

**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 infekčních chorob a mikrobiologie

***XIII. konference mladých vědeckých  
pracovníků s mezinárodní účastí***

**SBORNÍK PŘÍSPĚVKŮ**



**VFU Brno 1. 6. 2011**

Editace: Prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D.  
Doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D.  
MVDr. Šárka Cupáková, Ph.D.

ISBN 978-80-7305-010-8

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají autoři.

# OBSAH

## SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

<b>Vliv výrobního sádla na průběh oxidačních změn u fermentovaných masných výrobků</b>	
Pavlík Z., Saláková A., Kameník J., Steinhauserová I., Steinhauser L. ....	13
<b>Stanovení obsahu sodíku u trvanlivých fermentovaných masných výrobků pořízených na trhu České republiky</b>	
Steinhauserová P., Řehůrková I., Ruprich J. ....	16
<b>Chemical and textural parameters of farmed fallow deer meat</b>	
Dominik P., Saláková A., Steinhauser L., Buchtová H. ....	19
<b>Přežívání tkáňových cyst <i>Toxoplasma gondii</i> v kozím mase a masných výrobcích z něho vyrobených</b>	
Neumayerová H., Juránková J., Gallas L., Saláková A., Koudela B. ....	22
<b>Využití magnetic capture a real-time PCR pro detekci a kvantifikaci <i>Toxoplasma gondii</i> ze vzorků tkání</b>	
Juránková J., Opsteegh M., Koudela B., Van Der Giessen J. ....	25
<b>Vplyv genotypov NN, Nn a nn na kvalitu bravčového mäsa</b>	
Supuka, P., Turek, P., Supuková A. ....	27
<b>Stanovení alergenních bílkovin v kozím mléce</b>	
Ruprichová L., Dračková M., Borkovcová I., Vorlová L. ....	30
<b>Hodnotenie vybraných fyzikálno-chemických znakov akosti mlieka z mliečnych automatov</b>	
Flimelová E., Bezeková J., Čanigová M. ....	33
<b>Vybrané mikrobiologické ukazovatele kvality mlieka z mliečnych automatov</b>	
Bezeková J., Flimelová E., Čanigová M. ....	36
<b>Aktivita vody u balených bezlepkových pekárenských výrobků</b>	
Vlášek V., Hanák M., Klepáčová A., Štencl J. ....	39
<b>Metody ověřování deklarovaných údajů na obalu medu</b>	
Vlkovič D., Vorlová L., Přidal A. ....	42
<b>Technologické vlastnosti vybraných laktobacilov majúcich antimikrobiálnu aktivitu</b>	
Smetanková J., Hladíková Z., Greif G., Greifová M. ....	45
<b>Ochranná funkcia metabolických produktov <i>Pediococcus</i> sp. voči vybraným nežiaducim mikroorganizmom</b>	
Hladíková Z., Smetanková J., Greif G., Greifová M. ....	48
<b>Tvorba biofilmu <i>Staphylococcus epidermidis</i> na nerezové oceli v mléce a vliv glukózy a chloridu sodného na vývoj biofilmu zprostředkovaného <i>ica</i></b>	
Červinková D., Michu E., Jaglič Z., Babák V. ....	51

## SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ

<b>Stanovení antokyanů v barevných pšenicích</b>	
Bartl P., Tremlová B., Ošťádalová M., Pokorná J., Tauferová A. ....	57
<b>Carotenoid Pigments in Tomatoes</b>	
Tauferová A., Tremlová B. ....	60
<b>Káva a její účinek na konzumenta</b>	
Pokorná J., Pažout V. ....	63
<b>Porovnání aminokyselinového složení u vybraných odrůd lupin</b>	
Rusníková L., Straková E., Suchý P. ....	66
<b>Analysis of plant oils used in poultry nutrition</b>	
Hudečková P., Straková E., Suchý P. ....	69
<b>Složení parohů Jelena evropského (<i>Cervus elaphus</i>) jako podklad optimalizace výživy z hlediska kvality trofejí</b>	
Jámbor M., Suchý P., Straková E. ....	72
<b>Změny chemického složení bažantích těl v průběhu jejich výkrmu</b>	
Karásková K., Jámbor M., Jůzl R., Suchý P., Straková E. ....	75
<b>Clinoptilolite effect on chicken efficiency and bone metabolisms</b>	
Macháček M., Straková E., Suchý P. ....	78
<b>Vliv suplementovaného smektitu na kolonizaci enterotoxigenní <i>E. coli</i>, hematologické ukazatele a užitkovost odstavených selat</b>	
Vondrušková H., Trčková M., Slámová R., Zralý Z., Alexa P. ....	81
<b>Vliv lykopenu a vitamínu E na růst, kvalitu a oxidativní stabilitu stehenního svalstva brojlerových kuřat</b>	
Bubancová I., Straková E. ....	84
<b>Vliv podávání lupiny (<i>Lupinus spp.</i>) na užitkovost brojlerových kuřat</b>	
Vopálenský J., Suchý P., Straková E. ....	87
<b>Changes in inorganic substances in broiler chickens in relation to age and sex</b>	
Navrátil P., Straková E., Suchý P. ....	90

## SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE

<b>Colonization of wild waterbirds by cephalosporin and fluoroquinolone resistant <i>Escherichia coli</i> strains</b>	
Janoszowska D., Dolejská M., Čížek A., Hanušová L., Hrušáková J., Svoboda O., Literák I. ....	97
<b>Usage of manganese-dependent superoxide dismutase gene <i>sodA</i> for rapid species identification of enterococci</b>	
Frolkova P., Svec P., Zurek L., Literak I. ....	100
<b>Šíří se klíšťata pozitivní na <i>Babesia canis canis</i> územím Slovenska?</b>	
Kubelová M., Tkadlec E., Bednář M., Roubalová E., Široký P. ....	103

<b>Stanovení inhibičních účinků platinových kovů na růst vybraných druhů rostlin</b>	
Mikulášková H., Kryštofová O., Kizek R., Beklová M. ....	106
<b>Izolace PAH z biotické tkáně</b>	
Štilárková E., Vávrová M., Stoupalová M., Večerek V. ....	109
<b>Study of the impact of selected platinum group metals on producers in aquatic ecosystems</b>	
Soukupova I., Strakova L., Beklova M., Kizek R. ....	112
<b>Stanovení methylrtuti v biotických a abiotických složkách životního prostředí</b>	
Králová Z., Vávrová M., Večerek V. ....	115
<b>Optimalizace metody SPE/HPLC pro stanovení vybraných léčiv</b>	
Járová K., Vávrová M., Stoupalová M., Večerek V. ....	118
<b>SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA</b>	
<b>Accumulation of Arsenic during Growing Period of Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i> L.)</b>	
Harkabusová V., Čelechovská O., Macharáčková B., Lavičková A. ....	123
<b>Štúdium vhodnosti použitia druhovo špecifických primerových párov ECUTSf/ecfITSr a EHITSf/ecfITSr na určenie genotypov u druhov <i>Encephalitozoon</i> spp.</b>	
Malčeková B., Valenčáková A., Luptáková L., Ravaszová P., Halánová M. ....	127
<b>Determination of Acrylamide in Food and Feed by Adsorption Voltammetry</b>	
Talašová H., Šucman E. ....	130
<b>Vplyv zát'áže na vnútorné prostredie poštových holubov</b>	
Zigo F., Vasiľ M., Chripková M. ....	133
<b>Působení ionizujícího záření na <i>Artemia franciscana</i></b>	
Žďárský M., Dvořák P., Beňová K., Renčko A., Špalek M. ....	136
<b>SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT</b>	
<b>Útulky a karanténne stanice pre opustené a túlavé zvieratá na území Slovenskej republiky s ohľadom na súčasnú právnu úpravu Slovenskej republiky</b>	
Kovács K., Takáčová J., Bartoš B., Špalek M. ....	141
<b>SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN</b>	
<b>Akutní toxicita vybraných léčiv pro akvarijní ryby <i>Danio rerio</i></b>	
Prášková E., Voslářová E., Mácová S., Plhalová L., Pištěková V., Svobodová Z. ..	147
<b>Effects of subchronic exposure of atrazine and simazine on <i>Danio rerio</i></b>	
Plhalová L., Haluzová I., Mácová S., Doleželová P., Prášková E., Maršálek P., Škorič M., Svobodová Z., Pištěková V., Bedáňová I. ....	150

<b>Kombinované účinky gama žiarenia a kadmia u <i>Poecilia reliculata</i></b>	
Renčko A., Žďárský M., Špalek M. ....	153
<b>Do cyanotoxins and lead influence avian reproduction?</b>	
Damkova V., Sedlackova J., Bandouchova H., Peckova L., Vitula F., Hilscherova K., Paskova V., Kral J., Osickova J., Ondracek K., Pohanka M., Pikula J. ....	156
<b>Vplyv nízkych dávok ionizujúceho žiarenia a lipkavca na sacharidový a lipidový metabolizmus u kura domáceho</b>	
Špalek M., Štofániková J., Renčko A., Kovács K. ....	159
<b>SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD</b>	
<b>Geomykóza netopierov v opustených baniach v okolí Dubníka (Východné Slovensko)</b>	
Korytár L., Ondrejka R., Ondřejková A., Beníšek Z., Prokeš M., Slepecká E., Pjenčák P. ....	165
<b><i>Cryptosporidium suis</i> and <i>Cryptosporidium</i> pig genotype II in Eurasian wild boars (<i>Sus scrofa</i>) in the Czech Republic</b>	
Němejc K., Sak B., Květoňová D., Hanzal V., Kváč M. ....	168
<b>Diagnostika kryptosporidiózy u voľne žijúcich zvierat pomocou ELISA metódy</b>	
Ravaszová P., Goldová M., Halánová M., Valenčáková A., Malčėková B. ....	171
<b><i>Mycoplasma gallisepticum</i> infection in the grey partridge <i>Perdix perdix</i></b>	
Peckova L., Vitula F., Bandouchova H., Pohanka M., Novotny L., Jira D., Kral J., Ondracek K., Osickova J., Zendulková D., Rosenbergova K., Tremel F., Pikula J. .	174
<b>Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from the Passeriformes from Costa Rica</b>	
Kounek F., Sychra O., Capek M., Lipkova A., Literak I. ....	178
<b>Identifikace a kvantifikace proteinů střevního nálevníka lidoopů <i>Troglodytella abrassarti</i></b>	
Profousová I., Koppová I., Modrý D., Šimůnek J. ....	181
<b>Sdílime tasemnice s našimi nejbližšími příbuznými? Molekulární a morfológická studie anoplocephalidních tasemnic z primátů</b>	
Petrášová J., Vallo P., Petrželková K. J., Foitová I., Koubková B., Mašová Š., Jirků M., Scholz T., Modrý D. ....	184
<b>Komplexní diagnostika NGD, význam virové etiologie</b>	
Vondráčková M., Tukač V. ....	187
<b>SEKCE 8: MORFOLOGIE A FYZIOLOGIE</b>	
<b>Infiltrace podkožní tukové tkáně makrofágy ve vztahu k lipomobilizaci u dojníc v okolo porodním období</b>	
Pěnkava O., Šlosárková S. ....	193

<b>Fyziologické funkce c-Myb v proliferaci, diferenciaci a apoptóze během odontogeneze</b>	
Lungová V., Buchtová M., Doubek J., Šmarda J., Matalová E. ....	196
<b>Myší třetí molár jako vývojový model fyziologických interakcí mineralizovaných tkání</b>	
Chlastáková I., Tucker S. A., Radlanski J. R., Doubek J., Míšek I., Matalová E. ....	199
 <b>SEKCE 9: PATOBIOLOGIE</b>	
<b>Studie "patogenního" nálevníka <i>Balantidium coli</i> u lidoopů s důrazem na jeho hostitelskou specifitu</b>	
Pomajbíková K., Petřelková K. J., Petrášová J., Růžicová M., Profousová I., Oborník M., Modrý D. ....	205
<b>Vliv perorální dotace různých forem zinku na sliznici bacheru kůzlat - morfometrická studie</b>	
Černík J., Pechová A., Pavlata L., Halouzka R., Jokverová O., Mišurová L., Luňáček J. ....	208
<b>Výskyt původců virových gastroenteritid (rody <i>Norovirus</i>, <i>Sapovirus</i>, <i>Kobuvirus</i>) v chovech prasat v České republice</b>	
Dufková L., Kulich P., Prodělalová J. ....	211
<b>Stanovení specifických protilátek proti viru bluetongue u volně žijících přežvýkavců v České republice (2010-2011)</b>	
Šperlová A., Zendulková D. ....	214
<b>Klíšťová encefalitida: využití nested qRT-PCR založené na detekci sekvence genu pro NS5 při diagnostice onemocnění u psů a při vyšetřování vzorků klíšťat</b>	
Hekrllová A., Rosenbergová K., Lány P., Kubíček O. ....	217
<b>Parazité gastrointestinálního traktu u psů v severní Keni</b>	
Hlaváč J., Albrechtová K., Sloboda M., Mihalca A., Modrý D. ....	220
<b>Prevalence of equine piroplasmids in a population of Jordanian Equids: a molecular study</b>	
Qablan M., Sloboda M., Modrý D. ....	223
<b>Úroveň viremie u perzistentní anellovirové infekce prasat</b>	
Jarošová V., Celer V. ....	226
<b>Expres rekombinantního glykoproteinu D herpesviru psů 1 v bakteriálních buňkách</b>	
Vaňková M., Celer V., Molinková D. ....	229
<b>Postradiačné zmeny v kostnej dreni kurčiat</b>	
Štofániková J., Špalek M. ....	232

## SEKCE 10: CHOROBY MALÝCH ZVÍŘAT

<b>Matematické modelování zatížení titanové LCP ploténky po selhání implantátu u miniaturního prasete</b>	
Urbanová L., Crha M., Stehlík L., Nečas A., Proks P., Srnec R., Snášil R., Fedorová P., Tuček P. ....	237
<b>Vztah mezi rupturou předního zkříženého vazy a borreliózou u psů</b>	
Blažek-Fialová I., Dvořák M. ....	240
<b>Porovnání účinku hydroxyethylškrobu 200/0.5 (HAES®) v 6% nebo 10% koncentraci, 130/0.4 (Voluven®) a fyziologického roztoku na stabilizaci krevního tlaku u králíků v celkové anestézii při artrotomii kolenních kloubů</b>	
Fialová L., Lexmaulová L., Raušer P., Srnec R., Dvořák M., Nečas A. ....	243
<b>Oxidační stres u fen s tumory mléčné žlázy</b>	
Stavinohová R., Lorenzová J., Crha M., Mrázová M., Pfeifr J. ....	247
<b>Acidobazický profil psů se syndromem dilatace a volvulu žaludku</b>	
Uhríková I., Lexmaulová L., Řeháková K. ....	250
<b>Měření tloušťky kloubní chrupavky v kolenním kloubu miniaturních prasat pomocí CT artrografie a MR zobrazení</b>	
Stehlík L., Proks P., Urbanová L., Srnec R., Krupa P., Nečas A. ....	253
<b>Orální neoplasie psů: Vybraní pacienti Veterinární a farmaceutické univerzity Brno</b>	
Janalík P., Fichtel T. ....	256
<b>Rentgenologické hodnocení selhání implantátů 4,5 LCP vs. 4,5 LCP v kombinaci plate/rod použitých k flexibilní piliřové osteosyntéze u miniaturních prasat</b>	
Stehlík L., Proks P., Crha M., Urbanová L., Srnec R., Raušer P., Nečas A. ....	259
<b>Indukce říje u fen pomocí GnRH agonisty deslorelinu</b>	
Jenčová M., Poláčková H. ....	262
<b>Reverzibilní suprese pohlavní aktivity kocourů</b>	
Novotný R., Vitásek R. ....	265
<b>Diagnostika anaplazmózy pomocí PCR a stanovení specifických protilátek</b>	
Konvalinová J., Svobodová V. ....	268
<b>Meranie množstva kortizolu v srsti a slinách psův a možnosť využitia pri diagnostike a kontrole terapie u hyperadrenokorticismu</b>	
Stegmann M., Svoboda M. ....	271
<b>Stanovení hladiny EGF (<i>epithelial growth factor</i>) v moči koček s FIC (<i>feline idiopathic cystitis</i>)</b>	
Honzák D., Kovaříková S., Hronová N. ....	274
<b>Borelióza psů v České republice</b>	
Schánilec P., Kybicová K., Agudelo F. C., Žáková A., Tremel F. ....	277



---

**SEKCE 11: CHOROBY VELKÝCH ZVÍŘAT**

<b>Monitoring zhubnej katarálnej horúčky na farme oviec počas roku 2010</b> Lacková Z., Bíreš J., Kočišová A., Lešková L. ....	283
<b>Vývoj účinného protokolu vitrifikace oocytů skotu</b> Lálová H. ....	286
<b>The prevention of digestive disorders in domestic rabbit with probiotic cultures of <i>Lactobacillus</i> and <i>Enterococcus</i></b> Supuka P., Supuková A. ....	289
<b>Vliv indukované akutní metabolické acidózy na parametry acidobazické rovnováhy v krvi a folikulární tekutině u skotu</b> Indrová E., Čech S., Pechová A., Doležel R., Lopatářová M., Malá J. ....	292
<b>Polymorfizmus génu DGAT-1 v chove dojníc a jeho vplyv na vybrané metabolické parametre v krvnom sére po otelení</b> Lešková L., Bauer M., Chrenek P., Lacková Z., Kováč. ....	295



# **SEKCE 1**

*Hygiena a technologie potravin*



## Vliv výrobního sádla na průběh oxidačních změn u fermentovaných masných výrobků

### Effect of production fat on oxidative changes of fermented meat products

Pavlík Zdeněk, Saláková Alena, Kameník Josef, Steinhauserová Iva, Steinhauser Ladislav

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

#### Summary

*The aim of this study was to evaluate how the use of different pork fat can affect oxidative changes of dry fermented sausages. Three sets of samples were made, with addition of different sort of pork fat – back fat, fat from necks and cover fat from legs. Colour and oxidative changes (TBA scores) were analyzed during ripening of dry fermented sausages. There were differences between samples in dependence of used sort of fat.*

**Keywords:** *dry fermented sausage; oxidative stability; pork fat*

#### Úvod

Kvalitě vepřového sádla pro výrobu trvanlivých masných výrobků je třeba věnovat velkou pozornost. Údržnost fermentovaných výrobků je totiž z větší části určována změnami tuku (Soyer and Ertas, 2006). Oxidační procesy v masných výrobcích během skladování nebo tepelné úpravě vedou k odbourávání barevných pigmentů, lipidů a bílkovin což může zapříčinit zhoršení chuti, textury, barvy a nutriční hodnoty masných výrobků (Haak et al., 2009). Vytvářejí se sloučeniny, které již v nízkých koncentracích ovlivňují negativně chuť výrobků (nažluklá, rybinová, kovová příchut'). Odbourávání tuků autooxidací nastupuje zejména při dlouhodobém mrazírenském skladování masa a masných výrobků (Kameník, 2007).

