledovanom období diagnostikované chronické endo a ektoparazitózy, nákazlivá krívačka, mušec, mastitídy a nedostatky vo výžive.

V hematologickom profile sme u oviec zaznamenali odchýlky od referenčného rozpätia v počte Er a v hodnote MCV. Pri ukazovateľoch energetického profilu sme v prvom polroku sledovania zistili pokles hodnôt TG a zvýšenie hodnôt BHB. V sledovanom období niektoré parametre hepatálneho profilu vykazovali pokles hodnôt (kreatinín počas celého sledovaného obdobia) alebo zvýšenie hodnôt (CIg počas celého sledovaného obdobia a CBi pri odberoch v zimnom období). V priebehu celého pozorovania sa zistila okrajová hypozinkémia. Klinické nálezy alebo zmeny vo vyšetrovaných laboratórnych parametroch poukazovali u oviec na chronické parazitózy a nedostatky vo výžive. Pri sérologickom vyšetrení sme nezistili pozitívne prípady. Na základe negatívnych sérologických výsledkov sme nepokračovali vo virologickom vyšetrení.

Diskusia

Pri entomologických štúdiách bola potvrdená prítomnosť zástupcov pakomárikov rodu *Culicoides* z Komplexu *Obsoletus*, *Pulicaris* a *Nubeculosus*, ktoré sú považované za vektorov zhubnej katarálnej horúčky (Goffredo a Meiswinkel, 2004). Percentuálne zastúpenie jednotlivých komplexov bolo rozdielne, pričom dominoval Komplex *Obsoletus* (78,5 %). Z hľadiska najvyššieho počtu odchytených pakomárikov na sledovanej farme bola najrizikovejšia druhá polovica mája a prelom júla a augusta, čomu zodpovedali aj priaznivé klimatické podmienky. Pri sledovaní aktivity pakomárikov sa odporúča využívať pre jej posúdenie aj meteorologické údaje.

Pri klinickom vyšetrení oviec neboli diagnostikované symptómy charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. V prípade výskytu klinickej manifestácie, tieto boli viazané u oviec na chronické parazitózy a nedostatky vo výžive. Vzhľadom na výskyt pakomárikov sa potvrdila potreba klinického sledovania prežívavcov ako súčasť surveillance choroby modrého jazyka v rámci včasnej diagnostiky, čo je aj v súlade so Smernicou Rady č. 2000/75/ES stanovujúcou špecifické ustanovenia pre kontrolu a likvidáciu katarálnej horúčky oviec- modrého jazyka a kódexom zdravia OIE pre suchozemské zvieratá (2004).

Pri laboratórnej analýze hematologických a biochemických parametrov neboli zistené zmeny charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. Odchýlky, ktoré sme diagnostikovali v priebehu sledovania u oviec, poukazovali na narušenie celkového metabolizmu v súvislosti s výskytom iných chorôb. Vzhľadom k tomu, že vyšetrované biochemické markery odrážajú narušenie orgánových systémov (napr. hemopoetický, enzymatický, hepatálny, imunitný) postihnutých v priebehu choroby modrého jazyka, je ich diagnostika dôležitou súčasťou posúdenia celkového stavu infikovaných zvierat alebo v rámci včasnej diagnostiky.

Pri sérologickom vyšetrení nebola diagnostikovaná prítomnosť protilátok voči žiadnemu sérotypu vírusu BT u oviec. Z dôvodu prítomnosti pakomárikov na farme oviec v transmisívnej sezóne je opodstatnené zabezpečiť kontinuálne sérologické analýzy zvierat ako neodmysliteľný prvok surveillance choroby modrého jazyka. Virologické vyšetrenia zvierat resp. vektora len v prípade podozrenia na nákazu (prítomnosť protilátok, klinické príznaky, biochemické zmeny poukazujúce na infekciu vírusom BT, v prípade presunu zvierat z oblastí s výskytom BT, aktuálnej nálezovej situácie).

PodĎakovanie

Práca bola robená v rámci projektu 4/2041/08.

Literatúra

BRAVERMAN, Y, MUMCUOGLU, K. Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* Kieffer (*Diptera: Ceratopogonidae*) with pigmented abdomen. *Veterinary Parasitology*, 2008, doi: 10.1016/j.vetpar.2008.11.016

DELÉCOLLE, J.C. Nouvelle contribution á l'étude systématique et iconographique des espèces du genre *Culicoides* (*Diptera: Ceratopogonidae*) du Nord-Est de la France. Université Louis Pasteur de Strasbourg, 1985, s. 240.

GOFFREDO, M., MEISWINKEL, R.. Entomological surveillance of bluetongue in Italy: methods of capture, catch analysis and identification of *Culicoides* biting midges. *Veterinaria Italiana*, 2004, 40, s. 260-265.

Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, bird and bees), 2004, chap. 2.1.9., Fifth Edition, OIE, Paris, s. 195-210.

RAWLINGS, P. A key, based on wing patterns of biting midges (genus *Culicoides* Latreille – *Diptera: Ceratopogonidae*) in the Iberian Peninsula, for use in epidemiological studies, *Graellsia*, 1996, 52, s. 57-71.

Smernica Rady č. 2000/75/ES z 20. novembra 2000 stanovujúca špecifické ustanovenia pre kontrolu a likvidáciu katarálnej horúčky oviec – modrého jazyka Úradný vestník Európskych spoločenstiev L327, 22.12.2000, s. 74-83.

Kontaktná adresa

MVDr. Zuzana Lacková, Klinika prežúvavcov, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, lackova_z@azet.sk

Vývoj právnych úprav v oblasti ochrany zvierat v SR

Development of legislation on animal protection in the Slovak republic

Takáčová Jana, Korim Peter, Kovács Kamil

Abstract

Protection of animals – until recently a relatively unknown concept, which is gradually getting recognized by people today is one of the most recent and most watched topics. Its basis is the welfare, the security is very important and people need, especially in terms of their productivity, but neither our conscience and morals do not allow us to have the animal did not provide at least the "five freedoms".

Kľúčové slová: *právna úprava, ochrana zvierat*

Úvod

Ochrana zvierat – ešte nedávno pomerne neznámy pojem, ktorý sa postupne dostával do povedomia ľudí a dnes je to jedna z najaktuálnejších a najsledovanejších tém. Jej základ tvorí welfare, ktorého zabezpečenie je pre nás ľudí veľmi dôležité a potrebné, hlavne čo sa týka oblasti ich produktivity, no ani naše svedomie a morálka nám nedovoľujú, aby sme zvierat'u nezabezpečili aspoň jeho „5 slobôd“. V dnešnej modernej spoločnosti je teda prirodzené a žiadúce, aby sa oblasti ochrany zvierat venovala patričná pozornosť aj na úrovni právnych predpisov (Szešťáková a kol., 2003).

1. História právnych predpisov v oblasti ochrany zvierat:

Ako prvý by som uviedla zákon č. 66/1961 Zb. o veterinárnej starostlivosti. Účelom tohto zákona bolo upraviť veterinárnu starostlivosť takým spôsobom, aby odpovedala potrebám vtedajšej živočíšnej veľkovýroby, aby zabezpečovala zdravie chovu hospodárskych zvierat. Súčasne sa muselo zabezpečiť vytváranie podmienok pre výrobu zdravotne nezávadných potravín a surovín živočíšneho pôvodu a krmív.

Nasledoval zákon č. 87/1987 Zb. o veterinárnej starostlivosti. Tento zákon vytváral predpoklady pre rozvoj veterinárnej starostlivosti ako dôležitého činiteľa ochrany a upevňovania zdravia zvierat, rastu živočíšnej veľkovýroby a výroby zdravotne a hygienicky nezávadných a biologicky hodnotných potravín a surovín živočíšneho pôvodu v záujme skvalitňovania výživy ľudí a ochrany ich zdravia.

Zákon č. 115/1995 Z.z. o ochrane zvierat nám ako prvý poskytol ucelený rámec vo vzťahu ku komplexnej ochrane zvierat. Jeho účelom bolo utvoriť predpoklady na ochranu zvierat úpravou správania ľudí k nim (Bugarský a kol., 1999; Falis a kol., 2003) a upraviť základné podmienky chovu a držby nebezpečných živočíchov.

Zákon č. 337/1998 Z.z. o veterinárnej starostlivosti ustanovoval pravidlá a podmienky veterinárnej starostlivosti v záujme zachovania a zlepšovania zdravia zvierat, ochrany životného prostredia, ochrany zdravia ľudí a výroby zdravotne neškodných, hygienicky bezchybných a biologicky hodnotných potravín živočíšneho pôvodu.

Zákon č. 488/2002 Z.z. o veterinárnej starostlivosti ustanovoval:

- veterinárne požiadavky na zdravie zvierat, násadové vajcia, spermú, embryá, vajíčka z hľadiska zdravia zvierat,
- veterinárne požiadavky na produkty živočíšneho pôvodu v záujme ochrany

- zdravia zvierat,
- veterinárne požiadavky na živé zvieratá, na produkty živočíšneho pôvodu v záujme ochrany zdravia ľudí,
- práva a povinnosti fyzických a právnických osôb vo veterinárnej oblasti,
- organizáciu, pôsobnosť a právomoci, ktoré vykonávali štátnu správu vo veterinárnej oblasti.

2. Súčasný právny predpis v oblasti ochrany zvierat

V súčasnosti detailná právna úprava ochrany zvierat je obsahom série nariadení vlády SR, ktoré sú určené na vykonanie zákona (Korimová a Červená, 2004), no nebolo jednoduché pripraviť právnu úpravu obsahujúcu požiadavky kladené právnou úpravou Európskej únie (Červená a kol., 2004).

Základ súčasnej právnej úpravy v oblasti ochrany zvierat tvorí zákon č. 39/2007 Z.z. o veterinárnej starostlivosti, ktorý ustanovuje:

- veterinárne požiadavky na zdravie zvierat, násadové vajcia, spermú, embryá, vajíčka z hľadiska zdravia zvierat,
- veterinárne požiadavky na produkty živočíšneho pôvodu v záujme ochrany zdravia zvierat,
- veterinárne požiadavky na živé zvieratá, na produkty živočíšneho pôvodu v záujme ochrany zdravia ľudí,
- práva a povinnosti fyzických a právnických osôb vo veterinárnej oblasti,
- organizáciu, pôsobnosť a právomoci, ktoré vykonávali štátnu správu vo veterinárnej oblasti,
- sankcie za porušenie povinností ustanovených týmto zákonom.

Na vykonanie tohto zákona boli vydané nasledovné nariadenia, ktoré boli transponované z právnych predpisov ES:

- Nariadenie vlády SR č. 270/2003 Z.z., v znení nariadenia vlády SR č.730/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne normy ochrany teliat . Toto nariadenie ustanovuje všeobecné a špecifické podmienky chovu teliat. Nevzťahuje sa na chovy, kde je menej ako 6 teliat a na teľatá chované spolu s matkou v období mliečnej výživy.
- Nariadenie vlády SR č. 325/2003 Z.z v znení nariadenia vlády SR č.735/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne normy ochrany ošípaných, nám definuje všeobecné podmienky chovu ošípaných a zahŕňa tiež špecifické požiadavky na chov kanca, na chov prasníc a prasničiek, na chov ciciakov a na chov odstavčiat a chovných ošípaných.
- Nariadenie vlády SR č. 326/2003 Z.z., v znení nariadenia vlády SR č.736/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne požiadavky na ochranu nosníc. Ustanovuje všeobecné požiadavky na chov nosníc, špecifické požiadavky podľa systému chovu a registračnú povinnosť vlastníka. Nariadenie sa nevzťahuje na chovy, kde je menej ako 350 ks nosníc, resp. kde sú nosnice chované za účelom produkcie násadových vajec.
- Nariadenie vlády SR č. 23/2009 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na pokusné účely alebo iné vedecké účely.
- Nariadenie vlády SR č. 322/2003 Z.z. o ochrane zvierat chovaných na farmárske účely. Dané nariadenie definuje všeobecné podmienky chovu, no nevzťahuje sa

na zvieratá, ktoré sú určené súťaže, výstavy, kultúrne alebo športové podujatia, na voľne žijúce zvieratá a pod.

- Nariadenie vlády SR č. 497/2003 Z.z., v znení nariadenia vlády SR č. 315/2003 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat v čase ich zabíjania alebo usmrcovania. Nariadenie sa vzťahuje na presuny, ustajnenie, znehybnenie, omráčenie, zabíjanie a usmrcovanie zvierat, ktoré sú určené na produkciu mäsa, kože a pod. a na spôsoby usmrcovania zvierat pri eradikácii chorôb. Nevzťahuje sa na vedecké pokusy vykonávané pod dozorom príslušných orgánov, zvieratá usmrtené pri kultúrnych alebo športových podujatiach a voľne žijúce zvieratá, ktoré boli ulovené povoleným spôsobom.
- Posledné nariadenie už síce nepatrí k vykonávacím predpisom zákona o veter. starostlivosti, ale radi by sme ho aspoň spomenuli, keďže zahŕňa ochranu zvierat počas prepravy. Jedná sa o Nariadenie Rady (ES) č. 1/2005 o ochrane zvierat počas prepravy a s ňou súvisiacich činností.

Diskusia a záver

Právna úprava v oblasti ochrany zvierat je pomerne obsiahla a dovoľm si tvrdiť, že aj dostačujúca, keďže v posledných rokoch došlo k výraznému zlepšeniu životných podmienok v chovoch, a to hlavne na základe neustáleho zdokonaľovania právnych predpisov. Napriek tomu stále dochádza k nedodržaniu právnych predpisov v praxi, a preto je potrebné neustále zabezpečovať vykonávanie kontrol na to, aby naozaj boli predpisy dodržiavané v praxi a aby zvieratá mali zaručenú svoju pohodu.

Literatúra

Sesztáková, E., Beňová, K., Toropila, M., Litecká, D., Falis, M.: Ochrana pokusných zvierat a vykonávanie pokusov na zvieratách v SR. Ochrana zvierat a welfare 2003, VFU Brno, 2003, s. 156-159, ISBN 80-7305-472-8

Bugarský, A., Takáčová, D., Korim, P., Pilipčinec, E.: Pokus na zvierati. Slov. vet. čas., 24, 5, 1999, s. 270 – 272

Falis, M., Beňová, K., Toropila, M., Litecká, D., Sesztáková, E.: Ochrana pokusných zvierat a vykonávanie pokusov na zvieratách v SR. In: Zborník z konferencie „Ochrana zvierat a welfare 2003“, VFU Brno, 2003, s. 52 – 56, ISBN 80-7305-472-8

Červená, K., Opátová, I., Stašová, M.: Ochrana pokusných zvierat v SR – právna úprava. In: Zborník z konferencie „Právna kultúra a európsky integračný proces“, PF UPJŠ Košice, 2004, s. 256 – 265, ISBN: 80-7097-570-9

Korimová, J., Červená, K.: Úprava ochrany hospodárskych zvierat v právnych predpisoch SR. In: Zborník z konferencie „Právna kultúra a európsky integračný proces“, PF UPJŠ Košice, 2004, s. 249-255, ISBN: 80-7097- 570-9

Zákon č. 66/1961 Zb. o veterinárnej starostlivosti

Zákon č. 87/1987 Zb. o veterinárnej starostlivosti

Zákon č. 115/1995 Z.z. o ochrane zvierat

Zákon č. 337/1998 Z.z. o veterinárnej starostlivosti

Zákon č. 488/2002 Z.z. o veterinárnej starostlivosti

Zákon č. 39/2007 Z.z. o veterinárnej starostlivosti

Nariadenie vlády SR č. 270/2003 Z.z. v znení nariadenia vlády SR č.730/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne normy ochrany teliat

Nariadenie vlády SR č. 325/2003 Z.z. v znení nariadenia vlády SR č.735/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne normy ochrany ošípaných

Nariadenie vlády SR č. 326/2003 Z.z. v znení nariadenia vlády SR č.736/2002 Z.z., ktorým sa ustanovujú minimálne požiadavky na ochranu nosníc

Nariadenie vlády SR č. 23/2009 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat používaných na pokusné účely alebo iné vedecké účely

Nariadenie vlády SR č. 322/2003 Z.z. o ochrane zvierat chovaných na farmárske účely

Nariadenie vlády SR č. 497/2003 Z.z. v znení nariadenia vlády SR č. 315/2003 Z.z., ktorým sa ustanovujú požiadavky na ochranu zvierat v čase ich zabíjania alebo usmrcovania

Nariadenie Rady (ES) č. 1/2005 o ochrane zvierat počas prepravy a s ňou súvisiacich činností

Kontaktná adresa

MVDr. Jana Takáčová, Ústav súdneho a verejného veterinárskeho lekárstva a ekonomiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, Košice, Email: jtakacova@uvm.sk

Vliv vzdálenosti na vybrané biochemické ukazatele krevní plazmy při přepravě brojlerů na jatky

Effect of distance on selected biochemical indicators of blood plasma of broiler chickens during transport to the slaughterhouse

Vošmerová Petra, Chloupek Petr

Abstract

The effects of distance on selected biochemical indicators (corticosterone, uric acid, triglycerides, total protein, glucose and lactate) during transportation to the slaughterhouse were monitored in a group of unsexed ROSS 308 broiler chickens aged 42 days. The broilers were sampled before (after catching, crating and loading) and after transport over three different travel distances (10 km, 70 km and 130 km). The corticosterone level after handling were significantly ($P < 0,01$) higher than in broilers after transport in all distances. The results obtained indicated that pre-transport manipulation with broilers may be more stressful than transport itself. To improve broiler meat quality, it is necessary to provide the recovery before slaughtering.

Keywords: broiler, transport, distance, stress, welfare

Úvod

Přeprava brojlerových kuřat na jatky zahrnuje chytání ptáků, jejich bednění, naložení na dopravní prostředek, samotnou přepravu a jejich vyskladnění na jatkách. Brojleři jsou v tomto předporážkovém období vystaveni mnoha stresorům, které mohou způsobit změny ve fyziologických parametrech, především hematologické, enzymatické a hormonální změny (Gyimothy, 2004), dále můžou u ptáků vyvolat strach a úzkost a v některých případech také vysokou úmrtnost (Mench, 2004).

Koncentrace kortikosteronu je v krevní plasmě jedním z nejčastěji používaným biochemickým ukazatelem pro měření hladiny stresové zátěže u ptáků. Kortikosteron je u ptáků primární glukokortikoid, jehož sekrece je klasická endokrinní odpověď na stres (Sapolsky et al., 2000). Stresová odpověď je zahájena aktivací hypotalamo-hypofyzární adrenální osy (HPA) a uvolněním kortikosteronu z kůry nadledvinek (Cockrem, 2007). Zvýšenou koncentraci po přepravě zjistilo více autorů (Ondrašovičová et al., 2008; Freeman et al., 1984; Broom et al., 1986). Ondrašovičová et al. (2008) popsali, že dlouhodobá přeprava brojlerových kuřat na jatky přispěla ke zvýšení koncentrace kortikosteronu a ke snížení glukózy v krvi. Pijarska et al. (2006) zjistili také nižší koncentraci glukózy u brojlerů po přepravě dlouhé 18 hodin. Podobně Halliday et al. (1977) popsali hypoglykémii a zvýšenou hladinu kyseliny močové u brojlerů po přepravě, shodné výsledky prezentovali Huff et al. (2008) u krůt. Také Delezie et al. (2007) objevili vyšší koncentraci kyseliny močové po přepravě.

Cílem naší práce bylo zjistit vliv různé vzdálenosti u brojlerových kuřat při přepravě na jatky na hladinu kortikosteronu, kyseliny močové, triglyceridů, celkového proteinu, glukózy a laktátu v krevní plasmě.

Materiál a metodika

Vliv vzdálenosti při přepravě na jatka na vybrané biochemické ukazatele byl sledován na skupině brojlerových kuřat ROSS 308 bez rozlišení pohlaví (celkový počet 360) ve věku 42 dní. Brojleři byli od prvního dne stáří ustájeni na hluboké podestýlce

v komerčních chovech s řízeným světelným, teplotním, zoohygienickým a krmně-technologickým režimem v souladu se standardními požadavky pro chov masných hybridů drůbeže. Teplota prostředí ve stáji byla postupně snižována z 30 ± 1 °C první den na 20 ± 1 °C v posledním dnu krmení. V závislosti na teplotě byla relativní vlhkost v rozmezí mezi 20% a 60%.

Ve věku 42 dní byly brojleři náhodně vybráni pro testování. Brojleři byly chytáni manuálně v hale, dáni do beden a naloženi na komerční dopravní prostředek, a poté byly přepraveny na jatky do třech různých vzdáleností (10 km, 70 km a 130 km). Brojlerům byla odebrána krev před každou přepravou po naložení beden s ptáky na dopravní prostředek (skupina 0 km, n = 180) a poté ihned po každé vzdálenosti: 60 brojlerů po 10 km přepravě (skupina 10 km, n = 60), 60 brojlerů po 70 km (skupina 30 km, n = 60) a 60 brojlerů po 130 km (skupina 130 km, n = 60). Krevní vzorky byly odebrány z *vena basilica* během 1 minuty od chycení, aby bylo zaručeno, že sledovaný parametr nebyl ovlivněn stresem způsobeným předodběrovou manipulací (Voslářová et al., 2008). Zastoupení pohlaví brojlerů v experimentu bylo 50% a 50%, vliv pohlaví však nebyl v experimentu sledován, protože podle předchozích pokusů nebyl tento vliv statisticky významný.

Heparinizovaná krev byla odstředěna při 3000 otáčkách po 10 minut a vzorky plasmy byly uloženy v hlubokém mrazu (-80 °C) v ependorfkách dokud nebyla provedena analýza. V rámci biochemických vyšetření byly stanoveny plazmatické koncentrace kortikosteronu, glukózy, laktátu, kyseliny močové (UA), triglyceridů (TG) a celkového proteinu (TP).

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí software Unistat 5.1 (Unistat Ltd., GB). Data byla zpracována pomocí metody ANOVA (the general linear model - GLM) a statistická významnost rozdílů mezi průměry byla zjištěna pomocí testu Tukey-HSD.

Výsledky a diskuse

Tabulka č. 1: Vybrané biochemické ukazatele u brojlerů (n = 360) přepravovaných na jatka ve čtyřech různých vzdálenostech: $\bar{x} \pm$ SEM (Standard Error of Mean)

Vzdálenost	Ukazatel					
	Cort (ng/ml)	UA (μ mol/l)	TG (mmol/l)	TP (g/l)	Glukóza (mmol/l)	Laktát (mmol/l)
0 km	6,78 ^a	345,8 ^b	0,56 ^a	40,63 ^b	14,36 ^a	7,92 ^a
10 km	5,18 ^b	420,7 ^a	0,50 ^b	43,93 ^a	13,97 ^a	5,23 ^b
70 km	3,61 ^c	430,0 ^a	0,53 ^{a,b}	37,28 ^c	14,08 ^a	4,86 ^b
130 km	3,23 ^c	467,4 ^a	0,48 ^b	37,00 ^c	13,11 ^b	5,26 ^b
SEM	0,11	26,5	0,02	0,02	0,04	0,06

Vysvětlivky: Cort = kortikosteron, UA = kyselina močová, TG = triglyceridy, TP = celkový protein.

Průměry ve sloupci, které nemají společné písmeno indexu (a, b, c), se významně liší ($P < 0,05$).

Výsledky našeho pokusu potvrdily, že stresové vlivy, kterým jsou brojleři vystaveni při přepravě na jatky způsobují výrazné změny ve vybraných biochemických

ukazatelích. Podle očekávání jsou tyto změny specifické v závislosti na délce přepravy. Výsledky jsou uvedeny v tabulce č. 1.

Podle hladiny kortikosteronu má na brojlery největší stresový dopad manipulace s nimi před vlastní přepravou. Tato hodnota byla statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší než hladina kortikosteronu po všech přepravách a se vzdáleností dále klesala. Naproti tomu Ondrašovičová et al. (2008) napsali, že hladina kortikosteronu byla u brojlerů po přepravě zvýšena, protože v jejich pokusu byla krev odebírána před jakoukoliv manipulací s ptáky, zatímco my jsme krev odebíraly až po naložení beden s ptáky do dopravního prostředku.

Dalším indikátorem stresu je hladina glukózy v krvi, která v našem pokusu nebyla statisticky ovlivněna krátkodobou přepravou, a po dlouhodobé přepravě byla statisticky významně ($P < 0,01$) nižší než před přepravou. Podobné výsledky popsali Ondrašovičová et al. (2008), kteří také nenašli změny v hladině glukózy po přepravě dlouhé 30 km a po přepravě dlouhé 120 km zjistili snížení hladiny glukózy v krvi brojlerů. Také Pijarska et al. (2006) a Halliday et al. (1977) popsali nižší hladinu glukózy po přepravě brojlerů.

Přeprava měla také vliv na hladinu kyseliny močové v krvi, která byla statisticky významně ($P < 0,01$) vyšší po všech třech sledovaných přepravách než před přepravou. S délkou přepravy se koncentrace kyseliny močové dále zvyšovala, ale mezi jednotlivými vzdálenostmi již nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl. Podobně i Delezie et al. (2007) a Halliday et al. (1977) popsali vyšší koncentraci kyseliny močové po přepravě a Huff et al. (2008) zjistili zvýšenou hladinu kyseliny močové u přepravovaných krůt. Hladina laktátu v krevní plazmě byla nejvyšší u brojlerů po jejich chytání, umístění do beden a naložení do dopravního prostředku. To souvisí s máváním křídel a bojem při manipulaci s brojlery. Po samotné přepravě koncentrace laktátu klesla.

Získaná data ukazují, že pro brojlery je více stresující manipulace před transportem, než samotná přeprava. Dlouhotrvající předporážkové zacházení s brojlery má negativní vliv na jejich welfare a tím i na sníženou kvalitu masa. Aby se zlepšila kvalita masa, je nutné poskytnout brojlerům odpočinek před porážkou (Zhang et al., 2009).

Závěr

Manipulace před přepravou u brojlerů vyvolává největší stresovou odpověď a krátkodobá přeprava neposkytuje dostatek času k jejich zotavení, zatímco delší doba přepravy poskytne brojlerům potřebný čas k částečnému zotavení. Po manipulaci s brojlery, která je pro ně stresující, by bylo vhodné jim poskytnout dostatek času na zotavení.

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou prostředků výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

K dispozici u autora.

Kontaktní adresa: MVDr. Petra Vošmerová, VFU Brno, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Palackého 1/3, 612 42 Brno, e-mail: vosmerovap@vfu.cz

Toxicita hřebíčkového oleje pro ryby *Poecilia reticulata* a *Danio rerio* **The acute toxicity of clove oil to fish *Poecilia reticulata* and *Danio rerio***

**Doleželová Petra, Mácová Stanislava, Plhalová Lucie, Svobodová Zdeňka,
Pištěková Vladimíra, Bedáňová Iveta, Voslářová Eva**

Abstract

Clove oil is in aquaculture used as an anesthetic for stress and mechanical damage prevention during veterinary interventions. It is often used in the Czech Republic in a water bath for the short-term immobilization of the fish.

Acute toxicity tests were performed on aquarium fish *Danio rerio* and *Poecilia reticulata*, which are considered to be the model organisms most commonly used in toxicity testing. The semi-static method according to OECD No. 203 (Fish acute toxicity test) was used for testing juvenile fish. The results obtained (the number of dead individuals at particular test concentrations) were subjected to a probit analysis using the EKO-TOX 5.2 program in order to determine LC₅₀ clove oil values. The statistical significance of the difference between LC₅₀ values in *D. rerio* and *P. reticulata* was tested using the Mann-Whitney non-parametric test.

The LC₅₀ clove oil mean value was $18.2 \pm 5.52 \text{ mg.l}^{-1}$ in juvenile *D. rerio* and $22.2 \pm 2.64 \text{ mg.l}^{-1}$ in *P. reticulata*. Acute toxicity values of clove oil for juvenile stages of both fish species were comparable.

Key words: clove oil, anesthesia, 96hLC₅₀, zebrafish, guppy

Úvod

Manipulace a zákroky na rybách a jejich přeprava musí odpovídat požadavkům Zákona č. 246/1992 Sb. na ochranu zvířat proti týrání, ve znění pozdějších předpisů. Anestezie ryb se používá pro celkové znecitlivění ryb za účelem manipulace s nimi či provádění různých veterinárních či chovatelských zákroků. Jedná se tedy o prevenci manipulačního stresu a mechanického poškození např. při umělém výtěru ryb, při injekční aplikaci léčiv a hormonálních přípravků, při odběrech krve, u akvarijských druhů ryb má nezastupitelnou úlohu při jejich přepravě (Svobodová aj., 2007).

Mezi nejčastěji používané anestetika u ryb patří přípravek MS 222 (tricain methanosulfonát), 2 – phenoxyethanol a hřebíčkový olej (Kolářová aj., 2006). V naší práci jsme hodnotili akutní toxicitu hřebíčkového oleje u dvou druhů akvarijských ryb – *Danio rerio* a *Poecilia reticulata*, které jsou doporučovány k akutním testům toxicity (Grush et al., 2004, Hrovat et al., 2009).

Hřebíčkový olej je tmavě hnědá kapalina získaná destilací květů, stonků a listů rostlin *Eugenia aromatica* nebo *Eugenia caryophyllata* (Soto and Burhanuddin, 1995, Kolářová aj., 2006). Účinnou látkou je eugenol (2 – Methoxy-4-(prop-2-enyl)phenol), který tvoří 70 – 90 % hmotnosti hřebíčkového oleje. Dále hřebíčkový olej obsahuje eugenol acetát (> 17 %) a kariofilen 5 (> 12 %) (Keene et al., 1998). Pro účinnou látku není stanoven maximální limit reziduí (MRL) a proto není registrován jako anestetikum pro ryby. Jeho použití je tak možné pouze na základě předpisu veterinárního lékaře a ochranná lhůta je dlouhá 500 stupňodnů. Doporučená koncentrace pro anestezii ryb je 30 – 40 mg.l⁻¹, anestezie nastupuje do 5 – 10 minut, doba zotavení je však delší než u ostatních anestetik (Kolářová aj., 2006).

Mnoho autorů se zabývalo hodnocením účinnosti a bezpečnosti anestetika hřebíčkového oleje u různých druhů ryb (Soto and Burhanuddin, 1995, Keene et al., 1998, Grush et al., 2004, Velíšek et al., 2005, Velíšek, 2006a,b). Všichni autoři se shodují na kritériích, které má ideální anestetikum splňovat: rychlá indukce, ale také zotavení, nízká toxicita pro ryby, bezpečnost pro savce, bez reziduí v tkáních a nízké náklady při použití.

Materiál a metodika

Testy akutní toxicity byly provedeny na juvenilních stádiích akvariálních ryb *Danio rerio* a *Poecilia reticulata* na základě metodiky OECD 203 Test akutní toxicity na rybách. Oba druhy ryb patří mezi standardní testovací organismy doporučované k testům toxicity. Celkově byla provedena série 5 testů, v každém testu bylo pět koncentrací hřebíčkového oleje. Testy se prováděly semistatickou metodou s obměnou roztoku po 48 h. Během pokusů byla zaznamenávána teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádobách a mortalita ryb. Do každé nádoby bylo dáno 10 ryb náhodně vybraných ze zásobní populace. Poté byly provedeny 96 hodinové testy akutní toxicity.

Teplota testovací lázně se pohybovala v rozmezí $24 \pm 1^\circ\text{C}$, koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 % (80 - 94 %), pH bylo v rozmezí od 7,64 do 8,33. Během testů nebyl v kontrolních nádobách zaznamenán úhyn ryb.

Základní fyzikální a chemické parametry ředící vody použité v akutních testech toxicity byly následující: $\text{KNK}_{4,5}$ 3,6 – 3,7 mmol.l^{-1} ; CHSK_{Mn} 1,4 – 1,9 mg.l^{-1} ; celkový amoniak pod mezí stanovitelnosti; NO_3^- 24,5 – 31,4 mg.l^{-1} ; NO_2^- pod mezí stanovitelnosti; Cl^- 18,9 – 19,1 mg.l^{-1} ; $\Sigma \text{Ca} \pm \text{Mg}$ 14 mg.l^{-1} .

Ze získaných hodnot (počet uhynulých jedinců v jednotlivých testovaných koncentracích) byla probitovou analýzou pomocí programu EKO-TOX 5.2 stanovena hodnota LC50. Statistická významnost rozdílu hodnot LC50 u *D. rerio* a *P. reticulata* byla provedena metodikou neparametrického Mann-Whitneova testu programem Unistat 5.1.

Výsledky a diskuse

Určení akutní toxicity hřebíčkového oleje je důležité z hlediska jeho použití při anestezii ryb a vhodné léčebné koncentrace lázně, ale také kvůli možné kontaminaci vodního prostředí anestetizační lázní (Velíšek et al., 2006a).

V našem testu jsme sledovali účinek hřebíčkového oleje u dvou druhů akvariálních ryb – *D. rerio* a *P. reticulata*. Akutní toxicita vyjádřená jako 96hLC50 pro juvenilní *D. rerio* se pohybovala v rozmezí hodnot 12.1 – 26.2 mg.l^{-1} (průměr \pm SD: $18.2 \pm 5.52 \text{ mg.l}^{-1}$) a pro juvenilní *P. reticulata* 20.3 – 26.6 mg.l^{-1} (průměr \pm SD: $22.2 \pm 2.64 \text{ mg.l}^{-1}$). Po statistickém vyhodnocení 96hLC50 nebyl zjištěn rozdíl v citlivosti mezi těmito dvěma druhy ryb.

Problematicke toxicity a účinků hřebíčkového oleje u různých druhů ryb se věnovala řada autorů. Srovnatelné hodnoty 96hLC50 publikoval autor Velíšek et al. (2005) u kapra obecného (*Cyprinus carpio*) (96hLC50 = 18.1 mg.l^{-1}), Velíšek et al. (2006b) u sumce evropského (*Silurus glanis*) (96hLC50 = 18.4 mg.l^{-1}) a nižší hodnoty zjistil Velíšek et al. (2006a) u pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*) (96hLC50 = 14.1 mg.l^{-1}). Můžeme tedy usuzovat, že pstruh duhový je k účinkům hřebíčkového oleje citlivější než ostatní popisované druhy ryb. Toto potvrzuje i práce autora Keene et al. (1998), který

uvádí hodnotu LC50 v časovém úseku 8 až 96 hodin pro juvenilního pstruha duhového zhruba 10 mg.l⁻¹. Velíšek et al. se ve svých studiích věnoval také stanovením účinků anestezie na jednotlivé druhy ryb. Byly zjištěny reverzibilní změny v některých biochemických ukazatelích (glukóza, amoniak, AST) u pstruha duhového po 10min expozici 30 mg.l⁻¹ hřebíčkového oleje. 10minLC50 byla 81.1 mg.l⁻¹. Z toho lze usuzovat, že doporučená koncentrace 30 mg.l⁻¹ pro anestezii ryb je bezpečná (Velíšek et al., 2006a). Podobné výsledky byly zjištěny u kapra obecného (10minLC50 74.3 mg.l⁻¹) (Velíšek et al., 2005) a u sumce evropského (10minLC50 76.7 mg.l⁻¹) (Velíšek et al., 2006b). Také Grush et al. (2004) zjišťoval akutní toxicitu a účinek anestezie při použití eugenolu u juvenilních stádií *D. rerio*. Hodnota 96hLC50 = 21 mg.l⁻¹ se spíše blíží námi zjištěné hodnotě u *P. reticulata* než u *D. rerio*. Při zkoumání účinnosti a bezpečnosti byl pozorován pouze delší čas ve fázi zotavení ryb, celkově však autoři hodnotí použití hřebíčkového oleje u různých druhů ryb pozitivně.

Hlavní předností hřebíčkového oleje při anestezii ryb je nízká cena. Při používání je však nezbytné dodržovat obecné zásady bezpečnosti práce s chemickými látkami. Nevýhodou hřebíčkového oleje je jeho poměrně nízký terapeutický index (Velíšek et al., 2006a).

Poděkování

Práce byla realizována při řešení projektu MSM č. 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Literatura

- GRUSH, J., NOAKES, D.L.G., MOCCIA, R.D. The efficacy of clove oil as an anesthetic for the zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton). *Zebrafish*, 2004, vol. 1, no. 1, s. 46–53.
- HROVAT, M., SEGNER, H., JERAM, S. Variability of *in vivo* fish acute toxicity data. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 2009, vol. 54, no. 3, s. 294–300.
- KEENE, J.L., et al. The efficacy of clove oil as an anaesthetic for rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture research*, 1998, vol. 29, no. 2, s. 89–101.
- KOLÁŘOVÁ, J., aj. Anestezie ryb v České republice. *Bulletin VÚRH Vodňany*, 2006, roč. 42, č. 3, s. 105–108.
- SOTO, C.G., BURHANUDDIN. Clove oil as a fish anaesthetic for measuring length and weight of rabbitfish (*Siganus lineatus*). *Aquaculture*, 1995, vol. 136, no. 1–2, s. 149–152.
- SVOBODOVÁ, Z., aj. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4. vyd. Praha: Informatorium, 2007. 264 s. ISBN 978-80-7333-051-4.
- VELÍŠEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Veterinární Medicína*, 2005, vol. 50, no. 6, s. 269–275.
- VELÍŠEK, J., SVOBODOVÁ, Z., PIAČKOVÁ, V. Účinek anestetika hřebíčkového oleje na pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). *Bulletin VÚRH Vodňany*, 2006a, roč. 42, č. 3, s. 125–132.
- VELÍŠEK, J. et al. Effects of clove oil anaesthesia on european catfish (*Silurus glanis* L.). *Acta Veterinaria Brno*, 2006b, vol. 75, no. 1, s. 99–106.

Kontaktní adresa

MVDr. Petra Doleželová, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, Brno 612 42, dolezelovap@vfu.cz

Využití biochemických markerů kontaminace při testech toxicity na rybách

Biochemical markers of contamination in fish toxicity tests

Haluzová Ivana, Blahová Jana, Havelková Marcela, Modrá Helena,
Šíroká Zuzana, Svobodová Zdeňka

Abstract

Juvenile specimens of common carp (*Cyprinus carpio*) were exposed to commercial pesticide formulations. After 28 days, biochemical markers of xenobiotic biotransformation were determined in fish liver.

There was no difference in total cytochrome P450 (CYP) and ethoxyresorufin-O-deethylase activity (EROD) in fish exposed to 0.25 or 2.5 mg.L⁻¹ Sencor 70WG (metribuzin 700 g.kg⁻¹) when compared to the control group.

Successor 600 (pethoxamid 600 g.L⁻¹) in concentrations of 0.06 mg.L⁻¹; 0.22 and 0.60 mg.L⁻¹ did affect neither CYP nor EROD activity. A significant increase ($p < 0.05$) in glutathione (GSH) content and activity of glutathione-S-transferase (GST) was found in fish exposed to 0.22 and 0.60 mg.L⁻¹ Successor 600.

Spartakus (prochloraz 450 g.L⁻¹) of 0.36 and 1.08 mg.L⁻¹ induced both ($p < 0.05$) CYP and EROD with a significant Spearman's correlation ($r = 0.49$; $p < 0.01$). The content of GSH and GST activity were enhanced ($p < 0.05$) also in 0.108 mg.L⁻¹.

The induction responses of 2nd phase markers were more sensitive than 1st phase systems.

Key words: *Cyprinus carpio*, cytochrome P450, EROD, glutathione, GST

Úvod

Kontaminace vodního prostředí látkami antropogenního původu vedla k potřebě nalezení vhodných markerů, které pomohou detekovat jejich přítomnost a objasnit účinek nízkých koncentrací cizorodých látek na volně žijící organismy. Mezi tyto markery řadíme u ryb také enzymatické systémy, které se účastní detoxikace xenobiotik v játrech. Odezva organismu na vystavení environmentálnímu stresu se kvalitativně i kvantitativně liší v závislosti na mnoha faktorech, jako je např. kontaminující látka, její koncentrace, délka expozice, velikost ryb, teplota vody a přítomnost dalších látek. Po vstupu do organismu probíhá metabolismus xenobiotik ve 2 fázích. V důsledku vystavení cizorodým látkám může dojít k indukci nebo inhibici těchto mechanismů. Látky jsou v 1. fázi přeměněny na metabolity polárnějšího charakteru a ty jsou následně po konjugaci s vhodným substrátem (k. glukuronová, glutathion, sulfát) ve 2. fázi vyloučeny. Ke konjugaci může v některých případech dojít již u samotné původní sloučeniny.

Metodika

Juvenilní jedinci kapra obecného (*Cyprinus carpio*) byli po dobu 28 dní vystaveni různým koncentracím komerčních přípravků na ochranu rostlin. Jednalo se o herbicid Sencor 70WG (metribuzin 700 g.kg⁻¹ – triazinon: 4-amino-6-(1,1-dimethylethyl)-3-methylthio-1,2,4-triazin-5(4H)-on), herbicid Successor 600 (pethoxamid 600 g.L⁻¹ – chloroacetamid:2-chloro-N-(2-ethoxyethyl)-N(2-methyl-1-phenylprop-1-enyl)acetamid) a fungicid Spartakus (prochloraz 450 g.L⁻¹ – azol: N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]imidazol-1-karboxamid).

Na konci pokusu byly ryby usmrceny a v jejich játrech (hepatopankreatu) stanoveny markery biotransformace xenobiotik: koncentrace celkového cytochromu P450 (CYP) spektrofotometricky (Šíroková a kol., 2005), aktivita ethoxyresorufin-O-deethylázy (EROD) spektrofluorimetricky (Chang a Waxman, 1998; Nilsen a kol., 1998; Rutten a kol., 1992), aktivita glutathion-S-transferázy (GST) spektrofotometricky (Habig a kol., 1974) a obsah glutathionu spektrofotometricky dle Ellmana (1959). Koncentrace mikrosomálních proteinů byla zjištěna metodou Löwryho a kol. (1951). Koncentrace proteinu byla změřena použitím komerčního kitu (Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit, Sigma-Aldrich).

Získaná data byly statisticky zpracována programem unistat. Výsledky byly testovány metodou analýzy variace ANOVA – Turkey test. Závislost mezi CYP a EROD byla hodnocena za použití Spearmanova korelačního koeficientu. Výsledky jsou uvedeny ve formě $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Výsledky a diskuze

Přípravek Sencor 70 WG v koncentraci 0,25 a 2,5 mg.L⁻¹ nevyvolal ve srovnání s kontrolou statisticky významné změny v koncentraci CYP ani aktivitě EROD (n=19–23; kontrola, přípravek 0,25 a 2,5 mg.L⁻¹ – CYP: 0,04±0,03; 0,04±0,04; 0,04±0,03 nmol.mg⁻¹ mikrosomálního proteinu. EROD: 8,18±7,78; 4,79±4,50; 2,93±3,61 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ mikrosomálního proteinu). Obsah glutathionu a aktivita GST nebyly sledovány. Působení CYP1A je spojeno s aktivitou EROD (Šíroková a Drastichová, 2004). Xenobiotika, která indukují některé isoenzymy cytochromu P450, mohou zároveň jiné isoenzymy inhibovat. V takovém případě nemusí dojít ke změně koncentrace celkového cytochromu P450 (van der Oost a kol., 2003).

Successor 600 v testovaných koncentracích 0,06; 0,22 a 0,60 mg.L⁻¹ neovlivnil CYP a EROD (n=22–24; kontrola, přípravek o koncentraci 0,06; 0,22 a 0,60 mg.L⁻¹ – CYP: 0,17±0,06; 0,13±0,06; 0,18±0,08; 0,20±0,07 nmol.mg⁻¹ mikrosomálního proteinu. EROD: 19,78±11,99; 22,52±10,91; 17,72±11,37; 22,82±9,27 pmol.min⁻¹.mg⁻¹ mikrosomálního proteinu). U ryb ze skupiny 0,22 a 0,60 mg.L⁻¹ bylo zjištěno statisticky významné (p<0,05) zvýšení GSH a aktivity GST (Tab 1).

Tab 1: GSH a GST po 28denní expozici ryb přípravkem Successor 600

ukazatel/konc. přípravku	kontrola	0,06 mg.L ⁻¹	0,22 mg.L ⁻¹	0,60 mg.L ⁻¹
GSH [nmol.mg ⁻¹ proteinu]	2,12±0,50 ^a	2,57±0,72 ^{ab}	3,03±1,29 ^b	3,12±1,30 ^b
GST [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteinu]	123,74±17,62 ^a	124,85±16,66 ^a	141,44±18,41 ^b	185,19±23,27 ^c

n=22–24

rozdílné indexy označují signifikantní rozdíl hodnot (p<0,05)

Pro pethoxamid (přípravek Successor 600) je hlavním detoxikačním mechanismem zřejmě eliminace formy konjugované s glutathionem (Kato a kol., 2001). GSH je zásadní složkou buněčného antioxidačního mechanismu a klíčovým konjugátem elektrofilních substancí ve 2. fázi metabolisme. Konjugační reakce je primárně zprostředkována GST (van der Oost a kol., 2003).

Spartakus v koncentracích 0,36 a 1,08 mg.L⁻¹ indukoval (p<0,05) CYP a EROD. Korelace mezi oběma parametry byla statisticky vysoce významná (r=0,49; p<0,01).

Obsah glutathionu byl oproti kontrole zvýšen u ryb z koncentrace 1,08 mg/l ($p < 0,05$), aktivita GST vzrostla ($p < 0,05$) ve všech testovaných koncentracích (Tab 2).

Tab 2: CYP, EROD, GSH a GST po 28denní expozici ryb přípravkem Spartakus

ukazatel/konc. přípravku	kontrola	0,108 mg.L ⁻¹	0,36 mg.L ⁻¹	1,08 mg.L ⁻¹
CYP [nmol.mg ⁻¹ m. prot.]	0,17±0,07 ^a	0,20±0,08 ^a	0,29±0,08 ^b	0,29±0,13 ^b
EROD [pmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ m. prot.]	24,20±20,70 ^a	38,10±42,87 ^a	140,83±128,37 ^b	198,99±136,47 ^b
GSH [nmol.mg ⁻¹ proteinu]	5,10±2,20 ^a	5,45±1,69 ^a	5,61±2,02 ^a	7,64±3,07 ^b
GST [nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹ proteinu]	102,81±25,13 ^a	128,59±24,87 ^b	149,15±35,90 ^c	197,37±32,34 ^d

n=29–30

rozdílné indexy označují signifikantní rozdíl hodnot ($p < 0,05$)

Prochloraz (přípravek Spartakus) byl v organismu ryb metabolizován za využití enzymatických mechanismů 1. i 2. fáze biotransformace.

Závěr

Cílem práce bylo prezentovat výsledky testů toxicity z hlediska ovlivnění vybraných biochemických markerů a jejich možného využití pro monitoring zátěže vodního prostředí testovanými látkami. Navzdory obecně přijímanému faktu, že markery 2. fáze metabolizace xenobiotik (GSH, GST) jsou méně citlivými ukazateli znečištění než markery 1. fáze (CYP, EROD), byla jejich odezva na znečištění v našich experimentech výraznější. Tento nález je způsoben rozdílným způsobem detoxikace testovaných látek (přípravků) v játrech ryb. Pro ověření našich závěrů by bylo přínosné také sledování indukce/inhibice jednotlivých isoform cytochromu P450.

Poděkování

Práce byla financována v rámci výzkumného záměru MSM **6215712402** a grantu IGA **141/2008/FVHE**.

Literatura

K dispozici u autora.

Kontaktní adresa

MVDr. Ivana Haluzová (ihaluzova@vfu.cz), FVHE VFU Brno, Ústav veřejného vet. lékařství a toxikologie, Palackého 1/3, Brno 612 42

Distribuce rtuti u pstruha duhového v průběhu larválního a juvenilního období

Distribution of mercury in rainbow trout during larval and juvenile period

Kenšová Renáta, Kružíková Kamila, Havránek Jan, Haruštiaková Danka, Svobodová Zdeňka

Abstract

The aim of the study was to evaluate the content of total mercury in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during its larval and juvenile period and to evaluate the dynamics of the progression of this element's content in analyzed tissues. Groups of rainbow trout were obtained from farming conditions Velká Losenice in bi-monthly intervals. Mercury content was assessed in following tissues: muscle, liver and kidney. Together with obtaining animal samples, specimens of fish feed were withdrawn and analyzed. The content of mercury was determined in those samples by the method of atomic absorption spectrometry on AMA 254 analyzer. Linear dependence of mercury content on the age and weight of fish was proved in all fish tissues.

Keywords: Hg, AAS, *Oncorhynchus mykiss*, fish breeding

Úvod

Rtuť patří mezi nejsledovanější prvky v rybách už po dlouhou dobu vzhledem ke své vysoké toxicitě a zároveň slouží jako indikátor zátěže životního prostředí průmyslovými odpady (Svobodová et al., 1996; Svobodová et al., 2004). Jedná se o globální znečišťující látku distribuovanou v životním prostředí včetně bioorganismů. Nejvíce toxickou formou rtuti pro lidský organismus je organická methylrtuť. Pokud se týká ryb jako potravinových zvířat je hlavní pozornost zaměřena na hospodářsky významné druhy (kapr, pstruh duhový) (Svobodová et al., 2004). Zvyšování koncentrace zejména kovů v životním prostředí a následně v potravinách se stalo vážným hygienickým problémem. Bezpečnost potravin je v posledních letech prioritou v zemích EU.