Sádlo má být jadrné, je nežádoucí zpracovávat měkký nebo dokonce olejnatý tuk. V takovém případě obsahuje sádlo větší množství nenasycených mastných kyselin, které jsou citlivé k oxidaci a dochází pak k předčasnému žluknutí. Sádlo s minimálním obsahem polyenových mastných kyselin má nejlepší vlastnosti ve vztahu k chuti a trvanlivosti fermentovaných salámů (Zanardi et al., 2001). Sádlo pro trvanlivé tepelně neopracované salámy má být také co nejčerstvější. Starší sádlo sice nemusí mít žádné smyslové změny, ale v salámech jsou pak tyto odchylky chuťově velmi brzy zjistitelné a zkracují pak trvanlivost hotového výrobku.

Pro výrobu trvanlivých fermentovaných salámů se většinou používá sádlo hřbetní, které je považováno za nejjakostnější. Cílem pokusu bylo zjistit, jakým způsobem ovlivní oxidační procesy, a tím i trvanlivost těchto produktů, použití různých druhů výrobního sádla.

#### Materiál a metody

Pro účel pokusu byly vyrobeny tři sady vzorků fermentovaných salámů s přidavkem různých druhů vepřového sádla – sádlo krční, hřbetní a deklóvé sádlo z kýty. Salám typu Herkules byl vyroben podle podnikové receptury. Ze všech sad byly postupně odebrány

vzorky z díla salámu a v průběhu jeho zrání. Byly provedeny analýzy parametrů, dle kterých lze sledovat průběh oxidačních změn.

**Stanovení obsahu tuku** – stanovení na přístroji SOXTEC, pro extrakci byl použit diethyleter.

**Stanovení thiobarbiturového čísla (TBA)** – Obsah malondialdehydu byl stanoven reakcí s kyselinou 2-thiobarbiturovou, destilační metodou.

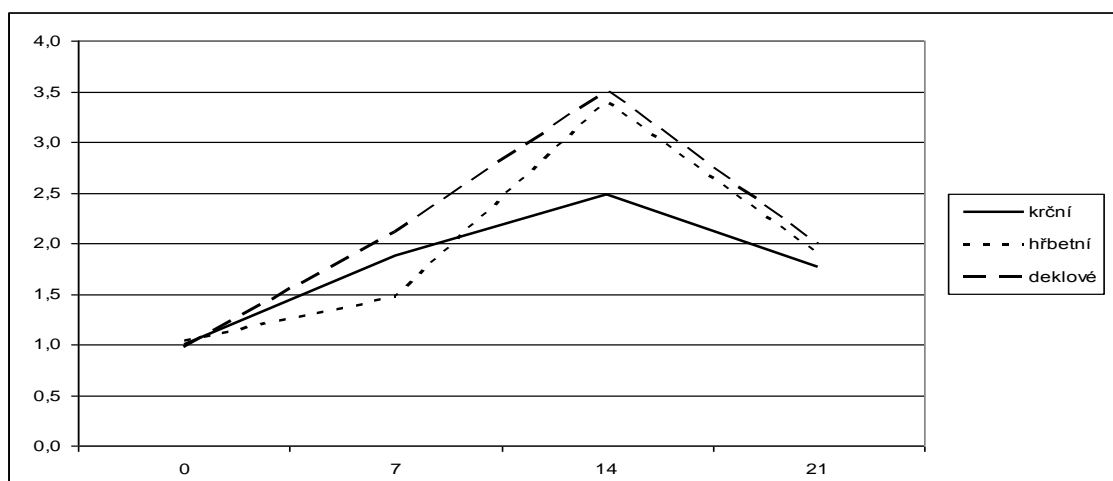
**Stanovení barvy** – na přístroji spektrofotometr KONICA MINOLTA CM-2600d.

### Výsledky a diskuze

Z tabulky 1 je patrné, jak se v průběhu zrání salámu měnil procentuální podíl obsahu tuku a obsah produktu jeho oxidace. Jsou zde uvedeny průměrné hodnoty pro všechny sady vzorků. Číslo v označení vzorku znamená den odběru vzorku (dobu zrání), dále je označen druh výrobního sádla – K – krční sádlo, H – hřbetní sádlo, D – deklové sádlo z kýt. Podíl tuku se v průběhu zrání rovnoměrně zvyšuje. To je dáno rostoucím podílem sušiny. Obsah malondialdehydu, tedy produktu jeho oxidace, se zvyšuje do 14. dne zrání. Poslední den měření jsou jeho hodnoty nižší – dochází k jeho odbourávání na další produkty. Průběh oxidačních změn je zaznamenán v grafu 1.

Tabulka 1: Hodnoty obsahu tuku a produktu jeho oxidace v průběhu zrání salámu

vzorek	tuk [%]	TBA [mg/kg]
0 K	29,653 ± 1,140	1,004 ± 0,123
0 H	30,150 ± 0,636	1,033 ± 0,151
0 D	28,092 ± 1,200	0,978 ± 0,099
7 K	36,572 ± 1,378	1,872 ± 0,256
7 H	34,908 ± 1,692	1,463 ± 0,363
7 D	33,271 ± 0,929	2,113 ± 0,263
14 K	38,121 ± 1,807	2,476 ± 0,216
14 H	39,598 ± 1,952	3,395 ± 0,657
14 D	36,800 ± 1,899	3,511 ± 0,631
21 K	40,471 ± 1,440	1,765 ± 0,234
21 H	41,191 ± 1,590	1,890 ± 0,086
21 D	39,416 ± 1,407	1,987 ± 0,143



Graf 1: Průběh oxidačních změn tuku v průběhu zrání salámu

Barva masných výrobků je důležitým parametrem, podle kterého lze mimo jiné posuzovat stupeň oxidace. Oxidační proces totiž postihuje v masných výrobcích nejen tuky, ale také hemová barviva. Měření barvy na nákroji salámu bylo prováděno na jeho středu i v okrajových částech. Určenými souřadnicemi v prostoru CIELAB byla světlost ( $L^*$ ), podíl červené barvy ( $a^*$ ) a podíl žluté barvy ( $b^*$ ). Výsledky stanovení barvy hotového výrobku (21. den zrání) jsou uvedeny v tabulce 2. Vzorky jsou označeny dle druhu výrobního sádla – K – krční sádlo, H – hřbetní sádlo, D – deklové sádlo z kýt. Z výsledků je zřejmé, že okraj nákroje je znatelně tmavší. Výjimkou jsou vzorky obsahující deklové sádlo, kde je tento rozdíl jen nepatrný. Podíl červené barvy je však na okraji a ve středu téměř stejný. Nelze tedy říct, že by oxidační procesy v průběhu zrání probíhaly ve větší míře v povrchových částech výrobku.

Tabulka 2: Hodnoty barevných parametrů na nákroji salámu (21. den zrání)

Vzorek	$L^*$	$a^*$	$b^*$
K - okraj	46,091 ± 4,513	14,389 ± 1,761	7,337 ± 1,293
K - střed	52,897 ± 3,432	13,928 ± 1,577	7,106 ± 0,910
H - okraj	45,817 ± 4,276	14,667 ± 1,558	7,438 ± 0,987
H - střed	51,441 ± 2,505	14,291 ± 1,191	8,011 ± 0,680
D - okraj	47,300 ± 3,150	14,483 ± 1,393	7,317 ± 1,050
D - střed	49,744 ± 3,321	15,840 ± 1,875	8,774 ± 1,456

### Závěr

V pokusu jsme sledovali vliv přídavku různých druhů vepřového sádla na průběh oxidačních změn trvanlivých fermentovaných salámů. Bylo zjištěno, že vzorky salámu s hřbetním sádlem mají oproti ostatním vzorkům vyšší podíl tuku, přičemž tento tuk nepodléhá autooxidaci tak snadno jako je tomu u sádla deklového. U toho byl zjištěn nejvyšší obsah produktu oxidace tuku, při nejnižším obsahu celkového tuku. Nejméně náchylný k oxidaci byl tuk u vzorků obsahující krční sádlo.

### Poděkování

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

### Literatura

- HAAK, L. Effect of plant phenolics, tocopherol and ascorbic acid on oxidative stability of pork patties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2009, vol. 89, p. 1360–1365.
- KAMENÍK, J. Technologie trvanlivých fermentovaných salámů z pohledu prevence vad finálních produktů. *Maso*, 2007, vol. 3, p. 10–16.
- SOYER, A.; ERTAS, A.H. Effects of fat level and storage time on lipid and color stability of naturally fermented turkish sausages (Sucuk). *Journal of Muscle Foods*, 2006, vol. 18, p. 330–340.
- ZANARDI, E. et al. Lipid and colour stability of Milano-type sausages: effect of packing conditions. *Meat Science*, 2001, vol. 61, p. 7–14.

**Kontaktní adresa:** Zdeněk Pavlík, Mgr., 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

## Stanovení obsahu sodíku u trvanlivých fermentovaných masných výrobků pořízených na trhu České Republiky

### The sodium content determination in dry fermented meat products purchased in the Czech Republic market

<sup>1</sup>Steinhausarová Pavla, <sup>2</sup>Řehůrková Irena, <sup>1,2</sup>Ruprich Jiří

<sup>1</sup>Veterinární a farmaceutická univerzita, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,  
Ústav hygieny a technologie mléka, Palackého 1, 612 42 Brno

<sup>2</sup>Státní zdravotní ústav Praha, Centrum zdraví, výživy a potravin, Palackého 3a, 612 42 Brno

#### Summary

*The aim of this work was to analyze and in terms of sodium (Na) content to compare selected dry fermented meat products (DFMP) made in the Czech Republic (CR) or abroad, purchased in the CR market. Totally 59 samples were analyzed at the National Institute of Public Health in Brno. All together 36 DFMP originated from 6 EU countries were produced abroad. 24 DFMP were made and purchased in the CR. Four traditional products (Lovecký salám, Poličan, Herkules and Paprikáš) were purchased from several major producers in the market and mutually compared. The accredited method of atomic emission spectrometry was used for the Na determination. The difference ranging between 3.4 and 5.1 g/kg of Na content was detected in 3 products from different producers when comparing 4 typical Czech DFMP. The lowest Na content in Czech products was measured in Lovecký salám (12.6 g/kg). While in the sausage Čorizo the highest (21 g/kg). Within the foreign origin products, the lowest amount was found in the product called Pancetta (9 g/kg), the highest in dried pork fat (29 g/kg). Due to the high exposure of the CR population to Na, its reduction in the diet is desired. The technological and sensory aspect must be considered in the production of DFMP. The consumer's information is important in terms of having the opportunity to influence their consumption.*

**Keywords:** sodium; dry fermented meat products; consumer's health

#### Úvod

Množství přijatého sodíku (Na) u populace západní Evropy dosahuje hodnot 3 - 5 g (tj. asi 8 - 11 g soli), což převyšuje dle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA) jeho potřebné množství až o 1,5 g Na/den [1]. Dle předběžných výsledků projektu EU 6.RP „EFCOVAL“ je dokonce množství přijatého Na u populace ČR vyšší, než v ostatních státech EU [2]. Až 75 % jeho přívodu tvoří v dietě člověka zpracované potraviny. Nadměrný přívod Na je jednou z hlavních příčin zvýšeného krevního tlaku, tedy rizikového faktoru vzniku závažných onemocnění jako je ischemická choroba srdeční, infarkt a renální onemocnění, které souvisí s poměrně vysokou morbiditou a mortalitou u evropské populace [1]. Masné výrobky jsou v očích veřejnosti, především v rozvinutých zemích, považovány za jeden z nejbohatších zdrojů tuku i Na, na druhé straně u většiny spotřebitelů tvoří součást jejich pestrého jídelníčku. Trvanlivé fermentované masné výrobky (TFMV) patří díky svým jedinečným senzoryckým vlastnostem a dlouholeté tradiční výrobě k oblíbeným výrobkům v ČR i v celé Evropě. Jsou typické především rozdílnou technologií výroby, která umožňuje charakteristické senzorycké vlastnosti a podmínky jejich skladování ve srovnání s ostatními skupinami masných výrobků [3]. Právě pro jejich jedinečnost a oblíbenost u spotřebitelů byly vybrány pro danou analýzu. Cílem této práce bylo analyzovat vybrané TFMV české i zahraniční produkce pořízené na trhu ČR z hlediska obsahu Na a vzájemně je porovnat



s ohledem na vliv na lidské zdraví. Dílčím cílem bylo sledovat značení výrobků jako důležitou informaci pro spotřebitele a dostupné hodnoty porovnat s výsledky měření.

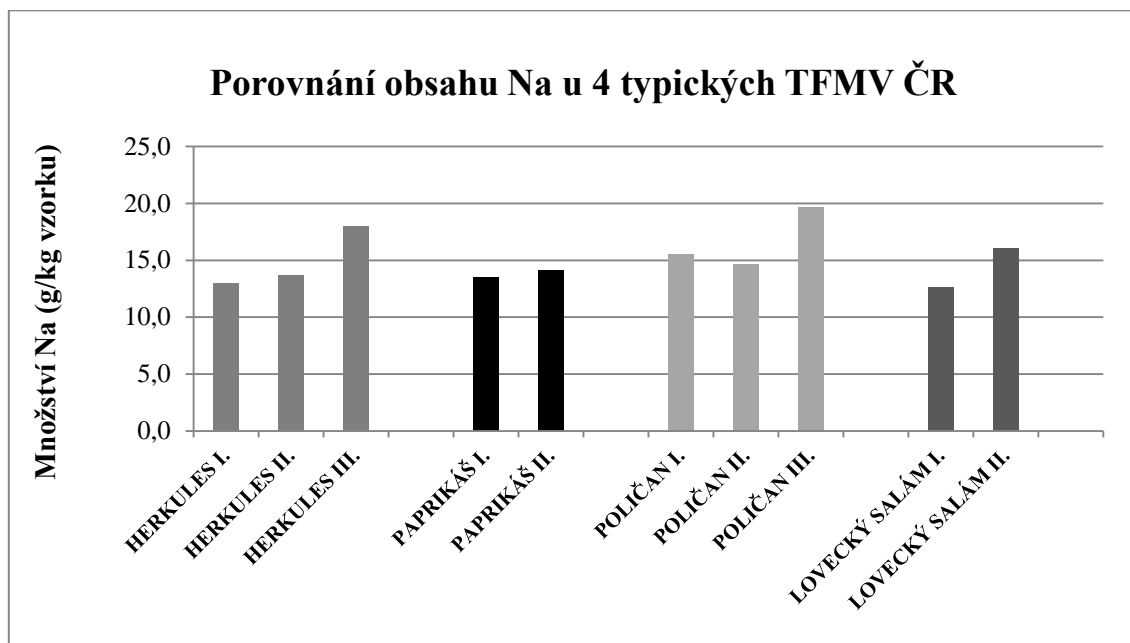
### **Materiál a metody**

V časovém rozmezí červenec – září roku 2010 bylo v tržní síti ČR a šesti hlavních obchodních řetězcích zakoupeno celkem 59 vzorků TFMV. Byly vyrobeny v zemích EU: Itálie (13), Španělsko (12), Německo (4), Maďarsko (3), Rakousko (2), Slovenská republika (1), Francie (1) a Česká republika (23). Čtyři české tradiční výrobky (Lovecký salám, Poličan, Herkules a Paprikáš) byly pořízeny od více hlavních producentů na trhu a naměřené hodnoty byly vzájemně porovnány, aby bylo možno posoudit rozdíly v technologii a poskytnout reálný obraz nabídky pro spotřebitele ČR. Vzorky byly zakoupeny v minimálním množství 150 g a bezprostředně předány do laboratoře Státního zdravotního ústavu Brno (SZÚ) akreditované dle ČSN-EN-ISO/IEC 17025. Do druhého dne byly vzorky uchovány při teplotě 0 - 4°C a následně homogenizovány pomocí homogenizátoru Grindomix (3000 otáček za minutu a 120 sekund). Vzorek byl poté přenesen do uzavřené a řádně označené plastové nádoby a do počátku analýzy obsahu Na skladován při teplotních podmínkách -18 °C. Stanovení obsahu Na bylo provedeno akreditovanou metodou „Stanovení prvků AES“. Vzorek byl nejprve rozložen v uzavřeném mikrovlnném systému (SOP CH\_4 „Rozklad vzorků pro anorganickou analýzu v mikrovlnném systému MLS-1200, ETHOS“). Jako analytická koncovka byla použita atomová emisní spektrometrie (SOP CH\_33 „Stanovení Na v potravinách metodou AES“). Vzorek byl po rozkladu a smísení s roztokem 0,2% KCl zmlžován do plamene acetylen-vzduch. Na přístroji AAS 3300 Perkin-Elmer byla měřena jeho emise při vlnové délce 589,6 nm. Celkem byla provedena 2 paralelní stanovení u jednoho vzorku. Naměřené hodnoty Na byly vyjádřeny jako průměrná hodnota v gramech na 1 kg analyzovaného vzorku s vypočítanou směrodatnou odchylkou.

### **Výsledky a diskuze**

Při porovnání 4 typických českých TFMV (graf č. 1) byl u 3 typů masných výrobků od různých producentů zjištěn vyšší rozdíl v hodnotách obsahu Na. Nejmenší rozdíl byl patrný u vzorků Paprikáš (0,6 g/kg), nejvyšší u salámu Herkules (5,1 g/kg). U vzorků salámu Poličan byl detekován rozdíl v množství Na u výrobků od jednotlivých producentů až 4,2 g/kg, u výrobků Lovecký salám 3,4 g/kg. S tímto výsledkem souvisí i velmi široké rozmezí množství Na naměřené u TFMV české produkce: Lovecký salám (12,6 g/kg) – salám Čorizo (21,0 g/kg). U výrobků zahraniční produkce bylo nejnižší množství Na stanoveno ve výrobku Pancetta (9,0 g/kg), nejvyšší v Sušeném špeku (29,0 g/kg). Toto široké rozmezí je zde zřetelně způsobeno rozdílnými typy výrobků ve stejné skupině masných výrobků. Lze předpokládat, že vzhledem k vyššímu vysušení výrobku Sušený špek je množství Na vyšší, než u výrobku Pancetta. Je však třeba zmínit skutečnost, že i u výrobků zahraniční produkce, stejného názvu, ale vyrobených u různých producentů, bylo množství Na detekováno v různých rozmezích (např. u výrobků Fuet bylo naměřeno množství 16,5 a 21,2 g/kg, u výrobků Salchichón 14,5 a 22,0 g/kg Na ve vzorku). Množství Na ve výrobku bylo uvedeno pouze na 15 % ze všech 59 analyzovaných masných výrobků. Žádná informace o obsahu Na, ani soli nebyla uvedena u celkem 14 % vzorků. Pouze dva z devíti analyzovaných masných výrobků s deklarovaným obsahem Na odpovídaly množství uvedenému na jejich obale. U ostatních výrobků (7) naměřené hodnoty převyšovaly tento deklarovaný obsah. U

jednoho z masných výrobků zahraniční produkce bylo toto množství dokonce dvakrát vyšší, než množství deklarované.



Graf 1: Porovnání obsahu Na ve 4 typech TFMV vyrobených v ČR

### Závěr

Vzhledem k vysoké expozici Na u populace ČR je žádoucí jeho snižování v dietě. Z výsledků je patrné, že lze masné výrobky produkovat i s nižším množstvím soli/Na. Toto rozhodnutí je však závislé na jednotlivých producentech a jejich snaze přispět částečnou reformulací svých receptur k možnému posunu ve výrobě zdravotně výhodnějších masných výrobků. Velmi důležitá je informovanost konzumentů, kteří pak mají možnost ovlivnit spotřebu jednotlivých masných výrobků. Z daných výsledků však vyplývá, že informace uvedené na obalech týkající se množství sodíku v jednotlivých výrobcích ne vždy odpovídají reálnému obsahu v daném produktu.

### Poděkování

Tato práce vznikla na Státním zdravotním ústavu v Brně, v rámci řešení projektu Interní grantové agentury VFU Brno, číslo projektu 69/2010/FVHE.

### Literatura

- [1] EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition, Allergies (NDA). Tolerable upper intake levels for vitamins and minerals. EFSA, February 2006, ISBN: 92-9199-014-0, dostupné na WWW: <<http://www.efsa.eu.int>>
- [2] European Food Consumption Validation [online], (EFCOVAL: FOOD-CT-2006-022895), dostupné na WWW: <<http://www.efcoval.eu>>
- [3] KAMENÍK, J. Trvanlivé masné výrobky. 2010. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 262 s.

**Kontaktní adresa:** Pavla Steinhauserová, MVDr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, [steinhauserova@chpr.szu.cz](mailto:steinhauserova@chpr.szu.cz).

## Chemical and textural parameters of farmed fallow deer meat Chemické a texturní parametry masa farmově chovaného daňka

Dominik Petr, Saláková Alena, Steinhauser Ladislav, Buchtová Hana

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

### Summary

*The aim of this study was to characterize selected chemical and textural parameters of meat from farmed fallow deer. Chemical parameters (content of dry matter, fat, pure protein and collagen) and textural parameters (hardness, cohesiveness) were measured in meat from loin (*Musculus longissimus dorsi*) and leg (*Musculus gluteus medius*). Samples came from farmed fallow deer (*Dama dama*) slaughtered in August 2010. We found differences between loin and leg in all chemical parameters, respectively content of dry matter ( $P<0.001$ ), content of intramuscular fat ( $P<0.01$ ), content of collagen ( $P<0.01$ ) and content of pure protein ( $P<0.05$ ). For textural parameters there were found no statistically significant differences, but meat from leg was more hardness.*

**Keywords:** *meat; chemical composition; texture*

### Introduction

A worldwide interest in deer farming produced, in the last decades, an exponential increase of the number of farmed deer. Anyway, wild ungulates farming have now a noticeable spreading in some areas, where traditional animal husbandry had been abandoned. Deer farming meets the growing interest which consumers show, for meat alternatives to the traditional types (Volpelli et al., 2002).

Venison has enjoyed a rise in popularity in recent years, owing to the meat's lower fat content. In many areas this increased demand has led to a rise in the number of deer farms. This meat is lower in calories, cholesterol and fat than common cuts of beef, pork or lamb. It can be eaten as steaks, roasts, sausages and ground meat. Possibly because of its low fat content, venison does not always score highly for organoleptic properties, perhaps because much of the carcass fat is structural (Dahlan and Hanoon, 2008).

Meat texture is one of the most important meat parameters for consumers (Denoye and Lebihan, 2003). It depends on a number of factors, e.g. muscle type, breed, age, sex, slaughter weight, type of feed, aging period, technological process including muscle fibre arrangement and collagen content. Meat toughness increases with increasing age of an animal (Hutchison et al., 2010). Meat tenderness is determined by its structure, condition and chemical composition. To make meat tender, it must be left to age sufficiently to allow rigor mortis to loosen up (Shiba et al., 2004).

The aim of the present study was to characterize selected chemical parameters (dry matter, fat, collagen, and pure protein) and textural characteristics (hardness, cohesiveness) of meat from farmed fallow deer.

### Material and method

Samples for the study were obtained from farmed fallow deer (*Dama dama*), bagged in the Hodonín Region (Czech Republic). Samples were from twelve carcasses (males fallow deer), slaughtered in August 2010. Farmed fallow deer had the same age:

1,5 years. Carcass weight (without skin and head) after evisceration was 25-32 kg. Samples were from two parts of body: loin (*M. longissimus dorsi*) and leg (*M. gluteus medius*).

Samples weighing about 150 g were homogenized for chemical analysis. The following parameters were subsequently determined: amounts of dry matter (International Standard, 1997) and fat analysed on the Soxtec (FOSS Tecator AB, Sweden) with diethylether as the extraction agent (Application Sub Note 3127, 2001). The pure protein content was determined by the Kjeldahl method as an amount of organically bound nitrogen (recalculating coefficient  $f_1 = 6.25$ ) after precipitation with hot tannine solution using a Kjeltex 2300 (FOSS Analytical AB, Sweden) semiautomatic analyzer following the method recommended by the producer (Application Note 300, 2003). The content of collagen was computed from the content of hydroxyproline amino acid (recalculating coefficient  $f_2 = 8$ ). Hydroxyproline was determined quantitatively by photometric measurement of absorbance at 550 nm on a GENESYS<sup>TM</sup>6 spectrophotometer (Thermo Electron Corporation, USA).

Meat was heat treated in plastic bags separately in a water bath at 72 °C, the core temperature of samples was kept at 70 °C for 60 min. Samples were cooled at room temperature and stored overnight at  $4 \pm 2$  °C (Coró et al., 2003). Cooked samples were tested by Texture Profile Analysis (TPA) using the Instron Universal Testing Machine, model 5544 (Instron Corporation, England). For TPA, cylinder samples (1 cm high, 1.25 cm in diameter) were compressed twice to 50% of their original height with a compression platen of 36 mm in diameter. Force time curves were recorded at a crosshead speed of 50mm/min. Hardness (N) defined as the peak force required for the first compression, and cohesiveness defined as the ratio of the positive force area during the second compression to that in the first compression were evaluated (Szczesniak, 2002).

Statistical data analyses were conducted using the *STATISTICA 7 CZ* statistical program (StatSoft, Czech Republic). The significance of differences between samples was determined by the Student's t-test. The 0.05, 0.01 and 0.001 levels of significance were used.

### **Results and discussion**

Table 1 shows values of selected chemical and textural parameters of the loin and leg. Higher dry matter content was measured at the leg, and has also been found statistical significant difference ( $P < 0.001$ ). Other chemical parameters were also higher in leg than in loin. Statistically significant differences were found for all chemical parameters, the intramuscular fat content of  $P < 0.01$ , the collagen content of  $P < 0.01$  and pure protein content was the difference  $P < 0.05$ . For textural parameters were found no statistically significant differences. Figure 1 illustrates the relationship between collagen content and hardness. In the loin was measured lower collagen content and lower force in hardness.

Table 1: Chemical and textural parameters of farmed fallow deer in two parts of carcasses

	Loin ( <i>M. longissimus dorsi</i> )		Leg ( <i>M. gluteus medius</i> )		<i>P</i> value
	Mean	± s.d.	Mean	± s.d.	<i>P</i> <
Dry matter [%]	25.040	± 0.95	26.403	± 0.65	0.001
Fat [%]	0.347	± 0.19	0.722	± 0.39	0.01
Collagen [%]	0.394	± 0.10	0.555	± 0.16	0.01
Pure protein [%]	21.602	± 0.92	22.449	± 0.73	0.05
Hardness [N]	34.556	± 12.81	38.203	± 12.26	N.S.
Cohesiveness [-]	1.248	± 0.03	1.246	± 0.02	N.S.

N.S. – no significant differences

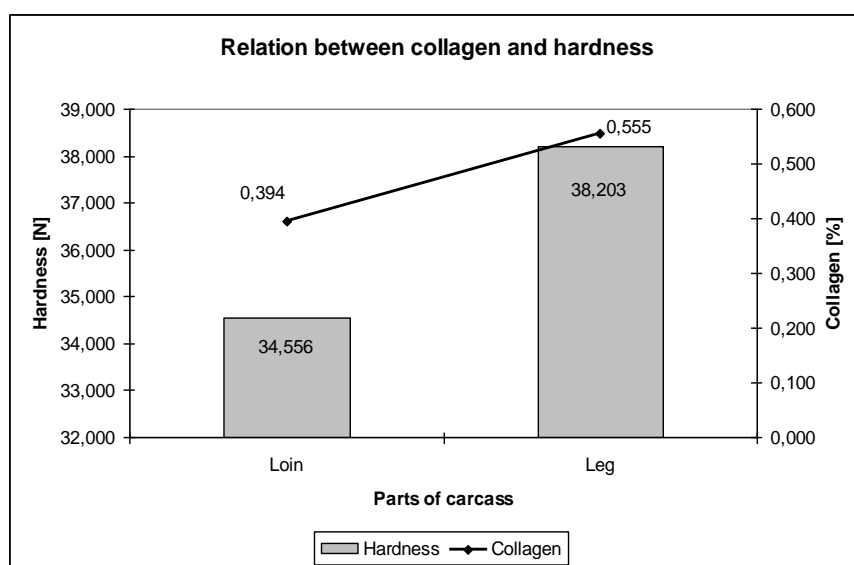


Figure 1: Relation of content of collagen and hardness between loin and leg

## Conclusion

This work was confirmed that meat from the loin is more tenderness because it has a lower content of dry matter, collagen, intramuscular fat and pure protein. We can see how it is described in the introduction, meat tenderness depends on many factors, mainly in the type of muscle and collagen content.

## Acknowledgements

This research was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic, Grant No. MSM6215712402, Veterinary Aspects of Food Safety and Quality.

The results of this study are also solved part of the University Development Fund Project No. 1396, Optimizing evaluation of textural parameters of meat and meat products depending on the chemical composition.

## References

List of references for the author.

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

## **Přežívání tkáňových cyst *Toxoplasma gondii* v kozím mase a masných výrobcích z něho vyrobených**

### **Viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in goat meat and in goat meat products**

<sup>1</sup>Neumayerová Helena, <sup>1</sup>Juránková Jana, <sup>2</sup>Gallas Leo, <sup>2</sup>Saláková Alena, <sup>1</sup>Koudela Břetislav

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno  
<sup>2</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

#### **Summary**

*Toxoplasma gondii* is common parasite of goats. The Consumption of not-well-cooked meat is possible source of infection. The aim of this study was to determinated viability of *T. gondii* cysts in goat meat and in fermented sausages made from this meat. The samples were vacuumed consequently incubated and digested using modified digestion technique and bioassayed to ICR mice. Mice were euthanised and examined for presence of *T. gondii* with using of PCR and ELISA. *T. gondii* cysts are vital after 3 hours in a freezer but not after 4 hours (-22 °C). After 7 days in 2,5% salt solution is viable, but not after 9 days. Cysts are nonviable in fermented sausages. After six weeks under 4 °C is *T. gondii* still vital in meat.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; viability; tissue cyst; meat

#### **Úvod**

*Toxoplasma gondii* je celosvětově rozšířený parazit infikující všechny teplokrevné obratlovce. Kočkovité šelmy jsou definitivním hostitelem a při infekci vylučují oocysty trusem do vnějšího prostředí. Oocysty odcházejí nevysporulované a při vhodných podmínkách působení teploty a kyslíku sporulují a stávají se tak infekčními. Oocysty vysporulují většinou za 3 až 5 dnů a poté mohou být pozřeny mezihostitelem. U mezihostitelů se po proběhlé infekci vyvíjejí v mase a orgánech tkáňové cysty, které jsou infekční pro dalšího mezihostitele nebo definitivního hostitele (Dubey, 2004).

Výskyt toxoplasmózy u koz je častý. Onemocnění probíhá většinou inaparentně, avšak může způsobit aborty. Jelikož jsou kozy chovány často pastevním způsobem je prevalence tohoto onemocnění značná. Zhruba 70% zvířat v našich podmínkách má protilátky a proto je kozí maso z hlediska konzumu rizikové. Velmi závisí na prostředí, ustájení a klimatických podmínkách. Ve vzorcích sér koz vyšetřených na našem ústavu byla stanovena prevalence 81,8 %, přičemž soubor tvořily zvířata z různých chovů. V některých chovech, zvláště ekologických, byla prevalence i 100 % (Jílková, 2010 nepublikovaná data). U člověka je infekce většinou latentní. Až u 20 % případů onemocnění probíhá akutně pod obrazem lymfodenopatie, chřipky či mononukleózy. U těhotných žen při primoinfekci může *T. gondii* způsobit potrat či poškození plodu. Následky mohou být velmi závažné, může se objevit hydrocephalus, mikroftalm, mentální retardace, snížené IQ, různé neurologické poruchy a časté postižení očí v podobě chorioretinitidy (Roizen a et al., 1995).

Jedním z hlavních zdrojů infekce *T. gondii* pro člověka je nedostatečně tepelně upravené maso. Trvanlivé fermentované masné výrobky jsou tepelně neopracované masné výrobky určené k přímé spotřebě. Připravují se ze syrového masa, tukové tkáňe a po promíchání se solí, kořením a dalšími přísadami se vzniklá směs (dílo) plní do obalu.

Za definovaných podmínek (teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu, proudění vzduchu) probíhá zrání a sušení výrobků.

Cílem naší studie bylo zjistit, jak podmínky skladování koziho masa ovlivňují přežívání tkáňových cyst *T. gondii* a zda tkáňové cysty *T. gondii* přežívají proces přípravy a zrání trvanlivých fermentovaných masných výrobků.

### **Materiál a metody**

Maso bylo získáno z experimentálně infikovaných koz. Zvířata byla infikována dávkou 15 000 oocyst *T. gondii* ve stáří asi 3 měsíců. Jedna skupina zvířat byla utracena 1 měsíc po infekci druhá za 3 měsíce po infekci. Maso zvířat bylo nakrájeno na kousky 1cm × 1cm a po 50 g naváženo do vakuovacích sáčků. Poté bylo zavakuováno. Takto připravené vzorky masa byly chlazeny při 4 °C, mrazeny při -20 °C. Další část masa byla nasolena dusitanovou solící směsí na 2,5 % a zavakuována stejným způsobem a poté byla skladována při 4 °C. Ze zbylých části masa byly připraveny masné výrobky typu fermentované klobásy. Doba zrání byla 12 dní. V průběhu skladování, byly odebírány vzorky na biologický pokus a chemickou analýzu (stanovení NaCl, sušiny, aw).

Posouzení vlivu skladování a zpracování koziho masa na přežívání tkáňových cyst *T. gondii* bylo prováděno biologickým pokusem na myších (Dubey, 1998). Testovaný materiál byl nejprve zhomogenizován pomocí mixerů. Homogenát byl následně vystaven účinku umělé trávicí šťávy (složení: pepsin, HCl, sůl) při 37 °C po dobu 60 minut. Sediment z každého vzorku natráveného materiálu získaného byl resuspendován v PBS a po přidání antibiotik byl podkožně injikován 4 ICR myším. Za 2 měsíce od infekce byly myši utraceny a byl jim odebrán mozek a krev. Mozek byl vyšetřen na přítomnost DNA *T. gondii* (primery pro B1 gen). Sérum získané z odebrané krve bylo použito pro ELISA test na stanovení protilátek *T. gondii*.

### **Výsledky**

Prezentované výsledky představují kombinaci analýzy mozku infikovaných myší a sérologického vyšetření séra těchto zvířat. Pozitivní výsledek u jedné myši ze skupiny zjištěný jakoukoliv z použitých metod, byl hodnocen jako průkaz přežívání tkáňových cyst v mase či masném výrobku. Z našich výsledků vyplývá, že *T. gondii* zůstává v nakrájeném vakuovaném kozím mase chlazeném při 4 °C infekční pro myš po dobu 6 týdnů při konečném pH 6,015 a aw 0,975. Proces mražení při -22 °C přežívají cysty pouze 3 hodiny, po 4 hodinách je kozi maso neinfekční. Proces solení 2,5% dusitanovou solící směsí přežívají tkáňové cysty *T. gondii* ve vakuovaném mase při 4 °C po dobu 7 dní při konečné hodnotě pH 5,975, aw 0,966 a 1,976% obsahu soli. Ve fermentované klobáse nepřežívají tkáňové cysty dobu delší než 24 hodin od naražení díla při definovaném pH 5,131; aw 0,964, obsahu soli 1,758 %, obsahu tuku 6,545 % a obsahu sušiny 31,849 %.

### **Diskuse**

Tkáňové cysty obsažené v mase, orgánech a dalších produktech mohou hrát významnou roli jako zdroje infekce pro člověka. Někteří autoři předpokládají u 50 % případů humánní toxoplasmózy původ infekce zprostředkovaný právě potravinami (Slifko et al., 2000). Při retrospektivních epidemiologických analýzách epidemií toxoplasmózy bylo zjištěno, že jsou často asociovány požitím syrového masa, nedostatečně tepelně

upraveného masa nebo dalších produktů z jatečných zvířat. (Tenter et al., 2000). Ve vzorcích masa chlazených při 4 °C za využití vakua je přežívání tkáňových cyst velmi dlouhé. Poslední vzorky končí 6. týdnem a vzorky takto ošetřeného masa byly stále infekční. Je možné, že cysty *T. gondii* za takto definovaných podmínek budou přežívat ještě déle. Takto ošetřené vzorky se tudíž mohou skladovat poměrně dlouhou dobu, což je využitelné z hlediska dalších experimentů s infekčními cystami *T. gondii* v mase.

Fermentované klobásy připravené z kozího masa byly již po 24 hodinách neinfekční pro myš. Fermentované masné výrobky obsahující tkáňové cysty *T. gondii* je možno považovat z hlediska bezpečnosti nezávadné. Podobné údaje byly zjištěny i ve fermentovaných masných výrobcích vyrobených z vepřového masa, které obsahovalo tkáňové cysty *T. gondii* (Neumayerová et al., 2008).

Izolované tkáňové cysty mohou přežít až 56 dní v 0,85% roztoku soli (Dubey, 1997). Devitalizace cyst v mase je zaručena při využití 1,4% laktátu, tripolyfosfáty nemají žádný efekt. Při využití NaCl závisí na její koncentraci. 1 % NaCl v mase tkáňové cysty ve vepřovém mase nezničí ani za 45 dnů (Hill et al. 2004, 2006).

### **Závěr**

Bylo zjištěno, že cysty *T. gondii* při 4 °C přežívají dlouhodobě minimálně 42 dnů v mase uchovaném ve vakuovém balení. Ve stejném balení za přidavku dusitanové solící směsi je *T. gondii* infekční pro myš pouze 7 dní. Při zamražení masa na -22 °C parazit hyne za 4 hodiny. Fermentované výrobky typu klobásy nepředstavují žádné riziko, jelikož cysty jsou inaktivovány již za 24 hodin.

### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem MSM6215712402.