Cílem práce bylo posoudit obsah celkové rtuti u pstruhů duhových v průběhu larválního a juvenilního období a zhodnotit dynamiku vývoje obsahu tohoto prvku v analyzovaných tkáních.

Materiál a metodika

Na pstruhařství Velká Losenice (součást Rybářství Velké Meziříčí a. s., okres Žďár nad Sázavou) byly v letech 2004 až 2005 v pravidelných dvouměsíčních intervalech (kromě zimního období) odebírány skupiny pstruhů duhových (*Oncorhynchus mykiss*) v průběhu larválního a juvenilního období (18 měsíců), tj. od jiker (A) až po tržní rybu (H). Celkem bylo odebráno 7 skupin ryb po deseti kusech (vyjma poslední skupiny H – odebráno 8 ks a skupiny A – vzorek jiker) ryb. Data jednotlivých odběrů, označení skupin, počet ryb, věk, celková délka těla a hmotnost ryb jsou shrnuty v tabulce č. 1. Ryby byly odkrmovány krmivem Aquastart o různé velikosti granulí od firmy Biomar A/S. Ryby byly změřeny, zváženy a odebrány vzorky tkání. Současně byly odebrány vzorky krmiv. Obsah rtuti byl analyzován metodou AAS na přístroji AMA 254. Obsah rtuti byl stanovován ve svalovině, játrech a ledvinách vždy, když bylo možno získat dostatečné množství tkáně k analýze (u souborů B a C byl k analýzám použit

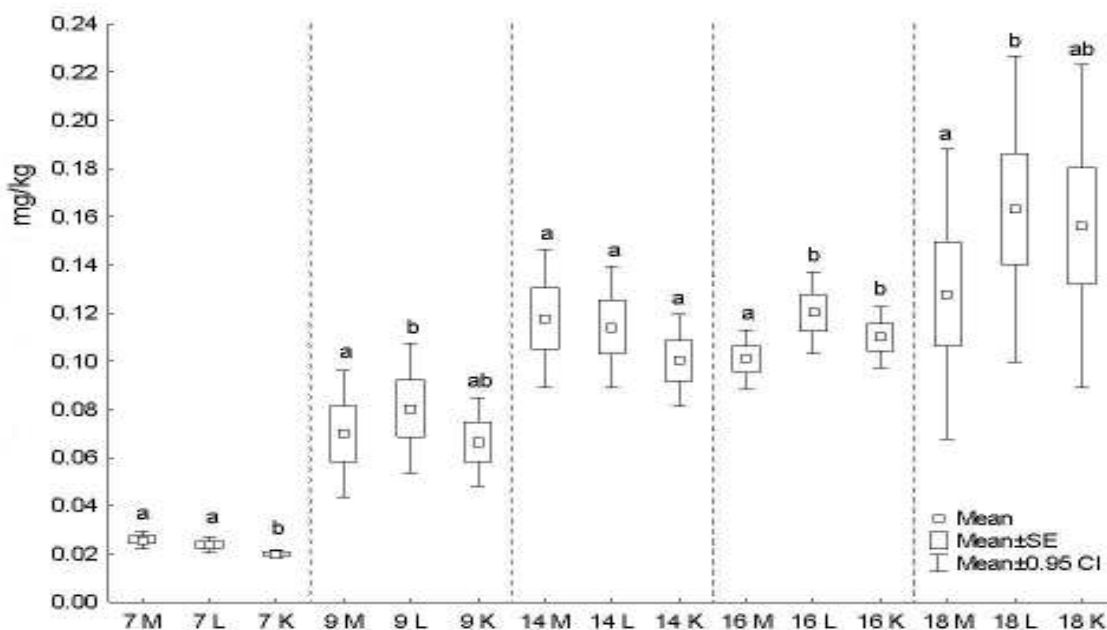
homogenát celých těl). Odebrané vzorky byly zamrazeny, neprodyšně uzavřeny v igelitových sáčcích a přechovávány až do analýz v hlubokomrazicím boxu při teplotě -86°C . Statistická analýza dat byla provedena za pomoci testu ANOVA a Tuckey testu.

Tabulka 1: Charakteristika analyzovaných skupin ryb

Skupina	Datum odběru	Věk (měsíce)	Počet ryb (ks)	Celková délka těla (mm)	Hmotnost (g)
A	20. 3. 2004	0,5	0	0	0
B	15. 5. 2004	3	10	$40 \pm 8,4$	$0,9 \pm 0,51$
C	16. 7. 2004	5	10	$72 \pm 8,5$	$5 \pm 2,2$
D	10. 9. 2004	7	10	$106 \pm 7,1$	$16 \pm 3,1$
E	18. 11. 2004	9	10	$168 \pm 13,5$	$54 \pm 9,1$
F	10. 4. 2005	14	10	$205 \pm 12,5$	$93 \pm 10,0$
G	16. 6. 2005	16	10	$235 \pm 10,9$	$152 \pm 13,5$
H	20. 8. 2005	18	8	$288 \pm 26,5$	$328 \pm 75,6$

Výsledky a diskuse

Obsah rtuti v tkáních pstruha duhového v závislosti na věku je uveden na grafu č. 1. V průběhu larválního a juvenilního období docházelo k lineárnímu nárůstu obsahu rtuti v analyzovaných tkáních. Z grafu vyplývá, že nejnižší koncentrace rtuti ve všech tkáních byly ve věkové skupině D (7 měsíců) a nejvyšší ve věkové skupině H (18 měsíců). Dále byla zjištěna pozitivní korelace mezi obsahem rtuti ve svalovině, játrech, ledvinách a hmotností a věkem ryb ($P < 0.001$).



Graf č. 1: Obsah rtuti v tkáních pstruha duhového v závislosti na věku (M – svalovina, L – játra, K – ledviny)

Součástí této práce byla také analýza krmiv předkládaných v průběhu larválního a juvenilního období pstruhům duhovým. Během této doby byly ryby postupně odkrmovány třemi typy krmiva od stejného výrobce lišící se různou velikostí granulí. Obsah rtuti v krmivech byl $0,0126 \text{ mg/kg}$ (velikost granulí 2 mm), $0,0401 \text{ mg/kg}$ (velikost granulí 3 mm) a $0,0859 \text{ mg/kg}$ (velikost granulí 4,5 mm). Výsledky měření jsou průměrnými hodnotami ze tří paralelních měření.

Většina publikovaných prací na téma sledování obsahu rtuti u ryb sleduje pouze obsah tohoto prvku u jednotlivých ryb nebo jejich souborů odlovených za účelem monitoringu zátěže životního prostředí nebo kvality potravin (Kružíková et al., 2008; Havelková et al., 2008; Maršálek et al., 2006; Houserová et al., 2006). Tato práce se zabývá obsádkou pstruha duhového chovanou ke komerčním účelům v provozních podmínkách pstruhařství a sleduje ji v průběhu larválního a juvenilního období. Po dobu těchto období trvající 18 měsíců byly používány tři různé typy krmiv o rozdílném obsahu rtuti. Poslední hodnocená skupina ryb představuje tržní ryby určené ke konzumaci, je zde tedy věnována pozornost i hledisku hygieny potravin.

V práci Ciardullo et al. (2008) sledovali mimo jiné obsah rtuti u pstruha duhového ve věkovém rozpětí 10–40 měsíců. Nejvyšší množství rtuti naměřili v ledvinách, následovaly žábry, svalovina, játra a kůže. Koncentrace rtuti ve svalovině nebyla závislá na růstu ryby. Nejnižší koncentrace rtuti v ledvinách byla naměřena ve 14 měsících a nejvyšší ve 40 měsících. Podobná situace byla i v játrech ale nejnižší hodnota rtuti byla zjištěna až v 16 měsících. Nejvyšší koncentrace rtuti u nejstarších skupin ryb byly v ledvinách a játrech, nejnižší v kůži. V naší práci se naopak potvrdila korelace mezi obsahem rtuti v tkáních a hmotností a věkem ryb. Nejvyšší množství rtuti jsme naměřili u nejstarší věkové skupiny (H) v játrech a ledvinách. Stejná situace byla i u skupiny G. Ve skupině F bylo zjištěno nejvyšší množství rtuti ve svalovině.

Závěr

Byla prokázána významná korelace mezi obsahem rtuti ve tkáních ryb a hmotností a věkem. Prokázán byl také lineární nárůst obsahu rtuti ve svalovině, játrech a ledvinách v průběhu larválního a juvenilního období. Je tedy možné vyslovit domněnku, že obsah rtuti v rybách závisí přímo úměrně na množství zkonzumovaného krmiva.

Poděkování

Práce byla realizována při řešení projektu MSM č. 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin.

Literatura

- Ciardullo S, Aureli F, Coni E, Guandalini E, Iosi F, Raggi A, Rufo G, Cubadda F 2008: Bioaccumulation potential of dietary arsenic, cadmium, lead, mercury and selenium in organs and tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) as a function of fish growth. *J. Agric. Food Chem* 56: 2442–2451
- Havelková M, Dušek L, Némethová D, Poleszczuk G, Svobodová Z 2008: Comparison of mercury distribution between liver and muscle – a biomonitoring of fish from lightly and heavily contaminated localities. *Sensors* 8: 4095–4109
- Houserová P, Kubáň V, Spurný P, Habarta P 2006: Determination of total mercury and mercury species in fish and aquatic ecosystems of Moravian rivers. *Vet Med-Czech* 51: 101–110
- Kružíková K, Randák T, Kenšová R, Kroupová H, Leontovyčová D, Svobodová Z 2008: Mercury and methylmercury concentrations in muscle tissue of fish caught in major rivers of the Czech Republic. *Acta Vet Brno* 77: 637–643
- Maršálek P, Svobodová Z, Randák T 2006: Total mercury and methylmercury contamination in fish from various sites along the Elbe river. *Acta vet Brno* 75: 579–585
- Svobodová Z, Máchová J, Vykusová B, Piačka V 1996: Kovy v ekosystémech povrchových vod. Edice metodik VÚRH Vodňany 49: 18 p.
- Svobodová Z, Hejtmánek M, Studnicka M, Randák T 2004: Obsah rtuti ve svalovině hospodářky významných druhů ryb na území ČR – přehled. *Veterinářství* 12: 702–706

Kontaktní adresa: Mgr. Renáta Kenšová, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno. E-mail: rkensova@vfu.cz

Výskyt esterů kyseliny ftalové v chovatelských potřebách určených pro psy

Occurrence of phthalic acid esters in breeding equipments for dogs

Kovářová Jana, **Tluchořová L.**, Jarošová A., Svobodová Zdeňka

Abstract

Phthalic acid esters (PEAs) are ubiquitous environmental contaminants that rank among priority risk pollutants, exerting negative effects on vital body functions (embryotoxic, teratogenic, carcinogenic and undesired effects on cell membranes) as it was clearly established. The most widespread PEAs are di-(n-butyl) phthalate (DBP) and di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) which are used as additives in plastics to contribute flexibility, so they are extensively used in packaging materials, medical equipment and all products made from polyvinylchloride like plastic toys and equipments for pets. In this study, concentrations of DBP and DEHP in breeding equipments for dogs, exactly 7 food and water dishes and 2 toys, were measured by HPLC/MS. Concentrations of DBP and DEHP were the highest in the toy Hundenapf (Trixie, USA) – 512,87 mg.kg⁻¹ resp. 140.48 mg.kg⁻¹, the lowest was in the dish Sushi 1 (Almica, ČR) – 0.04 mg.kg⁻¹ resp. 3.91 mg.kg⁻¹. The sum of DBP and DEHP was the highest in the toy Sausage (512.87 mg.kg⁻¹) and the lowest in the dish Sushi 1 (Almica, ČR) (3.95 mg.kg⁻¹). Content of PAEs in breeding equipments for dogs exceeds the limits defined for plastic products (CSTEE, 1998).

Keywords: *phthalates, pet, food dish, toys, DBP, DEHP*

Úvod

Estery kyseliny ftalové (PAE) jsou ubikvitárně rozšířené enviromentální kontaminanty syntetizované člověkem, zařazené mezi tzv. prioritní rizikové polutanty (US EPA), používané především jako plastifikátory umělých hmot, adhezivní prostředky do barev, přídatné složky pesticidů, repelentů, průmyslových olejů a kosmetiky. Největší zdroj kontaminace životního prostředí a zásadní negativní vliv na zdraví lidí a zvířat představují výrobky běžné potřeby z polyvinylchloridu (PVC), především plastové nádoby, hračky, obalové materiály pro potraviny, podlahové krytiny a zdravotnický materiál (Calafat et al., 2006). V plastických materiálech nejsou ftaláty chemicky vázané a mohou volně migrovat na povrch (Rijk, 2001), vyluhují se do prostředí, odpařují do ovzduší a jako všechny lipofilní látky se dobře kumulují v potravních řetězcích (Krauskopf, 2003). Do těla se dostávají PAE zejména perorálně s potravinami a vodou, žvýkáním a olizováním PVC předmětů, popř. při transfuzi, hemodialýze a jiných lékařských zákrocích, v menší míře kontaktem přes kůži a vdechováním. Mezi nejvíce rozšířené a tedy nejrizikovější PAE řadíme di-(n-butyl) ftalát (DBP) a di-(2-ethylhexyl) ftalát (DEHP) (Jarošová et al., 2009). Akutní toxicita těchto látek je poměrně nízká, pro potkana orální LD₅₀ DBP je 8-17 g.kg⁻¹, pro DEHP je 10-100 g.kg⁻¹ (Marhold et al., 1986). Při dlouhodobé expozici ovšem dochází ke kumulaci těchto látek v tukové tkáni a k chronickým embryotoxickým, teratogenním a karcinogenním účinkům (Latini, 2005). DEHP působí také výrazně hepatotoxicky, poškozují varlata a imunitní systém (Korach, 1998). Přestože je problematika ftalátů stále více diskutována, představují tyto látky celosvětově závažný ekologický, hygienický a zdravotní problém. V naší práci jsme se zaměřili na obsah DBP a DEHP v chovatelských potřebách určených pro psy, které dosud nebyly z pohledu kontaminace PAE studovány. Z pohledu veterinární medicíny lze takto zhodnotit zatížení společenských zvířat, u

kterých v posledních letech stoupá incidence nádorových onemocnění a dalších zdravotních problémů, a zároveň posoudit tyto pomůcky jako další možný zdroj kontaminace pro člověka, který přichází s těmito předměty do kontaktu.

Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 7 plastových misek určených pro psy od různých výrobců/distributorů a 2 hračky, u nichž nebyl výrobce ani distributor zjištěn – bližší popis – tab.1, obr.1.



Obr.1.

Tab.1. Identifikace chovatelských potřeb

Miska č.	výrobce/distributor	název/popis
1	IKEA (Indie)	BĀSTIS FOOD BOWL 12
2	Trixie (USA)	HUNDENAPF
3	SUM-PLAST (Polsko)	SUM-PLAST
4	Savic (Belgie)	PICNIC 1
5	TOMMI (ČR)	SMART BOWL
6	ALMICA (ČR)	SUSHI 1
7	Plaček s.r.o (ČR)	DOG FANTASY
Hračka č.		
1	-	balonek
2.1	-	klobása-bílá část
2.2	-	klobása-červená část

Množství ftalátů bylo z jednotlivých chovatelských potřeb extrahováno směsí rozpouštědel (hexan:aceton, 1:1). PAEs byly následně separovány gelovou permeační chromatografií (GPC). Konečná analýza vzorku po pročištění koncentrovanou kys. sírovou byla provedena vysokoúčinnou kapalinovou chromatografií s hmotnostní detekcí (HPLC/MS). Bližší popis metody stanovení ftalátů v různých typech matric je uveden v publikaci Jarošová et al. (1998).

Výsledky a diskuse

Obsah DBP a DEHP byl zjištěn ve všech zkoumaných pomůčkách (viz.tab.2). U hračky č.2 (2.1, 2.2) překročilo množství DEHP horní mez detekce. Suma DBP + DEHP v miskách pro psy se pohybovala v rozmezí od 3.95 mg.kg⁻¹ (miska č.6) do 156.68 mg.kg⁻¹ (miska č.2). Nejnižší obsah DBP byl naměřen u misky č.6 (0.04 mg.kg⁻¹), nejvyšší u hračky č.2 - klobása, v bílé části (512.87 mg.kg⁻¹). Naměřená množství DEHP byla v rozmezí od 3.91 mg.kg⁻¹ (miska č.6) do 140.48 mg.kg⁻¹ (miska č.2). Ve všech vybraných pomůčkách pro psy byly zjištěny obsahy ftalátů, které jsou srovnatelné s dostupnými informacemi o naměřeném množství v plastových obalech a výrobcích z PVC pro lidskou potřebu (Jarošová et al., 2009). Kromě celkového množství určitého PAE je dalším důležitým kritériem jeho rizikového potenciálu rozdílná extrahovatelnost do prostředí. Je dokázáno, že tyto látky přecházejí do krmiva v závislosti na typu PAE a obsahu tuku v krmivu. Podobně různé typy ftalátů obsažené v hračkách určených ke žvýkání, se do slin uvolňují v různém množství v závislosti na jejich rozpustnosti ve vodě. Extrahované množství DEHP koreluje s aktuální koncentrací v PVC materiálu, zatímco uvolňování DBP je 4krát vyšší než z PVC obsahujícího stejné množství DEHP (Rijk, 2001). Evropská komise stanovila tolerovatelné denní dávky DBP (0.1 mg.kg⁻¹ ž.hm./den) a DEHP (0.037 mg.kg⁻¹ ž.hm./den) uvolňující se z PVC (CSTEE, 1998). Dalším právním předpisem, který nám může pomoci zhodnotit rizika plastových výrobků pro psy, je vyhláška o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami, které nesmějí uvolňovat do potravin své vlastní složky ve větším množství než 10 mg.dm⁻² nebo 60 mg.kg⁻¹ (Vyhl. MZd 38/2001 Sb.). Dle těchto norem

můžeme misky č. 2,3 a hračku č.1 označit za méně vhodné a hračku č.2 za rizikovou. Z pohledu vyhlášky MZd 84/2001 Sb, podle které musí hračky a plastové výrobky pro děti do tří let splňovat hygienické limity obsahu PAE do 0.1% hmotnosti, lze usuzovat, že hračka č.2 může negativně ovlivňovat zdraví společenských zvířat. Z výsledků vyplývá, že některé plastové chovatelské potřeby mohou představovat další významný zdroj kontaminace PAE pro zvířata i člověka.

Tab.2. Obsah DBP a DEHP v chovatelských potřebách

Miska č.	[mg/kg]			mg v 1 dm ²		
	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP
1	2.15	27.86	30.01	0.018	0.238	0.256
2	16.21	140.48	156.68	0.387	3.355	3.742
3	6.76	52.03	58.79	0.076	0.583	0.658
4	0.17	6.14	6.31	0.002	0.066	0.068
5	1.20	4.76	5.96	0.029	0.116	0.145
6	0.04	3.91	3.95	0.001	0.092	0.093
7	0.93	6.15	7.08	0.021	0.139	0.160
Hračka č.	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP	DBP	DEHP	Σ DBP+DEHP
1	86.85	50.25	137.10	-	-	-
2.1	512.87	N*	-	-	-	-
2.2	441.09	N*	-	-	-	-

*nezměřeno-překročena horní mez detekce

Literatura

US EPA WORKING GROUP: An exposure and risk assessment for phthalate esters, *Environmental Protection Agency*, 1981, 440/4-81-020 175 s.

CALAFAT AM, MCKEE RH. Integrating biomonitoring exposure data into the risk assessment process: phthalates [diethyl phthalate and di(2-ethylhexyl) phthalate] as a case study, *Environ Health Perspect*, 2006, vol. 114, no. 11, 1783–1789.

RIJK R, EHLERT K. Migration of phthalate plasticizers from soft PVC toys and childcare articles, *TNO report*, 2001, 5 p.

KRAUSKOPF LG. How about alternatives to phthalate plasticizers? *J. Vinyl. Additive Technol.*, 2003, vol. 9, no. 4, 159–171.

JAROSOVA A, HARAZIM J, KRATKA L, KOLENICKOVA D. Screening of phthalic acid esters in raw materials, premixes and feed additives. *Environ Chem Lett*, 2009, DOI: 10.1007/s10311-009-0237-7.

MARHOLD J. *Přehled průmyslové toxikologie. Organické látky. 1. vyd. Praha: Avicenum, zdravotnické nakladatelství, n.p.*, 1986, ISBN: 08-059-86.

LATINI G. Monitoring phthalate exposure in humans. *Clin. Chim. Acta*, 2005, vol.361, no. 1-2, 20–29.

KORACH KS. *Reproductive and developmental toxicology*, Marcel Dekker, NY, 1998, ISBN 0-8247-9857-0, 722 p.

JAROSOVA A., GAJDUSKOVA V, RASZYK J, SEVELA K. Determination of phthalic acid esters (PAE) in biological materials by HPLC. *Czech J Food Sci*, 1998, vol. 16, 122-130.

CSTEE: Phthalate migration from soft PVC toys and childcare articles, *CSTEE third plenary meeting*, Brusel, 1998.

Vyhláška MZd. č.38/2001 Sb. o hygienických požadavcích na výrobky určené pro styk s potravinami a pokrmami, ze dne 19. ledna 2001.

Vyhláška MZd č.84/2001 Sb. o hygienických požadavcích na hračky a výrobky pro děti ve věku do 3 let, ze dne 8.února 2001.

Kontaktní adresa:

Jana Kovářová, MVDr, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, jkovarova@vfu.cz

Analýza melaminu v mase Determination of melamine in meat

¹Novák Pavel, ¹Suchý Pavel, ²R.Germuška, ²M.Vičáková

¹ University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, ČR

² State Veterinary and Food Institute Dolny Kubin, SK

Abstract

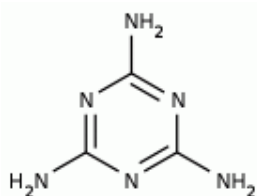
In the present study, we focused on analysis of the toxicity of melamine and its derivative, especially Cyanuric Acid. Study has two main tasks. The first is to monitor the distribution of melamine and Cyanuric acid and also found the concentration of both substances in the body of chickens.

The second task is to find and compare different methods determination of both substances by gas chromatography. Samples will be analyzed by conventional gas chromatography mass spectrometer and two-dimensional gas chromatography with FID detector. The results should serve for the next phase of the experiment.

We would also like to answer the questions: Do you need a mass spectrometer? Or does GCxGC provide the necessary selectivity?

Keywords: melamine, cyanuric acid, GC/MS/MS, GCxGC/FID, food products

Melamin, 2,4,6-triamino-1,3,5-triazin je organická sloučenina, která se používá při výrobě umělých hmot a průmyslových hnojiv. Melamin je ve vodě velmi málo rozpustný. Obsahuje 66 % dusíku. Ze stejného důvodu je někdy nezákonně přidáván do potravin, aby maskoval nedostatečný obsah bílkovin. Melamin je sám o sobě v malých dávkách netoxický, v kombinaci s kyselinou kyanurovou však může vést ke vzniku smrtelných ledvinových kamenů, protože s ní tvoří nerozpustný melamin kyanurát.



Toxická dávka je srovnatelná jako u kuchyňské soli a LD₅₀ přesahuje 3 gramy na kilogram živé váhy. Melamin a kyanurová kyselina se vstřebávají do krevního řečiště, koncentrují se a interagují v renálních mikrotubulech naplněných močí. Potom krystalizují a vytvářejí velká množství kulatých žlutých krystalů, které blokují a poškozují ledvinové buňky ohraničující mikrotubuly. To vede k selhání ledvin ^[1].

Sumární vzorec	C ₃ H ₆ N ₆
Molární hmotnost	126,121 g/mol
Teplota tání	-85,6 °C
Teplota varu	31,4 °C
Hustota	0,936 g.cm ⁻³

Princip metody

Vzorky se extrahují směsí acetonitril:voda:diethylamin a analyty jsou potom konvertované na trimethylsilyl deriváty. Metoda využívá nástřík PTV v kombinaci s plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem, či detektorem FID. Metoda je vhodná na stanovení melaminu, ammelidu, ammelínu a kyseliny kyanurové v suchých proteinových materiálech a jiných potravinách.

Chemikálie roztoky a použitá technika

Extrakční roztok: 10/40/50: DEA/voda/acetonnitril. Silanizační činidlo: BSTFA s 1% TMCS [bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamidem s 1% trimethylchlorsilanem]. Roztok: 20/80: DEA/voda, plynový chromatograf SATURN 4D s iontovou pastí, dvoudimenzionální plynový chromatograf s detektorem LECO GCxGC/FID

Experiment

K celému pokusu bylo použito 40 kuřat, které byly rozděleny do čtyř skupin po 10 kusech. Kuřata byla krmena standardním krmivem s přísádky kontrolovaných a později měřených látek. První skupina sloužila jako kontrolní vzorek bez přísádky kontaminantu, druhé skupině se podávalo krmivo s přísádkou 100mg Melaminu na 10kg krmiva, třetí skupině 100mg kyseliny kyanurové na 10kg krmiva a poslední čtvrté skupině směs melaminu a kyseliny kyanurové taktéž po 100mg na 10kg krmiva. Při experimentu se uvažovalo, že každé kuře spotřebuje denně stejné množství potravy. Kontaminované krmivo se podávalo 30dní, během kterých došlo k úhynu 5 jedinců, což průměrné počet. Kuřatům nebyla podávána smrtelná dávka, takže žádné ze zvířat neuhynulo na následky podávání kontaminantů. Po 30 dnech došlo u kuřat k průměrnému váhovému příbytku 800g a byly odebrány z každé testované skupiny čtyři typy vzorku, játra ledviny, prsní a stehenní svalovina, které se u každé skupiny homogenizovali. Vzorky nebyly podrobeny histologické kontrole, ale u jater a ledvin nebyly visuelně posouzeny žádné viditelné změny, tak jak udává literatura při podání smrtelných dávek.

Příprava negativního vzorku: 0,5g homogenizovaného vzorku navážit do 50ml polypropylénové zkumavky a přidat roztok všech standardů a dále pokračovat dle postupu přípravy reálného vzorku

Příprava reálného vzorku k analýze: Přidat 20ml extrakčního činidla DEA/voda/acetonnitril a mixovat 1min. Centrifugovat 10min. při rychlosti 5000xg, potom přefiltrovat přes nylonový papír zrnitosti 0,45 μ m. Odebrat 200 μ l a odpařit při 70°C do sucha. Přidat 200 μ l pyridinu a 200 μ l silanizačního činidla SYLON BFT a 100 μ l IS benzoguanaminu (1mg/l v pyridinu). Promíchat a inkubovat 45min. při teplotě 70°C [2].

Tabulka č.1: Vzorkování, vzorky se připravovaly a popisovali podle tabulky č. 1

		Prsní svalovina	Stehenní svalovina	Játra	Ledviny
Skupina 1Ko	Kontrolní vzorek	P 1Ko	S 1Ko	J 1Ko	L 1Ko
Skupina 2M	Melamin	P 2M	S 2M	J 2M	L 2M
Skupina 3K	Kyselina kyanurová	P 3Ky	S 3Ky	J 3Ky	L 3Ky
Skupina 4MK	Melamin + Kyselina kyanurová	P 4MK	S 4MK	J 4MK	L 4MK

Chromatografická analýza

GCMS podmínky 1: Plynový chromatogram SATURN4D

Kapilární chromatografická kolona: CP Sil 8 CB Low Bleed/MS 30m x 0,25mm ID, DF=0,25 kat.číslo CP 5860 init time 85°C 3min, 15°C/min do 320°C, držet 2min.

Injektor PTV: init time 95°C 1min, 155°C/min do 250°C držet 15min

Xfer Line 290°C

MS/MS Detektor: A/M amplitude 3,5V, Emission current 80 μ A, Manifold heater 220°C, průtok He50ml/min [2].

GCMS podmínky 2: Plynový chromatogram GCxGC/FID

30m x 0.25mm x 0.25 μ m Rxi-17, 50% diphenyl / 50% dimethyl, 75°C (1min), 4°C/min to 300°C Thermal modulation, 6 sec, 1m x 0.15mm x 0.15 μ m Rxi-1ms, 100% dimethyl, 85°C (1min), 4°C/min to 310°C

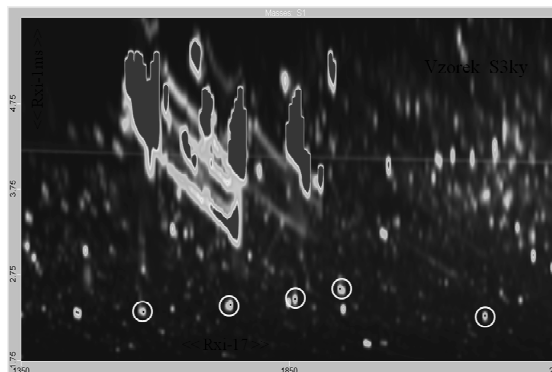
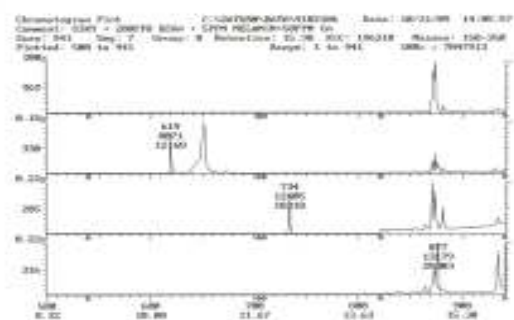
Výsledky

Tabulka č.2: Výsledky měření melaminu a kyseliny kyanurové v prsní svalovině a stehenní svalovině

Tabulka č.3: Výsledky měření melaminu a kyseliny kyanurové v játrech a ledvinách vpravo

Prsní svalovina/ Stehenní svalovina	MELAMIN v mg/kg	kyselina kyanurová v mg/kg
P1Ko / S1Ko		
P1Ko / V + 5mg/kg melamin + 50mg/kg CA		
P2M / S2M	4,9 / 4,4	24,9 / 4
P3KY / S3KY	0,3 / 0,4	25,4 / 17,3
P4M/K / S4M/K	1,8 / 1,8	1,3 / 1,9

Játra / Ledviny	MELAMIN v mg/kg	kyselina kyanurová v mg/kg
J1Ko / L1Ko		
J1Ko / L1Ko + 5mg/kg melamin + 50mg/kg CA		
J2M / L2M	3,3 / 8,7	- / 2,4
J3KY / L3KY	- / 0,9	- / -
J4M/K / L4M/K	0,9 / 2,6	- / -



Chromatogram č.1: analýza vzorku S3Ky- stanovení melaminu ve stehenní svalovině

Chromatogram č.2: výsledek analýzy vzorku S3Ky, metodou 2, vpravo, S3Ky, chromatografickou metodou 2. Na dvourozměrném chromatogramu je vidět ukázkové rozdělení všech přechodových forem melaminu až po kyselinu kyanurovou. Zleva označeny kroužkem kys.kyanurová, ammelid, ammelin, melamin a cyromazin.

Závěr

Po melaminové aféře v Číně v srpnu 2008 se na kontrolu melaminu v potravinách a potravinových doplncích obrátila větší pozornost. Evropské normy pro limity této látky v potravinách se několikrát průběžně upravovali a hledala se i vhodná metodika pro jejich univerzální stanovení v reálných vzorcích. Provedenými analýzami se potvrdila přítomnost melaminu a kyseliny kyanurové v cíleně kontaminovaných vzorcích i v nezávisle provedených analýzách různých potravin. Výsledky byly úspěšně porovnány s analýzami na jiných pracovištích a byla taktéž potvrzena použitelnost popsané analytické metody. Metoda je vhodná pro všechny proteinových vzorky a vzorky jiných potravin, což ji dělá univerzální a získaná data touto metodou měření byla analyticky čistá bez interferencí.

Experiment dále prověřil použití dvou chromatografických metod k analýze melaminu a kys.kyanurové. První zavedenou a ověřenou konveční metodou byla analyzována celá sada vzorků, jejichž výsledky jsou uvedeny v tabulkách. Výsledky s použitím dvourozměrné plynové chromatografie, bez použití hmotnostní detekce, korelovaly s výsledky získanými chromatografickou metodou č.1. Metodou č.2 budeme tedy schopni v dalších fázích experimentu měřit v jedné analýze všechny sledované látky s výjimečnou separací a s podstatně kratším strojovým časem.

Literatura

1. **Melamin** - Wikipedie, otevřená encyklopedie, <http://cs.wikipedia.org/wiki/Melamin>
2. Standardní pracovní postup: Stanovení MELAMÍNU metodou GC/MS/MS, ŠVPÚ Dolný Kubín 2007

Kontaktní adresa

Mgr. Pavel Novák, Pavlovská 19, 623 00 Brno, LECO Instrumente Plzeň, Sokolovská 219, Praha 9, 190 00, pavel.novak@leco.cz

Vyhodnocení monitoringu výskytu léčiv v povrchových vodách v ČR

Evaluation of pharmaceuticals monitoring in surface waters in the Czech Republic

Prášková Eva, Voslářová Eva, Pištěková Vladimíra, Svobodová Zdeňka

Abstract

Interest in the occurrence of pharmaceuticals in the water environment has increased significantly in recent years due to their potential impacts on public health. Our study summarizes results of monitoring pharmaceuticals in surface waters in the Czech Republic obtained from the Czech Hydrometeorological Institute. The most frequent occurrence and highest concentrations were detected in ibuprofen, carbamazepine, sulfamethoxazole and diclofenac.

Klíčová slova: carbamazepine, diclofenac, ibuprofen, vodní toky, odpadní vody, POCIS

Úvod

Vlivem lidské činnosti se do životního prostředí uvolňují nejrůznější kontaminanty. Nejčastěji se jedná o pesticidy, přípravky pro osobní hygienu, léčiva a detergenty, kdy zejména u léčiv je v posledních letech zaznamenáno rostoucí užívání (až nadužívání), což se projevuje na jejich výskytu prakticky ve všech složkách životního prostředí (Kotyza aj., 2009).

Léčiva bývají většinou vysoce odolná vůči čistírenským procesům, a tak je lze často detekovat při monitoringu povrchových vod. Ternes et al. (2007) se zabývali monitoringem výskytu léčiv v odpadních vodách a řekách v Německu, Rakousku, Polsku, Španělsku, Francii, Švýcarsku a Finsku. Výsledky monitoringu dokazují přítomnost minimálně některých ze sledovaných léčiv v povrchových vodách všech uvedených států. Nejvyšší koncentrace léčiv byly detekovány v Německu. Srovnatelné koncentrace byly ve většině zemí detekovány u carbamazepinu a diclofenacu. Zhang et al. (2008) uvádějí, že carbamazepine a diclofenac jsou v současnosti nejčastěji se vyskytující léčiva v povrchových vodách. Účinnost čistíren odpadních vod je v případě carbamazepinu ve většině případů menší než 10 %, u diclofenacu se pohybuje v rozmezí 0 – 80 % podle použité technologie. Také Gómez et al. (2007) při monitoringu výskytu léčiv v odpadních vodách a hodnocení rizik vstupu těchto látek do vodního prostředí na pobřeží Středozemního moře dospěli k závěru, že účinnost čistíren odpadních vod je u těchto látek nedostatečná. Kasprzyk-Hordern et al. (2009) analyzovali z pohledu výskytu léčiv odpadní vody ve Walesu, nejvyšší koncentrace (>10 µg/l) zjistili u paracetamolu, tramadolu, codeinu, gabapentinu a atenololu. Další studie (např. Bartelt-Hunt et al., 2009; Velicu and Suri, 2009; Yu and Chu, 2009) se zabývali sledováním výskytu léčiv a přípravků pro osobní hygienu ve vodních tocích v USA. O celosvětovém významu a závažnosti dané problematiky svědčí i vytvoření databáze shrnující výsledky 117 mezinárodních vědeckých prací s cílem kvantifikovat koncentrace, frekvenci výskytu a možnosti odstranění farmaceutických produktů v čistírnách odpadních vod (Miege et al., 2009).

Materiál a metodika

Cílem předložené práce bylo vyhodnotit výsledky monitoringu výskytu léčiv v povrchových vodách v České republice získané ve spolupráci s Českým hydrometeorologickým ústavem (ČHMÚ). ČHMÚ zabezpečuje provoz státní sítě sledování jakosti vody v tocích, státní sítě sledování jakosti podzemních vod a řady mezinárodních monitorovacích aktivit a projektů. Odběry vzorků povrchových a podzemních vod a jejich rozborů zajišťuje ČHMÚ v externích akreditovaných laboratořích. Pro účely předložené studie byly použity údaje ze screeningu léčiv, který proběhl v roce 2007 formou odběru 1 bodového vzorku na 5 lokalitách v ČR (Zelčín - Vltava, Valy - Labe, Hrádek nad Nisou - Lužická Nisa, Bohumín - Odra, Židlochovice - Svratka) a dále výsledky získané v letech 2007 – 2008 prostřednictvím pasivních vzorkovačů, tzv. POCIS (Polar Organic Chemical Integrative Sampler).

Výsledky a diskuse

Výsledky monitoringu povrchových vod ČHMÚ metodou odběru jednoho bodového vzorku na pěti lokalitách v ČR v roce 2007 jsou uvedeny v tabulce č. 1. Z výsledků vyplývá, že nejvyšší koncentrace léčiv v rámci sledovaných lokalit byly zjištěny v lokalitě Hrádek nad Nisou (Lužická Nisa). Ve všech lokalitách byla detekována rezidua ibuprofenu, carbamazepinu, sulfamethoxazolu a naproxenu. Nejvyšší koncentrace byly ve vodních tocích zjištěny u ibuprofenu, carbamazepinu a sulfamethoxazolu. Výsledky monitoringu povrchových vod v ČR jsou srovnatelné s výsledky zahraničních studií (Ternes et al., 2007; Zhang et al., 2008; Bartelt-Hunt et al., 2009; Yu and Chu, 2009 a další). Distribuce léčiv do vodního prostředí je umožněna především jejich nedostatečným zachycováním ze splašků v čistírnách odpadních vod a také formou průsaků ze skládek, z farmaceutických výrobních zařízení apod. (Kotzya aj., 2009).

Tabulka č. 1: Výsledky monitoringu léčiv formou odběru 1 bodového vzorku na 5 lokalitách v ČR v r. 2007

Léčivo	Počet pozitivních vzorků	Zjištěná koncentrace (ng/l)	Lokalita s nejvyšší zjištěnou koncentrací daného léčiva
Ibuprofen	5	92 - 389	Hrádek nad Nisou
Carbamazepine	5	76 - 214	Židlochovice
Sulfamethoxazole	5	36 - 100	Hrádek nad Nisou
Diclofenac	5	7 - 18	Židlochovice
Naproxen	5	5 - 17	Hrádek nad Nisou
Bezafibrate	4	3 - 9	Hrádek nad Nisou
Ketoprofen	1	53	Hrádek nad Nisou

Výsledky monitoringu povrchových vod získané ČHMÚ prostřednictvím pasivních vzorkovačů (POCIS) v letech 2007 – 2008 jsou uvedeny v tabulce č. 2.

I když se v tomto případě nejedná o reálné koncentrace sledovaných léčiv přímo ve vodních tocích, lze z údajů odvodit míru výskytu těchto léčiv ve vodním prostředí. Z výsledků vyplývá, že nejčastěji a zároveň v nejvyšších koncentracích byla ve vzorkovačích zachycena následující léčiva: diclofenac, carbamazepin, sulfamethoxazole, sulfapyridin a trimethoprim.

Tabulka č. 2: Výsledky monitoringu povrchových vod získané prostřednictvím pasivních vzorkovačů (POCIS) v letech 2007 – 2008

Léčivo	Počet pozitivních vzorků (celk. počet 42)	Maximální zjištěná koncentrace	Lokalita s nejvyšší koncentrací daného léčiva v POCIS
Diclofenac	42	1329 ng/ POCIS	Ústí nad Labem - Bílina
Carbamazepine	42	921 ng/ POCIS	Bohumín - Odra
Sulfamethoxazole	40	533 ng/ POCIS	Pohansko - Dyje
Sulfapyridin	40	282 ng/ POCIS	Ústí n. Labem - Bílina
Trimethoprim	42	207 ng/ POCIS	Hrádek n. Nisou - Lužická Nisa
Sulfamethazine	15	59 ng/ POCIS	Ústí n. Labem - Bílina
Sulfamethoxyypyridazine	1	10 ng/ POCIS	Ústí nad Labem - Bílina
Diaverdine	0	-	-
Sulfachlorpyridazine	0	-	-

O účincích léčiv na životní prostředí je v současnosti k dispozici stále málo informací, protože výzkumné projekty sledující tyto účinky jsou náročné jak finančně, tak časově (Kotyza aj., 2009). Tyto efekty je přesto nutno začít monitorovat, protože nebezpečí reziduí těchto látek v životním prostředí spočívá také v možnosti jejich vstupu do potravních řetězců, kde následně ohrožují i člověka jako konzumenta (Ramirez et al., 2009). Nelze opomíjet ani dopad na zdraví člověka z kontaminované pitné vody (Velicu and Suri, 2009).

Poděkování

Tato práce vznikla s podporou prostředků výzkumného záměru MSM6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

Literatura

K dispozici u autorů.

Kontaktní adresa

Mgr. Eva Prášková, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, epraskova@vfu.cz

Stanovení akutní toxicity chemických látek pro okřehek menší (*Lemna minor*) pomocí mikrometody

Assessing the acute toxicity of chemicals in duckweed (*Lemna minor*) using microbiotests

Soukupová Ivana, Beklová Miroslava

Abstract

Modified ČSN EN ISO 20079 was used for verification of microbiotest application of duckweed (*Lemna minor*) in assessing toxic impact of chemicals. The modification consists in using polystyrene macroplates, with the advantage of requiring low sample volumes for the test (10 ml). Plants *Lemna minor* were cultivated as a monoculture by various doses of chemicals for seven days. The aim of our work was to compare the acute toxicity (168hEC₅₀) obtained from conventional testing (100 ml) and from microbiotests (10 ml) using reference toxicants: potassium chloride and 3,5 – dichlorphenol made in the same time. The toxic influence of reference toxicants was evaluated on a basis of growth inhibition expressed as number of leaves and comparison of growth rates. The result value 168hEC₅₀ for potassium chloride using conventional test was 9.78 g.l⁻¹ and for 3,5 – dichlorphenol it was 5.71 mg.l⁻¹. The result values from microbiotests were 8.69 g.l⁻¹ and 4.24 mg.l⁻¹, respectively. From the comparison of measured 168hEC₅₀ values of acute toxicity from conventional test and microbiotest, we can conclude that microbiotests are a convenient alternative to today commonly used ecotoxicological biotests.

Klíčová slova: okřehek menší (*Lemna minor*), mikrometoda, chlorid draselný, 3,5 – dichlorfenol

Úvod

Okřehek menší (*Lemna minor*) se díky své malé velikosti a rychlému vegetativnímu růstu při pH vody v rozmezí 5 – 9 považuje za ideální organismus pro laboratorní testy toxicity a využívá se jako bioindikátor ekotoxikologických změn ve vodním prostředí (Radic a kol., 2009, Beklová, 2003). Česká norma ČSN ISO 20079 i metodika OECD 221 ho uvádí jako vhodný druh pro testování odpadních vod, za významný druh ho lze považovat i z hlediska postavení v potravním řetězci, kdy jako zástupce producentů je zdrojem potravy zejména pro ryby a vodní ptactvo. Jako referenční látky obě metodiky shodně uvádějí chlorid draselný a 3,5 – dichlorfenol. V metodě stanovení inhibice růstu okřehek (*Lemna minor*) dle výše uvedené normy se testují vzorky o minimálním objemu 100 ml. Současný trend ve vývoji ekotoxikologických biotestů vede mimo jiné k jejich miniaturizaci s důrazem na jednoduchost provedení, časovou a materiálovou nenáročnost, citlivost, reprodukovatelnost a minimální produkci odpadních vod. Použití menších objemů vzorků v miniaturizovaném provedení, se jeví jako vhodná alternativa ke standardně používaným ekotoxikologickým biotestům. Testovanými organismy využívanými v mikrobiotestech jsou bakterie, prvoci, řasy, bezobratlí, rybí tkáňové kultury atd. (Maršálek, 2004). Standardizovaná metoda mikrobiotestu, která by využívala okřehek, zatím neexistuje.

Cílem práce bylo stanovit akutní toxicitu chloridu draselného a 3,5 – dichlorfenolu pomocí mikrometody a porovnat výslednou hodnotu 168hEC₅₀ s hodnotou dosaženou kultivací okřehek v konvenčních podmínkách testu, které stanoví

norma ČSN ISO 20079 Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek menší (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehek.

Materiál a metodika

Akutní toxicita chloridu draselného a 3,5 – dichlorfenolu na okřehek menší byla stanovena na základě testu provedeného podle normy ČSN EN ISO 20079. Tyto referenční látky jsme testovali při dodržení podmínek uvedené metodiky, a to ve skleněných kádinkách v objemu 100 ml, ale také jako součást experimentálního ověřování, v objemu 10 ml, v rámci mikrometody. Jako kultivační nádoby byly k tomuto účelu použity polystyrenové makrotitrační destičky s plochým dnem, skládající se ze šesti jamek a s maximálním objemem každé jamky 15 ml. Spodní díl makrodestičky a její víčko jsou navrženy tak, že je zde zachován prostor, který umožňuje volný přístup kyslíku k rostlinám a zároveň zabraňuje rychlému odpaření media v průběhu testu. Konvenční experiment podle výše uvedené normy využívá překrytí potravinářskou fólií.

Rostliny byly v experimentu pěstovány různých koncentracích testované látky po dobu sedmi dní. Pro výpočet hodnoty $168hEC_{50}$ jsme pro chlorid draselný zvolili koncentrační řadu 3; 4; 7; 10 a 15 $g.l^{-1}$ a pro 3,5 – dichlorfenol koncentrační řadu 1,5; 2,1; 3; 4,2 a 5,9 $mg.l^{-1}$. K přípravě koncentrační řady testovaných látek byl použit uměle připravený živný roztok SIS o pH 6,5 (OECD, 2002). Experiment se skládal z pěti opakování pro každý vzorek. Výchozí počet rostlin - lístků v testovaném objemu 100 ml byl devět, v mikrometodě byl zredukován na pět.

Výsledky a diskuse

Kritéria platnosti (validace) uvedená v normě ČSN ISO 20079 zahrnují zachování všech doporučených postupů a podmínek, dále průměrný počet rostlin v kontrole musí mít průměrnou specifickou růstovou rychlost nejméně 0,275 za den, což odpovídá době zdvojení přibližně 2,5 dne a 7 násobnému zvýšení průměrného počtu lístků na konci testu.

Námi provedené testy, jak konvenční test (100 ml) tak i mikrotest (10 ml) podmínky validace splnily. Jako referenční látky mají být použity chlorid draselný a 3,5 – dichlorfenol, výsledky testů norma vyhodnocuje na základě stanovení inhibice růstu porovnáním růstových rychlostí (I_{μ}). Výsledná hodnota $168hEC_{50}$ pro 3,5 – dichlorfenol má být v rozsahu 2,2 – 3,8 $mg.l^{-1}$ v modifikovaném Steinbergově médiu. A hodnota $168hEC_{50}$ chloridu draselného v APHA médiu má být v rozmezí 5,5 – 10,0 $g.l^{-1}$. Norma, pokud jsou splněna kritéria platnosti, připouští i použití jiných médií, např. SIS média. Pro toto médium ovšem nejsou známy hodnoty akutní toxicity doporučených referenčních látek.

Výsledkem experimentu za použití objemu 100 ml (konvenční metoda) byla výsledná hodnota $168hEC_{50}$ chloridu draselného stanovena na 9,78 $g.l^{-1}$ (95% interval spolehlivosti = 9,16 – 10,40) a při testování 3,5 – dichlorfenolu na 5,71 $mg.l^{-1}$ (95% interval spolehlivosti = 5,52 – 5,90). Při použití objemu 10 ml (mikrometoda) byla výsledná hodnota $168hEC_{50}$ chloridu draselného stanovena na 8,69 $g.l^{-1}$ (95% interval spolehlivosti = 8,18 – 9,20) a pro 3,5 – dichlorfenol $168hEC_{50}$ na 4,24 $mg.l^{-1}$ (95% interval spolehlivosti = 4,15 – 4,33).

Z našich výsledků, za použití SIS média, byly výsledné hodnoty akutní toxicity chloridu draselného ve shodě se stanoveným rozmezím koncentrací, které je uvedeno v kritériích platnosti pro APHA médium. Pro 3,5 – dichlorfenol byly námi zjištěné výsledné hodnoty akutní toxicity $168hEC_{50}$ 5,71 a 4,24 $mg.l^{-1}$, což jsou hodnoty vyšší, než je rozsah koncentrací uvedený v normě (2,2 – 3,8 $mg.l^{-1}$). Tyto hodnoty EC_{50} jsou však platné za použití modifikovaného Steinbergova média.

Závěr

Z provedených testů akutní toxicity dvou referenčních toxikanitů (chloridu draselného a 3,5 – dichlorfenolu) pro okřehek menší (*Lemna minor*) za použití standardní metody i její modifikace spočívající v miniaturizaci, byly získány srovnatelné výsledky.

Výsledná hodnota $168hEC_{50}$ chloridu draselného, za použití konvenčního testu, byla 9,78 $g.l^{-1}$ a při testování 3,5 – dichlorfenolu, 5,71 $mg.l^{-1}$. Hodnota $168hEC_{50}$ za použití mikrometody u chloridu draselného byla 8,69 $g.l^{-1}$ a u 3,5 – dichlorfenolu, 4,24 $mg.l^{-1}$. Na základě získaných výsledků, lze mikrometodu pro stanovení toxických účinků chemických látek, odpadů a odpadních vod považovat za vhodnou alternativou ke standardně používaným ekotoxikologickým biotestům

Poděkování

Práce byla realizovaná za přispění finančních prostředků FRVŠ 2691/2010.

Literatura

BEKLOVÁ, M. Využití okřehku menšího *Lemna minor* ve vodní toxikologii = Use of Duckweed *Lemna minor* in Aquatic Toxicology. In *Toxicita a biodegradabilita odpadů a látek významných ve vodním prostředí*. Soláň, 2003, s. 16-20.

MARŠÁLEK, B. Aktuální trendy v ekotoxikologii vodních ekosystémů. In: KOČÍ, V., MARŠÁLEK, B., TLUSTÁ, P. (Eds.), 2004. Ekotoxikologické biotesty, 4, s. 5–7.

RADIC, S., STIPANICEV, D., CVJETKO, P., MIKELIC, I., L., RAJCIC, M., M., SIRAC, S., PEVALEK-KOZINA, B., PAVLICA, M. Ecotoxicological assessment of industrial effluent using duckweed (*Lemna minor* L.) as a test organism. *Ecotoxicology*, 2010, vol.19, no.1, s. 216 – 222.

ČSN ISO 20079 Jakost vod – Stanovení toxických účinků složek vody a odpadní vody na okřehek menší (*Lemna minor*) – Zkouška inhibice růstu okřehku. 2007, 25 s.

OECD. *Guidelines for the Testing of Chemicals – Revised Proposal for a New Guideline 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test 221*. 2002.

Kontaktní adresa

Soukupová Ivana, MVDr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Palackého 1-3, 612 42 Brno, soukupovai@vfu.cz

Akutní a subchronický účinek terbutrynu na danio pruhované (*Danio rerio*)

Acute and subchronic effect of terbutryn on zebrafish (*Danio rerio*)

Plhalová Lucie, Mácová Stanislava, Haluzová Ivana, Doleželová Petra, Slaninová Andrea, Maršálek Petr, Svobodová Zdeňka, Pištěková Vladimíra, Bedáňová Iveta, Voslářová Eva

Abstract

The aim of the presented study was to determine and compare acute toxicity of terbutryn on two different developmental stages of *Danio rerio* (embryonic and juvenile) and to investigate effects of subchronic exposure to sublethal levels of terbutryn on growth and on histopathological changes in *D. rerio*. Acute toxicity tests were performed according to OECD methodology (OECD No. 203 and OECD No. 212). The 96hLC50 terbutryn mean value was $5.71 \pm 0.46 \text{ mg.l}^{-1}$ for the juvenile stage of *D. rerio* and for the embryonic stage of *D. rerio* the 144hLC50 terbutryn mean value was estimated as $8.04 \pm 1.05 \text{ mg.l}^{-1}$. The study proved statistically significantly higher ($p < 0.01$) sensitivity in the juvenile stage of *D. rerio* to terbutryn compared to the embryonic stage of *D. rerio*. The juvenile growth tests were performed on *D. rerio* according to the OECD method No. 215. The environmental concentration of terbutryn ($0.02 \mu\text{g.l}^{-1}$) in the Czech rivers did not have any effects on growth and on histopathological changes in *D. rerio* and this concentration is lower than determined values of LOEC (0.6 mg.l^{-1}) and NOEC (0.2 mg.l^{-1}) of terbutryn.

Key words: Zebrafish, terbutryn, embryonic stage, juvenile stage, growth test

Úvod

Terbutryn se řadí mezi substituované symetrické triaziny. Triazinové herbicidy používané v zemědělství i mimo něj k potlačení řady druhů plevelů patří mezi všudypřítomné kontaminanty životního prostředí (Moretti et al., 2002; Arufe et al., 2004). Terbutryn je celosvětově používán pro kontrolu většiny travnatých a listnatých plevelů v mnoha plodinách, včetně obiloviny, brambor, luštěnin, kukuřice, cukrové třtiny a citrusů. Terbutryn je selektivní systémový herbicid, který působí jako inhibitor fotosyntézy (Roberts et al., 1998). Terbutryn je také používán ve vodním prostředí jako vodní herbicid pro kontrolu řas, vodního ponořeného i volně plovoucích plevelů a může tak zde ovlivnit mnoho necílových organismů (Muir, 1980; Roberts et al., 1998; Arufe et al., 2004). Terbutryn byl detekován nejen v povrchových a podzemních vodách (Carabias-Martínez et al., 2003), ale také v některých mořských vodách (ve středomořských pobřežních vodách) (Tolosa et al., 1996). I když používání terbutrynu bylo v mnoha zemích zakázáno, neboť má potenciál bioakumulovat v organismech, je neustále zjišťována jeho přítomnost ve vodním prostředí (Rioboo et al. 2007). Přípravky obsahující terbutryn nejsou v České republice registrovány od roku 2005, ale podle výsledků Českého hydrometeorologického institutu z roku 2008 byla nejvyšší nalezená koncentrace terbutrynu v českých řekách $0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$.

Cílem práce bylo stanovit a porovnat akutní toxicitu terbutrynu pro embryonální a juvenilní vývojová stádia ryb druhu *Danio rerio* a dále zjistit vliv dlouhodobého účinku subletálních koncentrací terbutrynu na růst a histopatologické změny na *D. rerio*.

Materiál a metodika

Testy toxicity byly provedeny na rybách *Danio rerio*, které patří mezi nejčastěji používané modelové organismy v testech toxicity. Testy akutní toxicity byly provedeny na juvenilních jedincích *D. rerio* dle směrnice OECD č. 203 (Fish, Acute Toxicity Test) v sérii 5 testů. V každé koncentraci a kontrole bylo testováno 10 ryb ve věku 2-3 měsíců náhodně vybraných ze zásobní populace. Testy byly prováděny semistatickou metodou s obměnou roztoku po 48 hodinách. V průběhu testů byla zaznamenávána teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádobách a mortalita ryb. Test byl ukončen po 96 hodinách od nasazení ryb.

Embryonální testy toxicity byly provedeny na embryích *D. rerio* dle směrnice OECD č. 212 (Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-Fry Stages) v sérii 6 testů. V každé koncentraci a kontrole bylo testováno vždy 20 oplozených jiker v jedné testovací nádobě. Jikry byly nasazeny do testu nejpozději do 8 hodin po oplození. Testy byly prováděny semistatickou metodou s obměnou roztoku po 24 hodinách. V průběhu testů bylo prováděno sledování líhnivosti a mortality. Test byl ukončen po vykulení a vstřebání žloutkového váčku u všech jedinců v kontrole, tj. 144 hodin po oplození.

Ze získaných hodnot (počet uhynulých jedinců v jednotlivých testovaných koncentracích) byla probitovou analýzou pomocí programu EKO-TOX 5.2 stanovena hodnota LC50 terbutrynu. Statistická významnost rozdílu hodnot LC50 u embryonálního a juvenilního stádia *D. rerio* byla provedena metodikou neparametrického Mann-Whitneova testu programem Unistat 5.1.

Testy subchronické toxicity byly provedeny na juvenilních jedincích (ve věku 20 dní) *D. rerio* dle směrnice OECD č. 215 (Fish, Juvenile Growth Test) v sérii 4 testů. Ryby byly umístěny do nádrží po 40 ks a vystaveny řadě subletálních koncentrací terbutrynu ($0,02 \mu\text{g.l}^{-1}$ – environmentální koncentrace v českých řekách, 0,06; 0,2; 0,6 a $2,0 \text{ mg.l}^{-1}$). Doba trvání semistatické testu (s výměnou roztoků po 48 hodinách) byla 28 dní. Ryby byly krmeny 2x denně sušenými *Artemia salina* ve výši 8% své tělesné hmotnosti, krmná dávka byla stanovena dle počáteční hmotnosti ryb a byla přepočítána po 14 dnech. Na konci testu byly ryby znovu váženy, byla změřena jejich délka a stanoven hmotnostní přírůstek ryb a dále hodnoty NOEC (No observed effect concentration) a LOEC (Lowest observed effect concentration) statistickým programem ANOVA (Dunnettův test). V průběhu testů byla zaznamenávána teplota, pH a koncentrace rozpuštěného kyslíku v testovacích nádobách a mortalita ryb. Ryby byly po skončení testu histologicky vyšetřeny.

Výsledky a diskuse

Průměrná hodnota 96hLC50 terbutrynu byla $5,71 \pm 0,46 \text{ mg.l}^{-1}$ pro juvenilní stádium *D. rerio* (hodnota 96hLC50 se pohybovala v testech v rozmezí od 5,20 do 6,13 mg.l^{-1}). Pro embryonální stádium *D. rerio* byla průměrná hodnota 144hLC50 terbutrynu $8,04 \pm 1,05 \text{ mg.l}^{-1}$ (hodnota 144hLC50 se pohybovala v rozmezí od 6,71 do 8,91 mg.l^{-1}). Porovnáním hodnot akutní toxicity terbutrynu pro embryonální a juvenilní stádia *D. rerio* byla zjištěna statisticky významně vyšší citlivost juvenilního stádia *D. rerio* ($p < 0,01$). Hodnoty LC50 terbutrynu byly v minulosti zjišťovány i u jiných druhů ryb a výsledky jsou srovnatelné s našimi. Bathe et al. (1973), Kidd and James (1991) uvádějí hodnotu 96hLC50 pro *Cyprinus carpio* 4 mg.l^{-1} , stejná hodnota LC50 byla zjištěna i pro *Lepomis macrochirus*, pro *Onchorhynchus mykiss* byla hodnota 96hLC50 terbutrynu 3 mg.l^{-1} .

V testech subchronické toxicity byla statisticky vysoce významná ($p < 0,01$) inhibice růstu ryb prokázána v koncentraci 0,6 mg.l⁻¹ terbutrynu. Zjištěná hodnota NOEC byla 0,2 mg.l⁻¹ terbutrynu a LOEC byla 0,6 mg.l⁻¹ terbutrynu. Při histologickém vyšetření ryb bylo zjištěno poškození tubulárního systému ledvin v koncentraci 0,6 mg.l⁻¹ terbutrynu. Environmentální koncentrace terbutrynu v českých řekách nemá vliv na růst ani na histopatologické změny u *D. rerio* a tato koncentrace je nižší než zjištěné hodnoty LOEC a NOEC terbutrynu. Obdobně Velíšek et al. (2009) nenalezl žádný vliv environmentální koncentrace terbutrynu na biochemický, hematologický a histologický profil u kaprů (*Cyprinus carpio* L.), kteří byli vystaveni této koncentraci terbutrynu po dobu 28 dnů.

Poděkování

Práce byla realizována v rámci řešení Výzkumného záměru MŠMT MSM č. 6215712402 Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin, IGA 199/2009/FVHE a IGA 200/2009/FVHE.

Literatura

- ARUFE, M.I.; ARELLANO, J.; MORENO, M.J.; SARASQUETE, C. Toxicity of commercial herbicide containing terbutryn and triasulfuron to seabream (*Sparus aurata* L.) larvae: a comparison with the Microtox test. *Ecotox. Environ. Saf.* 2004, 59, 209–216.
- BATHE, R.; ULLMANN, L.; SACHSSE, K. Determination of pesticide toxicity to fish. *Schriftenr. Ver. Wasser-Beden-Lufhyg Berlin-Dahlem.* 1973, 37, 241–256.
- CARABIAS-MARTINEZ, R.; RODRIGUEZ-GONZALO, E.; FERNANDEZ-LAESPADA, M.E.; CALVO-SERONERO, L.; SANCHEZ-SAN ROMÁN, F.J. Evolution over time of the agricultural pollution of waters in an area of Salamanca and Zamora (Spain). *Water Res.* 2003, 37, 928–938.
- KIDD, H.; JAMES, D.R. In: *The Agrochemicals Handbook*. Third ed. Royal Society of Chemistry Information Services, Cambridge, UK, 1991.
- MORETTI, M.; MARCARELLI, M.; VILLARINI, M.; FATIGONI, C.; SCASSELLATI-SFORZOLINI, G.; PASQUINI, R. In vitro testing for genotoxicity of the herbicide terbutryn: cytogenetic and primary DNA damage. *Toxicol. Vitro.* 2002, 16, 81–88.
- MUIR, D.C.G. Determination of terbutryn and its degradation products in water, sediments, aquatic plants, and fish. *J. Agric. Food. Chem.* 1980, 28, 714–719.
- ROBERTS, T.R.; HUTSON, D.H.; LEE, P.W.; NICHOLLS, P.H.; PLIMMER, J.R. *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Part 1: Herbicides and Plant growth regulators*. 1st ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1998.
- RIOBOO, C.; PRADO, R.; HERRERO, C.; CID, A. Population growth study of the rotifer *Brachionus sp.* fed with triazine-exposed microalgae. *Aquat. Toxicol.* 2007, 83, 247–253.
- TOLOSA, I.; READMAN, J.W.; BLAEVOET, A.; GHILINI, S.; BATROCCI, J.; HORVAT, M. Contamination of Mediterranean (Côte d'Azur) coastal waters by organotins and irgarol 1051 used in antifouling paints. *Mar. Pollut. Bull.* 1996, 32, 335–341.
- VELISEK, J.; SUDOVA, E.; MACHOVA, J.; SVOBODOVA, Z. Effects of subchronic terbutryn exposure on some biochemical, haematological and histopathological parameters of the common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Toxicol. Lett.* 2009, 189S, S208.

Kontaktní adresa

Lucie Plhalová, Mgr., Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Palackého 1-3, 612 42 Brno, lplhalova@vfu.cz

Prevalence výskytu *P. larvae* ve vzorcích medu a měli ve spádové oblasti SVÚ Olomouc

Prevalence of *P. larvae* in honey and bee debris samples in the attraction zone of SVI Olomouc

Bzdil Jaroslav

Abstract

The aim of this work was an examination of *Paenibacillus larvae* prevalence in honey and bee debris samples in the Czech Republic and its comparison with data of foreign countries. The samples were examined by standard methods that are used in laboratory diagnostics of American foulbrood (Máchová 1996, Bzdil 2007). In 2003-2009, 793 samples of Czech honey were examined - in 46 samples (5.8 %) a positive find of *P. larvae* was detected. There were also 10573 bee debris samples examined by the *Tween 80* method (Bzdil 2007) in 2005-2009 with a result of 966 samples (9.14 %) detected on *P. larvae*. It was found out that the prevalence of *P. larvae* in Czech honeys is lower than in foreign honeys, where the prevalence ranged from 8.5 % in Canadian and American provenience to 51,5 % in Uruguay honeys. This work also stated that the prevalence *P. larvae* in Czech honeys decreased from 11.43 % in 2003 to 6.89 % in 2009. A similar trend was also recorded in bee debris, where the prevalence decreased from 18.66 % in 2005 to 7.44 % in 2009. This trend may be a result of both high-quality diagnostics and radical procedures in sanitation of focuses of American foulbrood.

Keywords: American foulbrood, honey, bee debris, prevalence, *Tween 80*.

Úvod

Mor včelího plodu patří mezi nebezpečné nákazy včel a v současné době je v ČR problémem nejen ekonomickým, ale i ekologickým. Vždyť včely tvoří 95% opylovačů a svou činností zvyšují výnosy i u samosprašných rostlin až o 30-50%. Peroutka et al. (2003) hovoří o moru včelího plodu jako o nejzávažnější nebezpečné naze zavíčkovaného včelího plodu vyskytující se celosvětově. Klinicky se toto onemocnění prezentuje propadnutím a proděravěním víček. Plást bývá nerovnoměrně zakladen, nakažená larva mění barvu z perleťové až do tmavě hnědé. Následně se larva mění v hnědou viskózní hmotu, která metamorfuje vysycháním v příškvár, který pevně lpí na dně buňky. Včelstvo slábne a v průběhu 3-4 let hyne. Jak již dnes víme, léčba tohoto onemocnění s pomocí antibiotických přípravků se nesetkává s úspěchem. Jejím výsledkem je pouze prodlužování agonie včelstva, výskyt reziduí inhibičních látek ve všech včelích produktech a současná perzistence spor původce v těchto materiálech. Z druhé strany bývá často záchyt spor *P. larvae* v medu a také v měli významným indikátorem výskytu subklinických i klinických forem onemocnění. Proto bylo za cíl této práce zvoleno posouzení prevalence výskytu spor *P. larvae* v medu a měli u nás a porovnání této prevalence s údaji ve světové literatuře.

Materiál a metodika

Vzorky medu byly vyšetřeny metodou, kterou v ČR oficiálně uvedla v roce 2005 Haklová. Vyšetření včelí měli metodou *Tween 80*, která byla použita, poprvé oficiálně popsal ve své práci v roce 2007 Bzdil. K vyšetření vzorků medu i měli bylo použito následující materiálně technické vybavení: sterilní nádoby, sterilní zkumavky s těsnícím uzávěrem o objemu 16ml (MEUS s.r.l., Piove di Sacco, Italy), sterilní naběračky,

jednorázové sterilní plastové lžičky k nabírání sypkého materiálu, laboratorní váhy HELAGO HF-1200G (A&D Instruments Limited, Oxford, UK), pipety dělené po 0,1ml, pipetovací nástavec (Hirschmann Laborgeräte GmbH, Eberstadt, Germany), jednorázové plastové sterilní pipety o objemu 1ml kalibrované po 0,25ml, jednorázové plastové tyčinky ve tvaru L, Eppendorfovy zkumavky, sterilní destilovaná voda vlastní výroby, Tween 80 (Lach-Ner s.r.o., Neratovice, ČR), vodní lázeň JULABO TW12 (JULABO LABORTECHNIK GMBH, Seelbach, Germany), bakteriologické kličky, krevní agar s 5% ovčí krve (TRIOS s.r.o., Praha, ČR), MYPPN agar (TRIOS s.r.o., Praha, ČR), termostat BT 120 pro teplotu $37\pm 1^\circ\text{C}$ (EKOM s.r.o., Polná, ČR), PCR vybavení pro identifikaci izolátů, vzorky měli a medu. Vyšetření vzorků medu spočívalo v rozpuštění 15g medu v 15ml sterilní destilované vody. Naředěné vzorky byly 5 minut inkubovány ve vodní lázni při teplotě $88-92^\circ\text{C}$, následně ochlazeny na teplotu prostředí a 0,2ml takto ošetřeného materiálu bylo inokulováno na 1 krevní a 3 MYPPN agary. Plotny byly inkubovány 7-9 dní při teplotě $35-37,5^\circ\text{C}$. Suspektní kolonie byly spočteny a potvrzeny metodou PCR. Počet kolonií byl vynásoben 10, výsledkem kalkulace byl počet spor v 1g medu. Při vyšetření včelí měli byl ve zkumavce zalit 1g materiálu 8,5ml sterilní destilované vody a 0,5ml Tweenu 80. Směs byla dobře protřepána a zkumavky byly inkubovány v lázni o teplotě $70\pm 2^\circ\text{C}$ po dobu půl hodiny. Po dobu zahřívání byly zkumavky protřepány ve 3 cyklech trvajících 5 až 30 vteřin s přestávkami 5–10 minut. 2-5ml tekutiny ze spodní části zkumavek bylo po ochlazení promícháno v další uzavíratelné zkumavce se stejným objemem sterilní destilované vody. Směs byla znovu třepána v podélné ose zkumavky po dobu 5 vteřin a inkubována 10 minut ve vodní lázni o teplotě $90\pm 2^\circ\text{C}$. Po ochlazení a promíchání suspenze bylo inokulováno po 0,2ml objemu na 2-3 vysušené plotny MYPPN a alespoň 1 plotnu krevního agaru. Po oschnutí byly plotny inkubovány při teplotě $37\pm 1^\circ\text{C}$ po dobu 5–8 dní. Pak byly izolovány a spočítány typické kolonie a podrobeny PCR konfirmaci. Počty kolonií byly vynásobeny 100, čímž byl získán počet spor v 1g měli.

Výsledky a diskuze

První vzorky medu byly se zaměřením na *P. larvae* na SVÚ Olomouc mikrobiologicky vyšetřeny již v roce 2003. V tomto roce bylo celkem vyšetřeno 70 vzorků českého medu, z nichž bylo 8 pozitivních (prevalence 11,43%). V roce 2004 bylo vyšetřeno 60 vzorků a následně v roce 2005 pak 63 vzorků medu a z nich nebyl žádný pozitivní na přítomnost spor *P. larvae*. V roce 2006 bylo vyšetřeno 73 vzorků, z nichž 1 byl pozitivní (1,37% prevalence). V roce 2007 se počet vyšetřených českých medů zvýšil na 165 a z tohoto množství bylo celkem 10 pozitivních (prevalence 6,06%). O rok později (2008) bylo vyšetřeno 130 vzorků a 11 bylo pozitivních (prevalence 8,46%) a konečně v roce 2009 bylo vyšetřeno 232 vzorků a z tohoto počtu bylo 16 pozitivních (prevalence 6,89%). Celkem tedy bylo ve sledovaném období vyšetřeno v SVÚ Olomouc 793 vzorků českého medu ze 30 okresů ČR, ze kterých bylo 46 pozitivních (prevalence 5,8%). První vzorky včelí měli byly v SVÚ Olomouc vyšetřeny na přítomnost *P. larvae* v roce 2005. V roce 2005 bylo vyšetřeno celkem 150 vzorků měli a z tohoto počtu bylo 28 pozitivních (prevalence 18,66%). V roce 2006 vzrostl počet vzorků na 2245 a z tohoto počtu bylo 218 pozitivních (prevalence 9,71%). V roce 2007 bylo vyšetřeno 2641 vzorků, z nichž bylo 343 pozitivních (prevalence 12,99%). V následujícím roce 2008 byl počet vyšetřených vzorků měli 2675 a z nich bylo 164 vzorků pozitivních (prevalence 6,13%). V roce 2009 počet vyšetřených vzorků vzrostl na 2862 a z tohoto počtu bylo 213 pozitivních (prevalence 7,44%). V období let 2005-2009 bylo tedy na

SVÚ Olomouc celkem vyšetřeno 10573 vzorků měli, z nichž bylo 966 pozitivních (prevalence 9,14%). Prevalence výskytu *P. larvae* v mělich v České republice lze se světovými daty srovnat jen obtížně, neboť ve světové odborné literatuře podobné údaje chybí. Pokusili jsme se tedy porovnat alespoň prevalence v medech. Hornitzky a Clark (1991) vypočítali prevalenci výskytu *P. larvae* v australských medech. Ta činila 12,48%, což je číslo vyšší, než námi udávané hodnoty prevalence ve sledovaném období 2003-2009 v českých medech (5,8%). Steinkraus a Morse (1992) uvádí prevalenci výskytu v medech kanadské a americké produkce 8,5%, což je opět údaj vyšší ve srovnání s našimi daty. De Graaf et al. (2001) uvádějí prevalenci výskytu v belgických medech 11,0 %, což je také údaj vyšší, než uvádí tato práce v období let 2003-2009. Velkým problémem je mor včelího plodu v jihoamerické Uruguayi, kde Antúnez et al. (2004) konstatovali 51,5% prevalenci *P. larvae* v místních medech. Také Iurlina et al. (2006) zjišťuje v argentinských medech vysokou prevalenci výskytu (38,6%). Vysoké prevalence uvádí také polští autoři. Připomeňme práci Lipinského et al. (2007) a Pohorecké a Bobera (2008), kteří shodně uvádějí 23% prevalenci v polských medech. Jak je z výše uvedených literárních zmínek patrné, jsou naše údaje obzvláště v porovnání s údaji polských a jihoamerických kolegů relativně velmi nízké.

Závěr

Prevalence výskytu *P.larvae* ve vzorcích českého medu byly v porovnání se světovými literárními údaji shledány jako velmi nízké. V porovnání s nálezy v jihoamerických medech jsou naše údaje až téměř desetinásobně nižší. Co se týká výskytu agens ve vzorcích medu a měli v ČR ve sledovaných obdobích, můžeme mít důvod k mírnému optimismu, neboť byl především u měli v roce 2009 zaznamenán výrazný pokles prevalence oproti roku 2005. Podobně je tomu i u medů v porovnání s rokem 2003.

Literatura

- ANTÚNEZ, K. et al. *Paenibacillus larvae larvae* spores in honey samples from Uruguay: a nationwide survey. *Journal of Invertebrate Pathology*, 2004, no. 86, p. 56-58.
- BZDIL, J. Detection of *Paenibacillus larvae* Spores in the Debris and Wax of Honey Bee by the Tween 80 Method. *Acta Veterinaria*, 2007, no. 76, p. 643-648.
- DE GRAAF, D.C. et al. Influence of the proximity of American foulbrood cases and apicultural management on the prevalence of *Paenibacillus larvae* spores in Belgian honey. *Apidologie*, 2001, no. 32, p. 587-599.
- HAKLOVÁ, M. Standardní operační postup MI_01_PL/AZ 5. VÚVč Dol, 2005, 5 s.
- HORNITZKY, M.A.Z., CLARK, S. Culture of *Bacillus larvae* from bulk honey samples for the detection of American foulbrood. *Journal of Apicultural Research*, 1991, vol. 30, no. 1, p. 13-16.
- IURLINA, M.O. et al. Prevalence of *Bacillus* spp. in different food products collected in Argentina. *LWT*, 2006, no. 39, p. 105-110.
- LIPINSKI, Z. et al. The contamination of winter stores and early honey with spores of *Paenibacillus larvae larvae* in Polish apiaries of the Malopolska province. *Polish Journal of Veterinary*, 2007, vol. 10, no. 2, p. 71-74.
- PEROUTKA, M., DROBNÍKOVÁ, V., TITĚRA, D. Mor včelího plodu. In VESELÝ, V., *Včelařství*. 2. vyd. Praha: Brázda, 2003. 270s.
- POHORECKA, K., BOBER, A. Occurrence of *Paenibacillus larvae* spores in honey samples domestic apiaries. *Journal of Apicultural Science*, 2008, vol. 52, no. 2, p. 105-111.
- STEINKRAUS, K.H., MORSE, R.A. American Foulbrood incidence in some United-States and Canadian honeys. *Apidologie*, 1992, vol. 23, no. 6, p. 497-501.

Kontaktní adresa: Jaroslav Bzdil, MVDr., Státní veterinární ústav Olomouc, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc, Česká republika, e-mail: vetmed@seznam.cz.

Príčiny masových úhynov zimujúcich netopierov v urbanizovanom ekosystéme na území Slovenskej republiky

The causes of mass mortality of bats wintering in urban ecosystem in the Slovak Republic

Korytár Ľuboš, Ondrejková Anna, Ondrejka Róbert, Beníšek Zdenek, Prokeš Marián, Slepecká Eva, Súli Judit

Abstract

During the years 2009 and 2010 were monitored and practical protected wintering bats especially in the city of Kosice. Bats found in prefab houses of the town were caught and released. Appropriate measures are taken against sticking bats in the interior of buildings. It was recorded species composition and sex structure of wintering population. Bats were ringed to study the migration and roosting. Dehydration, starvation and reconstruction of prefab houses are major causes of deaths of wintering bats in urban ecosystem of The Slovak Republic.

Kľúčové slová: netopiere, urbánny ekosystém, Slovenská republika, Košice, zimovanie, úhyny

Úvod

Postupná urbanizácia krajiny spôsobuje environmentálne zmeny ovplyvňujúce druhovú štruktúru populácie netopierov, ich úkrytovú a potravnú ekológiu (Johnson et al., 2008). Urbánny ekosystém je extrémnym príkladom redukcie, fragmentácie a transformácie biotopov (Avila-Flores & Fenton, 2005). V mestách netopiere obsadzujú limitovaný počet prirodzených úkrytov (napr. stromové dutiny), avšak väčšina druhov je úzko naviazaná na úkryty poskytované ľudskými stavbami (Reiter & Zahn, 2006). V Európe netopiere prekonávajú zimné obdobie v stave prerušovanej hibernácie (Thomas, 1995). Významným fenoménom je zimovanie netopierov v panelových domoch (Horáček, 2004). Na území Slovenskej republiky bol doteraz potvrdený výskyt 28 druhov insektivorných netopierov 2čeladi: podkovárovité (*Rhinolophidae*) a netopierovité (*Vespertilionidae*) (Ceľuch & Ševčík, 2006). Lehotská & Lehotský (2000) uvádzajú ako druhy najčastejšie osídľujúce výškové panelové domy na území SR večernicu malú (*Pipistrellus pipistrellus*), večernicu pozdnú (*Eptesicus serotinus*) a raniaka hrdzavého (*Nyctalus noctula*). Matis & Dittel (1997) zistili najmä počas zimného obdobia výskyt druhu večernica pestrá (*Vespertilio murinus*). Netopiere počas migrácie a hibernačného obdobia častokrát uviaznu v rôznych štruktúrach panelových domov, alebo sú ich zimujúce kolónie ohrozované zásahmi zo strany nájomníkov bytov (Lehotská & Lehotský, 2000).

Materiál a metodika

Počas hibernačného obdobia netopierov v rokoch 2009 a 2010 sme na základe výnimky MŽP SR pre UVLF v Košiciach a pre členov organizácie SON (Spoločnosť pre ochranu netopierov na Slovensku) vykonávali monitoring výskytu a praktickú ochranu zimujúcich netopierov na území mesta Košice. Na požiadanie obyvateľov, alebo príslušných úradov verejnej správy sme realizovali odchyt a príjem netopierov. Boli vykonané vhodné opatrenia proti uviaznutiu netopierov v interiéroch budov, evidovaná druhová skladba a pohlavná štruktúra zimujúcej populácie. Netopiere boli značené chiropterologickými krúžkami za účelom ďalšieho štúdia migrácie a úkrytovej ekológie. V nutných prípadoch boli netopiere pred opätovným vypustením kŕmené

a rehydratované. Počas obdobia dlhotrvajúcich silných mrazov bola využitá metóda krátkodobého zazimovania netopierov pri chladničkovej teplote.

Výsledky

Počas sledovaného obdobia sme najmä na území mesta Košice riešili 16 prípadov nájdených netopierov. Okolnosti a príčiny evidovaných problémov s netopiermi sú zhrnuté v Tab. č. 1. Sumarizácia prípadov s poznámkami o početnosti a pohlavnej štruktúre druhov je znázornená v Tab. č. 2.

Tab. č. 1: Sumarizácia jednotlivých prípadov

Dátum	Lokalita	Problém	Druh	Príčiny
04.04.2009	KE	zranený, letu neschopný netopier na balkóne bytu	<i>Vmur.</i>	neznáme
19.04.2009	KE	netopier v PD na 9. poschodí (kúpeľňa)	<i>Nnoc.</i>	uviaznutie
11.09.2009	KE	prevzatie ťažko zraneného netopiera	<i>Ppip.</i>	uložený domácou mačkou
15.10.2009	KE	letu neschopný netopier v poštovej schránke PD	<i>Vmur.</i>	znečistenie stavbárskym tmelom, neschopný letu
11.11.2009	KE	netopiere na balkóne PD	<i>Nnoc.</i>	uviaznutie
08.12.2009	KE	netopier v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
11.01.2009	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
17.01.2010	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
20.01.2010	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
25.01.2010	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
26.01.2010	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
02.02.2010	KE	netopiere v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
08.02.2010	KE	netopier v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
07.03.2010	KE	netopier v interiéri PD	<i>Ppip.</i>	uviaznutie
17.03.2010	M.n.B.	prevzatie zraneného netopiera	<i>Nnoc.</i>	uložený domácou mačkou
19.03.2010	KE	netopiere v pivnici PD	<i>Nnoc.</i>	uviaznutie

Vysvetlivky: KE – Košice, M.n.B. – Moldava nad Bodvou, PD – panelový dom, *Vmur.* – *Vespertilio murinus*, *Nnoc.* – *Nyctalus noctula*, *Ppip.* – *Pipistrellus pipistrellus*

Tab. č. 2.: Početnosť a pohlavná štruktúra nájdených druhov netopierov

Druh	Počet prípadov	Počet objavených exemplárov	♂	♀	Pohlavie nezistené
<i>Nyctalus noctula</i>	4	30	25	5	-
<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	10	48	16	28	4
<i>Vespertilio murinus</i>	2	2	2	-	-
Σ	16	80			

Vysvetlivky: ♂ - samec, ♀ - samica

Záver

Počas hibernačných období v rokoch 2009 a 2010 sme prakticky riešili celkovo 16 prípadov nálezov netopierov v obytných častiach panelových domov v mestách Košice a Moldava n. Bodvou. Na daných lokalitách sme zaznamenali výskyt zimných kolónií troch druhov insektivorných netopierov. Po odchytení, príp. prevzatí bol zhodnotený zdravotný stav zvierat a tieto boli v čo najkratšom možnom čase opätovne vypúšťané. Celkovo sa nám podarilo spätne do environmentu navrátiť 78 exemplárov. Zaznamenali sme úhyn jedného jedinca samčieho pohlavia druhu večernica pestrá (*Vespertilio murinus*) a jednej samice večernice malej (*Pipistrellus pipistrellus*). V práci sú zosumarizované jedince, ktoré boli nájdené živé. Okrem týchto sme na viacerých miestach zistili, alebo nám bolo referované o výskyte kadáverov insektivorných netopierov, ktoré patrili ku skupinám uviaznutým v interiéroch budov. Ako najčastejšie príčiny úhynov zimujúcich netopierov v panelových domoch slovenských miest figurujú dehydratácia, vyhladovanie v dôsledku uviaznutia celých kolónií v bytových jadrách a utesnenie vstupných otvorov netopierích úkrytov v priebehu zatepl'ovania.

Pod'akovanie

Táto práca bola pripravená s podporou finančných prostriedkov grantovej agentúry VEGA, č. 1/0753/08.

Literatúra

Avila-Flores, R., Fenton, M.B., 2005: Use of spatial features by foraging insectivorous bats in a large urban landscape. *Journal of mammalogy*, 86(6), 1193–1204. ISSN: 0022-2372.

Ceľuch, M., Ševčík, M., 2006: Koľko druhov netopierov u nás skutočne žije? Zamyslenie nad novými nálezmi. *Vespertilio*, 9 – 10, 239. ISSN: 1213-6123.

Horáček, D., 2004: *Vespertilio murinus* a *Pipistrellus pipistrellus* ve spárách panelových domův Liberci. *Vespertilio*, 8: 140–142. ISSN: 1213-6123.

Johnson, J.B., Gates, J.E., Ford, W.M., 2008: Distribution and activity of bats at local and landscape scales within a rural–urban gradient. *Urban Ecosyst.* [online]. April 2008, 11. [cit. 2008-04-15]. Dostupné z: <http://www.nrs.fs.fed.us/pubs/jrnl/2008/nrs_2008_johnson-001.pdf>. ISSN: 1083-8155.

Lehotská, B., Lehotský, R. 2000: Skúsenosti z ochrany zimnej kolónie raniaka hrdzavého (*Nyctalus noctula*) v panelovom dome na bratislavskom sídlisku Dlhé Diely. *Vespertilio*, 4: 105–110. ISBN: 80-88850-20-7..

Matis, Š., Dittel, L., 1997: Jesenné pozorovania *Vespertilio murinus* v niektorých mestách na Slovensku. *Vespertilio*, 2: 141–142. ISBN: 80-967385-9-3.

Reiter, G., Zahn, A., 2006: Bat roosts in the alpine area: Guidelines for the renovation of buildings [online]. October 2006.

Dostupné z. : <<http://www.lsn.tirol.gv.at/en/doc/guidelines.pdf>>

Thomas, D.W., 1995: Hibernating bats are sensitive to nontactile human disturbance. *Journal of mammalogy*, 76(3), 940–946. ISSN: 0022-2372.

Kontaktná adresa

MVDr. Ľuboš Korytár, Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 041 81 Košice, korytar.uvm@gmail.com

Detekcia mikrosporídií u voľne žijúcich zvierat pomocou molekulových metód

Detection of microsporidia in wild animals using molecular methods

Malčeková Beáta, Valenčáková Alexandra, Luptáková Lenka, Molnár Ladislav, Ravaszová Petra

Abstract

Recently the pathogenic species of microsporidia of the genus *Encephalitozoon* have been detected increasingly also in representatives of the class Aves. Our study presents laboratory proof of *Encephalitozoon cuniculi* genotype II in a new host, gyrfalcon (*Falco rusticolus*), with suspect microsporidiosis. Samples of faeces from thirty gyrfalcons were examined for the presence of microsporidia spores using molecular methods. The samples were analysed by polymerase chain reaction to provide direct proof of the parasite, using both species non-specific and species specific primers and subsequent sequencing. In two gyrfalcons we confirmed *Encephalitozoon cuniculi* genotype II which implies new host species for this parasite.

Kľúčové slová: mikrosporídie, *Encephalitozoon cuniculi*, sokol, PCR, genotypizácia

Úvod

Mikrosporídie predstavujú rozmanitú skupinu obligátnych intracelulárnych parazitov, ktoré sú schopné infikovať široké spektrum bezstavovcov a stavovcov vrátane ľudí. V ostatných rokoch sa ich hostiteľské spektrum rapidne rozširuje. Sú charakterizované ako oportúnne patogény, čiže diagnostikovanie klinického manifestného ochorenia je indikátorom vrodenej alebo získanej poruchy imunitného systému.

Najčastejšie sa u vtákov vyskytuje *Encephalitozoon hellem* a v ojedinelých prípadoch sa objavili *Enterocytozoon bieneusi* a *Encephalitozoon intestinalis*. Prítomnosť spór *Encephalitozoon cuniculi* u vtákov sa potvrdila len v štyroch zaznamenaných prípadoch, a to dva prípady u kurčiat (Rettz, 1993; Rettz, 1994), jeden u korely chochlatej (Kašičková a kol., 2007) a u 36 exotických vtákov (Kašičková a kol., 2009).

E. cuniculi je jeden z najčastejšie diagnostikovaných druhov mikrosporídií prevažne u cicavcov vrátane ľudí (Halánová a kol., 1999). Jeho význam značne stúpol po uverejnení dôkazov o jeho prenose zo zvierat na ľudí, čím sa definitívne zaradil medzi zoonózy. Je pôvodcom encefalitozoonózy, chronického, zvyčajne asymptomaticky prebiehajúceho ochorenia, ktoré postihuje hlavne centrálny nervový systém, tráviacu, dýchaciu a vylučovaciu sústavu.

Naším cieľom bolo laboratórne vyšetriť 30 sokolov loveckých PCR metódou použitím druhovo nešpecifických primerov pre kmeň *Microsporidia* a druhovo špecifických primerov pre druhy rodu *Encephalitozoon* a rodu *Enterocytozoon*, pričom u piatich z nich boli prítomné klinické príznaky poukazujúce na mikrosporidiózu.

Materiál a metodika

Vzorky trusu sa získali na Klinike vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat UVLF v Košiciach, kde bol trus odobratý 30 sokolom loveckým (*Falco rusticolus*), ktorí pochádzali zo súkromného chovu. Päť z nich malo klinické príznaky poukazujúce na mikrosporidiózu. Trus bol spracovaný éterovou extrakciou podľa postupu

publikovaného Van Goolom a kol. (1990) a podrobený mikroskopickéj analýze pomocou optického zjasňovača Rylux (Vávra a kol., 1993). Takto spracované vzorky boli uložené v chladničke pri 4°C. Na extrakciu DNA sa použil izolačný kit QIAamp® DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) s postupom podľa inštrukcií výrobcu. Na amplifikáciu oblasti rRNA génov veľkej (LSU rRNA) a malej ribozómovej podjednotky RNA (SSU rRNA) a ITS oblasti sme použili druhovo nešpecifické primery 530F a 580R. PCR prebiehala v termocykleri Techne Genius a postup bol dodržaný podľa publikácie Malčeková a kol. (2009). Na druhové určenie mikrosporídií sa použil špecifický primerový pár ECUNF/ECUNR pre druh *Encephalitozoon cuniculi* podľa publikácie Valenčáková a kol. (2005). PCR produkty sa vizualizovali elektroforézou v 1% agarózovom géle ofarbenom etídium-bromidom pod UV lampou a porovnali s 100 bp DNA Ladder. PCR produkty boli sekvenované v oboch smeroch a následne boli sekvencie porovnané pomocou programu BLAST so sekvenciami uloženými v GenBank databáze (NCBI).

Výsledky

Mikroskopickou analýzou sa v štyroch vzorkách dokázala prítomnosť jasne fluoreskujúcich oválnych útvarov veľkosti 1,5 x 3 µm, ktoré sú charakteristické pre kmeň *Microsporidia*. Avšak len v dvoch vzorkách sa prítomnosť mikrosporídií potvrdila aj molekulovou analýzou, čo môže byť spôsobené nízkou koncentráciou spór v ostatných dvoch vzorkách trusu. Primerový pár 530F/580R vytvoril fragmenty veľkosti 1350 bp charakteristické pre *E. intestinalis*, *E. cuniculi* a *E. hellem*. Použitím druhovo-špecifických primerov ECUNR/ECUNF (*E. cuniculi*) sa vizualizovali fragmenty o veľkosti 550 bp. Sekvencie boli identické v GenBank databáze so sekvenciami *E. cuniculi* GB-M1 (AJ005581.1, AL59044 a AL391737.2). ITS oblasť obsahovala dve repetície 5'-GTTT-3' (5'-TTGTTGTGTTTTGATGGATGTTTGTGG-3') charakteristické pre genotyp II.

Diskusia

Na základe doterajších údajov sa u dravcov, konkrétne sokolov identifikoval jedine *Ent. bieneusi* genotyp D. Müller a kol. (2008) sa domnievali, že sokoly sa infikovali od holubov žijúcich v rovnakej farme, kde sa s holubmi skrmovali sokoly. Prítomnosť spór *Ent. bieneusi* u holubov potvrdili viacerí autori (Bart a kol., 2008). Jednou z ďalších zdrojov infekcie môže byť aj voda vodných nádrží a jazier, ktorá je znečistená trusom vodného vtáctva bohatého na mikrosporídiové spóry.

Spóry *E. cuniculi* sú vysoko odolné v environmentálnom prostredí hlavne vo vodných zdrojoch a dokážu prežiť aj niekoľko mesiacov až rokov, takže priamy kontakt zvierat alebo ľudí nie je potrebný na infikovanie nového hostiteľa. Okrem vodného zdroja infekcie sa sokoly môžu infikovať aj vzduchom prostredníctvom spór prítomných v aerosólovej forme z vysušeného trusu vo voliérach. Encefalitozoonóza spôsobená *E. cuniculi* predstavuje nové parazitárne ochorenie u sokolov. Zoonotický potenciál *E. cuniculi* bol potvrdený viacerými autormi, čo by malo byť brané do úvahy u sokoliarov žijúcich v úzkom kontakte so svojimi sokolmi.

V našej práci sme prvýkrát u sokola loveckého (*Falco rusticolus*) dokázali prítomnosť spór mikrosporídie *E. cuniculi* genotyp II použitím PCR metódy a sekvenovania.

PodĎakovanie

Táto práca bola riešená v rámci grantových projektov VEGA MŠ SR No. 1/0108/10 a No. 1/0412/09.

Literatúra

BART, A., WENTINK-BONNEMA, E.M., HEDDEMA, E.R., BUIJS, J., VAN GOOL, T. Frequent occurrence of human-associated microsporidia in fecal droppings of urban pigeons in amsterdam, the Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 2008, vol. 74, no. 22, s. 7056-7058.

HALÁNOVÁ, M., MACÁK, V., LETKOVÁ, V., ŠTEFKOVIČ, M., HALÁN, M. The first finding of antibodies to *Encephalitozoon cuniculi* in cows in Slovakia. *Vet. Parasitol*, 1999, vol. 82, s. 167-171.

KAŠIČKOVÁ, D., SAK, B., KVAČ, M., DITRICH, O. Detection of *Encephalitozoon cuniculi* in a new host-cockateel (*Nymphicus hollandicus*) using molecular methods. *Parasitology Research*, 2007, vol. 101, s. 1685-1688.

KAŠIČKOVÁ, D., SAK, B., KVAČ, M., DITRICH, O. Sources of potentially infectious human microsporidia: Molecular characterisation of microsporidia isolates from exotic birds in the Czech Republic, prevalence study and importance of birds in epidemiology of the human microsporidial infections. *Veterinary Parasitology*, 2009, vol. 165, s. 125-130.

MALČEKOVÁ, B., VALENČÁKOVÁ, A., LUPTÁKOVÁ, L., MOLNÁR, L. Detekcia *Encephalitozoon cuniculi* u nového hostiteľa sokola loveckého (*Falco rusticolus*). In *Zborník: „Zborník zo seminára doktorandov venovaného pamiatke akademika Boďu“*, Košice, 2009.

MÜLLER, M.G., KINNE, J., SCHUSTER, R.K., WALOCHNIK, J. Outbreak of microsporidiosis caused by *Enterocytozoon bieneusi* in falcons. *Veterinary parasitology*, 2008, vol. 152, no. 1-2, s. 67-78.

REETZ, J. Naturally-acquired microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) infections in hens. *Tierarztl Prax*, 1993, vol. 21, s. 429-435.

REETZ, J. Natural transmission of microsporidia (*Encephalitozoon cuniculi*) by way of the chicken egg. *Tierarztl Prax*, 1994, vol. 22, s. 147-150.

VALENČÁKOVÁ, A., BÁLENT, P., NOVOTNÝ, F., ČISLÁKOVÁ, L.: Application of specific primers in the diagnosis of *Encephalitozoon* spp. *AAEM*, 2005, vol. 12, s. 321-323.

VAN GOOL, T., HOLLISTER, W.S., SCHATTENKERK, W.E. a kol. Diagnosis of *Enterocytozoon bieneusi* microsporidiosis in AIDS patients by recovery of spores from faeces. *Lancet*, 1990, vol. 336, no. 8716, s. 697-698.

VÁVRA, J., DAHBIOVÁ, R., HOLLISTER, W.S., CANNING, E.U. Staining of microsporidian spores by optical brighteners with remarks on the use of brighteners for the diagnosis of AIDS associated human microsporidiosis. *Folia parasitological*, 1993, vol. 40, no. 4, s. 267-72.

Kontaktná adresa

Mgr. Beata Malčeková, malcekova@uvlf.sk, Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81 Košice, SR

Stanovení časných protilátek proti viru katarální horečky ovcí u volně žijících přežvýkavců

Detection of bluetongue virus early antibodies in free-living ruminants

Šperlová Adéla, Zendulková Dagmar, Lamka Jiří

Abstract

Bluetongue (BT) is an infectious non-contagious disease of ruminants transmitted by *Culicoides* biting midges. In 2006, cases of bluetongue (BTV-8) were found in the Northern Europe. In November 2007, BTV-8 was first detected in the Czech Republic. The objective of this study was to detect bluetongue antibodies in free-living ruminants. Eighty six serum samples of free-living ruminants were provided by Professor J. Lamka, one whole blood sample (with EDTA) from roe deer (*Capreolus capreolus*) was provided by gamekeepers from Libuň. A commercial ELISA kit Bluetongue Early Detection (ID.Vet, France) was used for detection of group-specific antibodies against BT virus. One sample was positive, remaining eighty seven samples were negative.

Keywords: bluetongue, free-living ruminants, ELISA, antibodies

Úvod

Katarální horečka ovcí (KHO) – bluetongue je infekční, avšak nekontagiózní onemocnění přežvýkavců přenášené tiplíky z rodu *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*). Původcem je RNA virus z rodu Orbivirus, čeleď *Reoviridae*, do dnešního dne bylo popsáno 24 sérotypů viru KHO (BTV-1 až BTV-24). Klinické příznaky KHO zahrnují nejčastěji horečku, hypersalivaci, hyperemii a ulcerace sliznic dutiny ústní, edémy, koronitidu a laminitidu, avšak průběh je často inaparentní. KHO není přenosná na člověka, avšak toto onemocnění vede k přímým a především nepřímým ekonomickým ztrátám. Poprvé bylo popsáno koncem 19. století v Jižní Africe (Monath and Guirakhoo, 1996) a tradičně se vyskytuje mezi 40.° severní šířky a 35.° jižní šířky (Gibbs and Greiner, 1988). V roce 1998 se sérotypy 1, 2, 4, 9 a 16 začaly šířit v jižní Evropě a v roce 2006 se zcela nečekaně objevil virus KHO sérotypu 8 v zemích Beneluxu, Německu a ve Francii a odtud se dál šířil. V České republice se poprvé objevil v listopadu 2007 a od té doby zde bylo vyhlášeno 14 ohnisek. V roce 2008 začala na našem území, podobně jako v jiných evropských zemích, povinná nouzová vakcinace domácích přežvýkavců. Volně žijící přežvýkavci, možný rezervoár viru KHO, však pochopitelně vakcinováni nejsou. Jejich role v epizootologii KHO v ČR není známá, a proto bylo naším cílem zjistit, zda v populaci našich volně žijících přežvýkavců původce této nákazy cirkuluje.