### **Literatura**

- DUBEY, J.P. Survival of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in 0,85-6% NaCl solution at 4-20 °C. *Journal of Parasitology*. 1997, vol. 83, s. 65-70.
- DUBEY, J.P. Refinement of pepsin digestion method for isolation of *Toxoplasma gondii* from infected tissues. *Veterinary Parasitology*. 1998, vol. 74, s. 75-77.
- DUBEY, J.P. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004, vol. 126, s. 57-72.
- HILL, D.E., SREEKUMAR, C., GAMBLE, H.R., DUBEY J.P. Effect of commonly used enhancement solutions on the viability of *Toxoplasma gondii* tissue cysts in pork loin. *Journal of Food protection*. 2004, vol. 67, s. 2230-2230.
- HILL, A.E., BENEDETO, S.M.C., COSS, C., McCRARY, J.L., FOURNET, V.M., DUBEY, J.P. Effect of time and temperature on the viability of *Toxoplasma gondii* in enhanced pork loin. *Journal of Food Protection*. 2006, vol. 69, s. 1961-1965.
- NEUMAYEROVÁ, H., KAMENÍK, J., STEINHAUSER L., KOUDELA, B. Riziko toxoplazmózy a trvanlivé fermentované masné výrobky. *Maso*. 2008, vol 4. s. 24.
- ROIZEN, N., SWISHER, C. N., STEIN, M. A., HOPKINS, J., BOYER, K. M., HOLFELS, E., METS, M. B., STEIN, L. 1995. Neurological and developmental outcome in treated congenital toxoplasmosis. *Pediatrics*, 1995, vol. 95, s. 11-20.
- SLIFKO, T.R., SMITH, H.V., ROSE, J.B. Emerging parasite zoonoses associated with water and food. *Internation Journal of Parasitology*. 2000, vol. 30, s. 1379-1393.
- TENTER, A.M., HECKEROTH, A.R., WEISS, L.M., 2000. *Toxoplasma gondii*: from animals to humans. *Internation Journal of Parasitology*. 2000, vol. 30 s. 1217-58.

**Kontaktní adresa:** Helena Neumayerová, Mgr., Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, hneu.vfu@gmail.com



## Využití magnetic capture a real-time PCR pro detekci a kvantifikaci *Toxoplasma gondii* ze vzorků tkání

### Detection and quantification of *Toxoplasma gondii* in tissue samples using magnetic capture and real-time PCR

<sup>1</sup>Juránková Jana, <sup>2</sup>Opsteegh Marieke, <sup>1</sup>Koudela Břetislav, <sup>2</sup>Van Der Giessen Joche

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, The Netherlands

#### Summary

Different transmission routes, including the ingestion of undercooked meat, can result in *Toxoplasma gondii* infection in humans. There is a lack of quantitative information on the contamination level of different types of meat and tissues. Therefore, a method for detection and quantification of *T. gondii* was developed. The method involved preparation of crude extract from 20 - 100 gram samples of tissues, magnetic capture of *T.gondii* DNA and real-time PCR targeting the *T. gondii* 529 bp repeat element.

**Keywords:** *Toxoplasma gondii*; magnetic capture; real-time PCR

#### Úvod

Jedním ze zdrojů infekce lidí parazitem *Toxoplasma gondii* je nedostatečně tepelně upravené maso s tkáňovými cystami. V důsledku chybějících vhodných metod pro detekci *T. gondii* v mase zvířat dosud nejsou prováděna preventivní vyšetření zjišťující stupeň kontaminace masa. Magnetic capture (MC) je novou molekulární metodou, s níž lze detekovat DNA *T. gondii* ve velkém vzorku tkáně a ve spojení s real-time PCR umožňuje kvantifikaci stádií *T. gondii*.

#### Materiál a metody

Z experimentálně infikovaných kůzlat oocystami *T. gondii* byly pomocí MC vyšetřeny vzorky svalů, jater a plic. Vzorky tkání experimentálně infikovaných kůzlat zbavené tuku, šlach a povázek byly homogenizovány a lyzovány v pufru s obsahem proteinasy K, čímž byl získán hrubý extrakt, kterého byl pomocí streptavidin sepharosy vyvázan biotin přirozeně se vyskytující v tkáních. Do vzorků pak byly přidány *T. gondii* specifické oligonukleotidy značené biotinem (Tox-CapF a Tox-CapR) a došlo k hybridizaci značených oligonukleotidů a DNA *T. gondii*. Následně byly do směsi přidány magnetické kuličky pokryté streptavidinem a prostřednictvím vazby streptavidinu a biotinu se na kuličky navázal hybrid značených oligonukleotidů a DNA *T. gondii*. Z komplexu pak byla pomocí magnetů DynaMag-15 a DynaMag-2 získána DNA *T. gondii*. Vzorky DNA byly vyšetřeny metodou real-time PCR, s použitím primerů Tox-9F a Tox-11R amplifikujících 529 bp repeat element a sondy Tox-TP1 značené BHQ1-FAM. Jako kompetitivní vnitřní kontrola amplifikace byly použity primery CIAC-F a CIAC-R a sonda CIAC značená BHQ1-JOE. Fluorescence byla odečítána při 530 nm (Tox-TP1) a 560 nm (CIAC) na konci každé extenze. Ze zjištěných hodnot Cp bylo vypočteno množství bradyzoitů na gram vzorku. Jako negativní kontrola byly použity vzorky z *T. gondii* neinfikovaných pokusných kůzlat.

### **Výsledky**

Všechny vzorky svalů, jater a plic z *T. gondii* experimentálně infikovaných kůzlat byly při vyšetření r-t PCR pozitivní. Průměrné množství parazitů ve svalech bylo 2117,5 bradyzoitů/g. Průměrné množství v játrech bylo 425,3 bradyzoitů/g a průměrné množství v plicích bylo 3466,9 bradyzoitů/g.

### **Diskuse**

Výhodou v porovnání s klasickými metodami izolace DNA, pro které jsou využívány malé (max. 50mg) vzorky, je možnost zpracování až 100 g tkáně a tím pádem vyšší záchyt cyst *T. gondii*. Zároveň je odstraněna DNA hostitele, která by v nadbytku mohla inhibovat PCR reakci. V této práci byly pomocí metody magnetic capture vyšetřeny kromě vzorků svaloviny, na kterých byla metoda zavedena, i vzorky jater a plic, čímž bylo potvrzeno, že metodu lze využít i vyšetření vnitřních orgánů. Při srovnání počtů bradyzoitů v jednotlivých tkáních byl nejvyšší záchyt zaznamenán v plicích, což poukazuje na plicní formu toxoplasmózy. Standardem v detekci *T. gondii* ve vzorcích tkání je biologický pokus, což je časově a finančně náročný způsob, z etického hlediska nevhodný pro vyšetření velkého množství vzorků. Z těchto důvodů se magnetic capture jeví jako vhodná alternativa v diagnostice *T. gondii* z tkání, využitelná k vyšetření velkého množství vzorků.

### **Závěr**

Stávající výsledky jsou pouze předběžné, po úspěšném zavedení MC pro vyšetření vzorků jater a plic bude metoda využita pro vyšetření vzorků dalších vnitřních orgánů, bude posouzena distribuce parazita v těle hostitele a provedena kvantifikace bradyzoitů v jednotlivých tkáních.

### **Literatura**

DUBEY, JP. Toxoplasmosis – a waterborne zoonosis. *Veterinary Parasitology*. 2004, vol. 126, s. 57-72.

OPSTEEGH, M.; LANGELAAR, M.; SPRONG, H; DEN HARTOG, L.; DE CRAEYE, S.; BOKKEN, G.; AJZENBERG, D.; KIJLSTRA, A.; VAN DER GIESSEN, J. Direct detection and genotyping of *Toxoplasma gondii* in meat samples using magnetic capture and PCR. *Internal Journal of Food Microbiology*. 2010, vol. 139, s. 193-201.

Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on Surveillance and monitoring of *Toxoplasma* in humans, foods and animals. *The EFSA Journal*. 2007, vol. 583, s. 1-64.

**Kontaktní adresa:** Jana Juránková, MVDr., Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, yanniska@seznam.cz

## Vplyv genotypov NN, Nn a nn na kvalitu bravčového mäsa

### Effect of genotype NN, Nn and nn on pork quality

<sup>1</sup>Supuka Peter, <sup>1</sup>Turek Peter, <sup>2</sup>Supuková Anna

<sup>1</sup>UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice

<sup>2</sup>UPJŠ Košice, Lekárska fakulta – Ústav experimentálnej medicíny, Trieda SNP 1, 040 11 Košice

#### Summary

*One-side effort of breeders for improvement of pigs with the highest ratio of twigh weight of carcass body results in determination of body constitution as well as lowering of quality of obtained muscles. Aspiration of this work is to show differences in thigh muscle quality of individual genotypes of pigs from the viaw of stress sensitivity.*

*Experimental was provided on 38 tested animals, which were divided into 3 genotype groups: dominant homozygous – NN, heterozygous – Nn and recessive homozygous – nn. Qualitative parameters: pH<sub>1</sub>, pH<sub>2,4</sub>, meat color on the 1st and on the 7th day, water loss by dripping and loss by boiling and two quantitative parameters valuable fleshy parts and % meat of tigh. All the experimental groups were compared.*

**Keywords:** pig; meat quality; genotype; pietrain

#### Úvod

Úžitkovosť hospodárskych zvierat je ovplyvnená genetickým založením a chovateľským prostredím. Ku genetickým vplyvom patrí napr. spôsob kríženia, selekcia v stáde, vplyv plemena a vlastná genetická hodnota jedinca v rámci plemena. Z genetického hľadiska je úžitkovosť znak kvantitatívny, ktorý je determinovaný veľkým počtom génov tzv. gény malého účinku (polygény, minorgény). To znamená, že sa vo fenotype prejaví len ako dôsledok určitého zoskupenia veľkého počtu génov. Čím väčší počet génov sa na determinácii daného znaku podieľa, tým väčší vzniká počet tried fenotypu i genotypu **Supuka a Turek** (2005).

Medzi vplyvy chovateľského prostredia patria napr. vplyv rokov, ročných období, spôsobu výživy, chovu, stáda, haly, umiestnenia v hale a podobne **Kahánková** (1998).

Podľa **Hadbavného a kol.** (2008) okrem vplyvov systematicky pôsobia na úžitkovosť ešte náhodne nekontrolovateľné vplyvy prostredia, ktorých pôsobenie nie je možné ovplyvniť ani predpovedať. Parametre vnútorného prostredia ako aj vnútrodrohovú variabilitu u ošípaných sledovali vo svojich prácach **Buleca a kol.** (2008) a **Židek a kol.** (2007)

Výrazné osvalenie ošípaných býva sprevádzané zhoršenou konštitúciou, ale aj zhoršením kvality mäsa, ktoré sa prejavuje najmä bledoružovou až ružovo - šedou farbou, atypickým priebehom zrecích pochodov a zníženou väznosťou vody, čo má bezprostredný vplyv na straty mäsovej šťavy a následne na technologicko-spotrebiteľskú kvalitu výsledného mäsa i mäsových výrobkov. Podľa **Žideka a kol.** (2009) dôsledkom selekcie na vysoký podiel chudého mäsa je nižší podiel intramuskulárneho tuku a celkové zníženie kvality mäsa a tuku, čo potvrdzuje i **Buleca a kol** (2010). Za kritickú hodnotu pre posúdenie akostnej odchýlky v kvalite bravčového mäsa typu PSE (pale, soft, exudative–bledé, mäkké, vodnaté) sa považuje hodnota pH 1 pod 5,8.

Medzi úrovňou mäsitosti jatočných tiel ošípaných a zhoršením parametrov fyzikálno-chemickej akostnej charakteristiky ich mäsa nebola žiaľ dokázaná jednoznačná závislosť **Supuka a Turek (2006)**. Zistené korelačné koeficienty majú záporné a nízke hodnoty **Lagin a kol., (2002)**.

### Materiál a metodika

Do pokusu bolo zaradených 38 ošípaných plemien yorhshire „C,, pietrain, landras a biela ušľachtilá. Výkrm bol uskutočnený na SVJH v Spišských Vlachoch, kde boli ošípané následne aj zabitú a boli u nich vykonané merania sledovaných ukazovateľov.

Všetkých 38 ošípaných pochádzalo z jedného chovu a boli kŕmené štandardnou kŕmnou zmesou, kt. sa používa pri testovaní v staniaciach výkrmnosti a jatočnej hodnoty.

V sledovaných skupinách sme sa zamerali z kvantitatívnych ukazovateľov na podiel cenných mäsitých častí - % CMČ a podiel hmotnosti stehna - % PHS. Kvalitatívne ukazovatele sme vyhodnocovali na základe pH<sub>1</sub>, pH<sub>24</sub>, farba mäsa po 24 hodinách, resp. siedmich dňoch, stratu vody odkvapom za 24 hodín a stratu vody varom po jednej hodine varenia.

### Výsledky

Tabuľka 1: Výsledky skupiny NN bez ohľadu na plemenné zastúpenie

Ukazovatele n = 11	CMČ %	PHS %	pH <sub>1</sub>	pH <sub>24</sub>	farba 24	farba 7dní	strata vody odkv.	strata vody var.
min.	52,11	21,05	5,9	5,49	7,09	13,45	1,5	25,8
max.	60,25	25,94	6,4	6,57	22,45	25,98	8,1	34,9
priemer	<b>57,84</b>	<b>23,18</b>	<b>6,15</b>	<b>5,89</b>	<b>19,48</b>	<b>18,97</b>	<b>4,01</b>	<b>28,48</b>

Skupinu dominantných homozygotov – NN tvorili hlavne zástupcovia plemien biela ušľachtilá a landras. Aj keď ide o materské plemená, % cenných mäsitých častí a podiel hmotnosti stehna bol na veľmi vysokej úrovni. Pri klasifikácii ošípaných podľa systému SEUROP by bolo 72 % jedincov klasifikovaných v skupine E a 28 % v najvyššej skupine S.

Tabuľka 2: Výsledky skupiny Nn bez ohľadu na plemenné zastúpenie

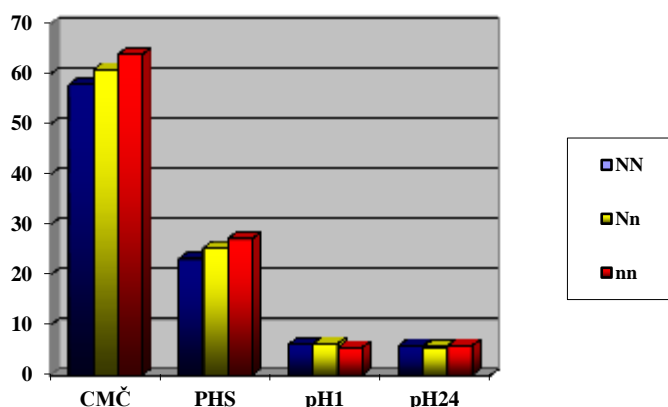
Ukazovatele n = 14	CMČ %	PHS %	pH <sub>1</sub>	pH <sub>24</sub>	farba 24	farba 7dní	strata vody odkv.	strata vody var.
min.	56,09	22,03	6,0	5,19	9,09	12,82	0,9	15,7
max.	63,45	26,41	6,7	6,07	22,45	27,08	7,1	38,9
priemer	<b>60,84</b>	<b>25,31</b>	<b>6,30</b>	<b>5,63</b>	<b>18,78</b>	<b>18,97</b>	<b>4,91</b>	<b>26,48</b>

Skupina heterozygotov – Nn bola tvorená malým počtom jedincov dvoch materských plemien a prevažne plemenom yorkshire „C,,. U tejto skupiny ošípaných bol zaznamenaný výrazný vzostup podielu hmotnosti stehna a zároveň vzostup % cenných mäsitých častí o 3 %. Takmer 86 % ošípaných z tejto skupiny bolo klasifikovaných podľa systému SEUROP v triede S.

Tabuľka 3: Výsledky skupiny nn bez ohľadu na plemenné zastúpenie

Ukazovateľ n = 13	CMČ %	PHS %	pH <sub>1</sub>	pH <sub>24</sub>	farba 24	farba 7dní	strata vody odkv.	strata vody var.
min.	59,81	26,05	5,4	5,5	16,09	17,45	4,5	24,8
max.	66,59	29,94	6,1	6,2	23,45	25,98	8,1	36,9
priemer	<b>63,84</b>	<b>27,18</b>	<b>5,52</b>	<b>5,89</b>	<b>21,48</b>	<b>22,37</b>	<b>5,01</b>	<b>29,61</b>

Prevažnú časť skupiny recesívnych homozygotov – nn tvorili zástupcovia plemena pietrain, ktoré je známe vysokým podielom chudého mäsa v jatočnom tele. Potvrdilo sa to aj u nami sledovaných ošípaných. Nevýhodou tejto skupiny bol výrazný pokles kvality mäsa a značná časť jedincov bola klasifikovaná ako ošípané s PSE mäsom.



Graf 1: Porovnanie vybraných parametrov mäsovej kvality troch skupín genotypov NN, Nn a nn

### Záver

Na základe dosiahnutých výsledkov sa dá jednoznačne poukázať na rozdiely medzi jednotlivými genotypmi ošípaných z pohľadu kvantitatívnych a kvalitatívnych ukazovateľov bravčového mäsa. Najvyšší podiel mäsa (CMČ, PHS) bol zaznamenaný u skupiny recesívnych homozygotov – nn, 63,84 % resp. 27,18 %, o niečo nižšie zastúpenie mala skupina heterozygotov – Nn 60,84 %, resp. 25,31 % a najnižší podiel mala skupina dominantných homozygotov – NN 57,84 %, resp. 23,18 %.

Hodnota pH<sub>1</sub>, ako najdôležitejšieho parametru pre stanovovanie kvality bravčového mäsa bola najvyššia u skupiny heterozygotov – 6,3, mierne nižšia hodnota bola u skupiny dominantných homozygotov – 6,15 a výrazne najnižšia u skupiny recesívnych homozygotov – 5,52. Na základe dosiahnutých výsledkov sa dá konštatovať, že medzi jednotlivými skupinami genotypov sú výrazné rozdiely v kvalite mäsa, ale aj vo výťažnosti cenných mäsitých častí, a preto má veľký význam selektovať plemená ošípaných na základe vnímavosti na stres.

### Literatúra

U autorov.

**Kontaktná adresa:** Peter Supuka, MVDr., Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie Košice, Ústav chovu zvierat, Komenského 73, 04181 Košice, supuka.peter@gmail.com

## Stanovení alergenních bílkovin v kozím mléce

### Determination of allergenic proteins in goat's milk

Ruprichová Lenka, Dračková Michaela, Borkovcová Ivana, Vorlová Lenka

Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno

#### Summary

The aim of the study was to determine the potential allergenic proteins in goat's milk. Caseins,  $\alpha$ -lactalbumin and  $\beta$ -lactoglobulin are proteins with potential allergenic properties. Their profile is different depending primarily on variety of animal, breed, diet, geographic conditions, etc. Altogether 40 samples of goat's milk which were taken from goat's farm in southern Moravia region of the Czech Republic were analysed by method RP-HPLC.