Materiál a metodika

Vzorky: V letech 2009-2010 jsme získali 86 vzorků krevních sér volně žijících přežvýkavců od prof. Lamky a 1 vzorek plné krve (s EDTA) srnce (stáří asi 2 roky) od mysliveckého sdružení Libuň, okres Jičín. Druhové a početní zastoupení je uvedeno v Tab. 1.

Zpracování vzorků:

Krevní séra - uchovávána v -80 °C.

Plná krev s EDTA – odstředěna při 1500 otáčkách/min po dobu 10 min, plazma odpipetována a uložena do -18 °C.

Sérologické vyšetření

Vzorky krevního séra a plazmy byly vyšetřeny komerčně dodávaným ELISA kitem (Bluetongue Early Detection, ID.Vet, Francie) pro průkaz časných i pozdních skupinově-specifických protilátek proti proteinu VP7 viru KHO.

Tab. 1: Druh a počet vyšetřovaných zvířat

Druh	Počet
Muflon (<i>Ovis aries musimon</i>)	58
Jelen lesní (<i>Cervus elaphus</i>)	14
Sika Dybowského (<i>Cervus nippon dibowskii</i>)	9
Daněk evropský (<i>Dama dama</i>)	5
Srnec obecný (<i>Capreolus capreolus</i>)	1

Výsledky

Vzorek krevní plazmy srnce byl sérologicky pozitivní, ostatní vzorky byly negativní.

Diskuse a závěr

Volně žijící přežvýkavci jsou vnímaví k infekci virem KHO a jsou potenciálním rezervoárem této nákazy. V Evropě byla dosud KHO podle dostupných literárních údajů prokázána u alpak v Německu (Henrich et al., 2007), muflonů, jelenů lesních, daňků evropských, srnců obecných, paovců hřivnatých a kozorožců iberských ve Španělsku (Fernández-Pacheco et al., 2008; Ruiz-Fons et al., 2008; García et al., 2009; Rodríguez-Sánchez et al., 2009, 2010), u jelenů lesních a jaků domácích v Belgii (Linden et al., 2008; Mauroy et al., 2008) a u jelenů lesních a srnců obecných ve Francii (Rossi et al., 2010). Ve Španělsku a Belgii KHO u volně žijících přežvýkavců nebyla v počátcích sledování zjišťována, ale v pozdějších letech její séroprevalence postupně narůstala (Ruiz-Fons et al., 2008; Linden et al., 2008). Této problematice je na Ústavu infekčních chorob a epizootologie FVL VFU Brno věnovaná intenzivní pozornost. Od r. 2008 zde bylo sérologicky vyšetřeno 360 vzorků volně žijících přežvýkavců. Z tohoto celkového počtu byl dosud pozitivní pouze jeden vzorek, který byl odebrán na konci r.2009. Podle informací z odborné literatury protilátky po infekci virem KHO přetrvávají doživotně (Tweedle et Mellor, 2002), a tudíž aktuálně probíhající infekci je třeba potvrdit virologickým vyšetřením. Na základě námi dosažených výsledků se nakažová situace z pohledu KHO u volně žijících přežvýkavců jeví jako poměrně příznivá. Řešení této problematiky bude i nadále pokračovat.

Poděkování

Práce vznikla za podpory Výzkumného záměru Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky č. 621 571 2403.

Literatura

FERNÁNDEZ-PACHECO, P. - FERNÁNDEZ-PINERO, J. - AGÜERO, M. - JIMÉNEZ-CLAVERO, M.A. Bluetongue virus serotype 1 in wild mouflons in Spain. *Vet Rec.* 2008, 162: 659-660

GARCÍA, I. - NAPP, S. - CASAL, J. - PEREA, A. - ALLEPUZ, A. - ALBA, A. - CARONERO, A. - ARENAS, A. Bluetongue epidemiology in wild ruminants from Southern Spain. *Eur J Wildl Res.* 2009, 55: 173-178

GIBBS, E.P.J. - GREINER, E.C. Bluetongue and epizootic haemorrhagic disease. In *The arboviruses: epidemiology and ecology*. Volume 2, Monath, T. P.(ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida 1988, pp: 39-70

HENRICH, M. - REINACHER, M. - HAMANN, H.P. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet Rec.* 2007, 161(22):764

LINDEN, A. - MOUSSET, B. - GRÉGOIRE, F. - HANREZ, D. - VANDENBUSSCHE, F. - VANDEMEULEBROUCKE, E. - VANBINST, T. - VERHEYDEN, B. - DE CLERCK, K. Bluetongue virus antibodies in wild red deer in southern Belgium. *Vet Rec.* 2008, 162 (14): 459

MAUROY, A. - GUYOT, H. - DE CLERCQ, K. - CASSART, D. - THIRY, E. - SAEGERMAN C. Bluetongue in captive yaks. *Emerg Infect Dis.* 2008, 14 (4): 675-6

MONATH, T.P. - GUIRAKHO, R. Orbiviruses and Coltiviruses, In: *Virology*, Fields, B.N. - Knipe, D.M. - Howley, P.M. (Eds.), Lippincott, Raven, Boston, Massachusetts, USA,1996 pp. 1735-66

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. - SÁNCHEZ-CORDÓN, P. - MOLINA, V. - RISALDE, M.A. - PÉREZ DE DIEGO A.C. - GÓMEZ-VILLAMANDOS, J.C. - SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, C.M. Detection of bluetongue serotype 4 in mouflons (*Ovis aries musimon*) from Spain. *Vet Mic.* 2009, 141 (1-2): 164-167

RODRÍGUEZ-SÁNCHEZ, B. - GORTÁZAR, C. - RUIZ-FONS, F. - SÁNCHEZ-VIZCAÍNO, J.M. Bluetongue virus serotypes 1 and 4 in red deer, Spain. *Emerg Infect Dis.* March 2010; 16 (3): 518-520

ROSSI, S. - GIBERT, P. - BRÉARD, E. - MOINET, M. - HARS, J. - MAILLARD, D. - WANNER, M. - KLEIN, F. - MASTAIN, O. - MATHEVET, P. - BOST, F. Circulation et impact des virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO) chez les ruminants sauvages en France. *Bulletin épidémiologique* N°35/Hors-série/Special FCO, Afssa 2010, pp: 28-32

RUIZ-FONS, F. - REYES-GARCÍA, A.R. - ALCAIDE, V. - GORTÁZAR, C. Spatial and temporal evolution of bluetongue virus in wild ruminants, Spain. *Emerg Infect Dis.* June 2008; 14(6): 951-953

TWEEDLE, N. - MELLOR, P.S. Technical review – bluetongue: The virus, hosts and vectors. Version 1.5. Report to the Department of Health, Social Services and Public Safety U.K. (DEFRA) 2002

Kontaktní adresa

MVDr. Adéla Šperlová, Ústav infekčních chorob a epizootologie VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, e-mail: V09239@vfu.cz

SEKCE C

Patobiologie

Morfologie a fyziologie

Choroby malých zvířat

Choroby velkých zvířat

Vztah mezi expozicí virem psinky a vybranými parazitárními infekcemi u psů v severní Keni

Relation between exposition to canine distemper virus (CDV) and selected parasitic infections in populations of dogs in Northern Kenya

Hlaváč Jan, Sedlák Kamil, Tesařová Jana, Albrechtová Kateřina, Modrý David

Abstract

Almost 600 dogs from Turkana region from north Kenya were examined. Antibodies against distemper, neospora and toxoplasma were detected. Blood parasites of genus *Hepatozoon* were diagnosed microscopically and molecularly. Microscopic evaluation of blood smears didn't reveal any babesia. Statistical analysis with Chi-square test showed strong correlation between neospora and other evaluated infections. Correlations between *T. gondii* and CDV was also proven, further research and advanced statistical analysis will be required for better understanding of ecology and relationship of selected parasitosis.

Keywords: Distemper, *Toxoplasma*, *Neospora*, *Hepatozoon*, co-infection

Úvod

Psinka je infekční onemocnění způsobené RNA virem s čeledi *Paramyxoviridae*, postihující šelmy a ploutvonožce. V Africe byla psinka opakovaně příčinou závažných epidemií volně žijících šelem (Roelke-Parker et al., 1996), bezprostředně ohrožující místní populace. Po akutní fázi, která je provázené zvýšenou mortalitou, dochází u přeživších zvířat k dlouhodobé imunopresi jejíž patogeneze nebyla dosud spolehlivě vysvětlena (Beineke et al., 2009). Nedávné retrospektivní studie ukázaly, že fatální průběh psinkové epidemie u lvů v Serengeti a Ngorongoro byl způsoben přidruženou infekcí prvoky rodu *Babesia* (Munson et al., 2008). Cílem práce bylo odhalit, do jaké míry má virus psinky (CDV) vliv na hostitele, resp. na rozšíření parazitů v populaci.

Materiál a metodika

Mezi sledované parazity jsme zahrnuli infekce krevními prvky rodu *Babesia* a *Hepatozoon* a tkáňové parazitózy *Toxoplasma gondi* a *Neospora caninum*. Soubor zahrnuje vzorky z 600 psů žijících v okolí j. Turkana v severní Keni. V dané oblasti nežijí žádné ferální populace psů, každý pes má svého unikátního majitele, což umožňuje jejich identifikaci a zpětnou dohledatelnost. Z hlediska epizootologického sledování je důležité, že u psů nejsou prováděny žádné preventivní ani léčebná opatření. Klinické a anamnestické údaje od každého psa byly zaznamenány do protokolu. Krev byla odebírána z *vena cephalica antebrachii*. Z každého odběru byly vyhotoveny dva krevní nátěry, malé množství krve bylo konzervováno ethanolem pro molekulární analýzy. Sérum získané po odstředění bylo konzervováno 0,1 % azidem sodným.

Izolace DNA byla provedena fenol-chloroformovou metodou, PCR diagnostika prvoků rodu *Hepatozoon* proběhla za použití specifických primerů (Inokuma et al. 2002).

Serologická diagnostika psinky, resp. neospory byla provedena metodou nepřímé imunofluorescence (IFAT) zároveň byla stanovena i výše titru. Průkaz protilátek proti *T. gondii* byl proveden metodou ELISA. V tomto případě byl cut off stanoven jako trojnásobek průměru optické density (OD) negativních kontrol.

Krevní nátěry byly prohlédnuty při 1000x zvětšení v pýřitém okraji. Přítomnost gamontů rodu *Hepatozoon* byla zaznamenána do protokolu.

Statistická analýza byla provedena v programu KyPlot (v. 2.0 beta 15, Koichi Yoshioka, Japonsko).

Výsledky

Prevalence psinky ve studované populaci byla 37,0 %, při cut off hladině titru 1:25. Pro cut off titru 1:100 vykazovalo séropozitivitu 18,9 %. Tato hodnota titru byla používána jako cut off pro všechny korelační výpočty z důvodů eliminace falešně pozitivních výsledků. Prevalence dalších zjišťovaných parazitóz jsou uvedeny v tabulce 1. Mnohem nižší senzitivita při mikroskopickém vyšetření u *Hepatozoon canis* souvisí s obvykle velmi nízkou parazitemií.

tab. 1 Prevalence studovaných infekcí:

	Hepatozoon PCR	Hepatozoon mikroskopie	<i>N. caninum</i> (cut off 1:50)	<i>T. gondii</i>	CDV (cut off 1:100)
prevalence:	42,3 %	9,6 %	17,9 %	18,3 %	18,9 %

Statistické vyhodnocení: Získaná data byla analyzována pomocí χ^2 testu a jsou uvedena v tab. 2.

tab. 2 Hladiny významnosti na základě výsledků χ^2 testu pro vztah mezi psinkou a vybranými parazitózami:

	CDV/ Neospora	CDV/ Toxoplasma	CDV/ Hepatozoon*
P	p<0,01	p<0,05	NS

*prevalence na základě PCR diagnostiky

Závěr

Zjištěné prevalence parazitóz jsou relativně vysoké, ale srovnatelné s výsledky zjištěnými v psích populacích jinde ve světě. (Barber et al. 1998, Sedlák et Bártová 2006, Rubini et al. 2005). Dále byla prokázána cirkulace viru psinky v dané populaci a ukázalo se, že mezi výskytem toxoplasmy a neospory a psinkou existují statisticky významné souvislosti. K vysvětlení pozorovaných souvislostí bude potřeba dalších experimentů..

Literatura

- BARBER R.; GASSER, B.; ELLIS, J. et al. Prevalence of Antibodies to *Neospora caninum* in Different Canid Populations, *The Journal of Parasitology*, 1997, Vol. 83, No. 6, p. 1056-1058
- BEINEKE, A.; PUFF, C.; SEEHUSEN, F. et al. Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2009, Vol. 127, No. 1-2, p. 1-18
- INOKUMA, H.; OKUDA, M.; OHNO, K. et al. Analysis of the 18S rRNA gene sequence of a *Hepatozoon* detected in two Japanese dogs. *Veterinary Parasitology*, 2001 Vol. 106, No. 3, p. 265-271

MUNSON, L.; TERIO, K.A; KOCK, R.; et al. Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions. 2008, *PlosOne*, Vol. 3, e2545

ROELKE-PARKER, M.E; MUNSON, L.; PACKER, C. et al. A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). 1996, *Nature*, Vol. 379, No. 5, p. 441-5.

RUBINI, A.S.; PADUAN, K.S.; CAVALCANTE G.G. et al. Molecular identification and characterization of canine *Hepatozoon* species from Brazil. *Parasitology Research*, 2005, Vol. 97, No. 2, p.91-93.

SEDLAK, K.; BARTOVA, E. The prevalence of *Toxoplasma gondii* IgM and IgG antibodies in dogs and cats from the Czech Republic, 2006, *Veterinarni Medicina*, Vol. 51, No. 12, p 555–558

Kontaktní adresa

Využití rekombinantního nestrukturálního proteinu viru PRRS k odlišení postinfekčních a postvakcinačních protilátek

Usage of recombinant nonstructural protein of PRRS virus to differentiate postinfectious and postvaccination antibodies

Janková Jitka, Celer Vladimír

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) cause widespread disease of swine characterized by respiratory problems in young pigs and reproduction problems like abortions, stillbirths and high mortality of weak piglets. Its genome encodes thirteen nonstructural proteins (Nsp) and seven structural proteins (GP 2, GP 3, GP 4, GP 5, E, M and N). Nucleocapsid protein N is extensively used in serological diagnostics of the disease. However diagnostic tests based on structural protein can't differentiate between postinfectious and postvaccination antibodies. On the other hand nonstructural proteins are produced in virus infected cells only and antibodies against Nsp are detected only in pigs infected with field virus or vaccinated using modified live virus vaccine.

The goal of this work was to express Nsp 7 protein of PRRSV. Expression of recombinant protein in BL21(DE3)pLysS *Escherichia coli* strain was induced by isopropyl- β -D-thiogalaktoside (IPTG). Purified Nsp 7 is serologically reactive and is suitable for usage as an antigen in indirect ELISA test for differentiation of postinfectious and postvaccination antibodies.

Klíčová slova: PRRSV, ELISA, protilátky, exprese, *Escherichia coli*, rekombinantní, nestrukturální

Úvod

Virus reprodukčního a respiračního syndromu prasat (PRRSV) způsobuje široce rozšířené onemocnění prasat charakteristické respiračními problémy u sajících a odstavených selat a reprodukčními problémy jako jsou aborty, mrtvě narozená selata a vysoká mortalita novorozených selat (Wensvoort a kol., 1991).

PRRSV je malý, obalený virus s ikosahedrální symetrií nukleokapsidy (Dea a kol., 1995), který patří do čeledi *Arteriviridae*, řádu *Nidovirales* (Cavanagh, 1997). Jeho genom je tvořen jedním vláknem RNA s pozitivní polaritou a obsahuje osm otevřených čtecích rámců (ORF) – 1a, 1b, 2, 3, 4, 5, 6 a 7, z nichž ORF 1a a 1b kódují třináct nestrukturálních proteinů (Nsp) a ORF 2-7 kódují sedm strukturálních proteinů (GP 2, GP 3, GP 4, GP 5, E, M a N) (Meng a kol., 1996).

Infekce virem vede k navození jak humorální, tak i buněčné složky imunitní odpovědi. Protilátky typu IgM bývají poprvé zjišťovány od 5. dne po infekci a jsou detekovatelné ještě 2 týdny po skončení virémie. Protilátky typu IgG bývají poprvé prokazovány 9.-14. den po infekci a postupně vymizí za 4-6 měsíců. Přibližně 4 týdny po infekci se zvyšuje také produkce interferonu gama a cytotoxických T lymfocytů. Tyto faktory posléze vedou k eliminaci viru z organismu (Albina a kol., 1998).

Současná sérologická diagnostika PRRSV je založena na průkazu protilátek proti některým strukturálním proteinům viru, především ORF 7 a je používána jako metoda stájové diagnostiky. Tato sérologická diagnostika je však zatížena nespecificky pozitivními i negativními výsledky, proto je žádoucí obohatit stávající diagnostické testy o nové virové proteiny jako antigeny. Navíc tato diagnostika interferuje s

vakcinací a ve vakcinovaných chovech ji proto nelze využít k detekci postinfekčních protilátek. V případě vakcinace inaktivovanou vakcínou je však možné vyvinout diagnostický set založený na detekci protilátek proti nestrukturálním proteinům viru PRRS. Tento typ proteinů je produkován pouze v buňkách infikovaných virem a protilátky proti těmto virovým strukturám je tedy možné detekovat pouze u zvířat infikovaných nebo vakcinovaných živým virem a lze tak relativně snadno odlišit postinfekční a postvakcinační protilátky.

Materiál a metody

Virovou RNA jsme získali z vakcinačního kmene evropského genotypu viru PRRS: Porcilis PRRS (Intervet). Gen pro nestrukturální protein Nsp 7 viru PRRS byl amplifikován metodou PCR za použití specifických primerů. Tyto primery byly navrženy na základě dostupných sekvencí PRRSV (Genebank) a byly na 5'konci vybaveny sekvencí CACC umožňující TOPO klonování do plazmidového vektoru pENTR/SD/D-TOPO (Invitrogen). Vzniklá DNA konstrukce byla ověřena sekvenováním. Následně byla provedena transpozice genu do vektoru pDest 17 (Invitrogen) umožňující expresi proteinu s polyhistidinovou kotvou. Vzniklou DNA konstrukcí byly transformovány různé genotypy hostitelských buněk *Escherichia coli*: BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL, BL21(DE3)pLysS a BL21-AI One Shot chemically competent cells (Invitrogene). Exprese rekombinantního proteinu byla indukována 0,1 mM IPTG nebo 0,2 % L-arabinózou (u BL21-AI buněk) po dobu 3 hodin při 37 °C a poté monitorována elektroforézou v polyakrylamidovém gelu v denaturujícím prostředí (SDS-PAGE). Exprimovaný protein byl purifikován metalochelatační afinitní chromatografií.

Purifikovaný rekombinantní protein Nsp 7 byl využit jako antigen v ELISA testu pro detekci viru-specifických protilátek v sérech prasat. Koncentrace antigenu vhodná pro ELISA test byla stanovena boxovou titrací za použití koncentrací: 40; 20; 10; 5; 2,5 a 1,25 ng/ml a ředění séra 1:100, 1:200 a 1:400. Sérologická reaktivita proteinu byla testována na souboru prasečích sér rozdělených do tří skupin: 1) séra kontrolní negativní skupiny, 2) séra PRRS negativních prasat vakcinovaných inaktivovanou vakcínou a 3) séra prasat přirozeně infikovaných PRRS virem. Všechny vzorky byly rovněž vyšetřeny komerčním ELISA testem založeným na strukturálním proteinu ORF 7 (Ingenasa) podle instrukcí výrobce.

Výsledky

Nejvýraznější produkci proteinu Nsp 7 vykazovaly buňky BL21(DE3)pLysS. Proto byla produkce a následná purifikace tohoto proteinu uskutečněna v tomto typu buněk. Výsledný rekombinantní protein byl purifikován z nesolubilní frakce bakteriálního lyzátu. Jeho čistota byla stanovena elektroforézou v polyakrylamidovém gelu. Identita rekombinantního Nsp 7 proteinu byla ověřena pomocí imunoblotu s monoklonální anti-polyHis protilátkou. Koncentrace purifikovaného proteinu byla stanovena spektrofotometricky a činila 0,2 µg/ml. Pro ELISA test byla zvolena optimální koncentrace proteinu 2,5 ng/ml a ředění séra 1:100.

Vyšetřovány byly 3 skupiny vzorků:

1) Séra kontrolní negativní skupiny (44 vzorků) byla vyšetřena komerčním testem ELISA pro potvrzení jejich negativity. Tato séra pak byla použita k určení cut-off hodnoty pro ELISA test založený na rekombinantním nestrukturálním proteinu. Cut-off hodnota byla stanovena jako součet průměrné hodnoty absorbancí negativních sér a

trojnásobku směrodatné odchylky tohoto souboru. Kontrolní sérum s touto absorbancí pak bylo zařazováno do každého prováděného testu.

2) ORF 7 a Nsp 7 ELISA testem byl vyšetřen soubor 20 vzorků sér prasat z chovu prostého PRRS infekce, ale vakcinovaných inaktivovanou vakcínou. Všechny tyto vzorky byly pozitivní ORF 7 ELISA testem, ale negativní Nsp 7 ELISA testem.

3) Pro porovnání citlivosti obou ELISA testů bylo vyšetřeno 199 vzorků sér z PRRS pozitivních chovů prasat. Nesouhlasné výsledky mezi oběma testy byly ověřeny imunoblotem. Výsledky tohoto porovnání jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1. Porovnání komerčního ELISA testu (ORF 7 protein) a Nsp 7 ELISA testu

		ORF 7 ELISA test		
		Pozitivní	Negativní	Celkem
Nsp 7 ELISA test	Pozitivní	69 (34,7 %)	10 (5,0 %)	79 (39,7 %)
	Negativní	57 (28,6 %)	63 (31,7 %)	120 (60,3 %)
	Celkem	126 (63,3 %)	72 (36,7 %)	199 (100 %)

Závěr

Naše výsledky demonstrují, že ELISA test založený na Nsp 7 proteinu viru nedosahuje sice diagnostické senzitivity ELISA testů založených na proteinu ORF 7, přesto však tento test detekoval dalších 5 % pozitivních sér, která by zůstala neodhalena při použití ORF 7 testu samotného.

Na omezeném souboru sér jsme potvrdili i hypotézu, že nestrukturální proteiny jsou vhodnými antigeny pro odlišení postinfekčních a postvakcinačních protilátek u zvířat vakcinovaných inaktivovanou vakcínou. Vzhledem k minimálnímu počtu PRRS negativních chovů se nám však podařilo získat jen omezený soubor sér nutných pro potvrzení této hypotézy.

Poděkování

Tato práce byla podporována Interní grantovou agenturou VFU Brno č.: 235/2009/FVL.

Literatura

Albina E., Piriou L., Hutet E., Cariolet R., L'Hospitalier R.: Immune responses in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV). *Vet Immunol Immunopathol.* 1998, 61(1): 49-66.

Cavanagh D.: *Nidovirales*: A new order comprising *Coronaviridae* and *Arteriviridae*. *Arch Virol.* 1997, 142: 629-633.

Dea S., Sawyer N., Alain R., Athanassios R.: Ultrastructural characteristics and morphogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus propagated in the highly permissive MARC-145 cell clone. *Adv Exp Med Biol.* 1995, 380: 95-98.

Meng X. J., Paul P. S., Morozov I., Halbur P. G.: A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J Gen Virol.* 1996, 77: 1265-1270.

Wensvoort G., Terpstra C., Pol J. M., ter Laak E. A., Bloemraad M., de Kluyver E. P., Kragten C., van Buiten L., den Besten A., Wagenaar F. et al.: Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet Q.* 1991, 13(3): 121-130.

Kontaktní adresa: Jitka Janková, Mgr., Ústav mikrobiologie a imunologie, FVL, VFU Brno, jankova.jj@seznam.cz

Prevalence a fylogenetická analýza TT virů prasat v České Republice a USA.

Prevalence and phylogenetic analysis of porcine TTviruses in Czech Republic and USA.

¹Jarošová Veronika, ¹Celer Vladimír, ²Pogranichnyi Roman

1. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Ústav mikrobiologie a imunologie, Palackého 1/3, 612 42, Brno, ČR.
2. Purdue University, The Indiana Animal Disease Diagnostic Laboratory, School of Veterinary Medicine, West Lafayette, IN, USA.

Abstract

Torque teno sus viruses (TTSV) were detected in the pig population of the Czech Republic by a nested PCR technique. The prevalence of individual TT viruses in the Czech Republic was determined to be 42.9% (TTSV1) and 46.7% (TTSV2). Both viruses were detected in 12% of newborn piglets, which suggests possible transplacental transmission.

Sequencing of several virus strains showed that sequenced TT virus strains belong to two different virus species. We can clearly distinguish the group TTSV1 and TTSV2, the level of nucleotide homology is about 43.3% between this two groups. There weren't demonstrated any differences in homology when comparing U.S. and Czech strains. The overall level of homology is 87.3% -100% at untranslated region for TTSV1 and TTSV2.

Klíčová slova: *Torque teno virus*, prevalence, fylogenetická analýza

Úvod

TT viry jsou malé neobalené viry s ikozahedrání symetrií velké zhruba 30±32 nm. Jejich genom je tvořen jednou cirkulární molekulou DNA (Okamoto a kol. 2002). Velikost genomu je různá v závislosti na druhu viru v rozmezí od 3000 do 4000 nt. Vyznačují se značnou genetickou variabilitou, jen lidské izoláty jsou rozděleny do 29 druhů. U prasat, jak domácích tak divokých byly popsány pouze dva druhy, *Torque teno sus virus 1* (TTSV1) a *Torque teno virus sus 2* (TTSV2), které patří do rodu *Iotatorquevirus* a čeledi *Anelloviridae* (ICTV 2009). První TTV izolát byl získán od Japonského pacienta s post-transfúzní hepatitidou neznámé etiologie (Nishizawa a kol. 1997). Následně byly TT viry prokázány u různých druhů domácích, volně žijících a hospodářských zvířat jako jsou například primáti, prasata, koně, psi, kočky, a další savci. Oba dva druhy TT virů jsou detekovány jak u prasat domácích tak i divokých a jejich výskyt je celosvětový (Cong a kol. 2000); (Leary a kol. 1999); (Okamoto a kol. 2001).

Stejně jako u humánních anellovirů nebylo zatím popsáno žádné onemocnění způsobené prasečími anelloviry. Zdá se ale, že TT viry mohou mít vliv na vyvolání onemocnění při koinfekci s jinými prasečími viry. Přenos je zajišťován především pomocí orofekální cesty, a také transplacentárním přenosem.

Cílem práce bylo určit prevalenci porcinních TT virů v České Republice a provést fylogenetickou analýzu sekvencovaných kmenů pocházejících z České republiky a USA.

Materiál a metody

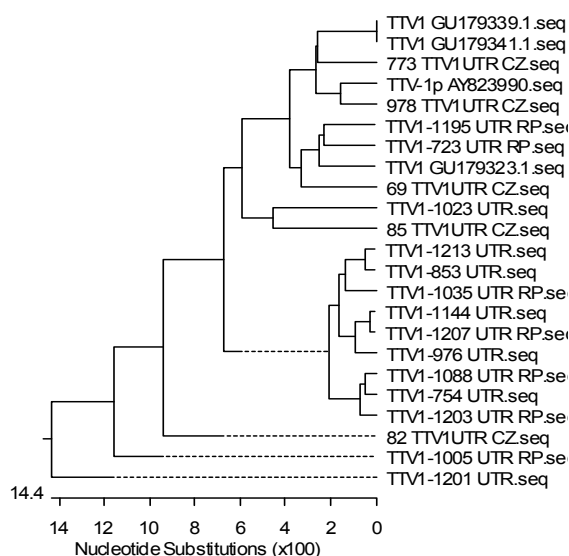
Celkem bylo pro určení prevalence TT virů v České Republice vyšetřeno 212 vzorků krve prasat z 27 prasečích chovů. U vzorků orálních tekutin z USA nebyla určována prevalence, byly pouze použity pro sekvencování. DNA byla extrahována ze vzorků pomocí NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) a poté byla skladována v zamraženém stavu.

Každý vzorek byl vyšetřen pomocí nested PCR s diagnostickými primery, které jsou pro oba viry lokalizovány ve vysoce konzervované oblasti nekódujícího regionu genomu a byly navrženy podle primerů publikovaných Martinezem a kol. 2006. Obě kola PCR reakce probíhaly za stejných teplotních podmínek. Následně byla provedena pouze u vzorků z České Republiky druhá nested PCR se sadou primerů umístěných v kódující oblasti genomu.

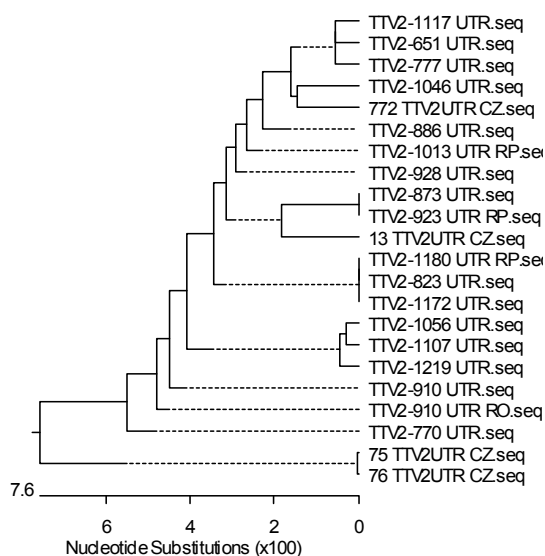
Pro sekvencování byly vyčištěny PCR produkty z 1% agarozového gelu. Nukleové kyseliny byly sekvencovány za použití BigDye[®] Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). Ke srovnání sekvencí a fylogenetické analýze byl použit Vector NTI v.10 software (Invitrogen, San Diego, CA).

Výsledky

TTSV1 byl prokázán u 91 vzorků a TTSV2 byl nalezen u 99 vzorků. Oba druhy prasečích TT virů byly současně detekovány u 66 vzorků. Byla zjištěna prevalence jednotlivých TT virů v České Republice, 42.9% (TTSV1) a 46.7% (TTSV2). Průměrná prevalence prasečích TT virů je tedy 44.8 %. Oba viry byly detekovány u novorozenech selat (1-2 dny po porodu), což naznačuje transplacentární přenos. Byly sekvenovány PCR fragmenty nekódujícího regionu genomu o velikosti 260 b.p. a PCR fragmenty kódující oblasti genomu o velikosti 850 b.p. Analýza nukleových kyselin potvrdila, že kmeny patří do dvou rozdílných druhů virů. Při srovnání nekódujících regionů obou druhů virů na úrovni nukleotidů byla zjištěna podobnost 43.3%. Nebyly zjištěny žádné rozdíly mezi českými a americkými kmeny. Sekvence TTSV1 a TTSV2 jsou homologní z 90 - 97% a 90-99%.



Obr.1.: fylogenetický strom TTSV1



Obr.2.: fylogenetický strom TSV2

Diskuse

V současnosti byly TT viry detekovány ve Francii, Itálii, Španělsku a v dalších zemích (Segales a kol. 2009), s prevalencí pohybující se od 11 do 93%. I když patogeneze anellovirových infekcí v současné době není známá a je zde možná souvislost se syndromem chřadnutí selat po odstavu. Některá pozorování naznačují, že roste pravděpodobnost vzniku PMWS u selat koinfikovaných virem PCV2 a TTSV2 (de Boissesson a kol. 2004). Je nutno počítat s tím, že tyto viry sice nevyvolávají samostatně žádnou klinickou odezvu ale mohou zhoršovat klinický průběh onemocnění.

Kultivace TT virů na buněčných kulturách zatím nebyla úspěšná, proto se v diagnostice využívá průkazu pomocí PCR. Kvůli jejich vysoké variabilitě se primery soustředí především do konzervované oblasti genomu. V humánní medicíně již byly vyvinuty i rekombinantní proteiny, které mohou být využity v sérologických testech.

Zatím nebyly doloženy žádné poznatky o mezidruhovém přenosu viru mezi zvířaty a člověkem, přesto je nutné počítat s možným zoonotickým potenciálem. Anelloviry by mohly hrát roli především při použití tkání prasat u xenotransplantací a také pro možný přenos do potravního řetězce.

Poděkování

Tento projekt je podporován Grantovou agenturou Ministerstva školství a mládeže, projekt číslo: ME08108.

Literatura

- Cong, M. E., B. Nichols, X. G. Dou, J. E. Spelbring, K. Krawczynski, H. A. Fields & Y. E. Khudyakov (2000) Related TT viruses in chimpanzees. *Virology*, 274, 343-355.
- de Boissesson, C., V. Beven, L. Bigarre, R. Thiery, N. Rose, E. Eveno, F. Madec & A. Jestin (2004) Molecular characterization of Porcine circovirus type 2 isolates from post-weaning multisystemic wasting syndrome-affected and non-affected pigs. *Journal of General Virology*, 85, 293-304.
- Leary, T. P., J. C. Erker, M. L. Chalmers, S. M. Desai & I. K. Mushahwar (1999) Improved detection systems for TT virus reveal high prevalence in humans, non-human primates and farm animals. *Journal of General Virology*, 80, 2115-2120.
- Nishizawa, T., H. Okamoto, K. Konishi, H. Yoshizawa, Y. Miyakawa & M. Mayumi (1997) A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 241, 92-97.
- Okamoto, H., T. Nishizawa, M. Takahashi, A. Tawara, Y. H. Peng, J. Kishimoto & Y. Wang (2001) Genomic and evolutionary characterization of TT virus (TTV) in tupaia and comparison with species-specific TTVs in humans and non-human primates. *Journal of General Virology*, 82, 2041-2050.
- Okamoto, H., M. Takahashi, T. Nishizawa, A. Tawara, K. Fukai, U. Muramatsu, Y. Naito & A. Yoshikawa (2002) Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaia. *Journal of General Virology*, 83, 1291-1297.
- Segales, J., L. Martinez-Guino, M. Cortey, N. Navarro, E. Huerta, M. Sibila, J. Pujols & T. Kekarainen (2009) Retrospective study on swine Torque teno virus genogroups 1 and 2 infection from 1985 to 2005 in Spain. *Veterinary Microbiology*, 134, 199-207.

Kontaktní adresa

Veronika Jarošová, Mgr., VFU Brno – FVL, Ústav mikrobiologie a imunologie, Sekce virologie, jaronika@seznam.cz

Molekulární detekce *Babesia caballi* u jordánských velbloudů

Molecular detection of *Babesia caballi* in Jordanian Dromedaries

Qablan Moneeb, Sloboda Michal, Modrý David

Abstract

A presence of *Babesia caballi* in camels was confirmed during a survey on blood protozoans in domestic animals in Jordan in 2008. A total of 4 (8%) clinically healthy camels originating from South Shouna were found positive using PCR. Sequence analysis of the isolates showed their conspecificity to *B. caballi* primarily infecting horses in the same locality. Sequences from both camels and horses were 100% identical. Present study is the first report of a presence of *Babesia* species in dromedary camels confirmed using molecular tools. The present study is supporting the theory on lower than expected host specificity of piroplasms infecting domestic animals. This study was financed by the internal grant of UVPS Brno (IGA159/2008/FVL)

Keywords: *Babesia*, *Theileria*, Jordan, host specificity, PCR

Introduction

Piroplasmids are worldwide distributed emerging tick-borne parasite of domestic animals and wildlife (Homer 2000). Veterinary important piroplasmids responsible for a serious economic challenge are found in cattle, horses and dogs (Uilenberg 2006). Equine piroplasmosis is caused by two species *Babesia caballi* and *Theileria equi*. The disease occurs throughout the tropical and subtropical areas of the world, with endemic areas in many parts of Europe, Asia, Arabia, south and Central America and Africa (Bhoora et al. 2008).

Piroplasms were considered to be highly specific parasites both in intermediate (vertebrate), and definitive (tick) hosts (Uilenberg et al. 1989; Uilenberg 2006). However, the level of their host specificity seems to be lower than previously thought; cases of “un-expected” piroplasmids in new vertebrate hosts are described in the literature in recent years. Advances in molecular techniques have resulted in the improved detection, identification and genetic characterization of many haemoparasites. In this study, blood samples from camels in Jordan have been examined by PCR amplification and sequence analysis of a fragment of the ssRNA gene.

Material and methods

Study was conducted in Jordan between March and April 2008. A total number of 50 camels were collected from four Jordanian localities (South-Shouna, Wadi Mousa, Wadi-Araba and Eastern Desert). Anamnestic data for each animal were obtained using bilingual questionnaires. From each animal blood preserved in ethanol was collected and two thin blood smear was prepared. The DNA was isolated using Phenol-Chloroform method. PCR was done using a pair of universal primer designed by (Criado-Fornelio et al. 2003). Later the PCR products were sequenced and subjected for further analysis.

Result

Clinical examination of camels revealed various health disorders like mange, mastitis and hair-loss in some animals, however, no clinical signs of piroplasmosis were observed. Neither *Babesia* nor *Theileria* merozoites were detected in the blood cells during the microscopic examination of the stained smears from camels.

All camel samples were analyzed by PCR amplification and direct sequencing of a fragment (~700bp) of the ssRNA gene. All positive camel samples were from south Shouna locality. Sequence results confirmed the occurrence of *Babesia caballi* in camels.

Discussion

Members of the genera *Babesia* and *Theileria* are of the most ubiquitous and widespread blood parasites in the world, based on numbers and distribution of species in animal, they ranked second only to the trypanosomes (Homer et al. 2008). The host specificity of piroplasms assumed to be lower than expected (Criado-Fornelio et al. 2003). Our finding of *Babesia caballi* isolates in Jordanian dromedary camels is in agreement with this assumption. To our knowledge this study represents the first report of piroplasmids infection in camels confirmed by molecular tools.

References

- BECK, R., VOJITA, L., MRLJAK, V., MARINCULIĆ, A., BECK, A., ZIVICNJAK, T., CACCIÒ, S. M. Diversity of *Babesia* and *Theileria* species in symptomatic and asymptomatic dogs in Croatia. *International Journal for Parasitology*, 2009, vol. 39, s. 843–8.
- BHOORA, R., FRANSSEN, L., OOSTHUIZEN, M. C., GUTHRIE, A. J., ZWEYGARTH, E., PENZHORN, B. L., JONGEJAN, F., COLLINS, N. E. Sequence heterogeneity in the 18S rRNA gene within *Theileria equi* and *Babesia caballi* from horses in South Africa. *Veterinary Parasitology*, 2008, vol. 159, s. 112–120.
- CRIADO-FORNELIO, A., MARTINEZ-MARCOS, A., BULING-SARANA, A., BARBA-CARRETERO, J. C. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe - Part I. Epizootiological aspects. *Veterinary Parasitology*, 2003, vol. 113, s. 189–201.
- HOMER, M. J., AGUILAR-DELFINO, I., TELFORD III, S. R., KRAUSE, P. J., PERSING, D. H. Babesiosis. *Clinical Microbiology Review*, 2000, vol. 13, s. 451–69.
- UILENBERG, G. Babesia—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 2006, vol. 138, s. 3–10.
- UILENBERG, G., FRANSSEN, F. F., PERIE, N. M., SPANJER, A. A. Three groups of *Babesia canis* distinguished and a proposal for nomenclature. *The Veterinary quarterly*, 1989, vol. 11, s. 33–40.

Contact address

MSc. Moneeb Qablan, Department of Parasitology, VFU Brno, Palackého 1/3, Brno, email: moneeb_78@hotmail.com

Detekce oocyst *Toxoplasma gondii* ve vzorcích z vnějšího prostředí

Detection of *Toxoplasma gondii* oocyst in samples from the environment

Neumayerová Helena, Koudela Břetislav

Abstract

Toxoplasmosis is one of the most common parasitic human and warm-blooded animals infections. In humans is *Toxoplasma gondii* dangerous especially for pregnant women and immunosuppressed patients. Cats and other felids are definitive hosts of this parasite and shed oocysts of *T. gondii* into the environment. Oocysts represent potential danger for human health. During the year 2009 was examined 150 samples from children sand-pits in Brno using PCR method. There were 3 positive samples for *T. gondii* DNA.

Klíčová slova: *Toxoplasma gondii*, toxoplasmóza, pískoviště, oocysty, kontaminace

Úvod

Toxoplasma gondii je celosvětově rozšířený parazit. Ve společnosti se o něm mluví zejména v souvislosti s kočkami a nebezpečím pro těhotné ženy. *T. gondii* přitom infikuje všechny teplokrevné obratlovce a může způsobit závažné problémy nejen u těhotných žen. U zdravých jedinců se toxoplasmóza může manifestovat jako chřipkové onemocnění, či angína. Vzhledem k příznakům jako jsou horečka, zduření mízních uzlin, únava, bolest svalů a další, nebývá většinou diagnostikována. Podle nových výzkumů, se až 30 % případů manifestuje klinicky (Ho-Yen, 2001).

Toxoplasmóza je také nebezpečná pro imunodeficitní pacienty, u kterých může způsobit závažné encefalitidy a pneumonie, které mohou vést až ke smrti. V případě, že se žena s parazitem před těhotenstvím nesetkala, nemá vytvořené protilátky a může dojít k transplacentálnímu přenosu a infekci plodu. Dochází tak k primoinfekci, která může vést k potratu (většinou v časně fázi těhotenství), dále k vývojovým vadám jako je hydrocefalus, microftalmie, intracerebrální kalcifikace a dalším pozdním následkům (mentální vady, epilepsie). Při nemanifestované infekci, se projeví následky až za několik let, například v podobě závažných očních problémů vedoucích někdy až ke ztrátě zraku.

Parazit má 3 infekční vývojová stadia, tachyzoity, bradyzoity a sporozoity. Tachyzoiti jsou charakterističtí pro akutní fázi onemocnění. Bradyzoiti jsou přítomni v tkáňových cystách v mase a v nakažených orgánech. Sporozoiti se nacházejí uvnitř infekčních oocyst.

Definitivním hostitelem tohoto parazita jsou kočkovité šelmy, u kterých dochází k pohlavní fázi rozmnožovacího cyklu a k následné tvorbě oocyst. Nevysporulované - neinfekční oocysty se s trusem dostávají do vnějšího prostředí. K tomu, aby oocysta byla infekční, musí vysporulovat, což trvá v závislosti na teplotě a přístupu ke kyslíku průměrně 3 až 5 dní (Dubey and Beattie, 1988).

Vzhledem k defekačním návykům koček, bývá trus často zahrabán do vlhké půdy nebo písku, kde mají oocysty ideální podmínky pro další přežívání. Kočky hrají významnou roli v epidemiologii toxoplasmózy. Kočka může během jednoho dne vyloučit až miliony oocyst (Dubey and Frenkel, 1972; Dubey 2001) Trus obsahující oocysty může

kontaminovat prostředí (vodu, půdu, vegetaci). Oocysty jsou odolné vůči mnoha chemikáliím a působení vysokých a nízkých teplot. (Dubey et al., 1970, Frenkel and Dubey, 1972). Za ideálních podmínek při 4 °C vydrží až 54 měsíců infekční, v půdě i více než 1 rok (Frenkel and Dubey, 1973; Frenkel et al., 1975). V literatuře se setkáváme s celou řadou zdokumentovaných epidemií toxoplasmózy, kdy došlo ke kontaminaci vodních zdrojů nebo půdy (Teutsch et al., 1979; Stagno et al., 1980; Benenson et al., 1982; Bowie et al., 1997; Aramini et al., 1999; Taverne, 2002). Díky novým molekulárním metodám dnes již můžeme monitorovat možnou kontaminaci prostředí.

Materiál a metody

Během jara až podzimu 2009 jsme provedli výzkum se zaměřením na možnou kontaminaci vnějšího prostředí oocystami *T. gondii*. Při sběru vzorků jsme se zaměřili na dětská pískoviště v různých městských částech města Brna a použili molekulární metody k odhalení případné kontaminace.

V laboratoři Ústavu parazitologie VFU Brno byla odzkoušena metoda PCR pro detekci oocyst na uměle infikovaném písku. Metoda vykázala citlivost 2 oocysty na 50 g písku. V průběhu jara až podzimu 2009 byly shromažďovány a vyšetřovány vzorky z městských částí Brno: Bohunice, Bystrc, Starý Lískovec, Řečkovice, Žabovřesky, Střed, Sever a Vinohrady. Z každého pískoviště byl odebrán směsný vzorek o hmotnosti asi 1kg. Pro samotné vyšetření bylo použito 50 g. Toto množství bylo smícháno s vodou do objemu 100 ml a po dobu 20 minut byl vzorek třepán na třepačce. Získaný roztok oddělený od kamínků byl centrifugován při 2000 ot. po dobu 10 minut. Supernatant byl odlit, ke vzorku se opět přidala voda, vzorek byl zamíchán a opět následovala centrifugace při 2000 ot. po dobu 10 minut. Po slití byl k sedimentu přidán flotační roztok (Sheatherův cukerný roztok). Pomocí sklíček byla přenesena povrchová blanka na sklíčko (moment prohlížení vzorků pro odhalení případné parazitární kontaminace), poté bylo sklíčko opláchnuto do zkumavky. Tento postup se opakoval 10×. Získaná suspenze byla odstředěna 10 min při 2000 ot. Výsledný objem 500 µl byl rozdělen na 2 části. První část vzorku byla zpracována standardně komerčním kitem pro izolaci DNA. U druhé části vzorku bylo aplikováno střídání cyklů vysokých a nízkých teplot (10 cyklů 80 °C a 10 cyklů -70 °C) pro případné rozbití oocyst. Dále se pokračovalo stejně jako s první částí vzorku, následovala izolace DNA komerčním kitem. PCR reakce byla koncipovaná v počtu 30 cyklů s primery TM1 a TM2 na tyto teploty - denaturace 94 °C 0,5 min, - annealing 60 °C 0,5 min, extenze 72 °C 10 minut. Negativní vzorky při první PCR reakci byly vyšetřeny double PCR. Výsledky byly vizualizovány na 1% agarózovém gelu v UV světle.

Výsledky a diskuse

Ze 150 vyšetřených pískovišť byly pozitivní jen 3 pískoviště na přítomnost DNA *T. gondii*. (2 pískoviště na Vinohradech a 1 pískoviště v Bystrci). V Bystrci šlo o lokalitu blízko zahrádek, kde se kočky často objevují a v minulosti zde byl městskou částí řešen problém časté fekální kontaminace. Na Vinohradech byla kontaminace zjištěna ve 2 pískovištích. Zde je nutno dát do souvislosti problém s přemnožením koček v této městské části a jejich následný odchyt. Mimo kontaminaci oocyst *T. gondii* bylo zjištěno i zastoupení ostatních parazitů. Ve čtyřech pískovištích byla nalezena i vajíčka škrkavek r. *Toxocara*.

V současné době je zpracováno několik metodických studií, které se zaměřují na možnosti detekce oocyst *T. gondii* v prostředí (Matsuo et al., 2004; Alfonso et al., 2008). Pouze Lass et al. (2008) přináší informace o míře kontaminace dětských pískovišť. Vyšetření proběhla v polských městech a ukázala poměrně vysokou míru kontaminace u 13 pozitivních pískovišť z 83 vyšetřených.

Závěr

Můžeme tedy říci, v městě Brně je situace o poznání lepší, zřejmě také z důvodů pravidelného vyměňování písku (na jaře před začátkem sezóny). Ke snížení kontaminace prostředí také jistě pomůže i sledování pohybu koček a při jejich přemnožení by mělo dojít k odchytu. I nadále je důležité se tématu *T. gondii* v prostředí věnovat a snížit tak možnost nákazy pro člověka.

Literatura

- ALFONSO, E., LEMOINE, M., POULEE, M. L., RAVAT, M. C., ROMAND, S., THULLIEZ P., VILLENA, I., AUBERT, D. Spatial distribution of soil contamination by *Toxoplasma gondii* in relation to cat defecation behaviour in urban area. *Internation Journal for Parasitology*, 2008, vol. 38, s. 1017-1023.
- ARAMINI, J. J., STEPHEN, C., DUBEY, J. P., ENGELSTOFT, C., SCHWANTJE, H., RIBBLE, C. S. et al. Potencial contamination of drinking water with *Toxoplasma gondii* oocyst. *Epidemiology and Infection*, 1999, vol. 122, s. 305-315.
- BENENSON, M. W., TAKAFUJI, E. T., LEMON, S. M., GREENUP, R. L., SULZER, A. J. Oocyst-transmitted toxoplasmosis associated with ingestion of contaminated water. *The New England Journal of Medicine*, 1982, vol. 307, s. 666-669.
- BOWIE, W. R. Outbreak of toxoplasmosis associated with municipal drinking water. *Lancet*, 1997, vol. 350, s. 173-177.
- DUBEY, J. P. 2001. Oocysts shedding by cats fed isolated bradyzoites and comparison of infectivity of bradyzoites of the VEG strain *Toxoplasma gondii* to cats and mice. *Journal of Parasitology*, 2001 vol. 87, s. 215-219.
- DUBEY, J. P., BEATTIE, C. P. Toxoplasmosis of animals and man. Boca Raton, Fla. : CRC Press: 1988, 220pp.
- DUBEY, J. P., FRENKEL, J. K. Cyst-induced toxoplasmosis in cats. *Journal of Protozoology*, 1972, vol 19, s. 155-177.
- DUBEY, J. P., MILLER, N. L., FRENKEL, J. K. Characterization of the new fecal form of *Toxoplasma gondii*. *Journal of Parasitology*, 1970, vol. 56, s. 447-456.
- FRENKEL, J. K., DUBEY, J. P. Effect of freezing on the viability of *Toxoplasma gondii* cyst and oocysts. *Journal of Parasitology*, 1973, vol. 59, s. 587-588.
- FRENKEL, J. K., RUIZ, A., CHINCHILLA, M. Soil survival of *Toxoplasma* oocysts in Kansas and Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1976, vol. 24, s. 439-443.
- HO-YEN, D.O. *Infection in the immunocompetent*. In JOYNSON, D.H.M., WREGHITT, T.G. *Toxoplasmosis A comprehensive clinical guide*. 1. st. ed. Cambridge : Cambridge University Press, 2001. p. 125 – 143.
- LASS, A., PIETKIEWICZ, H., MODZELEWSKA, E., DUMETRÉ, A., SZOSTAKOWSKA, B., MYJAK, B. Detection of *Toxoplasma gondii* oocysts in environmental soil symples using molecular methods. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 2008, vol. 28, s. 599-605.

MATSUO, J., KIMURA, D., RAI S., K., UGA, S. Detection of *Toxoplasma* oocysts from soil by modified sucrose flotation and PCR methods. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine & Public Health*, 2004, vol. 35, s. 270-274.

STAGNO, S., DYKES, A. C., AMOS, C. S., HEAD, R. A., JURANEK, D., WALLS, K. et al. An outbreak of toxoplasmosis linked to cats. *Pediatrics*, 1980, vol. 65, s. 706-711.

TAVERNE, J. Toxoplasmosis in Brazil (in brief). *Trends in Parasitology*, 2002, vol. 18, s. 203-204.

TEUTSCH, S. M., JURANEK, D. D., SULZER, A., DUBEY, J. P., SIKES, R. K., et al. Epidemic toxoplasmosis associated with infected cats. *The New England Journal of Medicine*, 1979, vol. 300, s. 695-699.

Kontakní adresa

Mgr. Helena Neumayerová, Ústav parazitologie, VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, email: hneu.vfu@gmail.com

Gastrointestinal parasites of indigenous and introduced primate species of Rubondo Island National Park, Tanzania, with special emphasis on *Blastocystis* sp.

Gastrointestinální parazité původních a introdukovaných druhů primátů žijících na ostrově Rubondo Island, Tanzanie, se zaměřením na *Blastocystis* sp.

Petrášová Jana, Uzlíková M, Kostka M, Petrželková KJ, Huffman MA, Mapua MI, Bobáková L, Mazoch V, Singh J, Kaur T, Modrý David

Abstract

The gastrointestinal parasites have been monitored in three primate species populations living in the isolated ecosystem of Rubondo Island NP, Tanzania; translocated chimpanzees (*Pan troglodytes*) and guerezas (*Colobus guereza*) and the indigenous vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*). *Troglodytella abrassarti* and *Enterobius* cf. *anthropopithecii* were detected only in chimpanzees, *Chilomastix mesnili* in chimpanzees and guerezas. In vervet monkeys, we found *Anatrichosoma* sp. and *Subulura* sp.; previously reported in Rubondo chimpanzees. *Blastocystis* sp., *Giardia* sp., *Iodamoeba buetschlii*, *Entamoeba coli*, *Entamoeba* spp., *Trichuris* sp., *Strongyloides* spp., spirurids and undetermined strongylids were present in all three primate species. We found significant difference in sensitivity for the detection of *Blastocystis* sp. between PCR-based method and MIFC. Subtypes (ST) of *Blastocystis* sp. were determined by sequencing of SSU rDNA. In total 31 isolates from all primates were placed within ST 1, three isolates belonged to the ST 2, and three isolates to the ST 3 and one isolate to the ST 5. The present study was supported by AV CR (KJB600930615), GA CR (524/06/0264, 206/09/0927) and IGA VFU (IGA 77/2007/FVL).

Keywords: primate introduction, parasite, prevalence, *Blastocystis*, chimpanzee

Translocation programs releasing animals into the wild need to assess the potential risks associated with the exchange pathogens between native and translocated species (Cunningham 1996). The present study evaluates the composition of the parasite communities in sympatric native and introduced primates in an isolated ecosystem of Rubondo Island NP, Tanzania. Over a three-year period we monitored the gastrointestinal parasites of three primate species populations; translocated chimpanzees (*Pan troglodytes*), guerezas (*Colobus guereza*) and the indigenous vervet monkeys (*Chlorocebus aethiops pygerythrus*). In total 366 (n= 206, 111, 49) fecal samples were collected from chimpanzees, vervet monkeys and guerezas, respectively. Samples were examined microscopically by merthiolate-iodine-formalin concentration (MIFC) method (Blagg *et al.* 1955). Results revealed that *Troglodytella abrassarti* and *Enterobius* cf. *anthropopithecii* (Fig.1: a, g) occur only in chimpanzees, while *Chilomastix mesnili* (Fig.1: d) was reported from chimpanzees and guerezas. Further, we report *Anatrichosoma* sp. (Fig. 1: l) and *Subulura* sp. (Fig. 1: m) from vervet monkeys, which previously have been reported from Rubondo chimpanzees (Petrželkova *et al.* 2006; 2010). Additionally the following parasites also recorded from all three primates species included in the study (Fig.1); *Blastocystis* sp. (b), *Giardia* sp. (c), *Iodamoeba buetschlii* (f), *Entamoeba coli* (e), *Entamoeba* spp., *Trichuris* sp. (k), *Strongyloides* spp.(i), spirurids (cf. *Protospirura muricola*) (j) and undetermined strongylids (h). Detection of *Protospirura muricola*, *Anatrichosoma* sp. and *Subulura*

sp. from chimpanzees and guerezas in our study and its absence from wild populations could be attributed to the possibility of acquiring the infection from native vervet monkeys. The oocysts of *Eimeria* sp. and polysporocystid undetermined adeleid coccidia were present in chimpanzee and vervet samples and we considered them as spurious parasites (n).

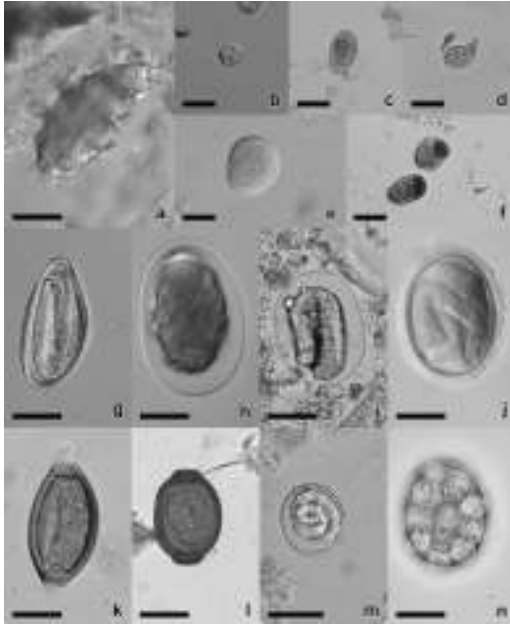


Figure 1.

Blastocystis is a common intestinal protozoa occurring in humans and various animals including pigs, monkeys, guinea pigs, birds, reptiles and rats (Tan 2004). Cysts are transmitted by fecal-oral route between animals and humans (Salim *et al.* 1999; Tan 2004). Due to the different origin of each primate species, genetic identification of *Blastocystis* subtypes could bring a new light to understand the possibility of transmission and distribution of *Blastocystis* in nature conditions. All fecal samples were examined by PCR-based method (Scicluna 2006). We conducted comparisons of PCR-based method and MIFC prevalence of *Blastocystis* using the Mc Nemar test for all fecal samples. Statistical analysis shows significant difference in sensitivity between PCR and MIFC (Mc Nemar test; $\chi^2 = 102, 43$; $P < 0.001$). For phylogenetic analysis resulted sequences of the SSU rDNA were aligned together available homologues sequences from *Blastocystis* subtypes indexed in the GenBank™ database. From thirteen morphologically identical subtypes of *Blastocystis* sp., seven subtypes have been isolated from non-human primates; five of these subtypes occur in humans (Stensvold *et al.* 2009; Parkar *et al.* 2010). In total 31 *Blastocystis* isolates from all primates were placed within ST 1, three isolates from guerezas and vervet monkeys within ST 2 and three isolates from guerezas and vervet monkeys fell within ST 3. The only one isolate belonging to ST 5 was from guereza. All subtypes were previously reported in captive primates and humans (Stensvold *et al.* 2009). Phylogenetic analyses indicate that transmission of *Blastocystis* sp. does not occur among Rubondo primate species.

Despite a lack of any apparent health problems from infections in introduced Rubondo primates, parasite monitoring during reintroduction/introduction projects is necessary to decrease potential risks resulting from the exchange of parasites between translocated and native species.

References

- BLAGG, W., SCHLOEGEL, E. L., MANSOUR, N. S., KHALAL, G. I. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1955, vol. 4, s. 23-28.
- CUNNINGHAM, A. A. Disease risks of wildlife translocations. *Conservation Biology*, 1996, vol. 10, s. 349-353.
- PARKAR, U., TRAUB, R. J., VITALI, S., ELLIOT, A., LEVECKE, B., ROBERTSON, I., GEURDEN, T., STEELE, J., DRAKE, B., THOMPSON, R. C. Molecular characterization of

Blastocystis isolates from zoo animals and their animal-keepers. *Veterinary Parasitology*, 2010, vol 169, s. 8-17.

PETRZELKOVA, K. J., HASEGAWA, H., MOSCOVICE, L. R., KAUR, T., MAPUA, M. I., HUFFMAN, M. A. Parasitic nematodes in the chimpanzee population on Rubondo Island, Tanzania. *International Journal of Primatology*, 2006, vol. 27, s. 767-777.

PETRZELKOVA, K. J., HASEGAWA, H., APPLETON, C. C., HUFFMAN, M. A., ARCHER, C. E., MOSCOVICE, L. R., MAPUA, M. I., SINGH, J., KAUR, T. Gastrointestinal parasites of the chimpanzee population introduced onto Rubondo Island National Park, Tanzania. *American Journal of Primatology*, 2010, vol. 72, s. 307-316.

SALIM, H. R., KUMAR, G. S., VELLAYAN, S., MAK, J. W., ANUAR, A. K., INIT, I., VENNILA, G. D., SMINATHAN, R., RAMAKRISHNAN, K. *Blastocystis* in animal handlers. *Parasitology Research*, 1999, vol. 85, s. 1032-1033.

SCICLUNA, S. M., TAWARI, B., CLARK, C. G. DNA barcoding of *Blastocystis*. *Protist*, 2006, vol. 157, s. 77-85.

STENSVOLD, C. R., ALFELLANI, M. A., NORSKOV-LAURITSEN, S., PRIP, K., VICTORY, E. L., MADDOX, C. Subtype distribution of *Blastocystis* isolates from synanthropic and zoo animals and identification of a new subtype. *International Journal of Parasitology*, 2009, vol. 39, s. 473-479.

TAN, K. S. *Blastocystis* in humans and animals: new insight using modern methodologies. *Veterinary Parasitology*, 2004, vol.126, s. 121-144.

Kontaktní adresa

MVDr. Jana Petrášová, Ústav fyziologie, VFU Brno, Palackého 1/3, Brno, email: petrasovaj@vfu.cz

Záchyt *Mycoplasma bovis* ze zevního zvukovodu telat postižených zánětem horních cest dýchacích

Detection of *Mycoplasma bovis* in external ear canal of calves suffering from respiratory disease

Pospíchalová Jana, Zendulková Dagmar, Rosenbergová Kateřina, Pospíšil Zdeněk

Abstract

Similarly like other Mollicutes, *Mycoplasma bovis* is small, pleomorphic bacterium that lacks a cell wall. It causes severe respiratory and reproductive disorders in cattle, has been identified in aborted fetuses, is responsible for mastitis in cows, arthritis (Nicholas and Ayling, 2003; Pfützner and Sachse, 1996), keratoconjunctivitis (Kirby and Nicholas, 1996), recently was also recognized as cause of otitis media (Lamm et al., 2004) and it has even been found in the brain tissue of animals with neurological findings (Ayling et al., 2005). Swabs taken from nose, conjunctiva and external ear canal were examined for *Mycoplasma* spp. by culture on appropriate liquid and solid media. The identification of *Mycoplasma* strains was carried out by nested-PCR. Culture technique revealed *Mycoplasma* spp. in six samples, three samples were taken from nose, two from conjunctiva and one from external ear canal. *Mycoplasma bovis* was identified by nested-PCR in four samples of them, two samples came from external ear canal and the others from nasal mucosa.

Keywords: *Mycoplasma bovis*, nested-PCR, otitis media, calves

Úvod

Mycoplasma bovis, podobně jako ostatní zástupci třídy Mollicutes, je malá pleomorfní, atypická bakterie postrádající buněčnou stěnu. Poprvé byla izolována v USA v roce 1961 z případu závažné mastitidy (Hale a kol., 1962). Je rozšířena v mnoha zemích světa a dnes již uznána jako primární patogen skotu, který může být příčinou závažných bronchopnemonií telat, artritid, reprodukčních problémů, mastitid (Pfützner a Sachse, 1996; Nicholas a Ayling, 2003), keratokonjunktivitid (Kirby a Nicholas, 1996) a nově také otitid. Až 10% postižených telat může uhynout na následky závažné sérofibrinózní pneumonie. Jedinci, kteří onemocnění přežijí, zaostávají v růstu a často u nich dochází k relapsu onemocnění (Nicholas a kol., 2001).

Poprvé byla otitida způsobená infekcí *Mycoplasma bovis* prokázána u telat v Severní Americe a Japonsku. Patogeneze onemocnění není zcela objasněna, ale předpokládá se, že infekce se s největší pravděpodobností šíří z faryngu přes Eustachovu trubici do střední části zvukovodu. Často bývá onemocnění u telat komplexní a je spojeno i s příznaky poruch respiračního aparátu. Klinicky se může infekce projevit netypickým držením hlavy a neurologickými příznaky. Nejčastěji je pozorováno mezi druhým a osmnáctým týdnem věku telat jak mléčných, tak i masných plemen skotu (Maeda a kol., 2003; Lamm a kol., 2004; Francoz a kol., 2005). V souvislosti s otitidou a nervovými příznaky byla *Mycoplasma bovis* prokázána i v mozku telat (Ayling a kol., 2005).

V České republice byla *Mycoplasma bovis*, po více než třicetiletém období bez záchytu, prokázána u telat s respiračními problémy v roce 2007 (Zendulková, 2007). Od té doby izolací tohoto patogena postupně přibývá.

Materiál a metody

Vyšetřovaný materiál byl získáván díky spolupráci s praktickými veterinárními lékaři a pracovníky firmy Pfizer, s.r.o., v různých chovech České republiky s hlavním zaměřením na ty, které se dlouhodobě potýkají s respiračními problémy telat a kde se tudíž nedala vyloučit přítomnost *Mycoplasma bovis*. Vzorky byly odebírány formou pasivního monitoringu, čili pouze od zvířat vykazujících klinické příznaky respiračního onemocnění, otitid nebo nervových poruch.

K vyšetření sloužily výtěry odebrané z nosní a spojivkové sliznice a ze zevního zvukovodu.

Vzorky byly odebrány od 20 telat. Celkem bylo vyšetřeno 14 výtěrů zevního zvukovodu, 14 spojivkových výtěrů (tři vzorky byly směsné od více zvířat) a 7 nosních výtěrů.

Kultivační vyšetření bylo prováděno na tekutých a pevných půdách pro mykoplazmata v aerobních a mikroaerofilních podmínkách za teploty 37°C. Pro druhovou identifikaci byla využita metoda nested-PCR, založená na amplifikaci *uvrC* genu specifického pro *Mycoplasma bovis*.

Výsledky

Mycoplasma bovis byla prokázána metodou nested-PCR ve čtyřech vzorcích pocházejících ze tří zvířat, dva byly odebrány ze zevního zvukovodu a ve zbývajících dvou případech se jednalo o nosní výtěry. Kultivačním vyšetřením byla *Mycoplasma* spp. prokázána v šesti vzorcích, ve třech případech se jednalo o nosní výtěr, ve dvou o výtěr spojivky a jeden pozitivní vzorek byl odebrán ze zevního zvukovodu. Ostatní vzorky byly na základě kultivačního vyšetření a nested-PCR označeny jako negativní. Kultivační vyšetření bylo negativní pouze u jednoho PCR pozitivního vzorku.

Diskuse a závěr

Mycoplasma bovis byla metodou nested-PCR prokázána ve dvou vzorcích výtěrů ze zevního zvukovodu, u jednoho z těchto výtěrů bylo pozitivní i kultivační vyšetření. Poprvé byl zánět středního ucha související s infekcí *Mycoplasma bovis* popsán u pěti telat holštýnského skotu v Michiganu, zde bylo pravděpodobným zdrojem infekce mléko krav se subklinickou mastitidou (Watz a kol., 1997). Z případů podobného onemocnění, které se vyskytlo v Anglii a Irsku, byla *Mycoplasma bovis* izolována z mozku a zvukovodu dvou postižených telat. U jednoho z nich bylo onemocnění ošetřeno antibiotiky, ale infekce později znovu propukla po přesunu zvířete. U telat byly zjištěny vysoké titry protilátek proti *Mycoplasma bovis* a sérologicky pozitivní byly i jejich matky (Ayling a kol., 2005). Další případ byl zaznamenán v roce 2007 ve Velké Británii, kde se u 20% telat na jedné farmě objevily příznaky závažné otitidy. Mykoplazmologickým vyšetřením ušních a nosních výtěrů uvedených telat byla potvrzena *Mycoplasma bovis* (Foster a kol., 2009).

V současné době nejsou dostupné informace o prevalenci *Mycoplasma bovis* v chovech České republiky, protože jen málo laboratoří se rutinně zabývá diagnostikou mykoplazmat. Jak však vyplývá z našich dosavadních vyšetření, případů infekcí vyvolaných *Mycoplasma bovis* postupně přibývá. Proto je naším cílem i nadále pokračovat v těchto studiích a přispět tak k detailnějšímu posouzení dané problematiky.

Poděkování

Práce vznikla díky finanční podpoře projektu VZ MSM 6215712403.

Literatura

- AYLING, R.D. - NICHOLAS, R.A.J. - WESSELLS, J. - HOGG, R. - BYRNE, W. Isolation of *Mycoplasma bovis* from the brain tissue of calves. *Veterinary Record*. 2005, 156: 391–392
- FOSTER, A P. - NAYLOR, R.D. - HOWIE, N.M. - NICHOLAS, R.A.J. - AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis* and otitis in dairy calves in the UK. *The Veterinary Journal*. 2009, 179: 455-457
- FRANCOZ, D. - FORTIN, M. - FECTEAU, G. - MESSLER, S. Determination of *Mycoplasma bovis* susceptibilities against six antimicrobial agents using the E test method. *Veterinary Microbiology*. 2005, 105: 57–64
- HALE, H.H. - HELMBOLDT, C.F. - PLASTRIDGE, W.N. - STULA, E.F. Bovine mastitis caused by *Mycoplasma* species. *Cornell Veterinarian*. 1962, 52: 582–591
- KIRBY, F.D. - NICHOLAS, R.A.J. Isolation of *Mycoplasma bovis* from bullocks' eyes. *Veterinary Record*. 1996, 138: 552
- LAMM, C.G. - MUNSON, I. - THURMOND, M.C. - BARR, B.C. - GEORGE, L.W. *Mycoplasma* otitis in California calves. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2004, 16: 397–402
- MAEDA, T. - SHIBAHARA, T. - KIMURA, K. - WADA, Y. - SATO, K. - IMADA, Y. - ISHIKAWA, Y. - KADOTA, K. *Mycoplasma bovis*-associated suppurative otitis media and pneumonia in bull calves. *Journal of Comparative Pathology*. 2003, 129: 100–110
- NICHOLAS, R.A.J. - WOOD, E. - BAKER, S. - AYLING, R.D. *Mycoplasmas* isolated from ruminants in Britain 1995–2000. In: Poveda, J.B., Fernandez, A., Frey, J., Johansson, K.-E. (Eds.), *Mycoplasmas of ruminants: Pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*, vol. 5. European Commission, Brussels. 2001, pp: 116–120.
- NICHOLAS, R.A.J. - AYLING, R.D. *Mycoplasma bovis*, disease, diagnosis and control. *Research in Veterinary Science*. 2003, 74: 105–112
- PFÜTZNER, H. - SACHSE, K. *Mycoplasma bovis* as an agent of mastitis, pneumonia, arthritis and genital disorders. *Revue Scientifique and Technique. Offices International Des Epizooties*. 1996, 15: 1477–1494
- ZENDULKOVÁ D. - HAAS D. - ROSENBERGOVÁ K. - POSPÍŠIL Z. - LÁNY P. - BURDOVÁ E. Bacterial profile of bovine respiratory disease in young calves. *Suppl Revista Romana de Medicina Veterinara*. 2007, 2 (17): 64
- WALZ, P.H. - MULLANEY, T.P. - RENDER, J.A. - WALKER, R.D. - MOSSER, T. - BAKER, J.C. Otitis media in preweaned Holstein dairy calves in Michigan due to *Mycoplasma bovis*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 1997, 9:250-254

Kontaktní adresa

MVDr. Jana Pospíchalová, mvdr.pospichalova@seznam.cz, Ústav infekčních chorob a epizootologie, Palackého 1/3, 612 42 Brno

Genetická analýza virů influenzy prasat Genetic analysis of swine influenza viruses

Rosenbergová Kateřina, Lány Petr, Zendulková Dagmar, Pospíšil Zdeněk

Abstract

The aim of this study was genetic analysis of swine influenza virus obtained from herds of swine in Czech Republic. In 2005 we isolated swine influenza virus and serologically identified as subtype H1N1 for the first time. In 2008 we detected influenza virus in nasal swab of clinically diseased swine. Both of virus we unitized as H1N1 by RT-PCR. For the genetic analysis we amplified cDNA of all eight viral segments. Genetic analysis of viruses was realised by sequencing. From sequence data was created phylogenetic analysis at the base of comparison our viral sequences with viral sequences from genetic database NCBI. Both of our swine viruses belong to „avian like“ H1N1 swine influenza viruses.

Key words: H1N1, swine, RT-PCR, sequencing

Úvod

Influenza je vysoce infekční virové onemocnění postihující respirační aparát savců (především koní a prasat), včetně člověka. U ptáků postihuje respirační a gastrointestinální trakt nebo u nich dochází k rozvoji systémového onemocnění. V chovech hospodářských zvířat i drůbeže může způsobit tato nákaza nejen zdravotní problémy, ale znamená také nemalé ekonomické ztráty. Významné riziko představuje influenza i pro humánní populaci. Pandemie influenzy v lidské populaci může svojí vysokou morbiditou ohrožovat ekonomiku i chod státu. Vznik nových pandemických virů je doposud objasněn pouze částečně. Důležitou roli zde může hrát prase, dlouho považované za mixážní nádobu, ve které mohou po současné infekci několika různými viry influenzy vznikat jejich nové varianty.

Po krátkém mezidobí, kdy se ukázalo, že aviární viry mohou infikovat člověka bez přechozích mutací v prasatech, se objevil pandemický virus H1N1 2009, který obsahuje geny pocházející z virů influenzy ptáků, lidí a prasat a jehož předchůdce cirkuluje mezi severoamerickými prasaty již deset let. Tím se navrácí původní teorie o praseti, jako mixážní nádobě influenzových virů.

Pandemický virus H1N1 2009 má geny pro hemaglutinin (HA), nukleoprotein (NP) a nestrukturální protein (NS) z americké linie klasických influenzových virů prasat H1N1, geny pro polymerázu A (PA) a polymerázu B2 (PB2) z americké linie neznámých influenzových virů ptáků a gen pro polymerázu B1 (PB1) z lidského sezónního viru H3N2. Zvláštní je přítomnost genů pro matrixový protein (MP) a neuraminidázu (NA) z evropské linie influenzových virů prasat H1N1 avian like (Kou *et al.*, 2009).

Informace o experimentální infekci prasat, stejně jako zavlečení pandemického viru do chovů prasat v různých státech světa, ukazují na možnost jeho cirkulace v chovech prasat (OIE 2009, Lange *et al.*, 2009). Při současné infekci prasat viry influenzy prasat a pandemickým virem vzniká nebezpečí vzniku další varianty s neznámou virulencí jak pro prasata, tak i pro člověka.

Materiál a metodika

Vzorky: Virus influenzy prasat A/sw/Brno/1/2005, námi poslední izolovaný virus. Výtěr z rypáku klinicky nemocného prasete z prosince 2008, který byl pozitivní při vyšetření RT-PCR na průkaz matrixového proteinu influenzy A (A/sw/Brno/1/2008).

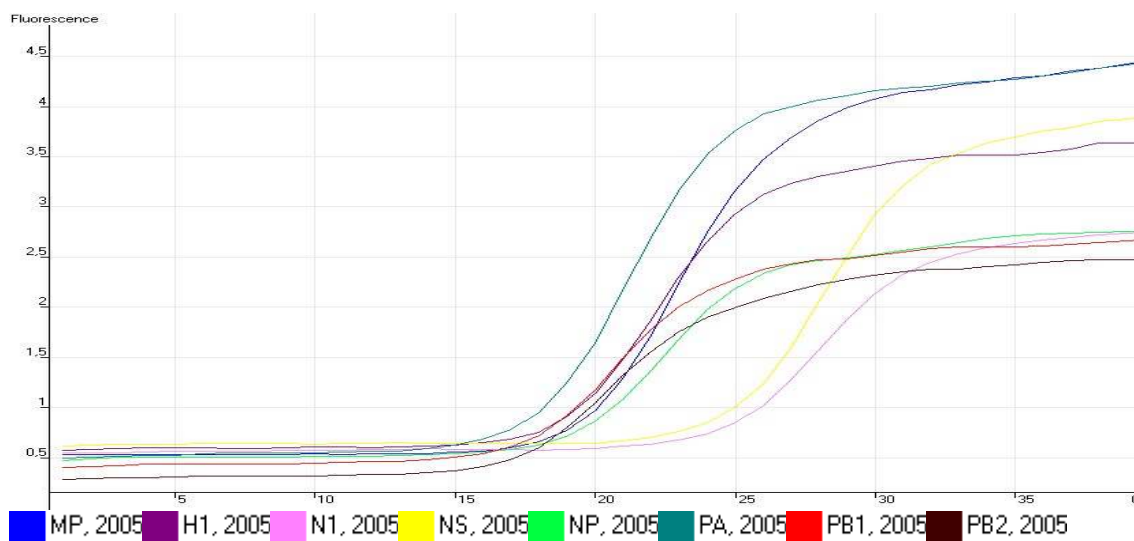
Izolace RNA: Ze vzorků virů byla izolována RNA pomocí komerční soupravy *RNeasy Mini Kit* (Quiagen) dle návodu od výrobce.

Reverzně transkripční PCR (RT-PCR): Amplifikace byla prováděna jako real time RT-PCR. K amplifikaci úseků cDNA jednotlivých segmentů viru influenzy byla využita souprava pro jednostupňovou real time RT-PCR – *SYBR 1-STEP QRT-PCR kit* (Invitrogen). Amplifikace byla provedena v termocykleru Rotor-Gene RG - 3000 (Corbett Research, Australia).

Vlastní sekvenace: Získané amplifikační produkty byly přečištěny pomocí purifikačního kitu “*QIAquick PCR Purification kit*” (Qiagen). Sekvenace byla provedena metodou kapilární elektroforézy s laserovým detektorem a automatickým genetickým analyzárem na Ústavu biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Ze získaných sekvenačních dat byla pomocí programu AlignX (Vector NTI Suite 5,5, INFORMAX) provedena fylogenetická analýza úseků jednotlivých segmentů viru influenzy jejich srovnáním se sekvencemi z genové banky NCBI (GenBank).

Výsledky

Kvantita produktu pro sekvenaci byla kontrolována real time RT-PCR (obr. č. 1)



Obr. č. 1: Nárůst fluorescence v průběhu amplifikace jednotlivých úseků cDNA viru influenzy

Hemagglutinin viru A/sw/Brno/1/2005 je nejvíce příbuzný virům influenzy prasat H1N1 avian like, tak jak jsme předpokládali podle výsledků předběžné sérotypizace viru pomocí referenčních antisér z projektu ESNIP a vyšetřením sér nemocných prasat z chovu, ze kterého byl virus izolován. Stejnou příbuznost vykazuje i virus A/sw/Brno/1/2008.

Neuraminidáza obou virů je také nejvíce příbuzná neuraminidázám ostatních virů influenzy prasat H1N1 avian like a částečně pandemickému viru A/H1N1 2009, podobně jako matrixový protein.

Ostatní segmenty obou virů rovněž zapadají do skupiny virů influenzy prasat H1N1 avian like a jsou odlišné od lidských virů, včetně pandemického.

Lze tedy konstatovat, že námi poslední izolovaný kmen z roku 2005 i virus A/sw/Brno/1/2008, obsažený ve výtěru z rypáku klinicky nemocného prasete, patří celé do skupiny virů influenzy prasat H1N1 avian like a neobsahují žádné segmenty RNA z jiných influenzových virů.

Diskuze a závěr

V evropských chovech prasat cirkuluje v současné době několik subtypů influenzových virů prasat. Nejběžnější je virus H1N1 aviárního původu, který se do západoevropských populací prasat inkorporoval na konci 70. let (*Panseart et al. 1981*). Od pandemie viru H3N2 v roce 1968 byly popisovány záchyty tohoto viru i u prasat (*Kundin, 1970*). Od roku 1994 se objevila varianta viru influenzy prasat H1N2, který měl H1 humánního původu z 80. let a N2 z viru influenzy prasat H3N2 (*Kuntz-Simon a kol. 2009*).

Výsledky sekvenací všech osmi segmentů námi posledně izolovaného viru z roku 2005 i viru z roku 2008 ve výtěru prokázaly, že se jedná právě o viry influenzy prasat H1N1 avian like. Zároveň to ukazuje na skutečnost, že tyto viry neprodělaly žádný reassortment s jiným virem influenzy prasat, ptáků nebo lidí. Zoonotický potenciál těchto virů je v současné době minimální. Jejich možný reassortment s pandemickým virem H1N1 2009 by však mohl zvýšit virulenci výsledného rekombinanta, zvláště pro prasata.

Literatura

Kou Z, Hu SN, Li TX.: Genome evolution of novel influenza A (H1N1) viruses in humans. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(13): 2159-2163.

Kundin WD.: Hong Kong A-2 influenza virus infection among swine during a human epidemic in Taiwan. Nature, 1970, s. 228-857.

Kuntz-Simon G, Madec F. Genetic and Antigenic Evolution of Swine Influenza Viruses in Europe and Evaluation of Their Zoonotic Potential. Zoonoses and Public Health, 2009, 56 (6-7): 310-325

Lange E, Kalthoff D, Blohm U, Teifke JP, Breithaupt A, Maresch Ch, Starick E, Fereidouni S, Hoffmann B, Mettenleiter TC, Beer M, and Vahlenkamp TW. Pathogenesis and transmission of the novel swine-origin influenza virus A/H1N1 after experimental infection of pigs. Journal of General Virology (2009), 90, 2119–2123

OIE, WAHID, 2009

Pensaert M, Ottis K, Vandeputte J, Kaplan MM, Bachmann PA. Evidence for the natural transmission of influenza A virus from wild ducks to swine and its potential importance for man. Bull World Health Organ 1981; 59:75–78.

Kontaktní adresa

Mgr. Kateřina Rosenbergová, Ústav infekčních chorob a epizootologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, rosenbergovak@vfu.cz

Sledovanie interakcií fungicídu azoxystrobin a $ZnSO_4$ na *Artemia franciscana*

Investigation of mutual effect of fungicide azoxystrobin and Zinc Sulphate on *Artemia franciscana*

Špalek Milan, Falis Marcel, Kovács Kamil

Abstract

The influence of zinc disulphate (at concentrations of 100 mg.l^{-1}) and pesticide azoxystrobin (at a concentration of $0,1$ and 1 mg.l^{-1}) on lethality to *Artemia franciscana* was investigated. Two different interactions were studied, namely, those of azoxystrobin at a concentration of $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ and zinc disulphate, azoxystrobin at a concentration of 1 mg.l^{-1} and zinc disulphate and individual exposure to those of azoxystrobin at a concentration $0,1$ and 1 mg.l^{-1} and to those of zinc disulphate. A significant decrease was observed in lethality due to exposure to those of azoxystrobin at a concentration of $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ and zinc disulphate in comparison with action of only azoxystrobin at a concentration of $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$. These results may be caused by attributes of zinc as direct bond at molecule of azoxystrobin or as bond at enzymic system responsible for damaging influence of azoxystrobin.

KLúčové slová: *Artemia franciscana*, síran zinočnatý, azoxystrobin

Úvod

Súčasným trendom je znižovanie počtu pokusov na zvieratách na minimum. V zmysle Smernice Rady Európy (1986) sa za zviera považované všetky živé stavovce okrem človeka, vrátane voľne žijúcich, ich rozmnožovania schopné larvy, nie však plody alebo embrya. Preto sme v tejto práci využili alternatívny biotest II. Generácie na *Artemia franciscana* (Dvořák a Beňová, 2002). Vo väčšine starších prác je uvádzaný druh *Artemia salina* vzhľadom k taxonomickým revíziám v nomenklatúre rodu *Artemia*.

Zintenzívňovanie poľnohospodárskej výroby má za následok zvýšené využívanie pesticídov, a tým zvýšené zaťaženie ekosystému a značné hospodárske problémy. S rastúcim stupňom znečistenia sa zvyšuje záujem o dôsledky pôsobenia cudzorodých látok na živé systémy všeobecne a následne na jednotlivé orgánové systémy.

Materiál a metódy

V experimente boli použité *Artemia franciscana* vyliahnuté v morskej vode (Dvořák a kol., 2005). (Zloženie morskej vody je nasledovné: $\text{NaCl } 23,900 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 10,830 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 2,250 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{KCl } 0,680 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O } 9,060 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{NaHCO}_3 0,200 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O } 0,040 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{KBr } 0,099 \text{ g.l}^{-1}$, $\text{H}_3\text{BO}_3 0,027 \text{ g.l}^{-1}$ a jej pH bolo $8,31$.) 10 kusov čerstvo vyliahnutých naupliových štádií sme umiestnili do polystyrénových Petriho misiek o priemere 60 mm pri celkovom objeme morskej vody 10 ml (vrátane vzorky). V pokuse boli použité roztoky heptahydrátu síranu zinočnatého v koncentrácii 100 mg.l^{-1} a azoxystrobinu v koncentráciách $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ a 1 mg.l^{-1} samostatne a v kombináciách (tabuľka 1).

V experimente bolo použitých 360 jedincov. Pre 1 kontrolnú a 5 experimentálnych skupín bolo rozdelených 60 homogénnych jedincov do 6 samostatných skupín (misiiek) po 10 jedincoch. Petriho misky boli umiestnené v termostate pri teplote $21 \pm 1^\circ\text{C}$.

V časovom intervale 24, 48, 72, 96 a 120 hod. sme vykonali odčítanie živých artérií. Výsledky sme porovnali oproti kontrolnej skupine a štatisticky vyhodnotili. Na vylúčenie odľahlých hodnôt u jednotlivých misiek sme použili Deanov-Dixonov test (Dvořák a Šucman, 1995). Rozdiely medzi priermi jednotlivých pokusných objektov sme testovali pomocou signifikantných rozdielov preukázateľnosti (Wayland a Hayes, 1991).

Tab. 1 Rozdelenie pokusných objektov do experimentálnych skupín

Označenie	Koncentrácia azoxystrobinu (mg.l ⁻¹)	Koncentrácia ZnSO ₄ (mg.l ⁻¹)
K	0	0
P1	0	100
P2	1	0
P3	0,1	0
P4	1	100
P5	0,1	100

Výsledky

V tabuľkách a grafoch nie je uvedená kontrolná skupina, ktorej nebola do vodného prostredia pridaná žiadna chemická látka. Letalita tejto skupiny bola aj po 120 hodinách nižšia ako 10%, čo je predpokladom pre hodnotiteľnosť testu (Dvořák a kol., 2005). Ďalšie výsledky sú uvedené v tabuľke 2 a v grafe 1. U azoxystrobinu je viditeľná závislosť letality na koncentrácii. Skupina P3 slúžila ako porovnávací pre štúdium vzájomných interakcií.

K štatisticky významnému zníženiu letality oproti porovnávací skupine (azoxystrobin 0,1 mg.l⁻¹) došlo na 2. až 4. deň u skupiny kombinácie azoxystrobinu 0,1 mg.l⁻¹ a ZnSO₄ 100 mg.l⁻¹. Oproti kontrolnej skupine došlo v porovnávací skupine k štatisticky významnému zvýšeniu letality na 2. až 5. deň. K štatisticky významnému zvýšeniu letality oproti kontrolnej skupine došlo u skupiny P1 na 5. deň, u P2 až P4 na 2. až 5. deň a u P5 na 4. až 5. deň.

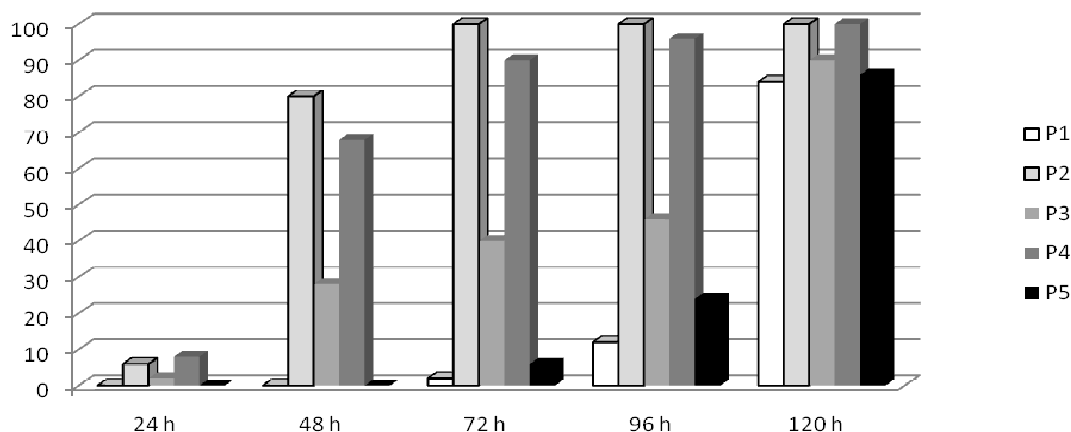
Ostatné rozdiely neboli štatisticky významné.

Tab. 2 Výsledné hodnoty letality v jednotlivých pokusných skupinách

Pokusná skupina	Časový interval	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
P1		0	0	2	12	84
P2		6	80	100	100	100
P3		2	28	40	46	90
P4		8	68	90	96	100
P5		0	0	6	24	86

Diskusia

Zinok má značnú afinitu k ligandom obsahujúcim dusík a síru. V biologických systémoch sa nachádza vo väzbe s mnohými organickými látkami, napríklad bielkovinami, aminokyselinami, nukleovými kyselinami. Zinok- ako významný biogénny prvok- je súčasťou mnohých metaloenzýmov.



Graf 1 Grafické znázornenie výsledných hodnôt letality *Artemia franciscana*

Azoxystrobin je fungicíd so širokým spektrom účinku proti hlavným druhom patogénnych plesní, hlavne z rodov *Ascomycetes*, *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes* a *Oomycetes*. Inhibuje klíčenie spór a rast mycélia. Je to jeden z najpoužívanejších fungicídov v celosvetovom meradle. Azoxystrobin je charakterizovaný ako nebezpečný pre ryby, a aj ostatné vodné živočíchy, hlavne kvôli toxicite pre riasy.

Pri porovnaní pôsobenia rôznych koncentrácií azoxystrobinu, vyššia koncentrácia tejto účinnej látky spôsobila vyšší úhyn sledovaných jedincov. V prípade kombinácie síranu zinočnatého a vyššej koncentrácie azoxystrobinu sme pozorovali štatisticky nevýznamné zlepšenie prežívania artémií, hlavne po 48, 72 a 96 hodinách expozície. V prípade nižšej použitej koncentrácie azoxystrobinu $0,1 \text{ mg.l}^{-1}$ sme pozorovali výrazný ochranný účinok síranu zinočnatého na toxické pôsobenie azoxystrobinu. Tento efekt mohol byť spôsobený buď priamou väzbou zinku na molekulu azoxystrobinu, čo v konečnom dôsledku spôsobilo obmedzenie jeho škodlivých vlastností. Alebo tiež väzbou na enzymatický systém, ktorým sa prejavuje škodlivé pôsobenie azoxystrobinu. Teóriu inaktivácie aktívnych väzobných miest molekuly aktívnej látky fungicídu podporuje skutočnosť, že tento ochranný účinok pozorujeme v skupinách s nižšou koncentráciou fungicídu.

Pod'akovanie

Práca bola riešená za podpory grantového projektu VEGA 1/0393/08.

Literatúra

Dvořák, P., Beňová, K., 2002: The investigation of interaction of low doses of ionizing radiation and risk factors by means of *Artemia salina* biotest. *Folia Veterinaria*, 46, 4: 195-197

Dvořák, P., Šucman, E., 1995: Statistika ke cvičení z biofyziky, Ústav biochémie a biofyziky FVH VFU, Brno 1995, 13 s.

Dvořák, P., Šucman, E., Beňová, K., 2005: The development of a ten-day biotest using *Artemia salina* nauplii, *Biologia* 60, 5: 593-597

Smernica Rady Európy z 24. novembra 1986 k priblíženiu právnych a správnych noriem členských štátov pre ochranu zvierat používaných pre pokusy a iné vedecké účely (86/609/EWG)

Wayland, J., Hayes, Jr., 1991: Dosage and other factors influencing toxicity, *Pesticide toxicology*, volume 1. general principles, Academic Press 1991, 39-97

Kontaktná adresa: Milan Špalek, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovakia, spalek@uvm.sk

Laserová mikrodisekce tkáňově vázaných buněčných populací Laser capture microdissection of tissue bound cell populaion

^{1,2}Chlastáková Ivana, ¹Janečková Katarina, ^{1,3}Dubská Lenka, ¹Doubek Jaroslav,
^{1,2}Matalová Eva

¹University of Veterinary and Pharmaceutical Science

²Institute of Animal Physiology and Genetics AS CR, v.v.i.

³Masaryk Memorial Cancer Institute, CR

Abstract

Laser capture microdissection (LCM) is a modern technique known since 1990s and increasingly used in many areas of biomedical research such as genetics, molecular biology, neurology, pharmacy, assisted reproduction or forensic disciplines interconnected with a UV-A laser and a computer. The major advantage of LCM is selection of specific cell populations with different characteristics from surrounding tissues followed by contact-free catapult of the sample into a test-tube. We developed an upgrade application of LCM to isolate homogenous cell populations of specific cell populations in developing tooth germs and to analyze those by fluorescent cytochemistry and flow cytometry.

Klíčová slova: laserová záchytná mikrodisekce, primární sklovinný uzel, cervikální kličky

Laserová mikrodisekce (LCM) je moderní metoda, která byla představena v 90. letech (Emmert-Buck et al., 1996). V současné době je stále více zaváděna do vývojové biologie, experimentální medicíny a dalších oblastí biomedicíny, kde má velmi široké uplatnění.



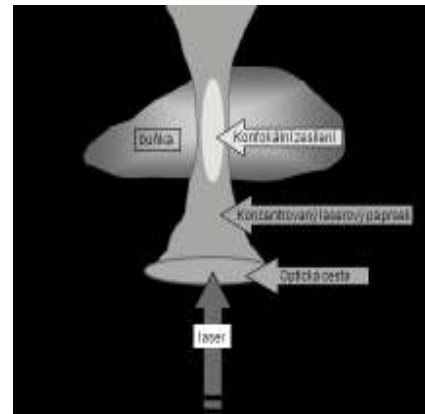
1. Systém LCM

LCM je možné využít nejenom pro izolaci buněčné populace, ale také organel nebo chromozomů a jejich částí. Další významné využití LCM je možné pro přesun živých buněk z kultury nebo při asistované reprodukci. Tímto způsobem nachází LCM uplatnění také v molekulární medicíně či genetice, kde je možno provádět mikroinjektáž léčiv nebo genetického materiálu do živých buněk bez mechanických nástrojů pro účely genového inženýrství či genové terapie. Dalšími významnými obory využívající LCM jsou biologie, neurologie, biotechnologie, farmacie, ale i kriminalistika.

V biologických oborech je tato metoda velmi často aplikována ke studiu chování buněk po selektivní destrukci buněčných organel nebo subbuněčných struktur uvnitř živého organismu. Velmi významnou oblastí je také studium defektu neuronů, které je možno hodnotit po selektivním výběru jednotlivých neuronů. Nespornou výhodou LCM je rychlost, snadné ovládání, ale především je to jedinečná možnost získání unikátní buněčné populace s odlišnými charakteristikami od okolní tkáně (www.olympus.cz).

Systém LCM, využitý v naší práci, tvoří invertovaný mikroskop, tzn že zdroj světla i objektivy jsou umístěny pod vyšetřovaným vzorkem (obr. 1) fixovaným na speciálním podložním sklíčku s membránou, která se vyznačuje vysokou absorpcí v UV-A oblasti. Podle použitého objektivu může být laserový svazek zaostřený do plochy o průměru

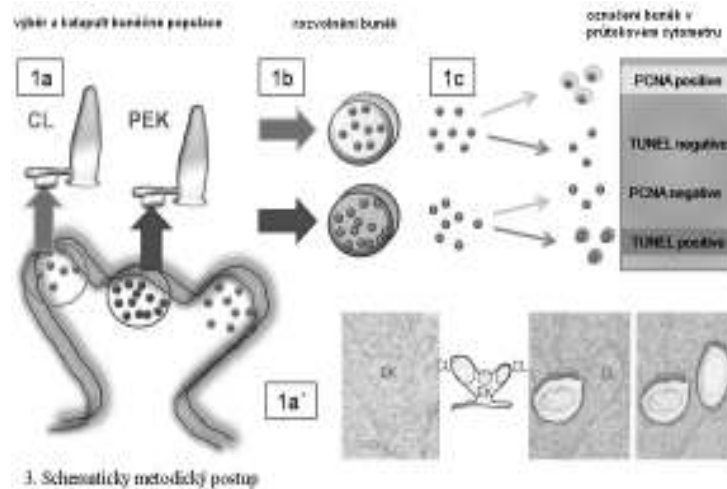
menším než 1 μm . Výběr buněk je prováděn na obrazovce počítače propojeného s mikroskopem a po vyznačení místa laserového řezu elektronickým perem, dojde k přesnému řezu působením velmi intenzivního laserového svazku (obr. 2) o vlnové délce 337 nm (UV-A) a následnému bezkontaktnímu katapultu vybraných buněk do předem připravené zkumavky. Použitá vlnová délka leží mimo absorpční maximum DNA, RNA a bílkovin, a proto nedochází k jejich změnám a je tak možné provádět následné molekulární analýzy na úrovni genomu, transkriptomu i proteomu.



2. Výběr buněk laserem

Během posledních deseti let byla řada významných výsledků dosažena s využitím LCM především na úrovni DNA a RNA, což je dáno zejména snadnou manipulací se vzorky a dostupností amplifikačních metod, které zajistí dostatečné množství sledovaných molekul pro následné analýzy (Domazet et al., 2008). Na úrovni proteomu však amplifikační metody nejsou dostupné.

Z tohoto důvodu jsme navrhly novou aplikaci LCM v kombinaci s průtokovou cytometrií. LCM byla využita pro získání dvou úzce spolu sousedících tkáňově vázaných buněčných populací v epitelu zubního zárodku a to primární sklovinný uzel (primary enamel knot, PEK) a cervikální kličky (cervical loop, CL). Primární sklovinný uzel má při vývoji zubu nezastupitelnou roli. Objevuje se během časného stádia morfogeneze na vrcholu zubního pupene jako koncentricky uspořádaný shluk nedělících se buněk. Buňky PEK produkují signální molekuly, které řídí okolní buňky a umožňují přechod do stádia zubního pohárku. Po ukončení své funkce podstupují buněčnou smrt



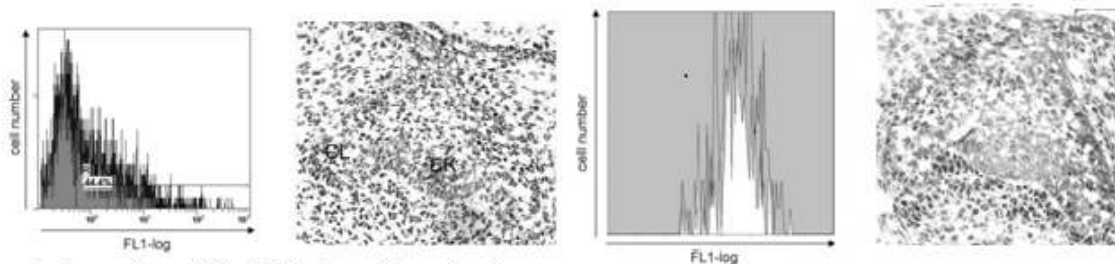
3. Schematicky metodický postup

cestou apoptózy (Jernvall, 1998). Cervikální kličky v epitelu vyvíjejícího se zubu obklopují PEK z obou stran a vykazují vysoký stupeň proliferační aktivity, která se projevuje vysokou expresí jaderné molekuly PCNA (proliferating cell nuclear antigen) (Lesot et al., 1996). Buňky PEK a CL získané pomocí LCM byly následně mechanicky a enzymaticky rozvolněny a volné buňky

podrobeny analýze markerů proliferace a apoptózy s využitím fluorescenčního značení a průtokové cytometrie (flow cytometry, FC) (obr. 3). FC umožňuje detekovat různé markery na úrovni jednotlivých buněk, které procházejí testovací kapilárou a kde jsou následně detekovány. Výsledky z průtokové cytometrie byly pro verifikaci porovnány s klasickým imunohistochemickým přístupem.