**Keywords:** goat's milk; allergenic proteins; RP-HPLC

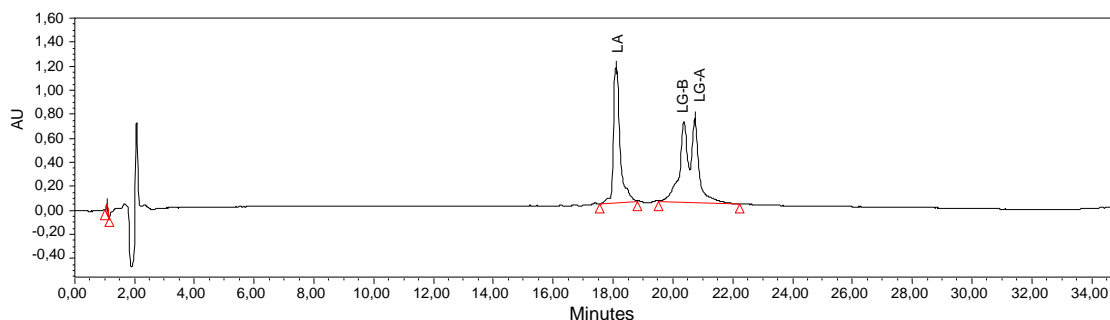
#### Úvod

Alergie na mléko a mléčné výrobky se v dnešní době objevuje stále častěji, zejména u dětí. Mezi hlavní alergeny mléka patří kaseiny (CN),  $\alpha$ -laktalbumin (LA) a  $\beta$ -laktoglobulin (LG) (Monaci et al., 2006). Největší zastoupení mají kaseiny, které tvoří 80 % celkových mléčných bílkovin (Park a Haenlein, 2006). Méně jsou v mléce zastoupeny syrovátkové bílkoviny, které tvoří přibližně 20 % (Ng-Kwai-Hang et al., 2003). Za alergeny s největším alergenním potenciálem jsou považovány  $\alpha_{S1}$ -kasein a  $\beta$ -laktoglobulin (Monaci et al., 2006).

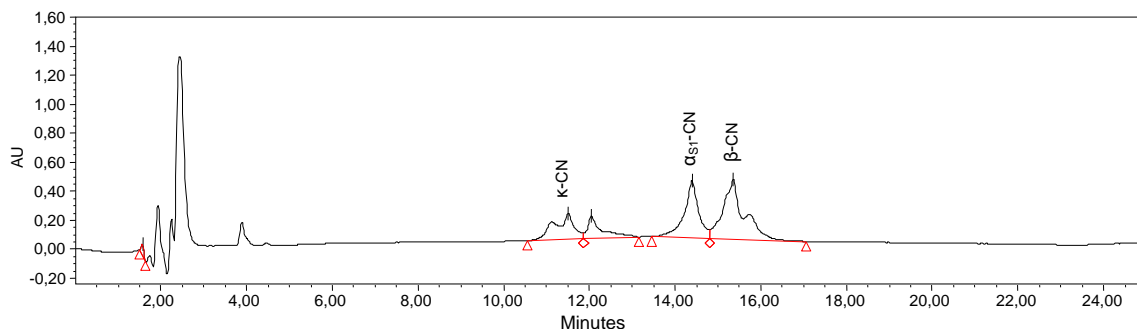
Dosavadní léčba alergie na danou potravinu spočívá v jejím celkovém odstranění z jídelníčku. Výsledky studií však naznačují, že postupné zvyšování dávek mléka vede u dětí k celkové adaptaci, toleranci alergenu, který původně vyvolával alergické reakce (Skripak et al., 2008). To je jeden ze závažných důvodů proč je důležité znát obsah alergenů mléce. Cílem této práce je stanovení obsahu jednotlivých kaseinů ( $\alpha_{S1}$ -casein,  $\alpha_{S2}$ -casein,  $\beta$ -casein,  $\kappa$ -casein) a hlavních syrovátkových bílkovin ( $\beta$ -laktoglobulin a  $\alpha$ -laktalbumin) jako potenciálních alergenů v kozím mléce metodou RP-HPLC (vysokoúčinné kapalinové chromatografie s reverzní fází).

#### Materiál a metodika

Popis a příprava vzorku, chemikálie, podmínky pro stanovení, validace a optimalizace metody RP-HPLC pro kaseiny a syrovátkové bílkoviny je uvedena v práci Ruprichová et al. (2010a,b). Chromatografické záznamy analýz jsou uvedeny na obrázcích 1–4.



Obrázek 1: Chromatogram standardů syrovátkových bílkovin



Obrázek 2: Chromatogram standardů kaseinů

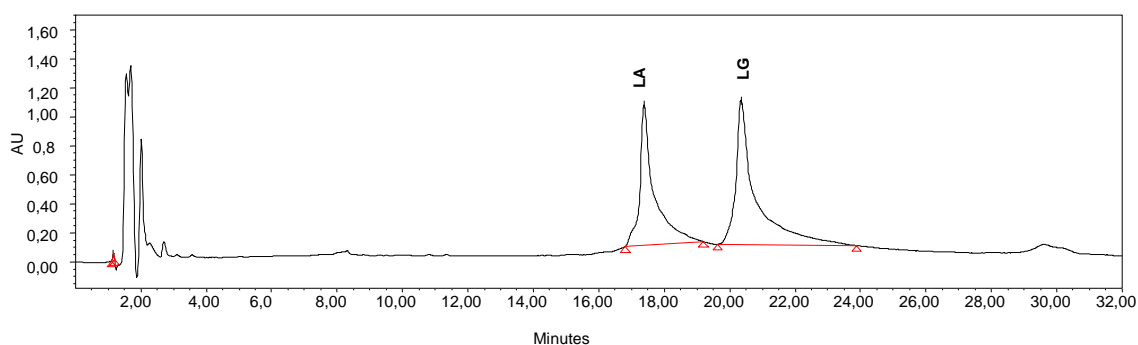
### Výsledky a diskuse

V tabulce č. 1 jsou uvedeny koncentrace kaseinů,  $\alpha$ -laktalbuminu a  $\beta$ -laktoglobulinu kozího mléka. Obsah  $\alpha$ -laktalbuminu v kozím mléce činil  $28,91 \pm 3,88$  % a  $\beta$ -laktoglobulinu  $71,09 \pm 3,88$  %.

Tabulka 1: Obsah kaseinů a syrovátkových bílkovin v kozím mléce v %.

[%]	Kaseiny				Syrvátkové bílkoviny	
	$\alpha_{S1}$ -CN	$\alpha_{S2}$ -CN	$\beta$ -CN	$\kappa$ -CN	LA	LG
<b>Průměr</b>	2,43	6,03	44,54	47,01	28,91	71,09
<b>Min</b>	0,03	0,35	39,04	41,82	21,54	64,09
<b>Max</b>	3,83	11,85	51,28	53,37	35,91	78,46
<b>SD</b>	0,84	2,37	2,83	1,97	3,88	3,88

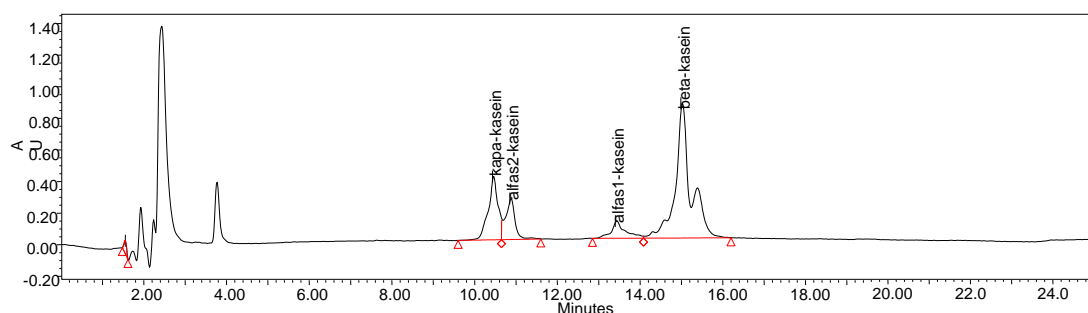
Moioli et al. (1998) ve své studii uvádí, že  $\alpha$ -laktalbumin kozího mléka obsahuje frakce A, B, které však nejsou z chromatogramu kozího mléka (obr. 3) zřejmé. Moioli et al. (1998) dále uvádí, že u kozího mléka se vyskytují 2 frakce  $\beta$ -laktoglobulinu (A a B). Porovnáním chromatogramů standardu a vzorku kozího mléka lze usoudit, že převažuje výskyt  $\beta$ -laktoglobulinu B. Frakce  $\beta$ -laktoglobulinu A a  $\beta$ -laktoglobulinu B však nejsou z chromatogramu zřetelné.

Obrázek 3: Chromatogram  $\alpha$ -laktalbuminu a  $\beta$ -laktoglobulinu v kozím mléce.

U kozího mléka byl zjištěn obsah  $\alpha_{S1}$ -kaseinu  $2,43 \pm 0,84$  %,  $\alpha_{S2}$ -kaseinu  $6,03 \pm 2,37$  %,  $\beta$ -kaseinu  $44,54 \pm 2,83$  % a  $\kappa$ -kasein  $47,01 \pm 1,97$  %. Tyto hodnoty se liší v porovnání s hodnotami, které ve své studii uvádí Park (2006):  $\alpha_{S1}$ -kasein 5,6 %,  $\alpha_{S2}$ -kasein 19,2 %,  $\beta$ -kasein 54,8 % a  $\kappa$ -kasein 20,4 %.

Moioli et al. (1998) ve své studii uvádí, že  $\alpha_{S1}$ -kasein kozího mléka obsahuje nejvíce frakcí (A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub>, C, D, E, F, G, O),  $\alpha_{S2}$ -kasein má 3 frakce (A, B, C) podobně jako  $\beta$ -kasein (A, B, O) a  $\kappa$ -kasein obsahuje 2 frakce (A, B).

Nicméně, Bramanti et al. (2003) ve své práci poukazuje na závislost zastoupení jednotlivých frakcí kaseinů na genotypu. Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí pro genotyp určující vysokou hladinu  $\alpha_{S1}$ -kaseinu:  $\alpha_{S1}$ -kaseinu 18,4 a 21,0 %,  $\alpha_{S2}$ -kaseinu 13,6 a 11,0 %,  $\beta$ -kaseinu 54,0 a 48,0 %,  $\kappa$ -kasein 12,4 a 15,0 %. Zastoupení jednotlivých kaseinových frakcí pro genotyp určující nízkou hladinu  $\alpha_{S1}$ -kaseinu:  $\alpha_{S1}$ -kaseinu 1,9 a 0,0 %,  $\alpha_{S2}$ -kaseinu 19,3 a 14,0 %,  $\beta$ -kaseinu 58,5 a 60,0 %,  $\kappa$ -kasein 14,9 a 20,0 %.



Obrázek 4: Chromatogram kaseinů v kozím mléce.

V této práci jsme se však nezaměřovali na konkrétní identifikaci jednotlivých genetických variací, i když je v některých případech z chromatogramu zřejmý výskyt více frakcí. Tyto frakce však nejsou dostatečně odděleny, aby mohly být spolehlivě identifikovány, proto byly vyhodnoceny pouze  $\alpha_{S1}$ -kasein,  $\alpha_{S2}$ -kasein,  $\beta$ -kasein a  $\kappa$ -kasein.  $\alpha_{S2}$ -kasein byl vyhodnocen na základě práce Bordin et al. (2001). Tato identifikace však není jednoznačná, protože nebyly proměřeny standardy kaseinů kozího mléka, které jsou jen těžko dostupné.

### Závěr

Obsah  $\alpha$ -laktalbuminu v kozím mléce činil  $28,91 \pm 3,88$  % a  $\beta$ -laktoglobulinu  $71,09 \pm 3,88$  %. Jednotlivé kaseiny byly zastoupeny v množství:  $\alpha_{S1}$ -kaseinu  $2,43 \pm 0,84$  %,  $\alpha_{S2}$ -kaseinu  $6,03 \pm 2,37$  %,  $\beta$ -kaseinu  $44,54 \pm 2,83$  %,  $\kappa$ -kasein  $47,01 \pm 1,97$  %. Obsah  $\alpha_{S1}$ -kaseinu, který je považován za alergen s největším potenciálem, činil pouze 2,4 %. Zatímco množství  $\beta$ -laktoglobulinu bylo stanoveno na 71,09 %. Vzhledem k tomu, že syrovátkové bílkoviny tvoří pouze 20 % a kaseiny 80 % mléka, lze považovat kozí mléko za mléko s nízkým alergenním potenciálem.

### Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury VFU Brno 72/2010/FVHE.

### Literatura

K dispozici u autora.

**Kontaktní adresa:** Lenka Ruprichová, Ing., Ústav hygieny a technologie mléka, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1/3, 612 42, Brno. Česká republika. Tel.: +420 541 562 722, Email: ruprichoval@vfu.cz



## Hodnotenie vybraných fyzikálno-chemických znakov akosti mlieka z mliečnych automatov

### Evaluation of selected physico-chemical characteristics quality of milk from milk vending machines

Flimelová Erika, Bezeková Jana, Čanigová Margita

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, SPU Nitra*

#### Summary

*The objective of this study was to evaluate the physico-chemical quality of raw cow's milk from the milk vending machines. Milk were collected during 2010 on average every week and processed within 2 hours. In the purchased milk were evaluated contain milk fat, proteins, non-fat dry matter, calcium and freezing point of milk. Average of milk fat content in raw cow's milk reached 3.5 %. The requirement of the standard STN 57 0529 for a minimum fat content (3.3 g.100 g<sup>-1</sup>) don't reach purchased milk in 8 %. The average of protein content reached 3.44 %, troughout the year collected milk meets the requirement standards for protein content. The average of non-fat dry matter was 8.82 %, while in July the average value was lower than the standard requirement (8.5 g.100 g<sup>-1</sup>). The average of calcium content reached 124.25 mg.100 g<sup>-1</sup>. The freezing point of milk varied from -0.535 to -0.576 °C.*

**Keywords:** raw cow's milk; quality of milk

#### Úvod

Mlieko je nevyhnutnou súčasťou ľudskej stravy, pretože poskytuje všetky makro- (proteíny, tuky, sacharidy) a mikroprvky (vitamíny a enzýmy) (Ataro et al., 2008).

Mlieko je odporúčané ako zdroj vápnika, pre udržanie kostnej hmoty, takže jeho konzumáciou sa dá čiastočne predchádzať zlomeninám a osteoporóze (Kira a Maio, 2004).

Zloženie mlieka ovplyvňuje viacero faktorov ako napr. štádium laktácie, krmivo, zdravotný stav, vek dojnice, interval medzi dojeniami, ale aj genetický faktor (Fox, McSweeney, 1998).

Požiadavky na surové kravské mlieko upravuje technická norma STN 57 0529 (1999), ktorá stanovuje fyzikálno - chemické parametre ako je množstvo tuku (min. 3,3 %), bielkovín (min. 2,8 %) a beztukovej sušiny (min. 8,5 %). Udáva tiež povolenú teplotu tuhnutia (-0,515 °C) a ako doplnkový znak sa uvádza obsah vápnika (min. 120 mg.10 g<sup>-1</sup>).

Nesplnenie normovaných hodnôt beztukovej sušiny a teploty tuhnutia by mohli naznačovať podozrenie na prídavok vody a teda zriedenie mlieka počas získavania v prvovýrobe (Foltys a Kirchnerová, 2009).

V zahraničí je konzumácia surového mlieka a výrobkov z neho rozšírenejšia. Fratini et al. (2010) uvádzajú, že predaj surového mlieka pomocou automatov je dobrý spôsob, ako zvýšiť príjmy prvovýrobcov.

Cieľom práce bolo hodnotenie vybraných fyzikálno-chemických znakov akosti surového kravského mlieka ako je tuk, bielkoviny, beztuková sušina, vápnik a teplota tuhnutia.

## Materiál a metodika

### Vzorky

Celkovo bolo hodnotených 50 vzoriek surového kravského mlieka zakúpeného z mliečnych automatov v okresnom meste. Vzorky boli odoberané v podmienkach spotrebiteľa v objeme 1 litra a za dodržania chladiarenského reťazca dopravené do laboratória, kde boli najneskôr do 2 hodín spracované podľa jednotlivých metód stanovení. Odbery prebiehali počas celého roku 2010 jedenkrát týždenne.

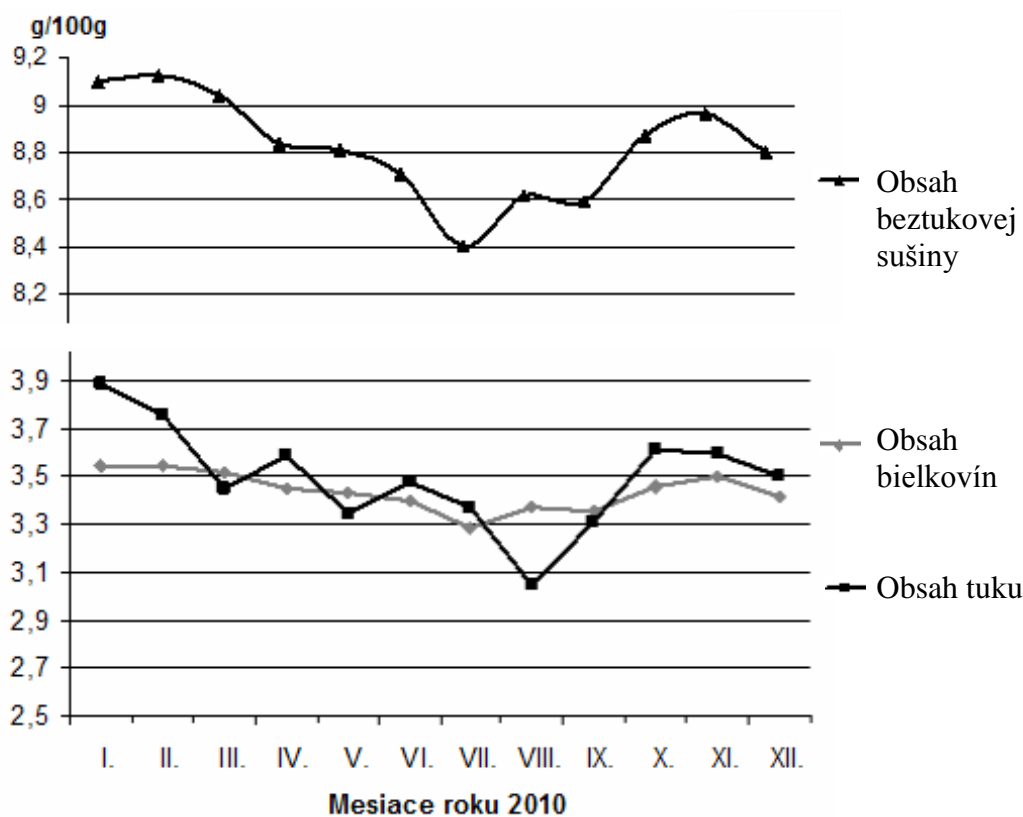
### Metódy

Zloženie mlieka a vybrané vlastnosti sa stanovili pomocou okalibrovaného prístroja LACTOSCAN 90 (MILKOTRONIC s. r. o., Bulharsko). Zariadenie, ktoré sa používa na rýchle meranie množstva tuku (T), beztukovej sušiny (BTS), bielkovín (B), laktózy (L), obsahu vody v %, teploty vzorky v °C, hustoty v laktodenzimetrických stupňoch °L), pH, teploty tuhnutia a obsahu soli.

Stanovenie vápnika sa vykonalo komplexometrickou titráciou podľa postupu popísaného Cvakom et al. (1992). Zo získaných výsledkov sa vypočítal aritmetický priemer na každý mesiac.

### Výsledky a diskusia

Hodnoty tuku v mlieku sa pohybovali od 3,05 % po 3,89 %. Obsah tuku počas sledovaného obdobia bol variabilný, čo môže signalizovať okrem nevyrovnanej kŕmnej



Obrázok 1: Zmeny obsahu tuku, bielkovín a beztukovej sušiny v g.100g<sup>-1</sup> počas roku 2010

dávky aj falšovanie mlieka odobratím tuku. Keďže nižší obsah tuku sa zisťoval v letných mesiacoch, je skôr pravdepodobné, že dojnice mali nižší prísun vlákniny v krmive. Minimálna hodnota tuku pre surové kravské mlieko, ktorú stanovuje STN 57 0529 (1999), nebola splnená v 8 % vzoriek. Vlkovič et al. (2011), ktorí taktiež hodnotili kvalitu surového kravského mlieka z mliečnych automatov, zistili obsah mliečného tuku od 1,24 % až do 4,25 %. Podľa týchto autorov až 40 % odobratých vzoriek mlieka nespĺňalo požiadavky českej legislatívy.

Obsah bielkovín v hodnotenom mlieku sa pohyboval od 3,29 % až po 3,55 % a dosiahol priemernú hodnotu za sledované obdobie 3,44 %. Počas celého roka 2010 mlieko spĺňalo požiadavky kladené na minimálny obsah bielkovín v mlieku. Fratini et al. (2010), ktorí sa zaoberali hodnotením obsahu bielkovín v mlieku na dvoch farmách zistili, že tento dosiahol priemernú hodnotu 3,15 % resp. 3,18 %.

Obsah beztukovej sušiny nevyhovoval požiadavke STN 57 0529 (1999) v mesiaci júl, kedy beztuková sušina dosiahla hodnotu len 8,4 %. Vlkovič et al. (2011) stanovili v surovom kravskom mlieku beztukovú sušinu v rozpätí od 7,8 % až do 9,21 %.

Obsah vápnika kolísal od 120,59 mg.100g<sup>-1</sup> do 128,78 mg.100g<sup>-1</sup> a dosiahol priemer 124,25 mg.100g<sup>-1</sup>.

Teplota tuhnutia mlieka dosahovala hodnoty od -0,576 °C do -0,535 °C. Na základe získaných výsledkov zo stanovenia teploty tuhnutia mlieka môžeme konštatovať, že do mliečnych automatov sa nedostávalo mlieko falšované prídavkom vody. Túto skutočnosť potvrdzujú aj výsledky zo stanovenia beztukovej sušiny. Vlkovič et al. (2011) na základe nimi stanovených hodnôt beztukovej sušiny a teploty tuhnutia mlieka vyslovili názor, že mlieko predávané v automatoch v niekoľkých prípadoch bolo pravdepodobne falšované prídavkom vody.

Nami stanovené hodnoty obsahu laktózy v mlieku sa pohybovali od 4,69 % do 4,95 %, čo je v súlade napríklad aj s výsledkami uvedenými Fratini et al. (2010). Títo v mlieku odobieranom z fariem stanovili laktózu v rozmedzí 4,72 % do 4,8 %.

### **Záver**

Z výsledkov analyzovania vzoriek mlieka odobieraných z predajných mliečnych automatov vyplýva, že mlieko až na obsah tuku a beztukovej sušiny v jednom mesiaci spĺňalo všetky sledované fyzikálno – chemické ukazovatele kvality mlieka zadefinované v STN 57 0529 (1999). Zrejme toto priaznivé hodnotenie súvisí s pravidelnou kontrolou kvality predávaného surového kravského mlieka štátnymi orgánmi, ktoré sú zodpovedné za kontrolu kvality živočíšnych produktov v Slovenskej republike.

### **PodĎakovanie**

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

### **Literatúra**

Je k dispozícii u autorov.

**Kontaktná adresa:** Erika Flimelová, Ing., Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, SPU v Nitre, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, erikaflimelova@centrum.sk

## Vybrané mikrobiologické ukazovatele kvality mlieka z mliečnych automatov

### Selected parameters of microbiological quality of milk from vending machines

Bezeková Jana, Flimelová Erika, Čanigová Margita

*Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre*

#### Summary

*The aim of the work was monitored and evaluated the microbiological quality of milk in vending machines offered during the year 2010. The sampling was carried out two or three times per month. The total bacterial count was monitored as the main indicator of microbiological quality of milk, which is in accordance with requirement STN 57 0529 (1999). The number of coliform bacteria and Enterobacteriaceae family were monitored as an additional quality character. Total bacterial count range from  $1.90 \times 10^4$  to  $1.45 \times 10^5$  per 1 ml. Twenty four percentage of samples not meet the requirement for total bacterial count STN 57 0529. Average numbers of coliform bacteria and Enterobacteriaceae family achieved the value of  $3.60 \times 10^3$  respectively  $3.80 \times 10^3$  per 1 ml. Twenty seven percentage of samples exceeded the maximum number of coliform bacteria  $1.00 \times 10^3$  per 1 ml declared in requirements STN 57 0529. The most common problems with the microbiological quality of the milk were occurred in the summer months.*

**Keywords:** total bacterial count; coliform bacteria; Enterobacteriaceae; milk quality

#### Úvod

Mikrobiologické požiadavky na surové mlieko v Slovenskej republike sú dané STN 57 0529 (1999) „Surové kravské mlieko na mliekarenské ošetrovanie a spracovanie“. Záväzný ukazovateľ CPM určuje článok 2.3.5. Celkový počet mikroorganizmov pre Q triedu kvality najviac  $5.10^4$  KTJ.ml<sup>-1</sup> a pre I. triedu kvality najviac  $1.10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. V súčasnosti je možné spracovávať mlieko s celkovým počtom mikroorganizmov do  $1.10^5$  KTJ.ml<sup>-1</sup> (Nariadenie ES 1662/2006). Hodnota CPM charakterizuje celkovú hygienicko-sanitačnú úroveň získavania mlieka (Foltys, Kirchnerová, 2008). Článok 2.4 uvedenej normy dopĺňa mikrobiologické znaky kvality aj o doplnkové znaky kvality ako je napr. sledovanie počtu koliformných baktérií, ktorých počty by nemali presiahnuť hranicu  $1.10^3$  KTJ.ml<sup>-1</sup>. Koliformné baktérie a čeľaď *Enterobacteriaceae* sú indikátorom fekálneho znečistenia a tiež úrovne sanitácie. Kontaminácia mlieka koliformnými mikroorganizmami poukazuje na nedostatočnú hygienu získavania a ošetrovania mlieka, na nesprávne technologické spracovanie, nedostatky v sanitácií výrobného zariadenia alebo na rekontamináciu.

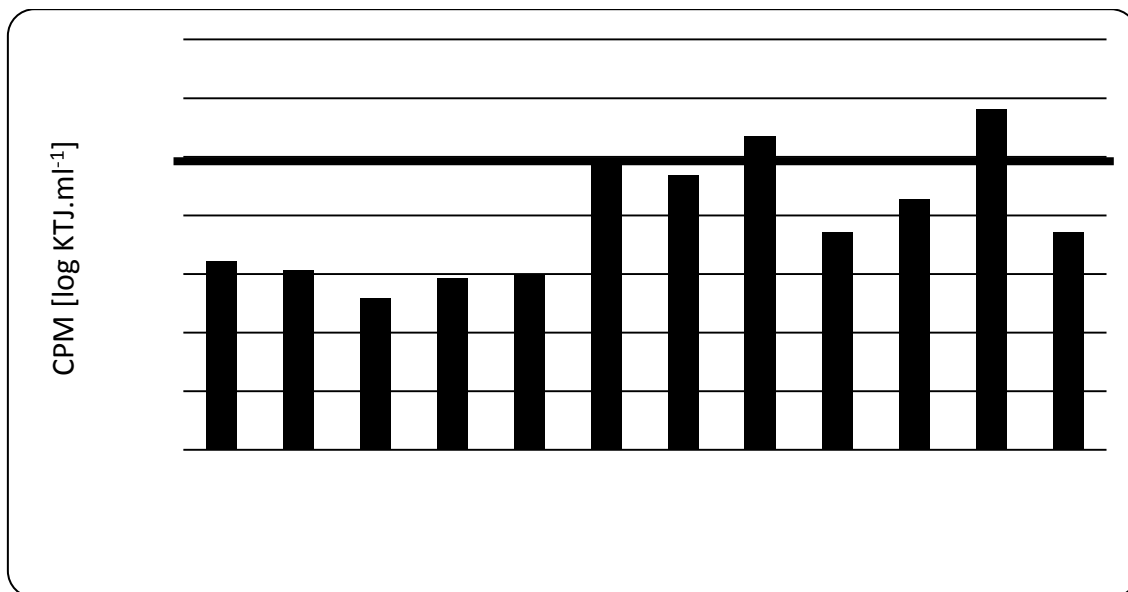
#### Materiál a metódy

Z mliečnych automatov okresného mesta sa odoberali vzorky 2 až 3-krát mesačne. Vzorky boli odobraté v podmienkach spotrebiteľského nákupu. Po transporte na Katedru hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov sa odobraté vzorky vyšetřili štandardnou zried'ovacou kultivačnou metódou. Celkový počet mikroorganizmov sa stanovoval na médiu GTK agar (*HiMedia Laboratories*, India) kultiváciou pri teplote  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 72 hodín. Počty koliformných mikroorganizmov sa zisťovali kultiváciou na VRB agare (*HiMedia Laboratories*, India) pri teplote  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 72 hodín a počty mikroorganizmov čeľade *Enterobacteriaceae* sa zisťovali kultiváciou na VRB s

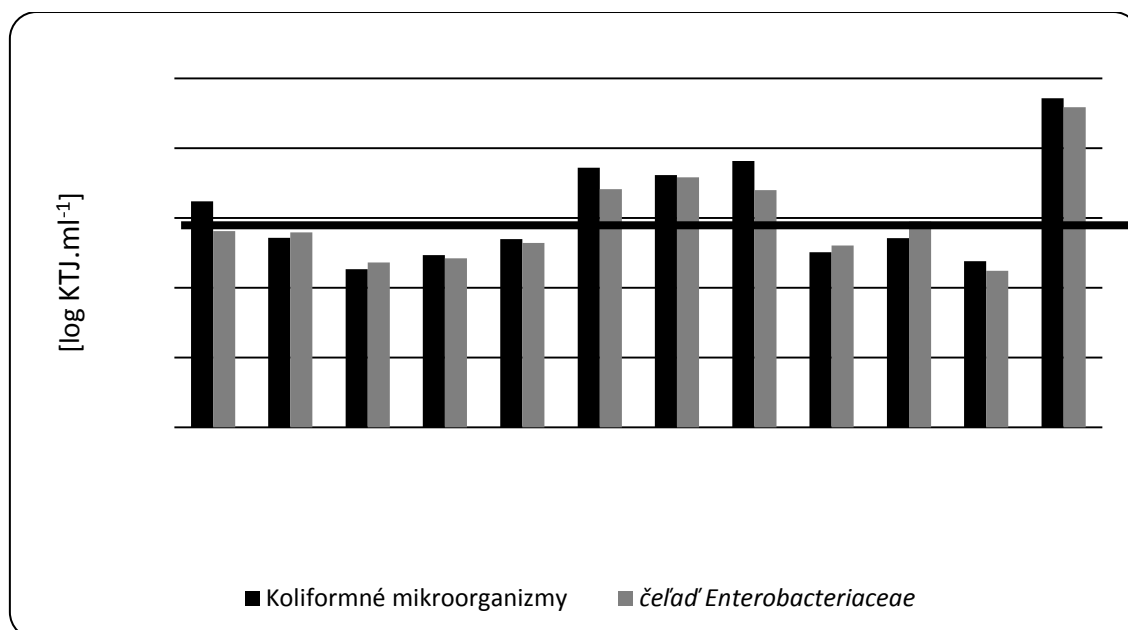
glukózou agare (*HiMedia Laboratories*, India) pri teplote  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  po dobu 72 hodín. Z výsledkov získaných za mesiac sa vypočítal aritmetický priemer.

### Výsledky a diskusia

Geometrický priemer CPM za rok 2010 v odoberaných vzorkách mlieka dosiahol hodnotu  $5,67 \cdot 10^4 \text{ KTJ} \cdot \text{ml}^{-1}$ . V mesiacoch august a november sa zistili CPM vyššie ako stanovuje príslušná legislatíva. Avšak pri výpočte kľzavého geometrického priemeru CPM aj v týchto mesiacoch v mlieku nebol prekročený max. stanovený limit pre túto skupinu mikroorganizmov.



Obrázok 1: Celkový počet mikroorganizmov v mlieku z mliečnych automatov v priebehu roka 2010



Obrázok 2: Počty koliformných mikroorganizmov a čeľade *Enterobacteriaceae* v mlieku z mliečnych automatov v priebehu roka 2010

V piatich mesiacoch roka (čo predstavuje 34,5 %) prekročili počty koliformných mikroorganizmov limit 1000 KTJ.ml<sup>-1</sup>. Najväčšie problémy sa vyskytli počas letných mesiacov, čo zrejme súvisí s vyššími teplotami v tomto období, a teda aj vhodnejšími podmienkami pre rozmnožovanie baktérií čeľade *Enterobacteriaceae* vrátane koliformných mikroorganizmov. Práve v týchto mesiacoch by mali výrobcovia mlieka venovať zvýšenú pozornosť hygiene získavania mlieka.

### **Záver**

Získané výsledky poukazujú na dostačujúcu mikrobiologickú kvalitu mlieka ponúkaného v reťazcoch mliečnych automatov. Napriek týmto zisteniam treba však aj naďalej klásť dôraz ako uvádzajú výrobcovia mlieka na podmienky použitia mlieka pred konzumáciou a to mlieko dostatočne dlho nechať prejsť varom pred samotným požitím.

### **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.bezekova@gmail.com

## Aktivita vody u balených bezlepkových pekárenských výrobků

### Water activity of packed gluten-free bakery products

Vlášek Václav, Hanák Miroslav, Klepáčová Alena, Štencl Jiří

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

#### Summary

*Water activity is an important parameter, which shows the availability of water in the food for microorganisms. Most bacteria that cause food spoilage are not able to grow at water activity below 0,90, yeasts sub 0,87, and moulds under 0,60. Water activity at normal baking range in values around 0,93 and therefore this product is a subject to market discipline. The use of packaging and modified atmosphere on these products significantly extends their life and form a barrier against external contamination.*

*In the present work the first objective measurement of water activity and dry matter content of selected bakery products, gluten-free, packed from the manufacturer in a modified atmosphere and determine whether the storage expose to the water activity of the product so closed, the second objective was to verify whether products and the last day warranty period will be no appearance fungi. The resulting measurements showed that water activity during storage varies within  $\pm 0,02 - 0,04$ . However, only a single product with a water activity greater than 0,90 was visually moulds not.*

**Keywords:** *water activity; bakery products; modified atmosphere; fungi*

#### Úvod

Pekařské výrobky, jsou výrobky, které se snadno mikrobiálně kazí a to zejména díky vysoké vnitřní relativní vlhkosti (aktivitě vody), která pochází zejména z fyzikálních a chemických reakcí (Smith, 2004). Aktivita vody se u pekárenských výrobků pohybuje kolem hodnoty 0,93 u metod manometrických (Barbosa-Cánovas, 2007). Vodní aktivita determinuje možnosti růstu mikroorganismů. Většina bakterií, které způsobují mikrobiální kažení potravin není schopna růst při aktivitě vody pod 0,90, kvasinky pod 0,87 a plísně pod 0,60 (Smith, 2011). K zabránění mikrobiální kontaminace z vnějšího prostředí se proto využívají obaly a pro potlačení jejich rozvoje modifikovaná atmosféra jako náplň, kdy při vhodné kombinaci plynů a jejich poměru lze výrazně prodloužit trvanlivost výrobku (Fernandez, 2006).

#### Materiál a metody

Pro měření byly použity vzorky pekařských výrobků zabalených od výrobce v modifikované atmosféře složené z oxidu uhličitého a dusíku. Běžné pekařské výrobky, byly zastoupeny bezlepkovým chlebem, bezlepkovým chlebem s dýňovými semeny a bezlepkovými bagetkami, jako nestandardní výrobky byly pro porovnání zahrnuté plněné taštičky, muffiny a marlenka. Vzorky v obalech byly standardně uloženy při teplotě 20 °C v místnosti laboratoře, skryté před přímým slunečním svitem. Před otevřením obalu vždy proběhlo vizuální posouzení, zda výrobek neprojevuje přítomnost plísně. Manometrické měření aktivity vody probíhalo za nastavených teplot na hodnoty 10 °C a 20 °C, s grafickým záznamem za pomoci softwaru. Měření probíhalo v rámci 4 měsíců a vzorky byly odebrány vždy po otevření obalu a okamžitě analyzovány. Pro objektivnosti výzkumu vždy probíhalo měření minimálně třikrát pro

každou teplotu a pro kůrku a střídku zvlášť. Zároveň s tímto pobíhalo stanovování sušiny na gravimetrických vahách.

### Výsledky

Při měření hodnot aktivity vody v průběhu skladování, se výsledná hodnota pro daný výrobek v průběhu celého měření měnila v rámci  $\pm 0,02 - 0,04$  (v rámci buď kůrky, nebo střídky). U bezlepkového chleba bylo při 10 °C naměřeno průměrné snížení hodnoty vodní aktivity u střídky z 0,953 na 0,948 a při teplotě 20 °C z 0,958 na 0,951. Obsah sušiny byl stanovován gravimetricky. U střídky došlo ke zvýšení z 64,12% na 66,13%. U kůrky stejného výrobku bylo zaznamenáno zvýšení aktivity vody při teplotě 10 °C z 0,946 na 0,949 a při 20 °C z hodnoty 0,938 na 0,949 s mírně klesající sušinou z 69,92% na 68,48%. U nestandardního pekařského výrobku Muffin, se hodnota aktivity vody měnila u střídky při teplotě 10 °C z 0,828 na hodnotu 0,797 a při 20 °C z hodnoty 0,826 na 0,788, při snížení obsahu sušiny z 82,20% na 80,64%. U měření vodní aktivity kůrky se tato hodnota měnila při 10 °C z 0,818 na 0,787 a při 20 °C z hodnoty 0,812 na 0,785. Sušine u tohoto výrobku se zvýšila z hodnoty 82,54% na 83,36%.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty aktivity vody a sušiny

Vzorek	Teplota 10 °C	Teplota 20 °C	Sušina [%]
Chléb – Kůrka	0,948	0,941	69,84
Chléb – Střídky	0,950	0,954	65,13
Chléb s dýní – Kůrka	0,943	0,935	76,16
Chléb s dýní – Střídky	0,943	0,946	66,73
Bagetka – Kůrka	0,945	0,948	69,25
Bagetka – Střídky	0,949	0,943	65,51
Taštička – Kůrka	0,919	0,924	75,23
Taštička – Střídky	0,926	0,932	72,88
Muffin – Kůrka	0,801	0,796	83,01
Muffin – Střídky	0,812	0,806	81,38
Marlenka – Povrch	0,679	0,682	89,65
Marlenka – Průřez	0,712	0,736	84,32

Při hodnocení, zda-li se na výrobku objevila plíseň, se krom jednoho chlebu, objevila plíseň na všech pekárenských výrobcích s aktivitou vody nad 0,90, které byly zabalené a ještě před vypršením záruční lhůty. U výrobků s aktivitou vody pod 0,90, kterými byly Marlenka a Muffiny, se plíseň na zabalených výrobcích neobjevila vůbec.