Apoptotické buňky v PEK odpovídaly TUNEL (terminal deoxynucleotidyl-transferase mediated nick and labelling) pozitivním buňkám, což korelovalo s imunohistochemickými nálezy na histologických řezech (obr. 4). Obdobně

proliferující buňky v CL značené anti-PCNA byly v souladu s imunohistochemickými nálezy na histologických řezech (obr. 5).



4. Apoptóza v EK - FC a imunohistochemie

5. Proliferace v CL - FC a imunohistochemie

Metodický přístup kombinující techniku laserové záchytné mikrodisekce tkáňově vázaných buněčných populací a průtokové cytometrie využívá výhod plynoucích z obou těchto metodik. Laserová záchytná mikrodisekce umožňuje získání specifické buněčné populace přímo z histologického řezu bez kontaminace okolní tkáni a průtokovou cytometrií lze následně detekovat markery v jednotlivých buňkách. Tento postup otevírá možnosti nových analýz na úrovni proteomu, kde nelze aplikovat amplifikační postupy dostupné pro analýzy DNA a RNA. Proteomové analýzy umožňují doplnit informace týkající se postranlačních změn, které nelze zjistit studováním genomu či transkriptomu (Domazet et al., 2008). Toto má velký význam například v nádorové biologii, kdy je možné získat komplexnější informace o proteinovém vybavení nádorově změněných tkání s aplikacemi v terapeutickém přístupu (Maitra et al., 2001; Simone et al., 2000).

Poděkování

Studentská práce byla podporována IGA VFU Brno (238/2009/FVL). Aktuální výzkum v této oblasti je podporován projektem GA AV (IAA600450904) a GA ČR (203/08/1680).

Literatura

Domazet B et al.. Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era: targeting the genetic basis of cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 2008, vol. 1(6), p. 475-88.

Emmert-Buck MR et al.. Laser capture microdissection. *Science*, 1996, vol. 274(5289), p. 998-1001.

Jernvall J et al.. The life history of an embryonic signaling center: BMP-4 induces *p21* and is associated with apoptosis in the mouse tooth enamel knot. *Development*, 1998, vol. 125, p. 161-169.

Lesot H et al.. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitoses and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth. *Int J Dev Biol*, 1996, vol. 40, p. 1017-1031.

Maitra A and Gazdar AF. Tissue microdissection and processing. *Cancer Treat Res*, 2001, vol. 106, p. 63-84.

Simone NL et al.. Laser capture microdissection: beyond functional genomics to proteomics. *Mol Diagh*, 2000, vol. 5, p. 301-507.

www.olympus.cz

Kontaktní adresa

MVDr. Ivana Chlastáková, Ústav fyziologie VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, ivanachlastakova@seznam.cz

***In vivo* modely sepse u laboratorního potkana**

***In vivo* models of sepsis in laboratory rat**

Janečková Katarína, Scheer Peter

Abstract

In our study, beside one control group (n=6), three models of sepsis were used: the model with intravascular applications of native *E. coli* bacteria (n=6), the model with intraperitoneal applications of native *E. coli* bacteria (n=5) and model with intraperitoneal applications of faeces (n=14). Highest mortality was observed in the intravascular model, in 7.5 hours on average. Mean arterial pressure values were higher as compared to control group. Mortality in coli-intraperitoneal model was low, but mean arterial pressure values were higher as compared to control group. Observation for a longer time would be necessary to evaluate the progress of septic state. In the intraperitoneal faecal model inoculums prepared from the mixture of rat and rabbit faeces were administered 24 hours before starting the observation. Mean arterial pressure values were significantly lower as compared to the control group. Maximum survival time was 29.5 hours and minimum 24 hours and 21 minutes. Increased AST activity, creatinin and urea plasmatic levels were found out, which indicate renal and hepatic alteration.

Klíčová slova: *in vivo* model sepse, potkan, arteriální tlak

Úvod a metodika

Sepse a její komplikace (septický šok) představují v současné medicíně stále aktuální nevyřešený problém. Mortalita u lidí je v závislosti na standardech zdravotnické péče stále vysoká (Angus et al. 2001, Martin et al. 2003) a rovněž ve veterinární medicíně můžeme očekávat značně vysokou morbiditu i mortalitu (Vela et al. 2006).

Cílem naší práce bylo zhodnotit vhodnost modelů sepse z hlediska hemodynamických parametrů – středního arteriálního tlaku a srdeční frekvence pro další studium septického šoku.

V práci bylo celkově použito 51 potkanů kmene Wistar, hmotnosti 407 – 724 g ($x=540$; $SD=72,8$) samčího pohlaví. Sledovány byly 3 modely (intravaskulární, koli-intraperitoneální a intraperitoneální fekální), jedna **kontrolní skupina (K, n=6)** a byl proveden jeden předpokus. Jedincům v **intravaskulárním modelu (IV; n=6)** byla v 30. minutě protokolu intra-arteriálně (*a. carotis*) aplikována dávka 2 ml suspenze kultury *E. coli* o koncentraci 10^6 /ml (tj. přibližně $4 \cdot 10^6$ /kg). V **koli-intraperitoneálním modelu (IP; n=5)** byla všem jedincům aplikována v 30. minutě protokolu dávka kultury *E. coli* o koncentraci 10^8 /ml v 5 ml suspenze (tj. přibližně 10^9 /kg ž. hm.). V **předpokusu (n=20)** k intraperitoneálnímu fekálnímu modelu bylo cílem nastavit vhodnou dávku aplikovaného inokulátu. Inokulát připravený smícháním 4 kusů trusu od králíků a 4 kusů trusu od potkanů v 30 ml fyziologického roztoku s následným přefiltrováním byl aplikován deseti jedincům (skupina A) v dávce 5 ml a deseti jedincům (skupina B) v dávce 2,5 ml (hmotnost do 500 g), resp. 3 ml (hmotnost nad 500 g) intraperitoneálně. Sledována byla doba přežití s cílem 100% 48-hodinové mortality. Ve vlastním **intraperitoneálním fekálním modelu (IPF, n=14)** bylo 24 hodin před začátkem vlastního sledování aplikováno intraperitoneálně 2,5 ml základního inokulátu připraveného stejným způsobem jako v předpokusu.

Sledování hemodynamických parametrů bylo prováděno v celkové anestézii. Úvod do anestézie (minuta 0) byl navozen inhalací éteru (standardně 1 ml/1 l vzduchu) pod skleněným zvonem. Po dosažení tolerančního stádia byl intramuskulárně aplikován diazepam (2 mg/kg ž. h.) a současně na jiné místo xylazin (5 mg/kg ž. h.) spolu s ketaminem (35 mg/kg ž. h.) v jedné stříkačce. Anestezie byla prolongována i.m. aplikací xylazinu s ketaminem v poloviční dávce každých 30, resp. 60 minut (podle individuální potřeby).



1. Kanylace a připojení na tlakový převodník a monitor vitálních funkcí

Po uvedení do celkové anestezie byly vypreparovány a následně kanylovány (kanyla 24 G) cévy *v. jugularis* a *a. carotis*. Kanylou ve *v. jugularis* byla automatickým dávkovačem podávána infuze fyziologického roztoku rychlostí (d): $(30 \times \text{hmotnost [kg]} + 70) / 24 = d$ [ml/h]. Pokud v půlhodině mezi jednotlivými záznamy hemodynamických parametrů poklesl součet srdeční frekvence a středního arteriálního tlaku (HR+MAP) pod hodnotu 350 zvýšila se v následující záznamové půlhodině rychlost infuze na 24 ml/kg/h, podávána maximálně 30 minut. Poté se rychlost vrátila na původní hodnotu.

Kanylou v *a. carotis* bylo prováděno měření arteriálního tlaku (střední arteriální tlak – MAP, systolický arteriální tlak – SAP, diastolický arteriální tlak – DAP) (obr. 1). Současně byl záznamován elektrokardiogram a srdeční frekvence monitorem. Monitor byl nastaven tak, aby automaticky po 30

minutách provedl zápis tlakové a EKG křivky (obr. 2).



2. zápis tlakové a EKG křivky monitorem

U IVF modelu byl pro zjištění hodnot parametrů ALP, AST, kreatinin a močovina proveden odběr krve u každého jedince v 30. minutě protokolu a po exitu.

Výsledky

V IV modelu byla průměrná doba přežívání jenom 458 minut (tj. 7,6 hod.) s maximem 786 minut a minimem 259 minut. Pouze jeden jedinec přežil do 810. hodiny, kdy byl záznam ukončen a jedinec eutanazován. V IP modelu z 5 sledovaných zvířat 4 přežila

do 810. minuty, kdy byla eutanazována. Jeden jedinec uhynul v 506. minutě sledování. V IVF modelu žádné zvíře nepřežilo 330 minut sledování, tj. více než 29,5 hodin pokusu. Maximální doba přežití byla 29,5 hodiny, minimální doba přežití byla 24 hodin a 21 minut. V kontrolní skupině (K) všichni jedinci přežili do 390. minuty sledování, kdy byli eutanazováni.

Srovnání srdeční frekvence a středního arteriálního tlaku mezi jednotlivými modely a v kontrolní skupině bylo provedeno v minutě 60, 150 a 300. Zaznamenány byly statisticky významné rozdíly v hodnotách MAP mezi jednotlivými modely a kontrolní skupinou v 60. i 150. minutě. V IV a IP modelu byly hodnoty MAP signifikantně vyšší ($p < 0,01$) než v kontrolní skupině a než v intraperitoneálním fekálním modelu. Naopak hodnoty MAP v 60. a 150 minutě u IPF modelu byly signifikantně nižší ($p < 0,05$) než v kontrolní skupině. V hodnotách srdeční frekvence byly zaznamenány statisticky významné rozdíly u intravaskulárního modelu, kde byla srdeční frekvence v minutě 300 signifikantně nižší ($p < 0,01$) než v kontrolní skupině. Taktéž u intraperitoneálního fekálního modelu byla hodnota naměřená ve 150. minutě opět signifikantně nižší ($p < 0,05$) než v kontrolní skupině. Signifikantní rozdíl ($p < 0,05$) byl zaznamenán také mezi IP a IPF modelem, u kterého byla hodnota signifikantně nižší. V IPF modelu byli dále zjištěny signifikantní vzestupy hodnot kreatininu a močoviny a aktivity AST v čase. Vzestup aktivity ALT nebyl signifikantní.

Závěr

V IV modelu byli naměřeny vysoké hodnoty arteriálního tlaku, doba přežití byla krátká a úhyn byl rychlý a nepředvídatelný. Takovýto perakutní průběh neodpovídá přirozenému rozvoji sepse. V IP modelu byly rovněž naměřeny vysoké hodnoty arteriálního tlaku, ale mortalita byla nízká. K plnému rozvoji sepse do septického šoku je nutná delší doba sledování. V IPF modelu byla zaznamenána signifikantní hypotenze, 100%ní mortalita (48 hodin) zvýšená koncentrace močoviny a kreatininu a zvýšená aktivita AST. Tento model považujeme za vhodný k dalšímu studiu septického šoku u laboratorních potkanů.

Poděkování

Studentská práce byla podporována z finančních prostředků Ústavu fyziologie VFU Brno a grantu IGA MZ NR 9484-3- Terlipresin v léčbě septického šoku rezistentního na katecholaminy.

Literatura

- Angus et al.. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med*, 2001, 29(7), p. 1303-7.
- Martin et al.. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Eng J Med*, 2003, 348, p. 1546-54.
- Vela et al.. Neonatal mortality in puppies due to bacteriemia by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*. *J Clin Microbiol*, 2006, 44, p. 666-8.

Kontraktní adresa

MVDr. Mgr. Katarína Janečková, Ústav fyziologie VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, vet.medina@seznam.cz

Časoprostorové hodnocení proliferace a apoptózy při oseointegraci zubních základů

Spatial distribution and evaluation of proliferation and apoptosis during tooth germ osseointegration

^{1,2,3}Lungová Vlasta, ^{1,2}Míšek Ivan, ^{1,2}Matalová Eva

¹VFU FVL Brno

²Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR Brno

³UP Olomouc, PřF, Katedra zoologie a antropologie

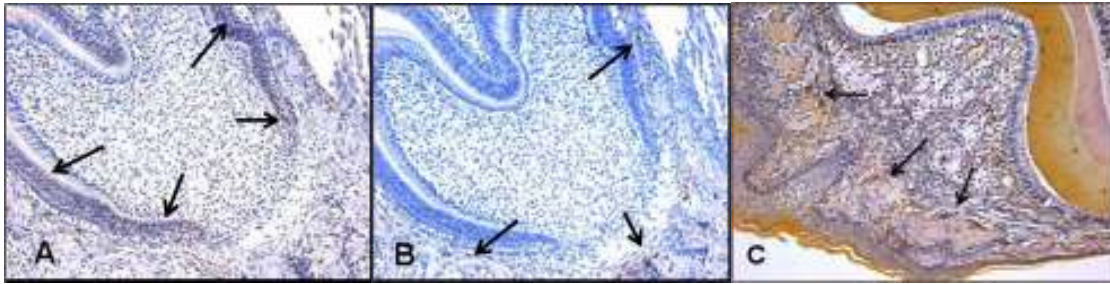
Abstract

Tooth morphogenesis is a complex multifactorial process in which differential mitotic activities and cell death play important roles. Lower first molar (M1) from mouse was investigated from the time of the mouse birth (P0) till the 12 days postnatally (P12). The main aim of this work was to map cell proliferation and apoptosis during postnatal development and to follow the tooth root histogenesis. At the first investigated stage (P0) mitosis was associated with the enamel organ, later (P2 – P12) with the Hertwig's epithelial sheath and periodontium development. Apoptotic processes were mainly involved in remodelling and resorption of the alveolar bone.

Klíčová slova: proliferace, apoptóza, morfogeneze, odontogeneze, zubní kořen

Zuby jsou útvary, které se vyskytují v živočišné říši až u čelistnatých obratlovců tedy i u savců včetně člověka. Jsou ektodermálního původu a vyvíjejí se na základě přesně koordinovaných epitel-mesenchymálních interakcí [1, 2, 3]. Jako vhodný model pro studium obecných morfologických i molekulárních mechanismů vývoje savčích zubů se využívá myší dentice. Základní morfogenetické procesy, které se účastní odontogeneze, zahrnují buněčné dělení, migraci buněk a programovanou buněčnou smrt – apoptózu [4]. U proliferace hraje důležitou roli postupná mitotická aktivita buněk a existence specifických míst buněčného dělení [5, 6]. Naproti tomu apoptóza souvisí především s morfogenezí a remodelací embryonálních tkání [7]. Vyskytuje nejen při patologických stavech, ale i během normálního embryonálního vývoje. Během odontogeneze byla apoptóza pozorována v zubní liště, ve stadiu zubního pupene, pohárku a zvonku [4, 8]. Dále se apoptóza podílí i na redukci počtu ameloblastů před erupcí zubu [9] a eliminaci osteoblastů v alveolární kosti. Mineralizovaná hmota je pak osteoklasty odstraněna.

Zatímco morfogenetické mechanismy uplatňující se při utváření zubní korunky v prenatálním období [10] jsou v literatuře podrobně popsány, postnatální období a zejména histogeneze v oblasti kořene není přehledně zmapována. Cílem této práce tedy bylo souhrnně zpracovat proliferaci a apoptózu buněk podílející se na oseointegraci myších prvních stoliček (M1) do dolní čelisti v postnatálním období tj. od narození až po erupci zubu a dále sledovat histogenezi zubního kořene. Proliferace buněk byla potvrzena imunohistochemickou metodou detekující antigen PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) v jádře dělících se buněk, apoptóza buněk metodou TUNEL a osteoklasty metodou TRAP. Morfologie byla hodnocena na sériových histologických řezech barvených hematoxylinem. Do současnosti byly zpracovány vzorky od stadia P0 (narození myši) až po P12 (12. den po narození).



Obr. č. 1: Příklad detekce proliferace A, apoptózy B a osteoklastů C u histologických řezů. Na obr. A je vidět intenzivní proliferace buněk orgánu skloviny ve stadiu P0 v místě anteriorních hrbolů. Obr. B – detekce apoptózy v P0 v místě anteriorních hrbolů. V tomto stadiu podstupují buněčnou smrt zvláště buňky alveolární kosti na stranách zubu a pod zubním základem. Hnědé buňky – pozitivní, modré protibarvení hematoxylinem. Obr. C – detekce osteoklastů ve stadiu P8. Odstranění mineralizované tkáně v horní části alveolární kosti nad hrboly zubní korunky. Pozitivní jsou narůžovělé buňky, modré protibarvení hematoxylinem.

Ve stadiu P0 je již dáno základní rozložení, počet a tvar hrbolů zubní korunky. Ta je v oblasti kořene zakončena cervikální kličkou, která sahá až k zubnímu krčku a určuje tak pozici budoucí cementosklovinné hranice. V dalších stádiích (P2 a později) se cervikální klička prodlužuje a pokračuje dál až za oblast budoucího krčku jako tzv. Hertwigova epiteliální pochva (HERS), která postupně vrůstá do alveolární kosti. Zubní základ je obklopen orgánem skloviny, který má v této době čtyřvrstevné uspořádání – vnitřní epiteliální vrstva (budoucí ameloblasty - AM), doprovodné epiteliální buňky *stratum intermedium* - SI, pulpa skloviny *reticulum stellatum* - RS a vnější sklovinný epitel. Ve svém čtyřvrstevném uspořádání je nejlépe viditelný v anteriorní a posteriorní části zubu a v oblasti mezihrbolů; u anteriorních a posteriorních hrbolů se po obou stranách zubu a nad hrboly redukuje. Ve stadiu P0 se buňky sklovinného orgánu intenzivně mitoticky dělí. Proliferace se zastavuje, u AM a ve vrstvě SI, pouze v oblasti nad anteriorními zubními hrboly, kde AM díky sekreci pre-dentinu odontoblasty (OD) v zubní pulpě začínají produkovat zubní sklovinu. Ve stadiu P2 se proliferace buněk zastavuje i v dalších vrstvách orgánu skloviny a omezuje se výhradně na apikální část zubního kořene do oblasti HERS. Od P4 a výše se vyskytuje v oblasti HERS a také u mezenchymálních buněk vnitřní vrstvy dentálního vaku, z nichž se vytváří periodoncium - budoucí závěsný aparát zubu.

Orgán skloviny je v P0 stále spojen s orálním epitelem pomocí stopky, která je nejvýraznější v oblasti posteriorních zubních hrbolů a na posteriorním konci zubu. Buňky této struktury podstupují v P0 a P2 apoptózu, a ve stadiu P4 zubní lišta již zcela vymizí. Od stadia P2 podléhají buněčné smrti i některé buňky sklovinného orgánu např. buňky pulpy skloviny - RS. K významné redukci orgánu skloviny však dochází v posteriorní části zubu až ve stadiu P6 resp. P8 a to díky apoptóze AM a buněk SI v místě nad zubními posteriorními hrboly.

Vedle orgánu skloviny probíhá apoptóza u zubních základů v postnatálním období především v alveolární kosti. Ve stadiu P0 obklopuje tato kost téměř celý zub. Postupně se však podrobuje remodelaci a ustupuje zvětšujícímu se zubu, který se jednak rozšiřuje díky depozici skloviny (AM) a dentinu (OD) a jednak prodlužuje díky růstu zubního kořene. Zpočátku (stadia P0 a P2) se apoptóza vyskytuje v alveolární kosti pod budoucími kořeny a zčásti v alveolární kosti po obou stranách zubu. Od stadia P4 dále je nejintenzivnější v dolní části horní třetiny alveolární kosti zejména na orální straně

zubu v místě posteriorních zubních hrbolů. Ve stadiu P8 je horní třetina orální alveolární kosti tlačícím se zubním hrbolem dokonce oddělena od zbývající části kosti. Osteoblasty v této části jsou velmi rychle apoptoticky eliminovány a činnost osteoklastů je zlikvidována a odstraněna mineralizovaná mezibuněčná hmota (P8 a P10). Ve stadiu P12 se nápadně rozšiřuje erupční dráha zubu a také dochází k výraznému prodloužení zubu do délky směrem k orálnímu epitelu. Ve stadiu P8 je významná i apoptóza u AM a SI v blízkosti budoucí cementosklovinné hranice. Přerušení vrstev sklovinného orgánu na povrchu zubního kořene umožní později průnik cementoblastů z vnitřní vrstvy dentálního vaku ke kořenovému dentinu. Může tak být zahájena cementogeneze v oblasti kořene.

Ze současných výzkumů vyplývá, že proliferace i apoptóza jsou klíčové procesy, které hrají centrální roli nejenom při vývoji zubů, ale i při vývoji ostatních orgánů a struktur během embryonálního vývoje. Uplatňují se i postnatálně při udržování tkáňové homeostáze mnohobuněčných organismů. Oba procesy pracují synchronně. Proliferace umožňuje růst a regeneraci tkání, apoptóza naopak reguluje patřičný počet buněk ve tkáních a popř. i jejich lokalizaci. Chybná regulace apoptózy má za následek poruchy homeostáze. V případě dentice může jít o poruchy resorpce alveolární kosti, která má za následek opožděnou erupci zubů či zvýšené odbourávání kostní tkáně spojené se špatnou fixací zubů v kosti a jejich předčasnou ztrátou. Znalosti týkající se časoprostorové lokalizace těchto dějů i jejich koordinace a regulace lze využít při výzkumu a zavádění postupů pro přirozenou náhradu chybějících zubů pomocí kmenových buněk, což představuje velkou výzvu pro rozvíjející se oblast molekulární stomatologie.

Literatura

1. SLAVKIN, H.C. 1990. *Molecular determinants of tooth development: a review*. Crit. Rev.Oral Biol.Med. 1: 1 – 16.
2. SHARPE, P.T. 1995. *Homeobox genes and orofacial development*. Connect. Tissues Res. 32:17 – 25.
3. RUCH, J.V. 1995. *Tooth crown morphogenesis and cytodifferentiations: candid questions and critical comments*. Connect. Tissue Res. 32: 1 – 8.
4. LESOT, H. 1996. *Mouse molar morphogenesis revisited by the three-dimensional reconstruction. II. Spatial distribution of mitose and apoptosis in cap to bell staged first and second upper molar teeth*. Int. J. Dev. Biol. 40: 1017 – 1031.
5. COHN, S.A. 1957. *Development of the molar teeth in the albino mouse*. Am. J.Anat.101: 295 – 320.
6. GAUNT, W.A. 1955. *The development of the molar pattern of the mouse (Mus musculus)*. Acta Anat. 24: 249 – 268.
7. ZAKERI, Z. et al. 1994. *Apoptotic cell death in the mouse limb and its suppression in the Hammertoe mutant*. Dev.Biol. 165: 294 – 297.
8. TURECKOVA, J. et al 1996. *Apoptosis is involved in disappearance of the diastemal dental primordia in mouse embryo*. Int. J. Dev. Biol. 40: 483 – 489.
9. BRONCKERS, A.L.J.J. et al. 1996. *Nuclear DNA fragmentation during postnatal tooth development of mouse and hamster and during dentin repair in the rat*. Eur. J. Oral Sci. 104: 102 – 111.
10. PETERKOVA, R. et al. 1996. *Mouse molar morphogenesis revisited by three dimensional reconstruction. I. Analysis of initial staged of the first upper molar development revealed two transient buds*. Int.J.Dev.Biol. 40: 1009 – 1016.

Kontaktní adresa

RNDr. Vlasta Lungová, PřF UP Olomouc, Katedra zoologie a antropologie, tř. Svobody 26, 779 00 Olomouc; e-mail: vlasta.lungova@upol.cz.

Fyziologické pH v kolonu šimpanzů (*Pan troglodytes*)

Physiological pH of colon in chimpanzees (*Pan troglodytes*)

Petrášová Jana, Profousová Ilona, Geiger J, Mrázek J, Bolechová P, Modrý David

Abstract

Saccharides and cellulose are fermented in rumen of cattle and in hindgut of horses, rhinoceros, elephants and chimpanzees. Optimal pH is necessary for the microbial flora that supplies fermentative activity. We have made colonoscopic examinations of eight chimpanzees (*Pan troglodytes*) from ZOO Pilsner and ZOO Prague. The examination was aimed on plotting of intestinal mucosa and measurement of pH. The mean value of pH in colon was 7, 19 ± 0, 41 and in rectum 7, 12 ± 0, 16. We also examined the relation between pH and the spectrum of parasites and bacterial flora in each animal. We have found fiberlytic bacteria *Clostridium leptum*, uncultured G+ bacteria of group *Firmicutes*, proteobacteria, *Bifidobacteria* and *Lactobacilli* and protozoa *Troglodytella abrassarti*, *Balantidium coli*, *Blastocystis* sp. and *Entamoeba coli*. There were minimal discrepancies between the microbial flora of colon and rectum. The animals living together share similar spectrum of bacteria and protozoa. The study was supported by Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical sciences (IGA 245/2009/FVL).

Klíčová slova: *Pan troglodytes*, kolon, kolonoskopie, pH, patologie

Fermentace sacharidů a celulózy je významným zdrojem energie a byla popsána nejen v batoru přežvýkavců, ale i v tlustém střevě koní, nosorožců, slonů (Dierenfeld 1995; Berg *et al.* 2005; Garrett *et al.* 2002) a lidoopů (včetně šimpanzů). Při optimálním pH jsou fermentační děje zajišťovány mikrobiální flórou a symbiotickými nálevníky, kteří však snižují svou aktivitu s měnícími se hodnotami různých parametrů v daném prostředí (Russel a Wilson 1996). Stanovením parametrů, jako pH, druhového složení mikroflóry, množství volných mastných kyselin a proliferační aktivity epitelu je možno posoudit optimální podmínky pro fermentaci v tlustém střevě u různých druhů zvířat (Howard *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1997). Celá řada těchto parametrů byla zjišťována u potkanů, prasat i člověka (Benno a Mitsuoka 1992; Howard *et al.* 1995; Campbell *et al.* 1997). Tyto parametry a spektrum mikrobiální flóry v tlustém střevě šimpanzů však zatím nejsou podrobně prozkoumány.

V průběhu roku 2009-2010 bylo v rámci preventivních veterinárních vyšetření provedeno kolonoskopické vyšetření osmi šimpanzů (*Pan troglodytes*) ze Zoo Plzeň a Zoo Liberec. Při vyšetření byl zkontrolován stav sliznice kolonu a rekta. Z důvodu upřesnění kinetiky enzymů symbiotických nálevníků těchto lidoopů bylo změřeno pH v kolonu a rektu a zároveň zafixován materiál na posouzení bakteriální populace GIT. V neposlední řadě byly odebrány vzorky trusu na parazitologické vyšetření.

Kolonoskopické vyšetření bylo prováděno za celkové anestézie zvířat přístrojem Olympus GIF E. Pomocí sondy byla odebrána část zažitiny (neformovaného trusu) z rekta a kolonu. Okamžitě bylo měřeno pH pomocí vpichové sondy pH metru pH/mV WT 720. Následně byly vzorky zafixovány do 10% roztoku formalínu, RNA Lateru (Sigma-Aldrich, Germany) a 96% molekulárního etanolu. Parazitologické vyšetření bylo provedeno flotační metodou v Sheathrově roztoku (Sheather 1923) a sedimentační metodou MIF-mertiolát-jód-formalínová koncentrace (Blagg 1955). Bakteriální populace byla stanovena pomocí real time PCR a DGGE. Vybrané bandy byly

identifikovány sekvenací DNA a následně byly tyto sekvence srovnány s databází BLAST.

Kolonoskopické vyšetření u šimpanzů de facto odpovídalo kolonoskopii u dětí cca 12-15 let. Tračník byl oproti nálezům u dospělých lidí přibližně o 1/3 užší. Anatomie střeva vyšetřených šimpanzů byla prakticky identická s anatomii střeva dospívajícího člověka. Kolonoskopem bylo možno zcela volně provést kompletní kolonoskopii až do céka s charakteristickými orientačními body jako u lidí – bylo možné identifikovat rektosigmoideální ohbí, lienální flexuru, příčný tračník s typickým trojúhelníkovitým lumen, hepatální flexuru a samozřejmě dno céka. Délka tračníku na zkráceném přístroji byla do 100 cm. Střevo tvoří haustra stejně jako u lidí, sliznice je lehce narůžovělá s patrnou cévní kresbou. Z patologických nálezů jsme diagnostikovali kolitidu a divertikl na sigmatu 13-ti leté samice (odchovávaná řadu let v lidské péči), u dvou samců (16 a 17 let) byla diagnostikována fibrinózní kolitida s tvorbou pablan. Divertikulóza je popisována zejména u starých a silných lidí s mechanickými poruchami střevní pasáže.

pH v kolonu a rektu dosahovalo stabilních hodnot v porovnání s pH kolonu lidí. Průměrné hodnoty pH kolonu dosahovaly $7,19 \pm 0,41$ (měřeno pouze u pěti jedinců), pH v rektu dosahovalo hodnot $7,12 \pm 0,16$ (měřeno u všech osmi šimpanzů)..

Z výsledku DGGE (provedeného zatím jen u pěti jedinců) vyplývá, že v rámci jednoho zvířete jsou minimální rozdíly mezi volnou mikroflórou obsahu tračníku a rekta. Jedinci žijící spolu mají velmi podobné profily bakterií. Sekvenací bakterií jsme zjistili nekultivované G+ bakterie skupiny *Firmicutes*, proteobakterie, butyrát produkující bakterie a nekultivované bakterie trávicího traktu šimpanzů (Ley *et al.* 2008). Počty bifidobaktérií dosahovaly hodnot 0,1–1 % z celkových baktérií, počty laktobacilů 0,2–1,2 %. Nejčastěji detekované byly bakterie skupiny *Clostridium leptum* (fibrolytické bakterie), které dosahovaly hodnot 70%.

Nejčastěji detekovanými druhy parazitů byli *Troglodytella abrasarti* (87,5%), *Balantidium coli* (25%), *Blastocystis* sp. (62,5%) a *Entamoeba coli* (37,5%).

Námi naměřené hodnoty pH v kolonu a rektu šimpanzů se blíží hodnotám naměřeným u prasat (Howard *et al.* 1995) a koní (Berg *et al.* 2005), ale nejvíce se podobají hodnotám zjištěných u novorozeneckých dětí (Gupta *et al.* 1982). Bohužel popisované hodnoty pH u dospělých lidí značně kolísají.

Hodnota pH je ovlivňována složením stravy a onemocněním gastrointestinálního traktu, z tohoto důvodu má stanovení pH u lidí velký klinický význam k určení malabsorbce, kolitidy nebo průjmu (Eherer a Fortran 1992). Podobný význam by mohlo mít stanovení pH v kolonu i u ostatních druhů zvířat, včetně šimpanzů a dalších kriticky ohrožených druhů primátů.

Literatura

BENNO, Y., MITSUOKA, T. Impact of *Bifidobacterium longum* on human fecal microflora. *Microbiology and Immunology*, 1992, vol. 36, s. 683-694.

BERG, E. L., FU, C. J., PROTER, J. H., KERLEY, M.S. Fructooligosaccharide supplementation in the yearling horses: Effects on fecal pH, microbial content, and volatile fatty acid concentration. *Journal of Animal Science*, 2005, vol. 83, s. 1549-1553.

BLAGG, W., SCHLOEGEL, E. L., MANSOUR, N. S., & KHALAL, G. I. A new concentration technic for the demonstration of protozoa and helminth eggs in feces. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1955, vol. 4, s. 23-28.

CAMPBELL, J. M., Jr. FAHEY, G. C., WOLF, B. W. Selected indigestible oligosaccharides affect large bowel mass, cecal, and fecal short-chain fatty acids, pH and microflora in rat. *Journal of Nutrition*, 1997, vol. 127, s. 130-136.

DIERENFELD, E. S. Black rhino nutrition: an overview. *Around the Horn*, 1995, vol. 3, s. 10-12.

EHERER, A. J., FORDTRAN, J. S. Fecal osmotic gap and pH in experimental diarrhea of various causes. *Gastroenterology*, 1992, vol. 103, s. 545-551.

GARRETT, L. A., BROWN, J. N., POXTON, I. R. A comparative study of the intestinal microbiota of healthy horses and those suffering from equine grass sickness. *Veterinary Microbiology*, 2002, vol. 87, s. 81-88.

GUPTA, A. P., GUPTA, A., BYAS, R.K. Stool sugar and pH in term breast fed neonates. *Indian Journal of Pediatrics*, 1982, vol. 49, s. 803-805.

HOWARD, M. D., GORDON, D. T., PACE, L. W., GARLEB, K. A., KERLEY, M. S. Effects of dietary supplementation with fructooligosaccharides on colonic microbiota populations and epithelial cell proliferation in neonatal pigs. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 1995, vol. 21, s. 297-303.

LEY, R. E., HAMADY, M., LOZUPONE, C., TURNBAUGH P. J., RAMEY, R. R., BIRCHER, J. S., SCHLEGEL, M. L., TUCKER, T. A., SCHRENZEL, M. D., KNIGHT, R., GORDON, J. I. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*, 2008, vol. 320, s. 1647-1651

RUSSEL, J. B., WILSON, D. B. Why are ruminal cellulolytic bacteria unable to digest cellulose at low pH? *Journal of Dairy Science*, 1996, vol. 79, s. 1503-1509.

SHEATHER, A. L. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. *Journal of Comparative Pathology*, 1923, vol. 36, s. 266-275.

Kontakní adresa

MVDr. Jana Petrášová, Ústav patofyziologie, VFU Brno, Palackého 1/3, Brno, email: petrasovaj@vfu.cz

Dynamika a vztahy vybraných biochemických parametrů v peripartálním období primiparních dojnic

Dynamic and relationships of selected biochemistry parameters of primiparous cows in early lactation period

Oldřich Pěnkava

Abstract

Dairy cows often suffer from a lack of energy, especially after parturition. That has got impact to their biochemistry profile. Aim of this study was to assess both changes of serum concentration of total bilirubin, a β -hydroxybutyrate (BHBA) and non-esterified fatty acids (NEFA) and relationships among these parameters, all in primiparous dairy cows during first month after parturient.

We collected 3 samples of venous blood from each of 147 primiparous cows, 1. sample 24 hours post partum (p.p.), 2. 8-12 days p.p. and last 25-30 days p.p.

The results showed the decrease of NEFA and bilirubin between first and last sample collection. On the other hand the BHBA increased rapidly but only between first and second sampling. We saw correlations among the parameters as well but mostly not strong. NEFA showed relationships among the different sampling and could be a predictor of energy metabolism status of dairy cows.

Klíčová slova: lipomobilizace, bilirubin, neesterifikované mastné kyseliny, β -hydroxybutyrát

Úvod

Organismus vysokoprodukčních dojnic je v období kolem porodu (tranzitní období) vystaven vysoké zátěži. Dojnice není v tomto období schopná potřeby energie krýt příjmem krmné dávky a rozvíjí se u ní negativní energetická balance. Hlavním alternativním zdrojem energie pokrývajícím tento deficit se stává tuková tkáň. Produkty lipolýzy jsou v organismu, zvláště v játrech, dále metabolizovány a využívány k produkci energie. Ke zvýšené lipolýze dochází již před porodem, kdy je pozorováno zvýšení hladiny neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) v krvi (Drackley a kol., 2005). Po porodu je lipolýza potencionována s ohledem na nastupující produkci mléka a dochází ke zvýšené produkci ketolátek jako vedlejšího produktu metabolismu mastných kyselin. Nadměrná lipolýza může vést k syndromu steatózy jater s narušením funkcí tohoto orgánu. To snižuje i clearance bilirubinu, jeho sérová koncentrace stoupá a odráží tak mimo úroveň katabolismu zejména funkční kapacitu jater (Bossaert, 2010).

Cíle práce

Cílem studie bylo vyhodnotit dynamiku sérových koncentrací bilirubinu, NEMK a β -hydroxybutyrátu (BHB) u primiparních dojnic v prvním měsíci laktace, dále posoudit korelace mezi těmito parametry a tak vyhodnotit možnost jejich využití k predikci stavu metabolismu dojnic.

Materiál a metody

Použita byla data získaná v rámci kontroly metabolické stability a výživy v peripartálním období. Bylo vyšetřeno 147 primiparních krav, které pocházely z chovů v ČR s volným ustájením, krměním směsnou krmnou dávkou a tradiční dietou v době zaprahnutí se sníženým obsahem vápníku. Krev byla odebírána z v. *coccygea*. U každé

dojnice byly provedeny tři odběry, 1. odběr do 24 hodin *post partum* (p.p.), 2. odběr 8-12 dnů p.p. a 3. odběr 25-30 dnů p.p. V krevním séru byly vyšetřovány hladiny cel. bilirubinu, NEMK, BHB pomocí automatického analyzátoru Cobas Mira (ROCHE, Switzerland). Statistická analýza byla provedena v programu KyPlot (v. 2.0 beta 15, Koichi Yoshioka, Japonsko). Dynamika mezi odběry byla vyhodnocena neparametrickým Steel-Dwassovým testem, vazby jednotlivých parametrů pomocí Spearmanova korelačního testu.

Výsledky a diskuse

Průměrné výsledky z jednotlivých odběrů jsou shrnuty v tabulce 1. Z tabulky je patrné, že u všech sledovaných parametrů došlo ke statisticky významné změně mezi 1. a 3. odběrem, tzn. během prvního měsíce laktace. Jak bilirubin, tak NEMK vykazovaly maximální koncentraci těsně po porodu, v dalších odběrech došlo k plynulému poklesu u bilirubinu se signifikancí mezi prvním a posledním odběrem, u NEMK byl průkazný pokles také mezi 2. a 3. odběrem. Odpovídá to pozorování Hachenberga a kol. (2007) i Bossaerta (2010). Důvodem zvýšené koncentrace v období okolo porodu byl zřejmě stres a hladovění zvířat. Bilirubin a NEMK vykazují obdobné trendy i díky soutěžení o transportní mechanismy v jaterních buňkách (Cowan a Thompson, 1983).

β -hydroxybutyrát vykázal prudký nárůst mezi 1. a 2. odběrem, což svědčí o nárůstu potřeby energie dojníc a zvýšené lipomobilizaci a odpovídá to pozorování Hachenberga a kol. (2007). Ta se projevila i udržením vysoké hladiny NEMK a nepřímo i bilirubinu.

Tabulka 1 Sledované biochemické parametry ($\bar{x} \pm s$) ze tří odběrů krve od primiparních dojníc s vyznačením průkaznosti rozdílů mezi jednotlivými odběry

bilirubin ($\mu\text{mol/l}$)			neesterifikované mastné kyseliny (mmol/l)			β -hydroxybutyrát (mmol/l)		
1. odběr	2. odběr	3. odběr	1. odběr	2. odběr	3. odběr	1. odběr	2. odběr	3. odběr
7,25 ^a	6,36	5,67 ^a	0,66 ^b	0,60 ^c	0,41 ^{b,c}	0,51 ^{d,e}	0,97 ^d	0,86 ^e
$\pm 3,96$	$\pm 2,99$	$\pm 2,58$	$\pm 0,30$	$\pm 0,31$	$\pm 0,18$	$\pm 0,23$	$\pm 0,78$	$\pm 0,65$

^{b,c,d,e} $p < 0,001$; ^a $p < 0,01$

Jednotlivé vazby mezi parametry v rámci jednoho odběru i mezi odběry shrnuje tabulka 2. Díky poměrně vysokému počtu sledovaných zvířat je mnoho těchto korelací statisticky významných. V rámci sledovaného období jednoho měsíce po porodu ale nebyly pozorovány příliš silné vazby mezi jednotlivými parametry. Poměrně těsné vazby byly nalezeny vždy jen v rámci jednoho odběru, nejsilnější pak mezi bilirubinem a NEMK v 1. odběru ($\rho = 0,65$; $p < 0,001$), což s největší pravděpodobností souvisí se zmíněnou zátěží zvířat ve dnech kolem porodu. Obdobně těsné vazby v rámci jednoho odběru pozorovali mezi NEMK a BHB i Wathes a kol. (2007) u prvotek ve 2. a 4. týdnu laktace ($r = 0,36$ resp. $0,61$). Zejména NEMK se jeví nejvíce provázána s ostatními parametry, význam rozdělení vzorků podle hladiny NEMK pro hodnocení dalších biochemických parametrů prokázala Šlosárková a kol. (2007). Tento parametr by zřejmě bylo možné využít k predikci stavu metabolismu v dalších fázích laktace, jak je patrné z korelace NEMK z 1. odběru s NEMK i BHB z 3. odběru ($\rho = 0,25$ resp. $0,21$).

Tabulka 2 Spearmanovy korelační koeficienty (ρ) mezi jednotlivými parametry

		celkový bilirubin		neesterifikované mastné kyseliny (NEMK)			β -hydroxybutyrát (BHB)		
		2. odběr	3. odběr	1. odběr	2. odběr	3. odběr	1. odběr	2. odběr	3. odběr
celkový bilirubin	1. od.	0,42***	0,13	0,65***	0,27***	0,06	0,1	0,16*	-0,03
	2. od.	x	0,35***	0,31***	0,55***	0,15	0,05	0,41***	0,09
	3. od.		x	0,02	0,05	0,29***	0,13	0,08	0,08
NEMK	1. od.			x	0,38***	0,25**	0,22**	0,34***	0,21*
	2. od.				x	0,31***	0,06	0,48***	0,13
	3. od.					x	0,08	0,22**	0,39***
BHB	1. od.						x	0,22**	0,06
	2. od.							x	0,37***

*** $p < 0,001$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,05$ **Závěr**

U sledovaných primiparních krav byla prokázána dynamika ukazatelů energetického metabolismu během období od porodu do 30. dne laktace. U NEMK a bilirubinu sérová koncentrace stagnovala či se snižovala, u BHB naopak skokově narostla během prvních dvou týdnů po porodu.

Byly potvrzeny korelace mezi sledovanými parametry, ale síla vazeb až na výjimky nebyla velká. Jako perspektivní pro možnou predikci stavu energetického metabolismu se jeví NEMK.

Literatura

BOSSAERT, P. The role of insulin in the energy conflict between milk production and ovarian activity during the transition period of high-yielding dairy cows. 2010, disertation thesis, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, Salisburylaan 133, B-9820, Merelbeke, Gent, pp. 266.

COWAN, R.E. – THOMPSON, R.P.H. Fatty acids and the control of bilirubin levels in blood. *Medical Hypotheses*, 1983, vol. 11, 343-351.

DRACKLEY, J.K. – DANN, H.M. – DOUGLAS, G.N. – GURETZKY, N.A.J. – LITHERLAND, N.B. – UNDERWOOD, J.P. – LOOR, J.J. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Italian Journal of Animal Science*, 2005, vol. 4, 323-344.

HACHENBERG, S. – WEINKAUF, C. – HISS, S. – SAUERWEIN, H. Evaluation of classification modes potentially suitable to identify metabolic stress in healthy dairy cows during the periparturient period. *Journal of Animal Science*, 2007, vol. 85, 1923-1932. ŠLOSÁRKOVÁ, S. – SKŘIVÁNEK, M. – DOUBEK, J. – FLEISCHER, P. Biochemical check of the periparturient load of high-producing dairy cows. 2007, In: Proceedings of the 13th International conference of Production Diseases in Farm Animals, Leipzig, Germany, July 29th – August 4th, p. 204.

WATHES, D.C. – CHENG, Z. – BOURNE, N. – TAYLOR, V.J. – COFFEY, M.P. – BROTHERSTONE, S. Differences between primiparous and multiparous dairy cows in the inter-relationships between metabolic traits, milk yield and body condition score in the periparturient period. *Domestic Animal Endocrinology*, 2007, vol. 33, 203–225.

Kontaktní adresa

MVDr. Oldřich Pěnkava, +420 541 562 304; old.penkava@gmail.com, VFU Brno, Ústav fyziologie, Palackého 1-3; 612 42 Brno

Chlorambucil a fludarabin jako přípravný režim pro transplantaci kostní dřeně

Chlorambucil and fludarabin as a pre-transplant conditioning

Tomenendálová Jaroslava, Mayer Jiří, Doubek Michael, Doubek Jaroslav

Abstract

The aims of study were to choose conditioning regimen based on combination of chlorambucil + fludarabine and to test nonmyeloablative conditioning based on this combination as a preparative regimen for BMT. We have chosen F-CH regimen (fludarabine 3 mg/kg for 5 days followed by 4 mg/kg of chlorambucil for 5 days) as conditioning. Pneumo-, nephro-, gastrointestinal-, and myelotoxicity were seen. Semiallogeneic BMT was carried out between LEW rats (donors) and BN×LEW rats (recipients), allogeneic BMT between LEW rats (donors) and BN rats (recipients). Experimental animals were treated by F-CH regimen, control animals by TBI. Clinical stage of animals undergone semiallogeneic BMT after F-CH regimen was only slightly affected. Leukopenia and lymphopenia were significantly milder in comparison with TBI group. Chimerism was 0 %. Similar results were achieved in group with allogeneic BMT after F-CH.

Klíčová slova: transplantace hemopoetických buněk, chronická lymfatická leukemie, potkan, cytostatika

Úvod

Chronická lymfatická leukemie je standardními metodami nevléčitelná. Jako jediná kurativní metoda se jeví alogenní transplantace hemopoetických buněk (HSCT). Klinická studie kombinované terapie založené na fludarabinu (F) a chlorambucilu (CH) byla předčasně ukončena z důvodu vysoké myelotoxicity (Rai a kol. 2000). Jelikož útlum kostní dřeně je jednou z nezbytných podmínek úspěchu HSCT, předpokládáme, že kombinace chlorambucil+fludarabin má potenciál jako předtransplantační režim využitelný u pacientů s high-risk lymfoidními malignitami. Cílem práce bylo vybrat předtransplantační režim založený na kombinaci cytostatických léků chlorambucilu a fludarabinu a otestovat jeho využitelnost jako nemyeloablativního předtransplantačního režimu.

Materiál a metody

První část experimentu byla zaměřena na zjištění toxicity chlorambucilu, fludarabinu a jejich kombinace a výběr kombinovaného režimu, který bude nejlépe klinicky snášen a zároveň bude mít dostatečný imunosupresivní účinek. Bylo použito celkem 136 SPF potkanů outbredního kmene Wistar. Nejprve jsme stanovili maximální tolerovanou dávku (MTD) pro každé léčivo zvlášť. Chlorambucil byl aplikován po dobu 5 dnů v dávkách 0,5-50 mg/kg, fludarabin rovněž 5 dnů v dávkách 0,5-60 mg/kg. Podle výsledků testování MTD pro obě léčiva jsme pro kombinaci zvolili fixní koncentraci fludarabinu (3 mg/kg) a tři různé koncentrace chlorambucilu (1, 2, resp. 4 mg/kg). Byly testovány tři režimy podávání: 1) simultánní aplikace chlorambucilu a fludarabinu, 5 po sobě jdoucích dnů, (CH+F), 2) aplikace fludarabinu (5 dní) následovaná aplikací chlorambucilu (5 dní) (F-CH), 3) aplikace chlorambucilu (5 dní) následovaná aplikací fludarabinu (5 dní) (CH-F).

Kontrolní skupině byl aplikován p.o. 70% roztok etanolu (0,7 ml *pro toto*) a i.p. fyziologický roztok NaCl (0,9 ml *pro toto*) 5 po sobě jdoucích dnů.

Sledovali jsme klinický stav, hmotnost, krevní obraz a biochemické parametry plazmy a provedli histopatologické vyšetření.

Cílem druhé části experimentu bylo otestovat režim založený na kombinaci CH a F jako nemyeloablativní přípravu pro semialogenní (LEW → BN×LEW) a alogenní (LEW → BN) HSCT. Celkem bylo použito 32 SPF potkanů inbredních kmenů Lewis (LEW), Brown Norway (BN) a jejich F1 kříženců (BN×LEW). Na základě první části experimentu jsme vybrali režim F-CH (3 mg/kg fludarabinu 5 dní následované 4 mg/kg chlorambucilu 5 dní) jako přípravu před semi/alogenní BMT. 48 hodin po aplikaci poslední dávky CH byla příjemcům aplikována i.v. suspenze buněk kostní dřeně ($4-5 \times 10^7$), získaných výplachem femurů a humerů dárců fyziologickým roztokem s heparinem a citrátem sodným a odstředěním výplašku (1100 ot/min, 10 min) v chlazené centrifuzě při 4-8°C. Skupina, která podstoupila semialogenní BMT byla imunosuprimována cyklosporinem A (CsA) po dobu 14 dnů od BMT. Kontrolní skupina podstoupila přípravu celotělovým ozářením TBI (8 Gy). Sledovali jsme klinický stav zvířat, krevní obraz, vývoj chimerismu pomocí metody PCR a výskyt nemoci z reakce štetu proti hostiteli (GVHD).

Výsledky a diskuse

Toxicita chlorambucilu, fludarabinu a jejich kombinace

Pro samotný fludarabin nebyla MTD stanovena. Zvířata dobře tolerovala i nejvyšší dávky bez změn zdravotního stavu. Hematologická toxicita fludarabinu byla minimální, neurotoxicitu a poškození GIT popisované u lidí jsme nezaznamenali. Shodně s humánní medicínou se objevila nefrotoxicita a pneumotoxicita (Plunkett W, Saunders 1991, berlex.bayerhealthcare.com). Tyto změny byly patrné pouze při histopatologickém vyšetření. MTD pro chlorambucil byla 40-50 mg/kg. Zaznamenali jsme pneumo-, nefro-, GIT- a myelotoxicitu. Uhynulo 75 % jedinců ve skupině 50 mg/kg, resp. 50 % ve skupině 40 mg/kg. 3 dny po ukončení aplikace chlorambucilu jsme odhalili především výraznou leukopenii $0,33 \pm 0,05 - 1,3 \times 10^9/l$, $p < 0,01$, podmíněnou především lymfopenií: $0,07 \pm 0,04 - 0,59 \pm 0,20 \times 10^9/l$, $p < 0,01$. Při srovnání toxicity chlorambucilu popsané u člověka a pozorované v našem experimentu u potkanů lze konstatovat, že u obou druhů je nejvýraznější toxicita hematologická. Neurotoxicita se neobjevila, poškození GIT bylo mírné. Naopak u člověka vzácně popisovaná pneumotoxicita a nefrotoxicita patřily u potkanů mezi nejzávažnější vedlejší efekty léčby (Robak a Kasznicki 2002, Nicolle a kol. 2004). Podobně jako při monoterapii jsme při kombinované terapii zaznamenali pneumo-, nefro-, GIT- a mírnou myelotoxicitu. Nejlépe tolerovaným režimem byl F-CH s mírnou nehematologickou toxicitou. Nedošlo k žádnému úhynu, zvířata byla postižena intermitentním průjmem, krátkodobým poklesem hmotností a apatií. Schopnost vyvolat leukopenii a lymfopenii byla dostatečná. Tento režim byl proto vybrán jako přípravný pro další fáze testování. Obecně lze říci, že změny byly mírnější při kombinaci léčiv než při monoterapii velkými dávkami. Potkani tolerují mnohem vyšší dávky chlorambucilu, fludarabinu i jejich kombinace než lidé; zejména suprese kostní dřeně je oproti humánním pacientům relativně nízká. Je zřejmé, že ani nejvyšší dávky monoterapie ani kombinované režimy nevedly k permanentnímu útlumu hemopoézy. Narozdíl od lidských pacientů bylo ovlivnění červené krevní řady minimální, stejně jako počtu trombocytů.

Semialogenní transplantace kostní dřeně po přípravě F-CH s imunosupresí cyklosporinem A

Klinický stav zvířat byl ovlivněn jen mírně – pokles hmotnosti, krátkodobá inapetence a mírný průjem. Porovnání se skupinou, která podstoupila semialogenní BMT po TBI (celotělové ozáření) prokázalo vysoce signifikantní rozdíl v počtu leukocytů 9. až 10. den po BMT: $7,43 \pm 1,03 \times 10^9/l$ F-CH vs. $1,15 \pm 1,44 \times 10^9/l$ TBI a v % zastoupení dárcovské DNA v den 13.-14. po BMT: 0 % F-CH vs. $73 \pm 9,7$ % TBI. Výchozí hodnoty obou parametrů nejevily signifikantní rozdíl.

Alogenní transplantace kostní dřeně po přípravě F-CH

Počet leukocytů – výchozí a hodnoty 8 dní po BMT a chimerismus – hodnoty výchozí a 15 dní po BMT byly porovnány s výsledky kontrolní skupiny po transplantaci s TBI: TBI+CsA a TBI-CsA (s, resp. bez imunosuprese cyklosporinem A). Výchozí hodnoty obou parametrů nejevily signifikantní rozdíl mezi jednotlivými skupinami. Počet leukocytů 8 dní po BMT byl u skupiny F-CH vyšší než u obou skupin TBI: $6,73 \pm 1,29 \times 10^9/l$ F-CH vs. $0,08 \pm 0,15 \times 10^9/l$ TBI+CsA, resp. $0,00 \pm 0,00 \times 10^9/l$ TBI-CsA, $p < 0,0001$, zastoupení dárcovské DNA u F-CH bylo 14 dní po BMT signifikantně nižší než u TBI+CsA: 0 % vs. $29,0 \pm 8,3$ %, $p < 0,01$ a nižší než u TBI-CsA: 0 % vs. $37,3 \pm 26,4$ %, $p = 0,07$.

Z výše uvedeného vyplývá, že režim F-CH není dostatečně imunosupresivní pro úspěšný přenos semialogenních nebo alogenních HSC získaných z kostní dřeně mezi geneticky neshodnými kmeny potkanů Lewis a Brown Norway.

Selhání engraftmentu mohlo být způsobeno příliš velkou genetickou neshodou mezi dárce a příjemcem. Dostatečná imunosuprese/myeloablace (TBI) je však schopna překonat genetické rozdíly mezi těmito kmeny. Dále nízkým počtem transplantovaných buněk. Ten však odpovídal běžně používanému množství – cca $2,5 \times 10^7$ až $2,5 \times 10^8$. Případně nízkým imunosupresivním potenciálem režimu. Již toxikologická část experimentu odhalila schopnost potkanů tolerovat podstatně vyšší dávky než člověk, relativně nízkou myelotoxicitu a odlišné spektrum nežádoucích účinků (chybí trombocytopenie a propuknutí závažných infekcí). Na vině může být odlišný metabolismus, případně farmakokinetika, například nižší aktivita deoxycytidinkinázy, enzymu zodpovědného za fosforylaci fludarabinu v buňkách (Plunkett a Saunders 1991).

Literatura

- NICOLLE, A., PROCTOR, S. J., SUMMERFIELD, G. P. High dose chlorambucil in the treatment of lymphoid malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2004, 45, p. 271-275.
- PLUNKETT, W., SAUNDERS, P. P. Metabolism and action of purine nucleoside analogs. *Pharmacol Ther*. 1991, 49, p. 239-268.
- RAI, K. R., PETERSON, B. L., APPELBAUM, F. R., KOLITZ, J., ELIAS, L., SHEPHERD, L., HINES, J., THREATTE, G. A., LARSON, R. A., CHESON, B. D., SCHIFFER, C. A. Fludarabine compared with chlorambucil as a primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000, 343, p. 1750-1757.
- ROBAK, T., KASZNICKI, M. Alkylating agents and nucleoside analogues in the treatment of B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2002, 16, p. 1015-1027.
http://berlex.bayerhealthcare.com/html/products/pi/Fludara_PI.pdf

Kontaktní adresa: MVDr. Jaroslava Tomenendálová, Ústav fyziologie, FVL VFU, Palackého 1-3, 612 42 Brno, tomenendalovaj@vfu.cz

Plazmatické koncentrace žlučových kyselin u leguána zeleného (*Iguana iguana rhinolopha*)

Plasma bile acid concentrations in the green iguana (*Iguana iguana rhinolopha*)

Hrdá Anna, Knotková Zora

Abstract

This study is a part of a project aimed to observe haematological and biochemical parameters of blood in green iguanas (*Iguana iguana rhinolopha*), with emphasis on bile acid concentrations.

The first aim of this study was to compare bile acid concentrations in samples of blood serum and plasma in healthy green iguanas. Differences were not significant. We decided to assess bile acid concentrations of green iguanas in blood plasma. The second aim of the present study was to determine the range of plasma bile acid concentrations in 24 clinically healthy green iguanas. The mean bile acid concentrations were $15,89 \pm 15,61 \mu\text{mol/l}$. In the third part of the study we compared bile acid concentrations in the females with ovarial activity and the females without ovarial activity, there were no significant differences. The fourth aim was to determine plasma bile acid concentrations in a few select groups of green iguanas with different types of metabolic derangements. We found the significant difference between the group of patients with various types of liver diseases and the group of healthy green iguanas.

Klíčová slova: žlučové kyseliny, biochemie krevní plazmy, leguán zelený

Leguán zelený (*Iguana iguana*) je převážně býložravý ještěr dorůstající až 2,1 m délky, přirozeně se vyskytuje na americkém kontinentu od Mexika po Brazílii. Patří k běžným pacientům veterinárních klinik specializujících se na exotická zvířata. Mezi časté zdravotní komplikace patří u plazů metabolická onemocnění, mezi něž řadíme i hepatopatie. Diagnostika jaterních onemocnění je zde však poněkud komplikovaná. Klinické příznaky jsou většinou nespecifické, z biochemických parametrů v periferní krvi lze sledovat například aktivitu transamináz, ty však nejsou pro jaterní tkáň specifické a zvýšené hodnoty bývají pozorovány pouze v akutní fázi onemocnění. Dalším parametrem doporučovaným pro zhodnocení stavu jater je koncentrace žlučových kyselin v krevní plazmě nebo séru (Divers a Cooper 2000). V klinické veterinární praxi je tento parametr využíván u různých druhů zvířat (Schlesinger a Rubin 2003, Cray a kol. 2008), u plazů jsou však dosavadní poznatky poměrně omezené (Montesinos a kol. 2002, McBride a kol. 2007, Knotkova a kol. 2008.). Žlučové kyseliny jsou syntetizovány z cholesterolu v játrech a vstupují do enterohepatálního cyklu, kdy jsou vyloučeny se žlučí do střeva, poté zpětně vstřebávány a převážná většina vychytávána játry. Předpokládá se, že jejich koncentrace v periferní krvi se může zvyšovat při alteraci hepatocelulárních funkcí, při hepatoportálních zkratech nebo při obstrukci žlučových cest (Anwer a Meyer 1995, Hofmann a Hagey 2008).

Prvním cílem naší studie bylo porovnání koncentrací žlučových kyselin v krevním séru a plazmě, jelikož výrobce analytického kitu doporučuje stanovení v séru, na našem pracovišti však pro biochemické vyšetření u plazů běžně využíváme plazmu. Vzorokry krve byly odebírány od 24 leguánů zelených (*Iguana iguana rhinolopha*) – 10 samic a 14 samců, chovaných dlouhodobě na Klinice chorob ptáků, plazů a drobných savců. Jejich zdravotní stav byl prověřován pravidelným klinickým, hematologickým a

biochemickým vyšetřením. Odběry krve byly prováděny po 24 hodin trvající hladovce z ventrální ocasní žíly, jako antikoagulans pro získání plazmy byl použit heparin. Získané vzorky krevního séra i plazmy byly zamrazeny a uchovávány při $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, po rozmrazení v nich byla stanovena koncentrace žlučových kyselin enzymatickou kolorimetrickou metodou (Bile Acids, Randox Laboratories, UK) na automatickém analyzátoru Cobas Mira Plus (Roche). Při zpracování vzorků krevního séra však velice často docházelo k jejich srážení v gelovitou hmotu, proto bylo porovnáno pouze 9 párů vzorků. Párovým t-testem nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi koncentracemi žlučových kyselin v krevním séru a plazmě ($p > 0,05$). V následujícím období byla tedy pro stanovení žlučových kyselin u leguánů zelených využívána již pouze krevní plazma.

Druhým cílem studie bylo stanovení rozmezí koncentrací žlučových kyselin v krevní plazmě u zdravých leguánů zelených žijících v našich podmínkách. Pro tyto účely byly prováděny opakované odběry vzorků krve od výše zmíněných zvířat (5 odběrů během jednoho roku). Koncentrace žlučových kyselin se při těchto odběrech do určité míry lišily, aritmetický průměr celé skupiny se pohyboval od 9,98 do 20,69 $\mu\text{mol/l}$. Z celkového počtu 110 vzorků byla vypočítána průměrná hodnota $15,89 \pm 15,61\ \mu\text{mol/l}$. McBride a kol. (2007) uvádí pro klinicky zdravé leguány zelené průměrné plazmatické koncentrace $7,5 \pm 7,8\ \mu\text{mol/l}$. Rozdíl mezi naměřenými hodnotami může být dán různě dlouhou dobou hladovky před odběry krve (24 h x 48 h), případně odlišnou použitou detekční soupravou.

V další fázi bylo cílem porovnat hladiny žlučových kyselin u samic leguána zeleného v období pohlavního klidu a u samic v době folikulogeneze. Vzorky krve byly odebírány od devíti klinicky zdravých samic (od každé samice celkem 11 odběrů v průběhu téměř dvou let), ovariální aktivita byla sledována pravidelným vyšetřením – měření plazmatické koncentrace kalcia, cholesterolu a triacylglycerolů, palpáce dutiny tělní, případně rentgenologické vyšetření. Samice s pravidelně probíhajícími rozmnožovacími cykly byly zařazeny do jedné skupiny, do druhé skupiny byly zařazeny samice, u nichž nebyla zaznamenána žádná ovariální aktivita. Naměřené plazmatické koncentrace žlučových kyselin u těchto dvou skupin byly porovnány nepárovým t-testem. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). U sledovaných samic se tak nepotvrdil předpoklad, že by koncentrace žlučových kyselin mohly být změněny vzhledem k ovlivnění stavu jater v období folikulogeneze.

Tab. č. 1 Plazmatické koncentrace žlučových kyselin u vybraných skupin leguánů zelených s odlišnými formami metabolických poruch

Skupiny leguánů	N	Koncentrace žlučových kyselin ($\mu\text{mol/l}$)				
		min	max	x	s	medián
Klinicky zdraví plazi	110	0,22	73,17	15,89	15,61	10,63
Samice s POFS*	12	1,08	86,18	23,04	28,16	9,55
MBD**	4	6,88	80,51	30,77	33,66	17,84
Nemoci jater	8	23,02	120,21	59,52	33,55	52,08

* POFS – (preovulatory follicle stasis) - retence ovariálních folikulů

** MBD – (metabolic bone disease) – porucha metabolismu vápníku, fibrózní osteodystrofie v důsledku sekundárního nutričního nebo renálního hyperparatyroidizmu

Posledním cílem studie bylo porovnání koncentrací žlučových kyselin u zdravých leguánů zelených a u skupin pacientů (pacienti Kliniky chorob ptáků, plazů a drobných savců) s vybranými onemocněními. Výsledky jsou znázorněny v tabulce č. 1.

Hodnoty naměřené u jednotlivých skupin pacientů byly porovnány pomocí nepárového t-testu se skupinou zdravých leguánů zelených. Statisticky významný rozdíl ($p < 0,01$) byl zaznamenán pouze u skupiny pacientů s onemocněním jater.

V následujícím období bude pozornost zaměřena zejména na změny plazmatických koncentrací žlučových kyselin u pacientů s hepatopatiemi přesně definovanými histopatologickým vyšetřením vzorků jaterní tkáně.

Literatura

ANWER, M.S., MEYER, D.J. (1995) Bile acids in the diagnosis, pathology, and therapy of hepatobiliary diseases. *Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice* 25: 503 – 517

CRAY, C., GAUTIER, D., HARRIS, D.J., ARHEART, K.L. (2008) Changes in Clinical Enzyme Activity and Bile Acid Levels in Psittacine Birds With Altered Liver Function and Disease. *Journal of Avian Medicine and Surgery* 22(1): 17 – 24

DIVERS, S.J., COOPER, J.E. (2000) Reptile Hepatic Lipidosis. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine* 9: 153–164

HOFMANN, A.F., HAGEY, L.R. (2008) Bile Acids: Chemistry, Pathochemistry, Biology, Pathobiology, and Therapeutics. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65: 2461 – 2483

KNOTKOVA, Z., DORRESTEIN, G.M., JEKL, V., JANOUSKOVA, J., KNOTEK, Z. (2008) Fasting and 24-hour post-prandial bile acids of healthy female red-eared terrapins (*Trachemys scripta elegans*). *Veterinary Record* 163: 510 – 514

MCBRIDE, M., HERNANDEZ-DIVERS, S.J., KOCH, T., BUSH, S., LATIMER, K.S., WILSON, H., HERNANDEZ-DIVERS, S.M., STEDMAN, N.L. (2007) Preliminary evaluation of pre- and post-prandial 3 α -hydroxy-bile-acids in the green iguana (*Iguana iguana*). *Journal of Herpetologic Medicine and Surgery* 16: 129-134

MONTESINOS, A., MARTÍNEZ, R., JIMENÉZ, A. (2002) Plasma Bile Acids Concentration in Tortoises: Reference Values and Histopathologic Findings of Importance for Interpretation. Proc. 27th WSAVA/FECAVA/AVEPA Congress, Granada, Spain, October 3 to 6, 2002, volume II, pp. 125–126

SCHLESINGER, D.P., RUBIN, S.I. (1993) Serum bile acids and the assessment of hepatic function in dogs and cats. *The Canadian Veterinary Journal* 34: 215 – 220

Kontaktní adresa

MVDr. Anna Hrdá, Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, FVL, VFU Brno, annahrda@seznam.cz

C-reaktivní protein u psů se syndromem systémové zánětové odpovědi

C-reactive protein in dogs with systemic inflammatory response syndrome

Řeháková Kristína, Uhríková Ivana

Abstract

Acute phase proteins change their serum concentrations rapidly in response to infection and tissue damage. The aim of the study was to investigate C-reactive protein (CRP) concentrations in 21 dogs with systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and to compare CRP levels with other inflammatory markers: 1. group: septic patients (n=6), 2. group: pyometra (n=8), 3. group: patients with GDV (n=7) and control group with 20 clinically healthy dogs. Routine hematologic and biochemical profiles were performed at initial examination. Serum CRP was measured using a canine CRP commercial ELISA kit. The WBC counts, total protein (TP), albumin and CRP concentrations in each group were compared to control group using Student's T test. A P value of less 0,05 was considered statistically significant. All groups had significantly increased WBC counts and CRP concentrations when compared to healthy dogs. Septic patients and dogs with pyometra had also significantly decreased albumin concentrations. No significant differences were found in WBC counts, CRP, TP and albumin concentrations among the three groups. Serum CRP is more sensitive inflammatory marker than WBC count in septic animals and dogs with GDV, but do not appear to have value in differentiation of sepsis from tissue damage.

Keywords: C-reactive protein, SIRS, dog

Úvod

Proteiny akutní fáze (Acute phase proteins, APP) tvoří skupinu proteinů jejichž sérové koncentrace se mění jako odpověď na infekci nebo tkáňovou destrukci. Hladiny C-reaktivního proteinu (CRP) společně s haptoglobinem, sérovým amyloidem A a fibrinogenem při zánětech rapidně stoupají (pozitivní APP), zatímco u albuminu dochází k poklesu (negativní APP).¹

Koncentrace CRP mohou být elevovány 100–1000x v průběhu prvních 24–48 h po zánětlivé iritaci pod vlivem stimulace prozáněťovými cytokiny.^{1,2} V humánní medicíně je proto CRP považován za vysoce citlivý marker septických stavů.²

Cílem práce bylo porovnat hladiny C-reaktivního proteinu u 3 skupin psů s diagnostikovaným syndromem zánětové odpovědi (systemic inflammatory response syndrome, SIRS) a korelovat jeho hodnoty s celkovým počtem leukocytů, koncentrací celkové bílkoviny (TP) a albuminu. Ve skupině psů se syndromem dilatace a volvulu žaludku (gastric dilatation and volvulus, GDV) korelovat hodnoty CRP v séru s koncentrací laktátu v plazmě.

Materiál a metodika

Do studie bylo zahrnuto celkem 21 pacientů Kliniky chorob psů a koček VFU Brno se syndromem zánětové odpovědi, tj. s přítomností alespoň dvou z následujících kritérií: hypo- nebo hypertermie, tachykardie (nad 140), tachypnoe (nad 20), leukopenie, leukocytóza nebo elevace počtu tyčků v periferní krvi. Pacienti byli na základě anamnestických údajů, klinického, paraklinického (USG a RTG) a laboratorního vyšetření rozděleni do 3 skupin: První skupinu tvořili psi se septickým onemocněním

(n=6) tj. s potvrzením makroskopického septického ložiska nebo pozitivním cytologickým nálezem: peritonitis (2), pyothorax (1), perforující cizí těleso v GIT (3). Do druhé skupiny byly zařazeny fený s pyometrou (n=8). Třetí skupina byla zastoupena pacienty se syndromem GDV (n=7). Kontrolní skupinu tvořilo 20 klinicky zdravých psů bez zjištěných abnormalit hematologického a biochemického vyšetření s hladinami CRP ve fyziologickém rozmezí (do 25 µg/ml).

Periferní krev pro laboratorní vyšetření byla odebrána z v. *jugularis externa*, resp. v. *cephalica antebrachii*. Celkový počet leukocytů byl stanoven ze vzorku EDTA krve na automatickém analyzátoru Celltac alpha MEK 6318 (Nihon Kohden, Japan) ihned po odběru. Rutinní biochemický profil byl vyšetřen ze séra, s výjimkou laktátu stanoveného z plazmy, na automatickém analyzátoru DPC Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Finland). C-reaktivní protein byl stanoven ve stejných vzorcích séra uchovávaných při -20°C komerčním ELISA kitem (Canine C-Reactive protein, BioVendor – Laboratorní medicína, a. s., Czech Republic). Absorbance byla měřena na ELISA readru ELX 808 (Bio-Tek Instruments Inc., USA) při 450 nm.

Ke srovnání hladin TP, albuminu, CRP a celkového počtu leukocytů u jednotlivých skupin byl použit nepárový Studentův t-test. Nulová hypotéza byla zamítnuta na hladině významnosti $p < 0,05$. Hodnoty TP, albuminu a celkový počet leukocytů byly podrobeny standardní korelační analýze ve vztahu ke koncentraci CRP.

Výsledky

Srovnáním souborů pacientů s kontrolní skupinou byly zjištěny signifikantně vyšší celkové počty leukocytů a koncentrace C-reaktivního proteinu ve všech třech skupinách. Signifikantně nižší koncentrace albuminu byla zjištěna u septických pacientů a u fen s pyometrou. Statistické hodnocení jednotlivých skupin pacientů nepřineslo další signifikantní rozdíly s výjimkou výraznější leukocytózy u fen s pyometrou ve srovnání s pacienty se syndromem GDV.

U všech zvířat ze skupiny septických pacientů byly zjištěny zvýšené hladiny CRP, zatímco pouze polovina z nich vykazovala leukocytózu. U fen s pyometrou byla elevace CRP potvrzena u 75 % zvířat, leukocytóza u 87,5 %. Ve skupině psů s GDV 71,4 % zvířat mělo zvýšené hladiny CRP ale pouze 28,6 % reagovalo leukocytózou.

Korelací hladin albuminu a CRP byla zjištěna mírná pozitivní závislost ve skupině septických pacientů (0,609) a negativní ve skupině fen s pyometrou (-0,747). Koncentrace CRP a laktátu u psů s GDV vzájemně nekorelovaly.

Tab. 1 Vybrané hodnoty leukocytů a C-reaktivního proteinu

	Leucs ($\times 10^9/l$)				CRP ($\mu g/ml$)			
	K	I	II	III	K	I	II	III
Průměr	9,05	19,96	26,23	13,17	4,15	60,84	63,55	45,23
SD	3,5	8,42	7,75	3,22	4,00	32,19	45,98	31,42
Minimum	6,2	11,80	8,00	9,60	0,00	27,66	0,00	0,00
Maximum	16,7	36,90	37,20	18,00	12,61	122,83	147,31	104,95

Vysvětlivky: K: kontrola, I: 1. skupina, II: 2. skupina, III: 3. skupina

Diskuse

Stanovení C-reaktivního proteinu u psů se SIRS potvrdilo význam CRP jako vysoce senzitivního markeru zánětu a tkáňové destrukce. Markantní rozdíl mezi hladinami CRP

a celkovým počtem leukocytů byl pozorován jak ve skupině septických onemocnění, kde byly hladiny CRP zvýšené u všech jedinců, zatímco leukocyty pouze u poloviny, tak ve skupině psů s GDV, kde u 71,4 % zvířat byly zvýšené hladiny CRP ale leukocyty zůstaly u stejného procenta ve fyziologickém rozmezí.

Zvýšená tvorba C-reaktivního proteinu u psů byla potvrzena u řady infekčních onemocnění,³ nádorových procesů,^{1,4-7} a u imunitně zprostředkovaných nemocí.¹ Nejvyšší hladiny se obecně uvádí u pyometery a akutní pankreatitidy. Naopak CRP pouze raritně stoupá u epilepsie nebo endokrinopatií.¹ K výrazné elevaci hladin CRP dochází také u pacientů 1-2 dny po chirurgickém zákroku. Pozitivní korelace mezi zvýšenou koncentrací CRP a stupněm závažnosti onemocnění byla prokázána u psů s pneumonií.³

Absence signifikantních rozdílů v koncentraci CRP mezi jednotlivými skupinami neumožňuje rozlišit septický stav od tkáňového poškození, i když průměrná a maximální koncentrace CRP ve skupině psů s GDV dosahovaly nejnižších hodnot.

Negativní korelace mezi CRP a albuminem byla podle očekávání zjištěna u fen s pyometrou, u kterých se vzhledem k subakutní/chronické povaze sumuje role albuminu jako negativního APP a hypoalbuminémie z inapetence.

V celém souboru 21 zvířat došlo k úhynu pouze u dvou pacientů s GDV s koncentracemi CRP 43,36 resp. 47,53 $\mu\text{g/ml}$ odpovídajícími průměrné hodnotě souboru (Tab. 1). Oba pacienti byly zároveň jedinými, u kterých byla provedena splenektomie a u kterých i přes masivní infuzní terapii byla koncentrace laktátu nad horní mez fyziologického rozmezí (3 mmol/l). I když iniciační hodnoty CRP nemají pravděpodobně vztah k přežívání pacientů, pokles hodnot CRP v průběhu prvních 3 dnů se jeví jako prognosticky příznivý faktor.^{2,8}

Literatura

1. Nakamura, M., Takahashi, M., Ohno, K. et al. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2008, vol. 70, no. 2, s. 127-131.
2. Gebhardt, Constance, Hirschberger, J., Rau, Stefanie et al. Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009, vol. 19, no. 5, s. 450-458.
3. Yamamoto, S., Shida, T., Miyaji, S. et al. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Veterinary Research Communications*, 1993, vol. 17, no. 2, s. 85-93.
4. Tecles, F., Spiranelli, E., Bonfanti, U. et al. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2005, vol. 19, no. 6, s. 865-870.
5. Mischke, R., Waterston, M., Eckersall, P. D. Changes in C-reactive protein and haptoglobin in dogs with lymphatic neoplasia. *Veterinary Journal*, 2007, vol. 174, no. 1, s. 188-192.
6. Tecles, F., Caldin, M., Zanella, Anna et al. Serum acute phase protein concentrations in female dogs with mammary tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2009, vol. 21, no. 2, s. 214-219.
7. Planellas, Marta, Bassols, Anna, Siracusa C. et al. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Veterinary Clinical Pathology*, 2009, vol. 38, no. 3, s. 348-352.
8. Chan, D. L., Rozanski, E. A., Freeman, L. M. Relationship among plasma amino acids, C-reactive protein, illness severity and outcome in critically ill dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2009, vol. 23, no. 3, s. 559-563.

Kontaktní adresa: MVDr. Kristína Řeháková, Centrální klinická laboratoř, FVL VFU Brno, E-mail: rehakovak@vfu.cz

Aktuální problematika tumorů mléčné žlázy u fen **An up-to-date information on mammary tumors in the bitch**

Stavinohová Renata, Nečesánková Michaela, Lorenzová Jana

Abstract

This article is a review of most recent information on breast cancer in the bitch. Mammary tumors are one of the most frequently diagnosed tumors in female dogs. Studies of canine mammary tumors in male dogs have brought new information which can be used in human medicine as well. The presentation of results of IGA VFU Brno 155/2008/FVL project "Genetic analysis of predisposition to mammary tumor growth" is included as a part of the article.

Klíčová slova: fena, gen, mastektomie, mléčná žláza, , polymorfismus, tumor

Nádory mléčné žlázy patří k nejčastěji diagnostikovaným nádorům u psů samčího pohlaví. Jejich zastoupení činí více jak 42 % ze všech diagnostikovaných tumorů u fen [Sorenmo et al. 2003]. Incidence výskytu tumorů mléčné žlázy je 3x vyšší než u lidí [Owen 1979]. Nejčastěji se tumory mléčné žlázy (TMŽ) vyskytují u fen ve věku 8,5 – 11 let [Lorenzová a kol. 2009]. Z histologického hlediska se jedná o nádory mléčné žlázy maligní, benigní či hyperplazie mléčné žlázy. Nejčastěji se vyskytují nádory maligní, ale údaje o incidenci jednotlivých typů tumorů mléčné žlázy ve skupinách (dle WHO) se v dostupné literatuře liší [Lorenzová a kol. 2009]. Problematika tumorů mléčných žláz u fen je hodně diskutovaným problémem. Existují klinické studie, které se zabývají jak analýzou faktorů ovlivňujících prognózu onemocnění a dobu přežívání pacientů s tumorem mléčné žlázy, tak vlivem rozsahu zákroku na hojení operační rány, dále markery nádorového onemocnění či parametry oxidačního stresu u pacientů s TMŽ.

Diagnostika onemocnění je založena na anamnéze a klinickém vyšetření. Pro vyloučení/potvrzení metastáz plic je nutné provést RTG dutiny hrudní. USG dutiny břišní je prováděno také za účelem potvrzení/vyloučení metastáz dutiny břišní. CT, MRI a scintigrafie nejsou v diagnostice metastáz tumorů mléčné žlázy zatím rutinně využívány. Laboratorní vyšetření krve a moči může vyloučit další onemocnění. Cytologické vyšetření vzorků je další diagnostickou metodou, která může odlišit neoplazii od zánětlivé reakce. Definitivní diagnózu stanovíme na základě histologického vyšetření tumoru a zařazení do jednotlivých typů a subtypů dle klasifikace WHO. Imunohistochemická analýza není běžně prováděnou metodou.

Jedinou vhodnou terapií tumorů mléčné žlázy zatím zůstává chirurgická excize [Slatter et al. 2003]. Rozsah chirurgického zákroku závisí na expanzi neoplazie a preferenci operátora [Skorupski et al. 2005] a nemá podle některých studií vliv na dobu přežívání pacienta, může mít však vliv na výskyt recidiv [Slatter et al. 2003]. Existuje mnoho studií zabývajících se rozsahem zákroku a jeho vlivu na hojení pooperační rány. Chemoterapie je známa, ale zatím nenachází v terapii mléčné žlázy uplatnění. [Slatter et al. 2003].

Příznivou prognózu ovlivňuje jak správně zvolená chirurgická intervence, tak včasná diagnostika nádorového onemocnění, tedy ještě před objevením se klinických příznaků onemocnění. Znamená to vyhledávání vnímavých jedinců na základě genetického sledování. Zkoumání genetických předpokladů k onemocnění je prioritou nejen

v humánní, ale také veterinární medicíně. Novější klinické studie přináší informace o genetických přístupech v diagnostice, terapii, prevenci a profylaxi nádorových onemocnění.

Genetická vnímavost k nádorovým onemocněním obecně i k tumorům mléčné žlázy je známým jevem u lidí i zvířat. V rámci problematiky genetického přístupu k nádorům mléčné žlázy u fen existuje několik studií. Studie obecně pojednávají o konkrétních genech spojených s vyšší vnímavostí nebo odolností ke vzniku nádoru ve vztahu k typu nádoru a jeho charakteristice, dále také o jeho mutacích/polymorfismech, které mohou ovlivnit výskyt tak závažného onemocnění. U lidí jsou v rutinní praxi testovány mutace v genech BRCA 1 a BRCA 2, jejichž mutace jsou spojeny s vyšším rizikem výskytu rakoviny prsu. U psů se testováním mutací/polymorfismů v těchto genech zjistilo následující. Mikrosatelitní polymorfismus vyskytující se v 14. intronu BRCA 1 genu může být užitečný markerem ztráty heterozygotnosti. Nález homozygotnosti vzácných alel rozšiřuje možnosti studie biologie a evoluce psa [Tsuchida S et al. 2001]. Další studie vysvětluje funkci BRCA 2 - jakožto tumor supresorového genu a zabývá se mutacemi BRCA 2. Tyto mutace zvyšují riziko tumorů mléčné žlázy. Závěrem studie byl i nález 4 nových tzv. SNP – single nukleotide polymorfisms - v exonu 27 BRCA 2 [Yoshikawa Y et al. 2005]. Studie [Lee lee Chu et al 1998] pojednává o uspořádání genomu genu p53 u psů. Studie dokazuje, že se gen p 53 podílí na vzniku maligních tumorů u psů. Ze studie vyplývá, že se na vzniku tumorů u psů podílí shodné poškození genů jako u lidí, tzn., že pes může představovat vhodný model pro studium etiologie a progresu tumoru i u lidí. Nakolik platný je nález SNP v rámci individuálního rizika nádoru mléčné žlázy pojednává další studie, jejímž závěrem je nález 7 SNPs. Těchto sedm polymorfismů genů znamená malý, leč signifikantní rizikový faktor pro spontánní, ale nedědičné onemocnění mléčné žlázy. V současné době není na základě analýzy SNP indikována specifická chirurgická terapie, terapie medikamentózní či profylaktická [Tempfer CB et al. 2006]. Jiné studie se zabývají vztahy mezi určitými geny a vnímavostí k různým typům tumorů a jejich expresí. Studie [Sugiura et al. 2007] zjišťuje expresi BRCA 1 tzv. splicing variant v normální tkáni a tumorem postižené mléčné žlázy psů. Jiný článek se zabývá expresí mikroRNA u nádorů mléčné žlázy fen [Boggs et al. 2008]. Mutace genů imunitního systému vedou také k vyšší vnímavosti tomuto onemocnění. Existují studie zkoumající význam IL-6 ve vztahu k nádorům mléčné žlázy. Závěrem jedné z nich je, že IL-6 je negativním prognostickým faktorem u pacientů s nádory mléčné žlázy [Knüpfer H. 2007].

V roce 2008 jsem se v rámci prvního ročníku postgraduálního studia částečně podílela na projektu IGA VFU Brno 155/2008/FVL, s názvem „Genetická analýza predispozice ke vzniku tumorů mléčné žlázy“, jehož řešitelem byla MVDr. Jana Lorenzová. Cílem projektu byla pilotní studie pro další analýzu možných asociací mezi mutacemi a polymorfismy (SNP) vybraných kandidátních genů a vnímavostí ke vzniku tumorů mléčné žlázy u psů. Genetický polymorfismus byl analyzován ve dvou genech potencionálně významných ke vzniku nádorů a v genech imunitní odpovědi. Závěrem projektu IGA je, že geny BRCA 1 a p 53 nebyly ve sledovaných skupinách polymorfni přesto, že jejich polymorfismus u psů byl v těchto oblastech sledovaných genů popsán [Tsuchida S et al. 2001]. Příčinou je pravděpodobně omezené plemenné spektrum a malý počet zvířat ve skupinách. V případě genů imunitní odpovědi IL6 a NOS3 byly nalezeny polymorfismy typu SNP. Nicméně malé počty případů a plemenná heterogenita neumožňují zatím učinit závěr o tomto zjištění. Naznačují však, že je

důležité dále shromažďovat materiál a pokračovat ve zkoumání genetických předpokladů onemocnění.

Genetické metody by mohly být nepostradatelnou nejen diagnostickou, ale také terapeutickou a preventivní metodou v rámci eliminace tumorů mléčných žláz u fen. Získáme-li informace o genetickém profilu jedince, ve vztahu k nádorovým onemocněním mléčné žlázy, relativně brzo - tj. před prvním háráním, můžeme takového jedince vyřadit z chovu. Současně doporučíme u postiženého jedince kastraci, jako prevenci nádorového onemocnění mléčné žlázy. Tímto bychom mohli pozitivně ovlivnit zdraví a kvalitu života jedinců s predispozicí k nádorovému onemocnění mléčné žlázy.

Literatura

BOGSS, RM; ZACHARY, MW; STICKNEY, MJ; PORTER, WW; MURPHY, KE. MicroRNA expression in canine mammary cancer. In *Mamm Genome*.2008;19:561-569

CHU, LL; RUTTEMAN, GR; KONG, JMC; GHAREMANI, M; SCHMEING, M; MISDORP, W; GARDEREN, E; PELLETIER, J. Genomic organization of the canine p53 gene and its mutational status in canine mammary neoplasia. In *Breast cancer Research and Treatment*.1998;50:11-25

KNÜPFER, H; PREISS, R. Significance of interleukin-6 (IL6) in breast cancer (review). In *Breast cancer Res Treat*.2007 Apr;102(2):129-35

LORENZOVÁ, J; CRHA, M; KECOVÁ, H; URBANOVÁ, L; STAVINOHOVÁ, R; NEČAS, A. Doba přežívání pacientů a příčiny jejich úhynu po chirurgickém ošetření tumorů mléčné žlázy v závislosti na histologickém typu tumoru: retrospektivní studie 221 případů. In *Acta Vet. Brno* 2009

OWEN, LN. A comparative study of canine and human Breast cancer. In *Incest Cell Pathol* 1979;2:257-275

SKORUPSKI, KA; OVERLEY, B; SHOFER, FS; GOLDSCHMIDT, MH; MILLER, CA; SORENMO, KU. Clinical characteristics of mammary carcinoma in male cats. In *J Vet Intern Med*. 2005;Jan-Feb;19(1):52-5

SLATTER, D. Mammary gland surgery. *Textbook of Small Animal Surgery*. Copyright 2003;349-351. ISBN 0-7216-8607-9

SORENMO, K. Canine mammary gland tumors. In *Vet Clin Small Anim* 2003;33:573-596

SUGIURA, T; MATSUYAMA, S; AKIYOSI, H; TEKENATA, S; YAMATE, J; KUWAMURA, M; AOKI, M; SHIMADA, T; OHASHI, F; KUBO K. Expression patterns of the BRCA 1 splicing variants in canine normal tissues and mammary gland tumors. In *J Vet Med Sci*.2007;Jun;69(6):587-92

TEMPFER, CB; HEFLER, LA; SCHNEEBERGER, C; HUBER, JC. How valid is single nucleotide polymorphism (SNP) diagnosis for the individual risk assessment of breast cancer? In *Gynecol Endocrinol*.2006 March;22(3):155-9

TSUCHIDA, S; IKEMOTO, S; TAGAWA, M. Microsatellite polymorphism in intron 14 of the canine BRCA 1 gene. In *J Vet Med Sci*.2001 Apr;63(4):479-81

YOSHIKAWA, Y; MORIMATSU, M; OCHIAI, K; NAGANO, M; YAMANE, Y; TOMIZAVA, N; SASAKI, N; HASHIZUME, K. Analysis of genetic variations in the exon 27 region of the canine BRCA2 locus. In *J Vet Med Sci*. 2005 Oct;67(10):1013-7

Kontaktní adresa

Renata Stavinohová, MVDr., renatastavinohova@seznam.cz, Klinika chorob psů a koček, Oddělení chirurgie a ortopedie, VFU BRNO – FVL, Palackého 1/3, Brno 612 42

Testování pevnosti fixace segmentálního defektu femuru samotnou 4,5 LCP a v konstrukci plate and rod

Testing of stiffness of segmental femoral defect fixation using 4.5 LCP alone versus 4.5 LCP in plate-rod construct

Urbanová Lucie, Srnec R., Proks P., Stehlík L., Nečas Alois

Abstract

The goal of the study was to determine mechanical properties, namely a resistance to bending forces, of bone-implant constructs in segmental femoral osteotomy ex vivo model of flexible buttress osteosyntheses in miniature pigs using 4,5 mm titanium LCP alone, versus 4,5 mm titanium LCP and 3 mm intramedullary pin („plate and rod“), respectively.

The „plate and rod“ fixation of the segmental femoral defect is significantly more resistant ($p = 0,01$) to bending forces (100 N, 200 N, 300 N, and 500 N), than LCP alone. These findings will be used in upcoming in vivo experiments.

Klíčová slova: Fixace fraktury, roztržštěná fraktura, pilířová osteosyntéza, selhání implantátů

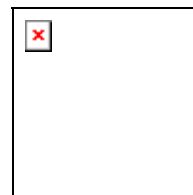
Při hodnocení prvotních klinických výsledků in vivo experimentální studie zaměřené na hojení kostních lézí v rámci projektu NPV II bylo zjištěno, že se pětiděrová titanová 4,5 mm LCP („Locking Compression Plate“ = zámková kompresní ploténka), v porovnání s šestiděrovou 3,5 mm LCP, jeví jako vhodnější implantát k provedení flexibilní pilířové osteosyntézy segmentálního defektu diafýzy femuru u miniaturního prasete. Výsledky této studie umožní omezit nežádoucí selhání implantátů při časově a finančně náročných transplantačních experimentech zaměřených na hojení kostí (Necas et al., submitted). Přesto i v případě rigidnějšího 4,5 mm systému LCP došlo v in vivo studii u některých zvířat k nežádoucímu selhání fixace (zlomení LCP). Přitom rigiditu fixace by bylo možné dále zvýšit například technikou „plate and rod“. Ta je statisticky významně rigidnějším typem fixace, než samotná pilířová ploténka. Pravděpodobnost selhání samotné ploténky ve srovnání s „plate and rod“ je desetkrát vyšší (Hulse et al. 1997). Z toho důvodu jsme se rozhodli ověřit mechanické vlastnosti 4,5 mm LCP v kombinaci s intramedulárním (IM) hřebem („plate and rod“) v porovnání se samotnou pilířovou 4,5 mm LCP na ex vivo modelu předtím, než případně tuto techniku použijeme k fixaci segmentálního defektu femuru u námi využívaného miniaturního prasete in vivo. Cílem studie tedy bylo porovnat mechanické vlastnosti z pohledu odolnosti fixace na působení sil ohybu u dvou technik přemostňující osteosyntézy segmentálního diafyzálního defektu femuru, a to samotnou pětiděrovou 4,5 mm titanovou LCP (model S-LCP), respektive v kombinaci „plate and rod“ (model PR-LCP). Testování a porovnání mechanických vlastností konstrukce kost-implantát při působení sil ohybu na flexibilní pilířovou osteosyntézu s uvedenými LCP implantáty na ex vivo modelu segmentální ostektomie femuru u miniaturních prasat nebylo podle našich znalostí dosud sledováno.

Materiál a metodika

Jako ex vivo model pro testování mechanických vlastností flexibilní pilířové osteosyntézy segmentálního defektu femuru byla zvolena konstrukce pravé stehenní miniaturních prasat srovnatelného stáří (8-10 měsíců) a velikosti (použitých ve studii hojení segmentálního defektu levého femuru transplantací mezenchymových kmenových buněk s biokompatibilními skafoldy v rámci širšího projektu NPV II).

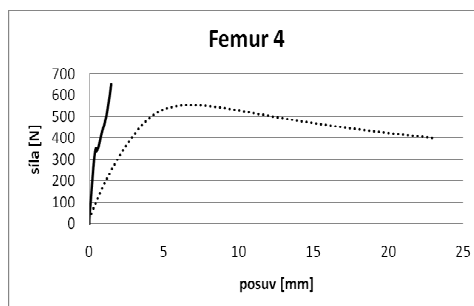
Pravé (neoperované) femury těchto prasat byly vypreparovány bezprostředně po eutanázii při ukončení pokusu, a to 16 týdnů po transplantaci.

Na vypreparovaných femurech miniaturního prasete (n=5) byl uprostřed diafýzy levého femuru oscilační pilou vytvořen iatrogenní segmentální defekt kosti (osteotomie) v celém průřezu kosti o výšce 15 mm kostního sloupce diafýzy femuru. Následně byla provedena fixace hlavních fragmentů femuru „plate and rod“ technikou přemostňující osteosyntézy, a to pětiděrovou 4,5 mm titanovou LCP (Synthes®) a čtyřmi 4,5 mm titanovými zámkovými šrouby zavedenými bikortikálně (s ponecháním prázdného centrálního otvoru ploténky v úrovni segmentálního defektu kosti) v kombinaci „plate and rod“ s IM Steinmannovým hřebem o tloušťce 3 mm, který vyplňoval 30 % průměru dřeňové dutiny kosti v jejím isthmu – model PR-LCP.



Obr. 1:
Upevňovací
prvek.

Takto připravené ex vivo modely kostí s implantáty byly předány k testování mechanických vlastností (ohybové namáhání) na zkušební stroji ZWICK Z 020-TND. K upevnění testované konstrukce do zkušebního stroje byl vytvořen třídílný upevňovací prvek v podobě: 1) vaničky o čtvercovém půdorysu (10x10 cm) a výšce stěn 2 cm, do níž byl distální i proximální konec kosti fixován polymethylmetakrylátem, opatřené klínovým žlábkem, 2) destičky o čtvercovém půdorysu (10x10 cm) a síle 0,5 cm opatřené klínovým žlábkem, která umožnila fixaci vzorku v ramenech zkušebního stroje ZWICK Z 020-TND, a 3) válečku o průměru 1,5 cm, vloženého mezi klínové žlábkové obou zmíněných součástí ukotvovacího prvku (obr. 1). Nejprve byl mechanicky testován ex vivo model PR-LCP tak, že byl podroben ohybovému namáhání definovanou silou a byly měřeny hodnoty vzájemného posunu distálního a proximálního segmentu osteotomizované kosti. Následně byl z konstrukce vyjmut IM hřeb a stejnému testování byla podrobena konstrukce S-LCP. U všech vzorků byl porovnáván rozdíl vzájemného posunu fragmentů (mm) při působení sil 100 N, 200 N, 300 N a 500 N. Ke statistickému zhodnocení výsledků byl zvolen neparametrický dvouvýběrový Wilcoxonův test.



Graf 1: Závislost velikosti působící síly na délku vzájemného posunu fragmentů při „plate and rod“ (plná čára) a samotné LCP (přerušovaná čára).

Výsledky

Ve všech případech byl prokázán statisticky významný rozdíl ($p = 0,01$) ve velikosti vzájemného posunu (přiblížení) fragmentů kosti fixovaných samotnou LCP (100N $0,55 \pm 0,23$; 200N $1,21 \pm 0,46$; 300N $1,96 \pm 0,79$; 500N $4,38 \pm 2,45$) a LCP v kombinaci „plate and rod“, a to při působení shodných sil (100 N $0,209 \pm 0,14$; 200 N $0,41 \pm 0,23$; 300 N $0,67 \pm 0,37$ a 500 N $1,82 \pm 0,82$). Rozdíl v průběhu křivek záznamu posunu fragmentů samotné LCP a v kombinaci „plate and rod“ znázorňuje graf 1.

Diskuse

Kombinace IM hřebu s ploténkou při fixaci roztržitých fraktur přináší řadu mechanických a biologických výhod. Mechanicky působí IM hřeb jako náhrada transkortikálního defektu. Konstrukce kost-implantát je pak odolnější vůči ohybu (Hulse et al. 1997). V naší studii byla odolnost LCP ploténky v kombinaci s hřebem oproti

působení všech zvolených velikostí působících sil statisticky významně větší v porovnání s fixací samotnou LCP. Dosud prováděné studie o „plate and rod“ nebyly zaměřeny na flexibilní pilřovou osteosyntéz využívající LCP. Dřívější studie potvrzují vhodnost „plate and rod“ u psů a koček při použití klasických (DCP) plotének. V nich bylo nejvíce komplikací zaznamenáno v souvislosti s migrací hřebu s následným drážděním okolních měkkých tkání (Reems et al. 2003). Při působení ohybových sil má hřeb tendenci se v kosti pohybovat (Hulse et al. 1997). Migrace hřebu je dána tím, že hřeb není pevně fixován v dřevové dutině a jeho udržení v optimální pozici, do které byl zaveden, je závislé pouze na třecích silách mezi hřebem a spongiózou kosti (Hulse et al. 1997). Tento jev jsme zaznamenali i v naší studii a na grafu průběhu testu je patrný jako prudký pokles síly působící na konstrukci kost-implantát (graf 1), jež byl dán posunem hřebu v dřevové dutině až do fáze jeho kontaktu s kompaktní kostí, resp. úchytovým zařízením. Platí, že čím větší je tření mezi hřebem a spongiózou, tím efektivnější je systém fixace (Hulse et al. 1997).

Ze studie provedené Hulsem et al. (2000) vyplývá, že velikost napětí na ploténce je nepřímo úměrná průměru IM hřebu, resp. procentu průměru dřevové dutiny, kterou vyplňuje. Z této studie vyplývá optimální stupeň vyplnění dřevové dutiny hřebem ze 35-40 %. Reems et al. (2003) doporučují vyplnit hřebem 35-50 % průměru dřevového kanálu. V našem případě byla zvolena tloušťka hřebu 30 % průměru dřevové dutiny tak, aby bylo možno zavést všechny šrouby bikortikálně, a tím se zvýšila pevnost fixace.