### Diskuse a závěr

Aktivita vody u vzorků byla poměrně stálá a vnitřní vliv potraviny na její kolísání měl malý dopad, což dokazuje, že možnost udržet v potravině stálou aktivitu vody lze i u konečného spotřebitele poměrně dlouho, jak potvrzuje i výzkum publikovaný v roce 2004 (Smith, 2004). Ovšem v obalu před koncem trvanlivosti výrobku dochází k viditelnému rozrůstání plísní, které mají schopnost růst při aktivitě vody nad 0,60 a tedy pokud by výrobky byly bez bariérové ochrany, pak by měly podlehnout zkáze všechny a daleko dříve (Smith, 2011). Využití bariérové ochrany, v podobě modifikované atmosféry, zabránilo rozvoji plísní u výrobků, které měly aktivitu vody



v hodnotách pod 0,90. Naopak u skupiny vzorků, u kterých hodnota aktivity vody přesáhla tuto hranici, se vyskytl jen jeden ze vzorků bezpečkového chleba, který nebyl viditelně znehodnocený plísní v den konce záruční lhůty. Toto může vést k domněnce, že pro dané výrobky nebyly použity vhodné obaly výrobcem, či vhodná kombinace plynů použitých při balení, což by souhlasilo s výzkumem publikovaným v roce 2006 (Fernandez, 2006) nebo že výrobce udává trvanlivost, jež není jeho pekařský výrobek schopen dosáhnout.

#### **Poděkování**

Práce vznikla v rámci výzkumného záměru MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

#### **Literatura**

SMITH, PG. *Introduction to Food Process Engineering*. 2.vyd. New York : Springer, 2011. s. 529. ISBN 978-1-4419-7661-1.

SMITH, J.; DAIFAS, D.; EL-KHOURY, W.; KOUKOUTSIS, J.; EL-KHOURY, A. Shelf Life and Safety Concerns of Bakery Products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2004. vol. 44, no. 1, s. 19-55.

BARBOSA-CÁNOVAS, GV.; FONTANA, AJ.; SCHMIDT, SJ.; LABUZA, TP. *Fundamentals and Applications*. 1.vyd. Iowa : John Wiley & Sons, 2007. s. 465. ISBN: 978-0-8138-2408-6.

FERNANDEZ, U.; VODOVOTZ, Y.; COURTNEY, P.; PASCALL, MA. Extended shelf life of soy bread using modified atmosphere packaging. *Journal of Food Protection*. 2006. vol. 69, issue. 3, s. 693-698.

**Kontaktní adresa:** Václav Vlášek, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, vlasek.v@centrum.cz

## Metody ověřování deklarovaných údajů na obalu medu Methods of verification the declared data at the packaging of honey

<sup>1</sup>Vlkovič Daniel, <sup>1</sup>Vorlová Lenka, <sup>2</sup>Přidal Antonín

<sup>1</sup>Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Oddělení včelařství Mendelovy univerzity v Brně

### Summary

*Our legislation gives to producers the obligation to label certain information such as type of honey and geographical origin. With this closely relate the problem of honey labelling. How precisely producers fulfilled what the labels indicate, was the main purpose of this study. The work was focused to evaluation of honey, their type and geographical origin through pollen analysis and optical rotation of carbohydrates. At the all samples were also determined an electrical conductivity, which complemented the previous analysis and enabled a complex overview of the honey quality. The resulting quality of honey was eventually compared depending on whether at the label was stated the private name or company name.*

**Keywords:** labelling; pollen analysis; optical rotation

### Úvod

Po vstupu ČR do Evropské unie se také otevřel i obchod s medem. Není tedy divu, že si dnes zákazník může vybrat z široké škály jak domácích, tak zahraničních medů v různé cenové relaci a kvalitě. Členění, možnosti označení medu a limity fyzikálně-chemických parametrů upravuje vyhláška Mze č. 76/2003 Sb., ve znění pozdějších úprav. Elektrická vodivost se svým limitem maximálně 80 mS/m pro květové medy a minimálně 80 mS/m pro medovicové medy je jediným parametrem pro zařazení medů do těchto skupin. Takovéto rozdělení lze s přesností určit jen skrz víceparametrovou analýzu (Přidal *et al.*, 2011). Především stanovení optické rotace sacharidů před a po inverzi je příhodnou metodou pro doplnění elektrické vodivosti (Dinkov, 2003). Dalším údajem na etiketě, který lze velmi těžce ověřit je země původu. V tomto případě můžeme využít pylovou analýzu (Ohe *et al.*, 2004). Geografické označení upravuje i Norma Jakosti č. ČSV 1/1999 – Svazová norma Český med, která má za úkol odlišit medy české provenience a vyzdvihnout jejich kvalitu (Podniková norma, 2003).

### Materiál a metodika

Analýzy zahrnovaly 14 vzorků získaných ze specializovaných prodejen v centru Brna (včelařské prodejny, prodejny zdravé výživy a specializované prodejní stánky). U vzorku byla stanovena elektrická vodivost a optická rotace sacharidů a to dle harmonizovaných metod Evropské komise pro med (Bogdanov *et al.*, 1997) v laboratořích Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Mikroskopická analýza byla provedena dle harmonizovaných metod (Ohe *et al.*, 2004). Kvantitativní pylová analýza byla upravena v podmínkách včelařské laboratoře na Mendelově univerzitě v Brně.

### Výsledky a diskuse

Elektrická vodivost je důležitý fyzikálně-chemický parametr pro ověření, zda se jedná o medovicový nebo květový med (Kaškonienė *et al.*, 2010). Medy byly podle údajů na etiketě rozděleny na květové a medovicové nebo lesní. Elektrická vodivost je velmi dobrým kritériem pro určení botanického původu medu, a proto je velmi často

používána v rutinní kontrole (Mateo and Bosch, 1998). Hodnoty vodivosti se pohybovaly v rozmezí od 11 do 44,6 mS/m u květových medů a od 11,6 po 96,2 mS/m u medů medovicových nebo lesních. Především výsledky u medovicových, lesních medů poukázaly na problém absence legislativního ošetření slova lesní. Jeden ze vzorků s označením „lesní-horský“ dosáhl vodivosti pouze 11,6 mS/m.

Mikroskopická analýza je soubornou analýzou zahrnující kvalitativní a kvantitativní analytickou část. Pouze kombinací těchto dvou částí lze vytvořit ucelený pohled na vzorek medu (Přidal, 2005). Podle spektra pylových zrn a případného obsahu medovicových prvků může ověřit deklarované údaje o geografickém a botanickém původu medu. Pylová analýza je rovněž metodou pro stanovení typu medu. Zvlášť velký význam má tehdy, když vodivost medu je v přechodových pásmech mezi jednotlivými základními typy medu. Pylová analýza je významná zejména při exportu a importu medu. V některých státech je toto hledisko jedním z rozhodujících při určování ceny medu a posouzení jeho případného porušení. Ze 14 zkoušených vzorků vyhověly bez výhrad jen 3 vzorky (21 %). U 3 vzorků (21) chyběl nebo byl nesprávně uveden geografický původ. Nejčastějším nedostatkem při označování medu v prodejnách je neoznačení typu medu. Takto bylo uvedeno pouze u 5 vzorků (36 %). Výrobci mají tendenci totiž tato označení nahrazovat alternativami, proto se velmi často používají slova, jako např. „luční“, „horský“ či dokonce „lesní“. Spotřebitel však nemůže z těchto názvů zjistit, o jaký typ medu jde. Tato chybovost pramení z neurčitosti evropské legislativy, která při označování zcela opomíjí existenci medů květovomedovicových, které vedle květových a medovicových vznikají jako přírodní směsi obou při souběžném výskytu obou typů snůšek (Přidal, 2005). Problematika nekomplexnosti evropských směrnic pro hodnocení medu je připomínána i v jiných členských zemích EU (Dustmann, 2002).

Optická rotace využívá schopnosti cukrů stáčet rovinu světla. Výsledné otočení závisí na koncentraci jednotlivých sacharidů (Bogdanov *et al.*, 2004). Květové medy mají v převaze levotočivou fruktózu (specifická optická otáčivost fruktózy je  $[\alpha]_D^{20} = -92,4^\circ$ ) nad pravotočivou glukózou (glukóza vykazuje kladné hodnoty hodnoty  $[\alpha]_D^{20} = +52,7^\circ$ ) a proto jsou květové medy levotočivé. Naopak medy medovicové mají v převaze pravotočivé sacharidy (např. glukóza, melicitóza aj.), a proto stáčí rovinu polarizovaného světla doprava před i po inverzi. Medy smíšené mají optickou otáčivost různou (Dinkov, 2003; Přidal, 2005). Pravotočivé medy mívají vždy převahu medovicového medu, ačkoliv ne vždy je splněn limit pro elektrickou vodivost a obsah medovicových prvků (Přidal and Vorlová, 2002). Hodnoty vzorků nabývaly hodnot od -17 po +14,6. Po stanovení optické otáčivosti po inverzi, 3 vzorky, jejichž vodivost byla 79,2, 78,3 a 69,5 mS/m, vykazovaly pravotočivost a mohly by být označeny jako květovomedovicové, byť vodivostí nedosahovaly legislativního limitu. Jeden vzorek označený jako „lesní-horský“ s vodivostí 11,6 mS/m měl stejnou optickou otáčivost jako květové medy.

### Závěr

Pylová analýza a optická rotace sacharidů jsou společně s elektrickou vodivostí důležitými částmi komplexního rozboru medu. U několika vzorků nebyly splněny požadavky na kvalitu, což potvrdily i fyzikálně chemické parametry. Mikroskopická analýza zkoumaných prokázala nesprávné označení botanického původu medů a geografického označení. Je tak potřebnou součástí při hodnocení a zkoušení medů. Při kontrole správnosti označování 14 vzorků medů z tržní sítě specializovaných prodejen

Brna bylo možné zřetelně prokázat, že odborný výraz „medovicový“ bez legislativní specifikace slova „lesní“ a legislativou ignorovaná kategorie medů „květovomedovicových“ nemůže účinně zabránit nesprávnosti, nejednotnosti a jisté nekalosti prodejců při označování medu. Výsledky naznačují, že spotřebitel se nemůže zcela spoléhat na to, že ve specializovaných prodejnách nakoupí vždy med řádně označený a co nejvyšší kvality, i když ve většině ostatních případů lze v takových prodejnách zajistit vzorky s vysokou nebo nejméně střední kvalitou dle normovaných požadavků.

Při hodnocení celkové kvality se prokázalo, že medy, které na etiketě uvádějí jméno a příjmení mají vyšší kvalitu a bez problému splňují limity legislativních parametrů. Na druhou stranu medy, které uvádějí na etiketě jako výrobce jméno společnosti ve více než 27 % nesplňují jeden nebo častěji 2 legislativní parametry (aktivitu diastázy a obsah hydroxymethylfurfuralu). Lze tedy říci, že jméno výrobce na etiketě je zárukou vyšší kvality medu.

#### **Poděkování**

Práce vznikla za finanční podpory Interní grantové agentury VFU Brno IG202342 a výzkumného záměru MSM 6215712402 „Veterinární aspekty bezpečnosti a kvality potravin“.

#### **Literatura**

- BOGDANOV, S., MARTIN, P., LÜLLMANN, C. Harmonised methods of the European honey commission. *Apidologie Extra issue*, 1997, p. 1-59.
- BOGDANOV, S., RUOFF, K., ODDO, L., P. Physico-chemical methods for the characterisation of unifloral honeys: review. *Apidologie*, 2004, vol. 35, p. S4-S17.
- DINKOV, D. A scientific note on the specific optical rotation of three honey types from Bulgaria. *Apidologie*, 2003, vol. 34, no. 3, p. 319-320.
- DUSTMANN, J. H. Honig im Blickfeld der EU. Anmerkungen zur neuen Honig-EU-Richtlinie. *Deutsches Bienen Journal*, 2002, vol. 11, no. 9, p. 357-359.
- KAŠKONIENĖ, V., VENSKUTONIS, P. R., ČEKSTERYTĖ, V. Carbohydrate composition and electric conductivity of different origin honeys from Lithuania. *LWT – Food Science and Technology*, 2010, vol. 43, no. 5, p. 801–807.
- MATEO, R., BOSCH-REIG, F. Classification of Spanish unifloral honeys by discriminant analysis of electrical conductivity, color, water content, sugars and pH. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1998, vol. 46, p. 393–400.
- ODDO, L. P., PIRO, R. Main European unifloral honeys: descriptive sheets. *Apidologie*, 2004, vol. 35, (suppl.1), p. S38-S81.
- OHE W. von der, ODDO L. P., PIANA M. L., MORLOT M., MARTIN P. Harmonized methods of melissopalynology. *Apidologie*, 2004, vol. 35, (suppl.1), p. S18-S25.
- PODNIKOVÁ NORMA: Český med, Norma jakosti č. ČSV 1/1999. *Včelařství*, 2003, vol. 56, no. 10, p. 258-259.
- PŘIDAL, A. *Včelí produkty – cvičení*. dotisk 1. vyd. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2005. 61 s.
- PŘIDAL, A., VLKOVIČ, D., VORLOVÁ, L. Kvalita a označování medu ze specializovaných obchodů Brna. In JŮZL, M. -- NEDOMOVÁ, Š. -- BUBENÍČKOVÁ, A. *Sborník příspěvků XXXVII. Semináře o jakosti potravin a potravinových surovin - Ingrovy dny*. 1. vyd. Poire s.r.o., Brno: Mendelova univerzita v Brně, 2011, s. 234-244. ISBN 978-80-7375-495-2.
- PŘIDAL, A., VORLOVÁ, L. Honey and its physical parameters. *Czech Journal of Animal Science*, 2002, vol. 47, no. 10, p. 439-444.

**Kontaktní adresa:** Daniel Vlkovič, Mgr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, danielvlkovic@gmail.com

## Technologické vlastnosti vybraných laktobacilov majúcich antimikrobiálnu aktivitu

### Technological properties of selected lactobacilli with antimicrobial activity

Smetanková Jana, Hladíková Zuzana, Greif Gabriel, Greifová Mária

*Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava*

#### Summary

*The aim of this work was to study technological properties of lactobacilli with antimicrobial activity. We studied their ability to grow in broth at different cultivation temperatures, pH values and concentrations of NaCl, reduction of nitrate, proteolytic and lipolytic activity, production of organic acids in milk, antibiotic resistance and production of biogenic amines.*

**Keywords:** *lactobacilli; technological properties; proteolytic activity; antibiotic resistance; biogenic amines*

#### Úvod

Vďaka svojim antimikrobiálnym vlastnostiam sú laktobacily súčasťou doplnkových kultúr. Cieľom ich použitia je zabezpečenie zdravotnej neškodnosti a teda biokonzervácia potravín. Aby mohli byť laktobacily s preukázanou aktivitou voči nežiaducej mikroflóre použité ďalej v praxi, je potrebné overiť ich technologické vlastnosti ako napríklad prežívanie v špecifických podmienkach výroby jednotlivých potravinárskych produktov, teda ich schopnosť rastu pri rôznych teplotách, pri rôznej koncentrácii NaCl a rôznej hodnote pH. Významnou je tiež tvorba organických kyselín v mlieku, ktoré zabezpečujú jeho prekysávanie. Keďže viaceré laktobacily sú schopné prenosu antibiotickej rezistencie na patogénne baktérie, je dôležité pozorovať u skúmaných kmeňov aj tento parameter. Ďalšou nežiaducou vlastnosťou je tvorba biogénnych amínov. Naopak žiadanou je proteolytická a lipolytická aktivita laktobacilov, ktorá prispieva k tvorbe arómy a chuti počas zrenia syrov.

#### Materiál a metódy

Testované mikroorganizmy: *Lactobacillus brevis*, *Lb. helveticus*, *Lb. fermentum*, *Lb. plantarum*, *Lb. buchneri* a *Lb. Paracasei* (izoláty z bryndze, VÚP Bratislava)

Kultivačné médium: MRS bujón (MERC, Darmstadt), UHT mlieko (nízkotučné)

#### **Ciele práce:**

Sledovanie tolerancie k rôznym teplotám (15 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C, 45 °C), k rôznej hodnote pH (5,7; 9) a k rôznym koncentráciám NaCl (2 %, 4 %, 6,5 %) v bujóne[1].

Sledovanie proteolytickej a lipolytickej aktivity [2].

Sledovanie redukcie dusičnanov [3, 4].

Sledovanie tvorby organických kyselín v odtučnenom mlieku metódou HPLC RID.

Sledovanie antibiotickej rezistencie [5].

Sledovanie tvorby biogénnych amínov [6].

#### Výsledky

Rast laktobacilov v rôznych podmienkach bol pozorovaný statickou aeróbnou kultiváciou v MRS bujóne, pri teplotách 25 °C, 30 °C, 37 °C a 45 °C po 72 h a pri

teplote 15 °C po 168 h. Pri pozorovaní rastu laktobacilov v MRS bujóne s rozličnými hodnotami pH a koncentraciami NaCl sa testované laktobacily kultivovali pri teplote 37 °C po dobu 72 h. Po uplynutí potrebného času bol klasifikovaný rast na základe záznamu vyrastenej biomasy. Namerané výsledky sú zhrnuté v tabuľke 1.

Tabuľka 1: Rast laktobacilov v rôznych kultivačných podmienkach

Vzorka MO	Teplota (°C)					pH		Koncentrácia NaCl (%)		
	15	25	30	37	45	5,7	9	2	4	6,5
<i>Lb. brevis</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	+	-	-
<i>Lb. helveticus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
<i>Lb. fermentum</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
<i>Lb. plantarum</i>	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-
<i>Lb. buchneri</i>	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+	-
<i>Lb. paracasei</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

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

Proteolytická aktivita sa potvrdila vytvorením zóny okolo pozorovaných kmeňov naočkovaných na MRS agar obohatený 10 %-ným prídavkom sušeného mlieka (Tabuľka 2). Lipolytická aktivita nebola pozorovaná. Po 24 h kultivácii v bujóne s prídavkom KNO<sub>3</sub> iba *Lb. plantarum* nerudukoval dusičnany a ostatné laktobacily ich redukovali až na NH<sub>3</sub>.