Závěr

Fixace segmentálního defektu femuru miniaturních prasat flexibilní pilřovou osteosyntézou pětiděrovou 4,5 mm titanovou LCP v kombinaci s 3 mm IM hřebem („plate and rod“) je při ex vivo mechanických testech odolnější na působení sil ohybu, než stabilizace samotnou 4,5 mm LCP. „Plate and rod“ se jeví jako vhodnější fixace segmentálních lézí femuru, u nichž lze předpokládat značné namáhání osteosyntézy ohybovými silami. Výsledky této studie umožní omezit případné nežádoucí selhání implantátů při časově a finančně náročných in vivo transplantačních experimentech zaměřených na hojení kostí v rámci dalšího řešení projektu NPV II 2B06130.

Poděkování

Práce vznikla za podpory IGA VFU Brno (projekt 259/2009/FVL) a výzkumného projektu Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy ČR (NPV II 2B06130).

Literatura

- HULSE, D- HYMAN ,W- NORI, M- SLATER, M. Reduction in plate strain by addition of an intramedullary pin. *Vet.Surg*, 1997, vol. 26, s. 451-459.
- HULSE, D- FERRY, K- FAWCETT, A. Effect of intramedullary pin size on reducing bone plate strain. *Vet Comp Orthop Traumatol*, 2000, vol. 13, s. 185-190.
- REEMS, MR- BEALE, BS- HULSE, DA. Use of a plate-rod construct and principles of biological osteosynthesis for repair of diaphyseal fractures in dogs and cats:47 cases (1994-2001), *JAVMA*, 2003, vol. 223, no. 3, s. 330-335.
- NECAS, A- PROKS, P- URBANOVÁ, L- SRNEC, R- STEHLÍK, L- CRHA, M- RAUŠER, P- PLÁNKA, L- AMLER, E- VOJTOVÁ, L- JANČÁŘ, J. Radiographic Assessment of Implant Failures of Titanium 3.5 LCP vs. 4.5 LCP Used for Flexible Bridging Osteosynthesis of Large Segmental femoral Diaphyseal Defects in a Miniature Pig Model. submitted.

Kontaktní adresa: MVDr. Lucie Urbanová, VFU Brno, KCHPK, ODD. CHIR. A ORTOP., lucieurbanova@email.cz

The Effect of Zinc Supplementation in Cows on the Ruminal Fermentation and Biomass

Panev Aleksandar, Hauptmanová Kateřina, Pavlata Leoš, Pechová Alena,
Filípek Jaroslav, Dvořák Rudolf

Abstract

The objective of our study was to determine the effect of zinc (Zn) supplementation on the ruminal fermentation and biomass in six dry standing cows which were fed various concentrations of Zn in the form of zinc oxide (ZnO) over a period of two months. The Zn supplementation was divided into three phases: optimal (sampling A), minimal (sampling B) and high Zn concentration (sampling C and D). The ruminal fluid samples were obtained at the end of each period except for the high Zn supplementation period when two samplings were performed at the beginning and at the end of the high Zn concentration supplementation. The results have shown that the ruminal fluid Zn concentration has a steady decreasing tendency throughout the whole experimental period (A 3.53, B 3.17, C 3.18, D 2.45 $\mu\text{mol/l}$) and the Zn concentration in the ruminal biomass has shown a steady growing trend in all samplings except in sampling B which was done at the end of the period with minimal Zn concentration (Sampling A 2370, B 1767, C 3489, D 3390 $\mu\text{mol/l}$). Based on the obtained results it is possible to conclude that most of the zinc fed with the feed ration is deposited in the ruminal biomass. Further experimental studies will be required in order to investigate the exact pathways of Zn deposition in the ruminal biomass.

Keywords: Biomass, Ruminal Fermentation, Zinc, Ruminal Fluid

Introduction

Zinc (Zn) is a trace mineral essential for the normal functioning of both plant and animal organisms, its functions are conducted with the mediation of metalloenzymes. Zn is irreplaceable in the bone metabolism, for all physiological processes in the skin and the creation of skin derivatives. It influences the development and functioning of the reproductive system, has a role in the synthesis of insulin and supports the functions of the ruminal microflora. The absorption of Zn is influenced by the form of Zn, age of the animal, the amount of Fe, Ca, Cu, Cd and Se also the absorption of Zn can be seriously hampered by the existence of ruminal acidosis. In ruminants Zn is absorbed by active transport. Zn concentrations of ruminal microorganisms have been shown to be 10 to 500% higher than the Zn content of the diets fed (1, 2, 3). Furthermore, it has been demonstrated that increasing the dietary level of Zn increases the amount of Zn associated with microbial fractions (2). The primary objective of this study is to establish the effects of Zn on the ruminal fermentation and biomass. This was achieved by supplementing Zn in three separate periods differing in the amount of supplemented Zn and by following the ruminal fermentation and biomass which could be influenced by the altered Zn levels.

Materials and Methods

Our trial was performed on six dry standing cows with an indwelling ruminal fistulas which were housed at the Ruminant Clinic FVL, VFU Brno. The animals were fed the same ration (10 kg of hay and 2 kg of concentrated feed) throughout the whole trial differing only in the Zn concentration in the designated periods. The feed was divided into two identical portions ($\frac{1}{2}$ was fed in the morning and $\frac{1}{2}$ in the evening). The zinc was

supplemented in the form of Zinc oxide (ZnO) added in the concentrate feed ration. Also the animals received 200 mg of Zn per day with the hay (content of Zn in the hay dry mater was 20 mg/kg). The ruminal fluid samples were obtained at the end of each period except for the high Zn supplementation period when two samplings were performed at the beginning and at the end of the high Zn concentration supplementation. The first sampling was performed when the animals were adapted to the feeding of recommended dose of Zn via the ration (zinc concentration: 180mg/ kg of dry mater in the concentrate ration) sampling A. After this the animals were fed for four weeks with feed ration which had no added zinc (30 mg/kg of dry mater in the concentrate ration). At the end of this time period second sampling was performed (Sampling B). Then the animals were fed with a feed ration containing high level of Zn (500 mg/kg of dry mater in the concentrate ration) -Sampling D. Another sampling was done at the beginning of the period in which high amounts of Zn were present in the feed ration (Sampling C). In these animals we have monitored selected parameters in the ruminal fluid's metabolic profile, Zn concentration in ruminal fluid, and biomass. The observed parameters in ruminal fluid's metabolic profile included pH, infusorians count, total acidity, ammonia and lactic acid, volatile fatty acids (acetic, propionic, iso.butyric, n-butyric, iso.valeric and n-valeric acids). The ruminal biomass separation was done according to the Czerkawski method (4), which was slightly modified. The method begins with filtering of the ruminal fluid through several layers of cotton gauze, after this the filtrated fluid is passed through 0.315 mm sieve. Centrifugation by 15000/s for period of 15 minutes is the following step, the formed sediment is diluted with 0.9% NaCl and centrifuged again. The created sediment is first dried with warmth and later it is placed in a exicator with silica gel, the biomass prepared in this manner was analyzed in our laboratory. The statistical processing of the results was done by the use of T student's test and Microsoft Excel software.

Results and Discussion

The results have shown(Table 1: Ruminal fluid parameters and biomass) that the ruminal fluid Zn concentration has a steady decreasing tendency throughout the whole experimental period (A 3.53, B 3.17, C 3.18, D 2.45 $\mu\text{mol/l}$) and the Zn concentration in the ruminal biomass has shown a steady growing trend in all samplings except in sampling B which was done at the end of the period with minimal Zn concentration (Sampling A 2370, B 1767, C 3489, D 3390 $\mu\text{mol/l}$). Whereas between sampling A and B we can see statistically significant decreasing of Zn concentration ($p < 0.05$), then the concentration at sampling C was significantly higher ($p < 0.01$). This was followed by a stable infusorians numbers throughout the experimental period which has shown decrease only in the period between samplings B and C.

Table 1: Ruminal fluid parameters and biomass

Sampling	Ruminal fluid pH	Total ruminal fluid acidity	Ammonia $\mu\text{mol/l}$	Infusorians $\times 10^3/\text{ml}$	Lactic Acid $\mu\text{mol/l}$	Zn ruminal fluid	Zn in biomass $\mu\text{mol/l}$
A	6.71	18.9	4.20	181	0.36	3.53	2370.58
B	6.60	20.0	4.54	181	0.23	3.17	1767.0
C	6.71	21.2	6.36	164	0.32	3.18	3489.9
D	6.59	21.5	7.76	207	0.42	2.45	3390.6

Table 2: Ruminal fermentation indicators

Sampling	Total VFA	Acetic Acid $\mu\text{mol/l}$	Propionic Acid $\mu\text{mol/l}$	Iso.butyric Acid $\mu\text{mol/l}$	n-Butyric Acid $\mu\text{mol/l}$	Iso.valeric Acid $\mu\text{mol/l}$	n-Valeric Acid $\mu\text{mol/l}$
A	101.8	72.8	16.5	0.2	8.5	0.9	1.0
B	106.4	70.3	17.2	0.6	10.4	0.8	0.8
C	100.4	70.1	16.5	0.7	11.1	0.9	0.9
D	107.5	69.4	16.5	0.8	11.0	1.1	1.1

In our trial we have noticed that the different levels of ZnO feed with the feed ration didn't cause significant change (Table 2: Ruminal fermentation indicators) in the total volatile fatty acids (VFA) quantity also the amounts of other acids which also are direct products of ruminal fermentation (lactic acid) didn't show any significant changes. Based on this it is possible to conclude that the various Zn concentrations in the feed ration didn't significantly influenced the ruminal fermentation. Although the amount of Zn feed with the feed ration was differing from optimal (zinc concentration: 180mg/kg of dry mater in the concentrate ration) to minimal (30 mg/kg of dry mater in the concentrate ration) and high (500 mg/kg of dry mater in the concentrate ration) the Zn concentration in the ruminal fluid was steadily decreasing through the whole experimental period. When this is compared with the constant rise (except for sampling B when it is decreasing) in Zn biomass concentration it is possible to say that most of the Zn fed in the trial was deposited in the ruminal biomass.

Conclusion

The goal of our experiment was to follow the effects of various Zn concentrations supplemented in the feeding ration on the ruminal fermentation indicators and biomass. From the presented experimental results it is possible to assume that the ruminal microflora present in the biomass is transforming the inorganic Zn in to organic forms which then are easily absorbed in to the blood and utilized by the organism. Further studies will be required in order to establish the exact amount of Zn processed by the ruminal biomass and its further roll in the ruminant metabolism.

Acknowledgments

The study was conducted as a part of MSM6215712403 project.

References

1. Mitchell, R.L. and J. Tosić. 1949. Trace elements in rumen microorganisms. *J. Gen. Microbiology* 3: XVI
2. Durand, M and R. Kavashima. 1980. Influence of minerals on rumen microbial digestion. *Digestive Physiology and Metabolism in ruminants*. In : Y. Ruckebusch and P. Thivend (Ed.) pp 375-408. AVI publishing Company, Westport, CT
3. Martinez, A. 1973. Effect of some major and trace elements interactions upon in vitro rumen cellulose digestion. PhD dissertation. Oregon State University, Corvallis.
4. Czerkawski W.J Chemical Composition of Microbial Matter in the Rumen. *J. Sci. Agric.* 1976, 27, 621-632

Address

DVM Aleksandar Panev, Ruminant Clinic, Faculty of Veterinary Medicine University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno. Palackeho 1-3, 61242 Brno, Czech Republic. paneva@vfu.cz

Účinky salbutamolu podaného inhalačne v priebehu celkovej anestézie na systémovú a pľúcnu hemodynamiku, mechanické vlastnosti pľúc a kyslíkovú bilanciu u koní.

The effects of inhalation salbutamol administration on systemic and pulmonary hemodynamic, pulmonary mechanics and oxygen balance during general anaesthesia in the horse.

Patschová Mária, Kabeš Radovan, Krisová Šárka

Abstract

This research aimed to determine the effect of aerosolized salbutamol administration on systemic and pulmonary hemodynamic, pulmonary mechanics and oxygen balance in healthy horses during general anaesthesia. Six healthy Thoroughbreds underwent two general anaesthetics in dorsal recumbency with (S-group) and without (C-group) aerosolized salbutamol administration in randomized order with a one month washout period. Anaesthesia was induced with 1,1 mg/kg of xylazine, 0,02 mg/kg of diazepam, 2,2 mg/kg of ketamine i.v. and maintained with isoflurane. Horses were mechanically ventilated. After achieving a steady state, baseline (T_0) values of cardiac output, arterial and mixed venous blood gas analysis, systemic and pulmonary blood pressure, heart rate, dynamic compliance, airway resistance were recorded in both groups. PaO_2/FiO_2 ratio, oxygen consumption, oxygen delivery (DO_2), pulmonary shunt values were calculated. In the S-group, 2 μ g/kg of aerosolized salbutamol were administered synchronously with insprium into the tracheal tube. In both groups data were recorded at 15, 30, 45 and 60 minutes after T_0 . For each time point, comparisons were made between the groups using Wilcoxon's test. A comparison did not reveal any difference at T_0 . Subsequently, significantly higher values of cardiac output, heart rate, DO_2 , PaO_2/FiO_2 ratio and significantly lower pulmonary blood pressure were found in the S-group. Aerosolized salbutamol administration caused hemodynamic changes which resulted in an elevation of oxygen delivery. The effect varied between individuals.

Key words: horse, salbutamol, general anaesthesia, oxygen balance, hemodynamic

Úvod

Pri celkovej anestézii koní dochádza k narušeniu pomeru ventilácie a perfúzie (V/Q) a k vzniku hypoxémie, ktorá sa podieľa na výskyte peri- a postanestéziologických komplikácií. Štúdie, zamerané na zlepšenie arteriálnej oxygenácie počas celkovej anestézie, dokázali úspešnosť použitia IPPV s PEEP, oxidu dusnatého a „recruitment maneuver“ (Moens a kol., 1994, 1998, Heinonen a kol., 2001, Wettstein a kol., 2006). Intravenózna aplikácia β_2 adrenergného agonistu klenbuterolu priniesla rozdielne výsledky (Keegan a kol., 1991, Lee a kol., 1998). V klinickej štúdii Robertson a Bailey (2002) viedlo inhalačné podanie β_2 agonistu salbutamolu k zvýšeniu hodnôt PaO_2 , ale nebol objasnený presný mechanizmus účinku.

Cieľom tejto experimentálnej štúdie bolo zistiť účinok inhalačnej aplikácie salbutamolu na systémovú a pľúcnu hemodynamiku, mechanické vlastnosti pľúc a kyslíkovú bilanciu počas celkovej anestézie u zdravých koní.

Materiál a metodika

Projekt pokusu (č. 1/2008) bol schválený Odbornou komisiou VFU Brno na ochranu zvierat a Ministerstvom školstva, mládeže a telovýchovy ČR.

Do experimentálnej štúdie bolo zaradených šesť koní plemena anglický plnokrvník s ľavou *arteria carotis communis* premiestnenou podkožne; dva žrebce, traja valasi a jedna kobyła (hmotnostné rozmedzie 471 – 587 kg, medián 497; vekové rozmedzie 5 – 10 rokov, medián 5,5). Kone boli považované za zdravé na základe klinického vyšetrenia a hematologického a biochemického vyšetrenia krvi. Každý kôň podstúpil dve celkové inhalačné anestézie v dorzálnnej polohe, s alebo bez inhalačnej aplikácie salbutamolu, v náhodnom poradí, v rozmedzí jedného mesiaca.

Na premedikáciu pred celkovou anestéziou bol použitý xylazín v dávke 1,1 mg/kg i.v., indukcia anestézie bola dosiahnutá aplikáciou 0,02 mg/kg diazepamu a 2,2 mg/kg ketamínu i.v. Anestézia bola vedená izofluranom so zmesou kyslíku a vzduchu (FiO₂ 60 %). Vydychovaná koncentrácia izofluranu bola 1,4 %. Mechanická ventilácia bola nastavená na udržanie EtCO₂ medzi 5 a 6 kPa. Do podkožne premiestnenej *arteria carotis communis* bol zavedený arteriálny katéter na meranie arteriálneho tlaku krvi a srdečného výdaja lítiumdilučnou metódou. Do *arteria facialis* bol zavedený ďalší arteriálny katéter na anaeróbny odber vzoriek arteriálnej krvi. Cez pravostrannú *vena jugularis* bol zavedený 7 F Swan-Ganz katéter do *arteria pulmonalis* na meranie pľúcnicového tlaku krvi a odber vzoriek zmiešanej venózne krvi. Zo vzoriek arteriálnej a zmiešanej venózne krvi bola uskutočnená analýza krvných plynov. Na spirometrické meranie bol použitý H-lite (Moens a kol., 2009) a boli vypočítané hodnoty dynamickej compliance a dychovej resistance.

Po dosiahnutí ustáleného stavu boli zaznamenané bazálne (T₀) hodnoty nasledujúcich parametrov u salbutamolovej a kontrolnej skupiny: srdečnej frekvencie, systémového a pľúcnicového tlaku krvi, analýzy arteriálnej a zmiešanej venózne krvi, dynamickej compliance, dychovej resistance a srdečného výdaja. Nasledujúce parametre boli vypočítané: pomer PaO₂/FiO₂, dodávka kyslíka (DO₂), spotreba kyslíka (VO₂) a pľúcny skrat (Qs/Qt). Následne boli u salbutamolovej skupiny do endotracheálnej kanyly inhalačne aplikované 2 µg/kg salbutamolu pomocou MDI adaptéra s komôrkou. Aplikácia bola synchronizovaná s nádychom. U kontrolnej skupiny bola aplikácia salbutamolu vynechaná. U oboch skupín boli vyššie zmieňované parametre zaznamenané 15, 30, 45 a 60 minút (T₁₅, T₃₀, T₄₅, T₆₀) od T₀. Štatisticky boli zhodnotené nasledujúce parametre: srdečný výdaj, srdečná frekvencia, systémový a pľúcnicový tlak krvi, pomer PaO₂/FiO₂, DO₂, VO₂, Qs/Qt, dynamická compliance a dychová resistance. Parametre salbutamolovej a kontrolnej skupiny boli navzájom porovnané v každom časovom bode (T₀, T₁₅, T₃₀, T₄₅, T₆₀) pomocou Wilcoxonovho testu.

Výsledky a diskusia

V čase T₀ nebol zistený štatisticky signifikantný rozdiel medzi salbutamolovou a kontrolnou skupinou v žiadnom parametre. Následne bol zaznamenaný štatisticky signifikantný rozdiel (p < 0,05) medzi skupinami v nasledujúcich parametroch, ktorých hodnoty sú uvedené v tabuľke č.1 ako priemer ± smerodajná odchýlka. Po aplikácii salbutamolu boli zaznamenané signifikantne vyššie hodnoty srdečného výdaja, srdečnej frekvencie, dodávky kyslíka a pomeru PaO₂/FiO₂ ako u kontrolnej skupiny koní. Diastolický a stredný pľúcnicový tlak krvi sa po aplikácii salbutamolu signifikantne znížil.

U hodnôt systolického pľúcnicového tlaku krvi, systémového tlaku krvi, spotreby kyslíka, pľúcneho skratu, dynamickej compliance a dychovej resistance nebol zaznamenaný signifikantný rozdiel medzi skupinami.

Mechanizmus zlepšenia arteriálnej oxygenácie po aplikácii salbutamolu, ktoré sa prejavilo zvýšením pomeru PaO₂/FiO₂ a dodávky kyslíka, pravdepodobne spočíva v zvýšení srdečného výdaja a perfúzie pľúc. Salbutamol pravdepodobne ovplyvnil srdečné a vaskulárne β₂ receptory s výsledkom zvýšenia srdečného výdaja a vznikom vazodilatácie v pľúcnom a systémovom krvnom riečisku. Hlavným účinkom salbutamolu, pozorovaným v tejto štúdii, bolo zlepšenie hemodynamiky, ventilačné parametre ovplyvnené neboli, preto môžeme predpokladať, že po inhalačnom podaní salbutamolu má na zvýšení dodávky kyslíka hlavný podiel zvýšený srdečný výdaj.

Tab. č. 1: Porovnanie salbutamolovej a kontrolnej skupiny, hodnoty sú uvedené ako priemer ± SD.

Parameter	T ₀ (salb)	T ₀ (kont)	T ₁₅ (salb)	T ₁₅ (kont)	T ₃₀ (salb)	T ₃₀ (kont)	T ₄₅ (salb)	T ₄₅ (kont)	T ₆₀ (salb)	T ₆₀ (kont)
Srdečný výdaj (l/min)	38 ± 7	37,4 ± 12,7	64 ± 25,5	35,4 ± 10,1	59,8 ± 23,4	30,1 ± 5,4	55,3 ± 19	30 ± 5,9	50,4 ± 9,4	29,4 ± 3,7
Štatistická významnosť	N.		N.		*p = 0,031		*p = 0,031		*p = 0,031	
Srdečná frekvencia	32 ± 2	30 ± 2	40 ± 6	30 ± 2	38 ± 5	30 ± 1	31 ± 4	34 ± 2	31 ± 3	32 ± 1
Štatistická významnosť	N.		*p = 0,031		*p = 0,029		N.		N.	
Diaľstolický pľúcnicový tlak krvi (mmHg)	12 ± 3	13 ± 4	9 ± 1	13 ± 2	7 ± 4	15 ± 2	8 ± 3	17 ± 4	7 ± 2	16 ± 5
Štatistická významnosť	N.		*p = 0,029		*p = 0,031		*p = 0,031		*p = 0,030	
Stredný pľúcnicový tlak krvi (mmHg)	16 ± 3	20 ± 4	15 ± 2	20 ± 3	13 ± 3	21 ± 3	13 ± 2	22 ± 4	12 ± 2	22 ± 4
Štatistická významnosť	N.		*p = 0,030		*p = 0,031		*p = 0,031		*p = 0,031	
PaO ₂ /FiO ₂	158 ± 32	176 ± 67	178 ± 52	151 ± 56	172 ± 37	138 ± 56	180 ± 43	121 ± 41	181 ± 47	114 ± 36
Štatistická významnosť	N.		*p = 0,031		N.		*p = 0,031		*p = 0,031	
DO ₂ (l/min)	5,8 ± 0,8	6 ± 2,3	9,6 ± 3,2	5,4 ± 1,8	8,9 ± 2,5	4,4 ± 1	8,3 ± 1,9	4,3 ± 1,1	7,6 ± 0,8	4,3 ± 1,2
Štatistická významnosť	N.		N.		*p = 0,031		*p = 0,031		*p = 0,031	

(salb – salbutamolová skupina; kont – kontrolná skupina; N. - nesignifikantné)

Záver

Inhalačne aplikovaný salbutamol zdravým koňom počas celkovej anestézie navodil hemodynamické zmeny, ktorých následkom bolo zvýšenie dodávky kyslíka. Salbutamol môže mať pozitívny účinok na arteriálnu oxygenáciu, ale v jeho pôsobení bola

zaznamenaná individuálna variabilita. Na určenie presného mechanizmu účinku je nutné zistenie pomeru ventilácie a perfúzie (V/Q) a jeho zmien po aplikácii salbutamolu.

PodĎakovanie

Táto štúdia bola podporovaná IGA VFU Brno, č. 45/2007/FVL a VZ MSM 6215712403.

Literatúra

Heinonen, E.; Hedenstierna, G.; Merilainen, P.; Hogman, M.; Nyman, G. Pulsed delivery of nitric oxide counteracts hypoxaemia in the anaesthetized horse. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2001, vol. 28, no. 1, s. 3-11.

Keegan, R.D.; Gleed, R.D.; Sanders, E.A.; Seaman, G.C.; Wertz, E.M.; Short, C.E. Treatment of Low Arterial Oxygen Tension in Anesthetized Horses with Clenbuterol. *Veterinary Surgery*. 1991, vol. 20, no. 2, s. 148-152.

Lee, Y.H.L.; Clarke, K.W.; Alibhai, H.I.K. The cardiopulmonary effects of clenbuterol when administered to dorsally recumbent halothane-anaesthetised ponies – failure to increase arterial oxygenation. *Research in Veterinary Science*. 1998, vol. 65, no. 3, s. 227-232.

Moens, Y.; Lagerweij, E.; Gootjes, P.; Poortman, J. Differential artificial ventilation in anesthetized horses positioned in lateral recumbency. *American Journal of Veterinary Research*. 1994, vol. 55, no. 9, s. 1319-1326.

Moens, Y.; Lagerweij, E.; Gootjes, P.; Poortman, J. Influence of tidal volume and positive end-expiratory pressure on inspiratory gas distribution and gas exchange during mechanical ventilation in horses positioned in lateral recumbency. *American Journal of Veterinary Research*. 1998, vol. 59, no. 3, s. 307-312.

Moens, Y.; Gootjes, P.; Ionita, J.C.; Heinonen, E.; Schatzmann, U. *In vitro* validation of a Pitot-based flow meter for the measurement of respiratory volume and flow in large animal anaesthesia. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2009, vol. 36, no. 3, s. 209-219.

Robertson, S.A.; Bailey, J.E. Aerosolized salbutamol (albuterol) improves PaO₂ in hypoxaemic anaesthetized horses – a prospective clinical trial in 81 horses. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2002, vol. 29, no. 4, s. 212-218.

Wettstein, D.; Moens, Y.; Jaegglin-Schmucker, N.; Bohm, S.H.; Rothen, H.U.; Mosing, M.; Kastner, S.B.R.; Schatzmann, U. Effects of an alveolar recruitment maneuver on cardiovascular and respiratory parameters during total intravenous anesthesia in ponies. *American Journal of Veterinary Research*. 2006, vol. 67, no. 1, s. 152-159.

Kontaktná adresa

Patschová Mária MVDr., Klinika chorob koní, Veterinárni a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, Brno, 612 42, Česká Republika, mpatschova@vfu.cz

Vliv suplementace selenu u matek na stav zásobení kůzlat v období odstavu

The influence of selenium supplementation of goats on the selenium status of their kids in time of weaning

Ševčíková Lucia, Pechová Alena, Pavlata Leoš, Antoš David, Malá Eva, Páleník Tomáš, Dvořák Rudolf

Abstract

The aim of this trial was to compare the effect of long-term supplementation of the goats with different forms of selenium (Se) on body reserves of Se in their kids at the time of weaning. The 33 pregnant goats were divided into 5 groups. First group was control while the other 4 groups were supplemented with Se before and after parturition until weaning. First trial group Se-I was given inorganic form of Se - sodium selenite while 3 other groups were given organic form of Se: group Se-L lactate-protein complex, group Se-P selenium proteinate and group Se-Y Se- enriched yeast. The kids were weaned at 3 months of age and 45 male kids were slaughtered. The long term supplementation of goats with Se influenced Se concentration in all examined tissues of kids. Between control and experimental groups were found significant differences excepting kidney corium and pancreas of group Se-I. The supplementation of mothers with Se in all forms significantly influenced supply of their kids at the time of weaning. The highest efficiency was found in group Se-Y supplemented by Se yeast, but also the other two organic forms of Se was more efficient than inorganic form of Se.

Key words: *Se-lactate, Se-proteinate, Se-yeast, liver, tissue, muscle*

K velice aktuálním a intenzivně studovaným mikroprvkům se celosvětově řadí selen (Se), který je v současnosti považován za jeden z nejvýznamnějších stopových prvků ve výživě zvířat i lidí. Je známo, že Se přechází přes placentární bariéru a saturace organismu novorozenečků mláďat tak závisí na stavu zásobení jejich matek (Mišurová a kol. 2009). Koncentrace Se v mléce závisí na množství a formě Se v krmné dávce (Givens a kol. 2004). Cílem této práce bylo srovnat vliv dlouhodobé suplementace matek organickými a anorganickou formou Se na zásobení mláďat v období odstavu.

Materiál a metody

Do pokusu bylo zařazeno 33 březích koz plemene bílá krátkosrstá. Kozy byly rozděleny do 5 skupin a od 6 týdnů před datem očekávaného porodu až do odstavu mláďat byl u jednotlivých skupin suplementován Se v odlišné formě. První skupina C (n=7) sloužila jako kontrolní, ve které nebyl Se přidáván do krmné dávky. Dalším 4 skupinám byl Se dotován prostřednictvím granulované krmné směsi, která obsahovala 0,9 mg/kg sušiny v různých formách podle jednotlivých skupin. První pokusná skupina Se-I dostávala anorganický Se ve formě seleničitanu sodného (n=7), skupina Se-L (n=7) dostávala Se ve formě laktáto-proteinového komplexu (0,17% Se, Selene chelate, Agrobac Karel Gebauer Czech Republic), skupina Se-P (n=6) ve formě selenium proteinate (B-Traxim Se, Pancosma Switzerland) a skupina Se-Y (n=6) ve formě kvasinek obohacených Se, 0.5% Se (Sel-Plex, Alltech, USA). Do doby porodu dostávaly kozy granulovanou krmnou směs v dávce 300g na kus a den, přičemž seno, voda a solný liz měly k dispozici ad libitum. Po porodu se dávka granulované směsi zvýšila na 1 kg na kus a den. Kůzlata měla v období mléčné výživy volný přístup k senu

i ke granulované krmné směsi. Ve 3 měsících byl proveden odstav a kozlíci byli odporaženi. Na jatkách byly odebrány orgány (játra, pankreas, myokard, plíce, ledviny, svalovina, jazyk, bránice) na stanovení Se. Po zpracování vzorků mineralizací v mikrovlnné peci Milestone Ethos TC (Milestone Italy) byla koncentrace Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$ čerstvé tkáně) stanovena hydridovou technikou AAS na přístroji SOLAAR M6 (UNICAM).

Výsledky

Nejvyšší koncentrace Se byly zjištěny v ledvinách, dále v játrech, pankreasu, plicích a slezině, o něco nižší koncentrace pak byly ve svalovině různého typu – myokard, jazyk, bránice, stehenní sval. Mezi kontrolní a všemi pokusnými skupinami byly zjištěny signifikantní rozdíly s výjimkou kory ledvin a pankreasu (Se-I). Při srovnání skupiny Se-I s ostatními pokusnými skupinami suplementovanými organickými formami Se byly zjištěny signifikantně vyšší koncentrace Se téměř ve všech sledovaných tkáních především ve skupině Se-Y (viz tabulka 1.)

Tab.1: Koncentrace Se ($\mu\text{g}/\text{kg}$ čerstvé tkáně) ve tkáních kůzlat po odstavu u kontrolní (C; n=10) a pokusných skupin dostávajících Se ve formě seleničitanu sodného (Se-I; n=8), laktátproteinového komplexu (Se-L; n=7), proteinátu selenu (Se-P; n=10) a kvasinek obohacených Se (Se-Y; n=10).

		C	Se-I	Se-L	Se-P	Se-Y
Játra	x	99,5 ^{A,B,C,D}	146,7 ^{A,e,f}	213,4 ^{B,e}	203,9 ^C	228,9 ^{D,f}
	s	20,0	23,8	50,6	53,9	52,0
Plíce	x	94,0 ^{A,B,C,D}	152,1 ^{A,e}	148,1 ^{B,f}	161,0 ^C	184,6 ^{D,e,f}
	s	15,0	6,6	18,7	35,6	31,0
Bránice	x	32,2 ^{A,B,C,D}	56,7 ^{A,ee,ff}	47,3 ^{B,ee,gg,h}	64,2 ^{C,h,i}	84,8 ^{D,ff,gg,i}
	s	5,9	6,8	4,4	16,8	15,2
Ledviny -kora	x	633,7 ^{aa}	636,0 ^{bb}	656,2 ^C	691,3 ^{dd}	789,8 ^{aa,bb,C,dd}
	s	75,0	87,3	29,1	68,7	54,3
Ledviny-dřeň	x	110,9 ^{a,B,cc,dd}	127,6 ^{a,ee,f,g}	166,4 ^{B,ee}	150,1 ^{cc,f}	153,4 ^{dd,g}
	s	14,8	14,1	19,1	20,7	15,8
Pankreas	x	176,2 ^{aa,bb,C}	176,6 ^{dd,ee,F}	225,3 ^{aa,dd,g}	207,7 ^{bb,ee,hh}	256,8 ^{C,F,g,hh}
	s	26,5	19,8	26,6	11,7	27,0
Jazyk	x	56,8 ^{A,B,C,D}	81,2 ^{A,ee,f,gg}	99,1 ^{B,ee}	98,0 ^{C,f}	102,1 ^{D,gg}
	s	9,7	9,1	10,0	13,2	8,7
Stehno	x	33,5 ^{A,B,C,D}	55,6 ^{A,e,ff}	62,6 ^{B,e,gg}	59,0 ^{C,hh}	83,3 ^{D,ff,gg,hh}
	s	3,9	3,9	7,2	6,9	18,6
Myokard	x	69,7 ^{aa,B,C,D}	101,7 ^{aa}	106,7 ^B	121,5 ^C	130,1 ^D
	s	12,9	16,7	17,1	24,4	30,4
Slezina	x	84,2 ^{A,B,C,D}	142,0 ^{A,e,f}	160,6 ^B	173,3 ^{C,e}	175,5 ^{D,f}
	s	18,2	24,4	23,0	22,2	25,9

Stejná písmena v řádku označují statisticky významný rozdíl mezi skupinami

(A $p \leq 0.0001$; aa $p \leq 0.01$, a $p \leq 0.05$)

x –průměr, s – směrodatná odchylka

Diskuse

Suplementace organických forem Se ve srovnání s anorganickou formou se odrazila ve vyšší koncentraci Se ve většině vyšetřovaných orgánů a tkání. Organické formy Se se nejen ve zvýšené formě vstřebávají, ale rovněž dochází k jejich sníženému vylučování z organismu díky jejich ukládání ve formě Se-met. (Juniper et al. 2009). Je zřejmé, že nejvyšší schopnost koncentrovat se ve tkáních má Se podávaný ve formě kvasinek. Příčinou je pravděpodobně především odlišný obsah Se-methionu a v jednotlivých preparátech (Alzate et al. 2008, Calomme et al. 1995). Koncentrace Se v krvi novorozenech mláďat představuje asi 60 % koncentrace Se v krvi matek (Mišurová et al. 2009) a dále je důležitá výživa v prvních týdnech života, kdy významnou roli hraje především mléko. Bylo zjištěno, že koncentrace Se v mléce je významně ovlivněna formou podávaného selenu a především preparáty obsahující Se-met výrazně zvyšují koncentraci Se v mléce (Juniper et al. 2006, Pechová et al. 2008). Domníváme se, že právě zvýšený obsah selenu v mléce koz skupiny Se-Y se významně projevil na koncentraci Se ve tkáních kůžlat.

Poděkování

Práce byla realizována za podpory projektů MSM č.6215712402 a č.6215712403.

Literatura

- ALZATE, A., FERNANDES-FERNANDES, A., PEREZ-CONDE, M.C., GUTIERREZ, A.M., CAMARA, C. Comparison of biotransformation of inorganic selenium by *Lactobacillus* and *Saccharomyces* in lactic fermentation process of yogurt and kefir. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, vol.56, no. 18, p. 8728-8736.
- CALOMME, M.R., VANDERBRANDEN, K., BERGHE, D.A.V. Selenium and *Lactobacillus* species. *Journal of Applied Bacteriology*, 1995, vol.79, no. 3, p. 331-340.
- GIVENS, D. I., ALLISON, A., COTTRILL, B., BLAKE, J. S. Enhancing the selenium content of bovine milk through alteration of the form and concentration of selenium in the diet of the dairy cow. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2004, vol. 84, no.1, p. 811 – 817.
- JUNIPER D. T., PHIPPS, R. H., JONES, A. K., BERTIN, G. Selenium supplementation of lactating dairy cows: Effect on selenium concentration in blood, milk, urine, and feces. *Journal of Dairy Science*, 2006, vol. 89, no. 9, p. 3544-3551.
- JUNIPER, D. T., PHIPPS, R. H., RAMOS-MORALES, E., BERTIN, G. Effects of dietary supplementation with selenium enriched yeast or sodium selenite on selenium tissue distribution and meat quality in lambs. *Animal Feed Science and Technology*, 2009, vol. 149, no. 3-4, p. 228-239.
- MISUROVA, L., PAVLATA, L., PECHOVA, A., DVORAK, R. Selenium metabolism in goats - maternal transfer of selenium to newborn kids. *Veterinární medicína*, 2009, vol.54, no. 3, p. 125-130.
- PECHOVA, A., MISUROVA, L., PAVLATA, L., DVORAK, R. Monitoring of changes in selenium concentration in goat milk during short-term supplementation of various forms of selenium. *Biological Trace Element Research*, 2008, vol. 121, no. 2, p.180-191.

Kontaktní adresa

MVDr. Lucia Ševčíková, Klinika chorob přežvýkavců, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, sevcikoval@vfu.cz

Vliv suplementace různých forem Mn na jeho koncentrace v krvi koz

The influence of supplementation of different forms of Mn on its concentration in blood of goats

Zvonareva Elizaveta, Pechová Alena, Mišurová Ľubica, Hauptmanová Kateřina, Pavlata Leoš, Dvořák Rudolf, Müller Jakub, Dvořák Zbyněk

Abstract

The goal of the experiment was to monitor the changes in the manganese concentration in goat blood and plasma during 4 month oral supplementation of three different forms of Mn. The experiment involved 34 goats divided into 4 groups. The first group (A; n=10) served as a control group, the second group (B; n=8) received inorganic manganese ($MnSO_4$), the other groups received Mn in organic forms – group C (n=8) Bioplex Mn, group D (n=8) B-Traxim 2C Mn. The supplementation of Mn was performed by feed mixture which was fed to goats before parturition in doses 0.5 kg/day and after parturition 1 kg/day. The concentration of Mn in the mixture was 20 mg/kg for control and 160 mg/kg for experimental groups. Blood was taken at the start of the experiment and after 14, 30, 60 and 90 days. The concentration of Mn during experiment was similar in all groups. Only on the day 14 and 30 was found significantly higher Mn concentration in the plasma of group B. The average Mn concentration in blood was between 10.29-12.48 $\mu g/l$ and in plasma 4.09 - 6.99 $\mu g/l$ in all groups. Based on our results, supplementation of organic and inorganic Mn did not influence the concentration of Mn in whole blood.

Key words: *manganese, Mn proteinate, Mn chelate, $MnSO_4$*

Suplementace stopových prvků v krmivu přežvýkavců zajišťuje prevenci minerálních karencí. Mangan (Mn) je jedním z mikroprvků, o jehož metabolismu a možnostech diagnostiky karencí je i v současné době poměrně málo vědeckých publikací. V organismu přežvýkavců je Mn po absorpci v krvi ve vazbě na plazmatický β -globulin transportován do jater (Hansen a kol., 2006; Chistjakov, 2007). Koncentrace Mn v krvi je často sledována jako ukazatel úrovně zásobení organismu Mn, ale názory autorů na vypovídací hodnotu tohoto stanovení nejsou jednotné (Gelfert a Stufenbiel, 2000).

Cílem této práce bylo sledování a srovnání koncentrace Mn v krvi u koz během 4 měsíců podávání krmiva suplementovaného různými formami manganu.

Materiál a metodika

Experiment byl realizován na Klinice chorob přežvýkavců VFU Brno v roce 2009 - 2010. Do pokusu bylo zařazeno 34 březích krátkosrstých bílých koz, které byly rozděleny do 4 skupin a jednotlivé skupiny byly samostatně ustájeny. Všechny kozy byly krmeny shodnou krmnou dávkou, která sestávala z doplňkové směsi (0,5 kg na kus a den v období před porodem a 1 kg na kus a den v poporodním období), dále měly ad libitní přístup k senu a k vodě. Průměrný příjem sena se pohyboval kolem 2,5 kg na kus a den. Kontrolní skupina A (n = 10) dostávala doplňkovou směs bez přídavku Mn (přirozený obsah Mn byl 20 mg/kg). Kozy pokusných skupin dostávaly doplňkovou směs, která byla obohacena Mn v různých formách, koncentrace Mn byla u všech pokusných skupin 160 mg/kg. Skupina B (n = 8) dostávala krmnou směs obohacenou anorganickým Mn ve formě $MnSO_4$, v dalších pokusných skupinách byly použity

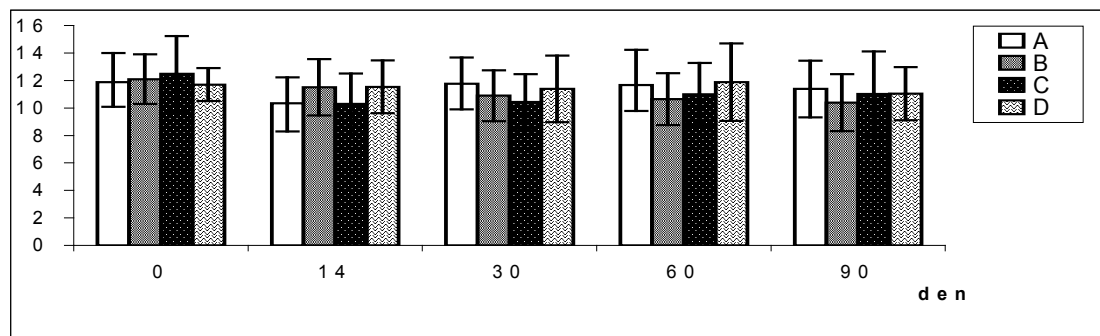
organické formy Mn – skupina C (n = 8) Bioplex Mn (15 % Mn proteinát) firmy Alltech, skupina D (n = 8) B-Traxim 2C Mn (21 % Mn chelát glycinu) firmy Pancosma.

Odběr krve byl proveden před zahájením pokusu a dále po 14, 30, 60 a 90 dnech od zahájení suplementace Mn. Krev byla odebírána z *v. jugularis* do zkumavky určené pro stopovou analýzu s přidavkem heparinu. Po odběru byla část krve odstředěna pro získání krevní plazmy a vzorky byly zamrazeny do laboratorního zpracování. Analýzy vzorků se prováděly v biochemické laboratoři Kliniky chorob přežvýkavců. Koncentrace Mn v krvi byla stanovena po mikrovlnné mineralizaci v uzavřeném systému s přidavkem peroxidu vodíku a kyseliny dusičné (2 ml krve/plazmy +1 ml H₂O₂ + 2 ml HNO₃) na přístroji MLS-1200 (Milestone, Itálie). Vlastní stanovení Mn bylo provedeno elektrotermickou atomovou absorpční spektrofotometrií na přístroji Solaar 939 (Unicam, Velká Británie).

Výsledky byly statisticky zpracovány za použití F-testu pro zhodnocení variability jednotlivých souborů a na základě jeho výsledku byl použit Studentův t-test pro soubory se shodnými/různými rozptyly. Výsledky jsou uvedeny jako průměry se směrodatnými odchylkami. Statistické zpracování bylo provedeno v programu Excel (Microsoft Windows 97).

Výsledky a diskuse

Analýza koncentrace Mn v plné krvi ukázala, že v průběhu suplementace Mn nedošlo k významným změnám koncentrace Mn v krvi. Průměrná koncentrace Mn v krvi koz pokusných skupin se pohybovala ve stejném rozmezí jako koncentrace Mn v krvi koz kontrolní skupiny, tj. 10,29-12,48 µg/l. Podobné koncentrace Mn zjistili v krvi dojníc Pechová a kol. (2008) (14,0 ± 3,2 µg/l) a Gehrke a Lachowski (1997) (5,10 až 12,35 µg/l). Nicméně naše získané údaje jsou výrazně nižší než 20-70 µg/l, než uvádí Underwood a Suttle (1999). Zjištěné výsledky koncentrace Mn v krvi ukazuje graf 1.

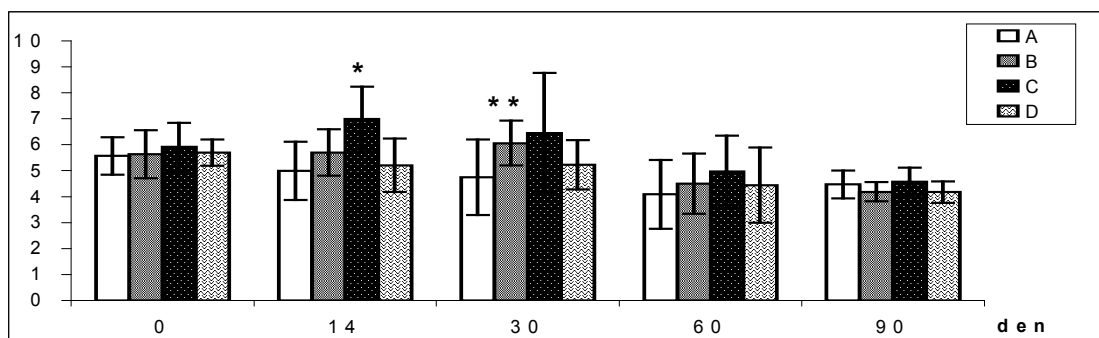


Graf 1. Koncentrace Mn (µg/l) v plné krvi u jednotlivých skupin koz (A, n = 10 kontrola; B, n = 8, MnSO₄; C, n = 8, Bioplex Mn; D, n = 8, Traxim 2C Mn) v průběhu experimentu.

Koncentrace Mn v krevní plazmě byla nižší než koncentrace v plné krvi. Průměrné hodnoty se u jednotlivých skupin pohybovaly v rozmezí 4,09 - 6,99 µg/l. Koncentraci Mn v plazmě u dojníc sledovali rovněž Gehrke a Lachowski (1997), kteří zjistili mírně nižší hodnoty 1,55 do 4,85 µg/l Mn. Obdobně Gelfert a Stufenbiel (2000) v chovech dojníc naměřili v krevním séru koncentrace Mn kolem 6 µg/l. Ve starších pracích byly naopak publikovány hodnoty vyšší. Sviatko a Hiscáková (1993) uvádí koncentrace Mn v krevním séru dojníc 42 µg/l a Illek (1979) zjistil průměrné koncentrace Mn v krevní

plazmě u dojnic $64,3 \mu\text{g/l} \pm 50,7 \mu\text{g/l}$. V této práci rovněž zjistil signifikantní vztahy mezi obsahem Mn v krevní plazmě a v krmné dávce.

V průběhu pokusu bylo zjištěno přechodné zvýšení koncentrace Mn u skupiny C 14.den ve srovnání se všemi ostatními skupinami ($p < 0,05$). Trend vyšších hodnot byl i v dalších odběrech, ale vzhledem ke směrodatné odchylce již rozdíly nebyly signifikantní. Určitý nárůst koncentrace Mn byl zjištěn rovněž u skupiny B, ale signifikantní rozdíl byl pouze ve 30 dnech ve srovnání se skupinou A (Graf 2.).



Graf 2. Koncentrace Mn v krevní plazmě ($\mu\text{g/l}$) u jednotlivých skupin koz (A, n = 10 kontrola; B, n = 8, MnSO_4 ; C, n = 8, Bioplex Mn; D, n = 8, Traxim 2C Mn) v průběhu.

* Statisticky významně se liší skupina C od skupin A, B, D ($p < 0,05$)

** Statisticky významně se liší skupina A od skupiny B ($p < 0,05$)

Poděkování

Práce byla zpracována za podpory výzkumného záměru MSM15745703.

Literatura

- CHISTJAKOV, J.V. *Základy bioanorganické chemie*. Moskva: Kolos C, 2007, 463-464 s.
- GEHRKE, M., LACHOWSKI, A. Determination of manganese in cow blood using the flameless atomic absorption spectrophotometry. II. Population investigations into the variability of manganese concentrations in the serum and blood of cows in various production stage. *Bull Vet. Inst. Pulawy*, 1997, vol. 41, p. 115-119
- GELFERT, C.C., STAUFENBILE, R. Problems in diagnostic of manganese in dairy cows by herd supervision. *Tierarzt Prax Ausg Grob Nutz*, 2000, vol. 28, p. 69-73
- HANSEN S.L, SPEARS J.W, LLOYD K.E, WHISNANT C.S. Growth, reproductive performance, and manganese status of heifers fed varying concentrations of manganese. *J. Anim. Sci.*, 2006, vol. 84, p. 3375-3380
- ILLEK, J. *Diagnostika karenci manganu, mědi a zinku u dojnic. (Diagnostic deification of manganese, copper, zinc by dairy cows.)* Brno: VFU Brno, 1979, 182 s. Doktorská disertační práce. Školitel: prof. MVDr. P. Jagoš, Csc.
- PECHOVÁ, A., PAVLATA, L., DVOŽÁK, R., LOKAJOVÁ, E. Contents of Zn, Cu and Se in milk in relation to their concentrations in blood, milk yield and stage of lactation in dairy cattle. *Acta Veterinaria Brno*, 2008, vol. 77, p. 523-531.
- SVIATKO, P., HISÁKOVÁ, M. Manganese levels in biological materials from dairy cows. *Veterinary medicine Praha*, 1993, vol. 38, p. 539-546
- UNDERWOOD, E.J., SUTTLE N.F. *The mineral nutrition of Livestock*, 3rd ed. 3. vyd. Oxon: CABI Publishing, 1999, 614 s.

Kontaktní adresa: Elizaveta Zvonareva, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Klinika chorob přežvýkavců, Palackého 1/3, 612 45, lizett@email.cz