Tabuľka 2: Veľkosť zón vytvorených proteolytickou aktivitou testovaných laktobacilov na MRS agare

Vzorka MO	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. helveticus</i>	<i>Lb. fermentum</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lb. buchneri</i>	<i>Lb. paracasei</i>
Plocha zóny (cm <sup>2</sup> )	4,7	4,2	6,3	4,4	6,4	4,4

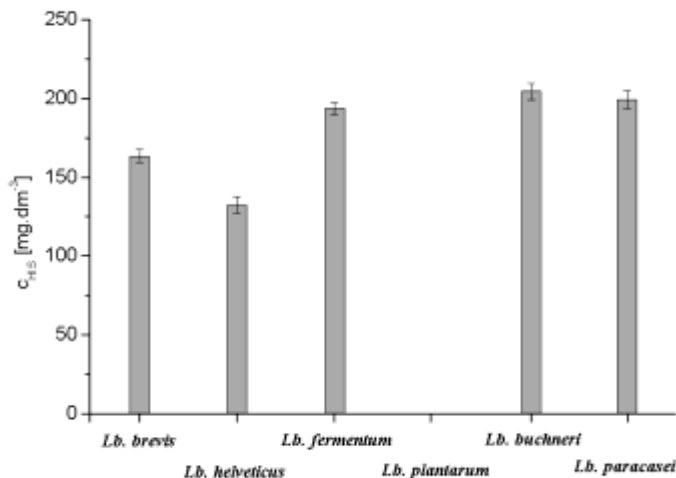
Nutnou podmienkou kultúr s potenciálnym využitím na výrobu mliečnych produktov je ich schopnosť prekysávať mlieko. Prekysávanie bolo pozorované v nízkotučnom UHT mlieku počas 52 hodín. Zo získaných údajov bol vytvorený fermentačný profil jednotlivých laktobacilov. Množstvo vyprodukovaných kyselín po skončení procesu je uvedené v tabuľke 3.

Tabuľka 3: Kysacia schopnosť laktobacilov - tvorba organických kyselín v mlieku

Vzorka MO	Kys. mliečna [g.kg <sup>-1</sup> ]	Kys. jantárová [g.dm <sup>-3</sup> ]	Kys. octová [g.dm <sup>-3</sup> ]	Laktóza [g.kg <sup>-1</sup> ]	pH	
	V čase 0 h					
	ND	ND	ND	43,13	6,46	
V čase 52 h						
<i>Lb. brevis</i>	17,85	0,35	1,18	23,22	3,43	
<i>Lb. helveticus</i>	16,73	0,67	0,65	23,47	3,47	
<i>Lb. fermentum</i>	3,44	0,65	1,29	39,97	4,89	
<i>Lb. plantarum</i>	17,10	0,71	1,27	23,94	3,58	
<i>Lb. buchneri</i>	15,52	0,66	1,26	24,23	3,70	
<i>Lb. paracasei</i>	13,58	0,69	1,32	26,12	3,76	

Antibiotická rezistencia laktobacilov bola sledovaná použitím diskov napustených jednotlivými antibiotikami o presnej koncentrácii. Všetky laktobacily boli rezistentné iba na nalidixovú kyselinu. Gentamicín inhiboval rast *Lb. brevis* a vankomicín rast *Lb. brevis* a *Lb. helveticus*. Rezistencia na netilmicín sa prejavila u *Lb. fermentum* a *Lb. buchneri*. *Lb. paracasei* bol rezistentný tiež voči ceftriaxonu.

Všetky testované laktobacily s výnimkou *Lb. plantarum* tvorili histamín. Tyramín netvorili vôbec (Graf 1).



Graf 1: Obsah histamínu produkovaný laktobacilmi izolovanými z bryndze v MRS bujóne po 48 h anaeróbnej kultivácii pri 37 °C

### Záver

Vo všeobecnosti možno konštatovať, že testované laktobacily majú dobrú schopnosť prežívať v rôznych podmienkach kultivácie s výnimkou vysokého obsahu soli (6,5 %). Preukázali proteolytickú aktivitu a schopnosť redukovať dusičnany až na NH<sub>3</sub> (okrem *Lb. plantarum*, ktorý ich vôbec neredukoval). Prekysávanie mlieka bolo u všetkých laktobacilov dobré. U niektorých kmeňov bola dokázaná antibiotická rezistencia a u všetkých laktobacilov s výnimkou *Lb. plantarum* aj tvorba histamínu. Z výsledkov vyplýva, že vďaka svojim technologickým vlastnostiam je najvhodnejším kmeňom pre aplikáciu vo výrobe *Lb. plantarum*.

### Pod'akovanie

Práca bola podporená projektom APVV 07/0158.

### Literatura

1. KASK, S., ADAMBERG, K., ORŁOWSKI, A., VOGENSEN, F. K., MØLLER, P. L., ARDÖ, Y., PAALME, T.: Physiological properties of *Lactobacillus paracasei*, *L. danicus* and *L. curvatus* strains isolated from Estonian semi-hard cheese. Food Research International, 2003, vol. 36, s. 1037-1046.
2. ESSID, I., MEDINI, M., HASSOUNA, M.: Technological and safety properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from a Tunisian traditional salted meat. Meat Science, 2009, vol. 81, s. 203-208.
3. BETINA, V. a kol.: Mikrobiologické laboratórne metódy. Alfa Bratislava, 1987. 544s.
4. STN ISO 7932 (560092). Mikrobiológia. Všeobecné pokyny na stanovenie počtu baktérií *Bacillus cereus* – metóda počítania kolónií kultivovaných pri 30°C. 1998.
5. CEBECI, A., GÜRAKAN, C.: Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiology, 2003, vol. 20, s. 511 – 518.
6. GREIF G., GREIFOVÁ M., DRDÁK M.: Stanovenie biogénnych amínov v potravinách živočíšneho pôvodu metódou HPLC. Potr. Vědy, 1997, vol. 15, s. 119-129.

**Kontaktná adresa:** Jana Smetanková, Ing., Ústav biotechnológie a potravinárstva, Oddelenie potravinárskej technológie, FCHPT STU Bratislava, Radlinskáho 9, 812 37 Bratislava 1, jana.smetankova@stuba.sk

## Ochranná funkcia metabolických produktov *Pediococcus* sp. voči vybraným nežiaducim mikroorganizmom

### Protective function of metabolic products of *Pediococcus* sp. against chosen spoilage microorganisms

Hladíková Zuzana, Smetanková Jana, Greif Gabriel, Greifová Mária

Fakulta chemickej a potravinárskej technológie, Slovenská technická univerzita, Bratislava

#### Summary

The purpose of this study was to evaluate protective function of *Pediococcus* sp. isolated from Slovak traditional cheep cheese. Production of organic acids was monitored by HPLC/RID method in broth and milk. The next step was investigation the antimicrobial activity against chosen spoilage microorganisms.

**Keywords:** *Pediococcus* sp.; organic acids; phenyllactic acid; antimicrobial activity

#### Úvod

V súčasnosti sa v odbornej literatúre stretávame s rôznymi diskusiami o praktickom využití kyslomliečnych baktérií (KMB) vďaka ich významným vlastnostiam. Ochranná funkcia produktov metabolizmu KMB sa uplatňuje pri konzervácii potravín. Konzervačný efekt je spôsobený hlavne redukciou pH prostredia pomocou vyprodukovaných kyselín ako je kyselina mliečna, kyselina octová, kyselina jantárová, kyselina fenylmliečna, kyselina propionová, kyselina kaprónová a i. a tiež tvorbou ďalších antimikrobiálnych látok vrátane bakteriocínov.

Baktérie z rodu *Pediococcus* patria medzi významné homofermentatívne baktérie mliečneho kysnutia. Ich hlavným metabolitom pri fermentácii sacharidov je racemická (DL) a pravotočivá  $L(+)$  kyselina mliečna. Sú zložkou bakteriálnych kultúr (štartérov) používaných vo fermentačnom procese (1).

#### Materiál a metódy

Študovaný mikroorganizmus: *Pediococcus* sp., vyzolovaný z ovčieho hrudkového syra (VÚP, Bratislava)

Kultivačné médium: MRS bujón (MERCK, Darmstadt), UHT mlieko (nízkotučné)

Indikátorové baktérie: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*

Indikátorové mikroskopické vláknité huby: *Aspergillus flavus*, *Fusarium nivale*, *Mucor racemosus*, *Penicillium funiculosum*, *Rhizopus oryzae*, *Alternaria alternata*

Tvorba organických kyselín: metóda HPLC UV/RID (2)

Antimikrobiálna aktivita: dvojvrstvová difúzna metóda podľa Magnussona (3)

#### Výsledky a diskusia

Práve produkcia organických kyselín (k. mliečna, k. octová, k. mravčia, k. kaprónová, k. propiónová, k. maslová, k. valérová...) sa významnou mierou podieľa na antimikrobiálnej aktivite kyslomliečnych baktérií (4).

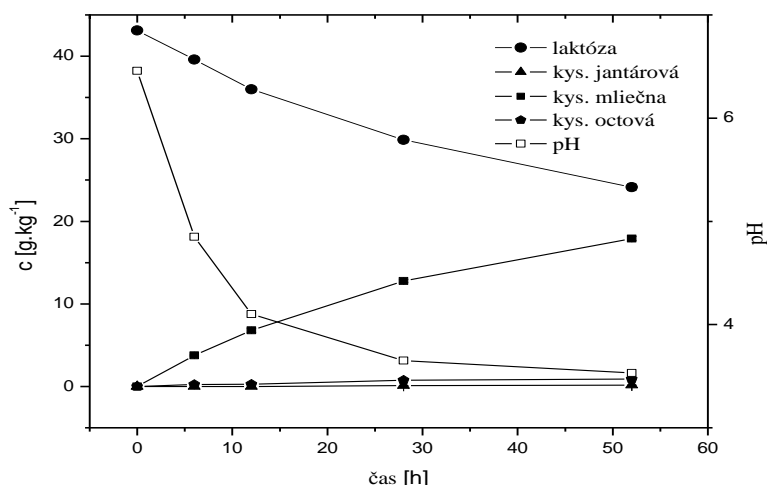
Po 72 hod. stacionárnej kultivácii *Pediococcus* sp. za aeróbných a anaeróbných podmienok sme zistili, že produkoval najviac k. mliečnej za aeróbných ( $15,282 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ )



aj anaeróbných podmienok ( $10,240 \text{ g.dm}^{-3}$ ). Ďalej bola zistená produkcia k. jantárovej ( $0,190 \text{ g.dm}^{-3}/1,042 \text{ g.dm}^{-3}$ ) a k. octovej ( $0,945 \text{ g.dm}^{-3}/2,226 \text{ g.dm}^{-3}$ ) v aeróbných/anaeróbných podmienkach. Za anaeróbných podmienok *Pediococcus* sp. produkoval aj etanol ( $3,739 \text{ g.dm}^{-3}$ ), pričom za aeróbných podmienok etanol netvoril.

Dobrá kysacia schopnosť mlieka súvisiaca s rastom a aktivitou zákysových kultúr je nutná z hľadiska výroby mliekarenských výrobkov. Mlieko musí vytvárať vhodné prostredie pre rast mikroorganizmov, nesmú v ňom byť prítomné žiadne inhibičné látky (1).

Na sledovanie tvorby organických kyselín *Pediococcus* sp. v mlieku boli odobrané vzorky v čase 0; 6; 12; 28 a 52 hod. ich kultivácie pri  $37^\circ\text{C}$  za anaeróbných podmienok a zmeraná ich pH hodnota. Časový priebeh využitia laktózy, tvorba organických kyselín a zmena pH *Pediococcus* sp. počas fermentácie mlieka je znázornená na obrázku 1.



Obrázok 1: Časový priebeh využitia laktózy, tvorby organických kyselín a zmeny pH *Pediococcus* sp. počas fermentácie mlieka za anaeróbných podmienok

Sledovanie produkcie organických kyselín *Pediococcus* sp. v mlieku za anaeróbných podmienok v rozličných časových intervaloch potvrdzuje tvorbu k. mliečnej ( $17,922 \text{ g.kg}^{-1}$ ), k. jantárovej ( $0,9154 \text{ g.kg}^{-1}$ ), a kyseliny octovej ( $0,890 \text{ g.kg}^{-1}$ ), s čím súvisí aj pokles pH hodnôt. V práci bola tiež sledovaná produkcia k. fenylmliečnej v MRS médiu s 0,1 % - ným prídavkom fenylalanínu pri anaeróbnej stacionárnej kultivácii ( $37^\circ\text{C}$ , 72 hod). *Pediococcus* sp. vyprodukoval k. fenylmliečnu v množstve  $49,66 \text{ mg.dm}^{-3}$ .

Pri skúmaní antimikrobiálnych vlastností *Pediococcus* sp. sme zistili, že mal rozdielnu antibakteriálnu, ako aj antifungálnu, aktivitu voči indikátorovým mikroorganizmom. Najväčšia inhibičná zóna po 24 hod. kultivácii *Pediococcus* sp. pri  $37^\circ\text{C}$  bola vytvorená pri *B. subtilis*. Porovnaním inhibičných zón u *E. coli*, *L. monocytogenes* a *P. aeruginosa* možno poznamenať, že tieto baktérie sú približne rovnako citlivé na metabolické produkty *Pediococcus* sp. Najmenej inhibovaný bol rast *S. aureus* a *B. cereus*.

Tabuľka 1: Percento inhibície *Pediococcus* sp. voči indikátorovým baktériám za aeróbných a anaeróbných podmienok

Indikátorový mikroorganizmus	<i>Pediococcus</i> sp.		
		Aeróbné prostredie	Anaeróbné prostredie
<i>Bacillus cereus</i>	% inhibície	8,11	9,85
	Inhibícia	++	+++
<i>Bacillus subtilis</i>	% inhibície	17,78	9,38
	Inhibícia	+++	+++
<i>Escherichia coli</i>	% inhibície	14,07	11,56
	Inhibícia	+++	+++
<i>Listeria monocytogenes</i>	% inhibície	13,38	16,11
	Inhibícia	+++	+++
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	% inhibície	13,16	13,41
	Inhibícia	+++	+++
<i>Staphylococcus aureus</i>	% inhibície	4,33	14,00
	Inhibícia	++	+++

vyjasnená zóna 3 – 9 % plochy Petriho misky (++)  
 vyjasnená zóna nad 9 % plochy Petriho misky (+++)

*Pediococcus* sp. inhiboval za anaeróbných podmienok všetky indikátorové baktérie, pričom najväčší inhibičný účinok prejavil voči *L. monocytogenes* a *S. aureus*. Iba v prípade *E. coli* a *B. subtilis* bola inhibícia väčšia za aeróbných podmienok. Pri sledovaní antifungálnej aktivity *Pediococcus* sp. po 24 hod. kultivácii pri 37 °C nebol pozorovaný žiadny inhibičný účinok voči *A. flavus*, *P. funiculosum* a *R. oryzae*. *Pediococcus* sp. najviac inhiboval rast plesne *A. alternata*, menej *M. racemosus* a *F. nivale*.

### Záver

*Pediococcus* sp. produkoval organické kyseliny za aeróbných i anaeróbných podmienok. Zo všetkých kyselín v najväčšom množstve vyprodukoval k. mliečnu. Najväčší inhibičný účinok prejavil *Pediococcus* sp. voči baktériám *B. subtilis* a výrazne inhiboval rast *E.coli*, *L. monocytogenes* a *P. aeruginosa*. Antifungálny účinok metabolických produktov *Pediococcus* sp. voči šiestim indikátorovým mikroskopickým vláknitým hubám bol potvrdený iba u *F. nivale*, *M. racemosus* a *A. alternata*.

### PodĎakovanie

Práca bola podporená projektom APVV 0158/2007.

### Literatúra

- GÖRNER, F.; VALÍK, L. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. *Malé centrum*. 2004, 528 s.
- GREIF, G.; KRAJČOVÁ, E.; GREIFOVÁ, M.; KAROVIČOVÁ, J. HPLC stanovenie antimikrobiálnych látok produkovaných baktériami mliečneho kysnutia. In: *Sborník prednášiek semináře „Mléko a sýry 2008“*. Praha, 2008, s.75-80. ISBN 978-80-7080-695-1.
- MAGNUSSON, J.; STRÖM, K.; ROSS, S.; SJÖGREN, J.; SCHNÜRER, J. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, vol. 219, s. 129-135.
- HUDÁČEK, J.; ZALÁN, Z.; ŠTĚTINA, J.; CHUMCHALOVÁ, J. Sledování produkce organických kyselin kmény *Lactobacillus* v různých mediích. In: *Sborník přednášek semináře „Mléko a sýry 2006“*. Praha, 2006, s. 234-239. ISBN 80-7080-620-6.

**Kontaktná adresa:** Zuzana Hladíková, Ing., Oddelenie potravinárskej technológie, FCHPT STU Bratislava, Radlinského 9,812 37 Bratislava, zuzana.hladikova@stuba.sk

---

## **Tvorba biofilmu *Staphylococcus epidermidis* na nerezové oceli v mléce a vliv glukózy a chloridu sodného na vývoj biofilmu zprostředkovaného *ica***

### **Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of *ica*-mediated biofilms**

Červinková Dana, Michu Elleni, Jaglič Zoran, Babák Vladimír

Veterinary Research Institute, Brno

#### **Summary**

*Staphylococcus epidermidis* may form biofilms in milk processing plants and secondarily contaminate milk products. In this study we showed that temperatures which are suboptimal for growth and static conditions support the adhesion of *S. epidermidis* in amounts capable of biofilm formation. On the contrary, at temperatures allowing the growth, adhered cells of *S. epidermidis* can be easily washed away from the stainless steel surface when bacteria begin to grow. Further we analyzed the ability of *S. epidermidis* to form a biofilm in milk and the influence of glucose and NaCl on biofilm formation. Biofilm production on stainless steel was investigated at 30 °C in pasteurized milk and in milk containing glucose, NaCl or both glucose and NaCl. Biofilm formation was evaluated by monitoring of colony-forming units (CFU) on stainless chips and by real-time quantitative PCR analysis of the *icaA* transcription. An increase in CFU and *icaA* transcription was observed after 20 h incubation, especially in milk containing glucose and NaCl. NaCl alone was shown to present a greater risk of biofilm development in milk than glucose, but the NaCl/glucose combination represented the highest risk.

**Keywords:** food safety; hygiene; dairy; expression; real-time quantitative PCR

#### **Introduction**

Microorganisms attached to the surfaces of food processing equipment could be a source of secondary contamination of both raw milk and milk products (Flin et al., 1997; Sharma & Annand 2002). These microorganisms can belong to potentially pathogenic species such as staphylococci (Moreto et al., 2003). Staphylococcal biofilm formation is a process consisting of two successive steps, beginning with the initial attachment to a contact surface followed by accumulation of multi-layered cell clusters – intercellular adhesion (Mack, 1999). Polysaccharide intercellular adhesion (PIA) has been described as a major functional component for intercellular adhesion and biofilm accumulation in *S. epidermidis* (Mack, Siemssen, & Laufs, 1992). Synthesis of PIA is encoded by the *icaADBC* (*ica*) operon (Gerke et al., 1998; Heilmann et al., 1996). Expression of *ica* is essential for PIA synthesis and is complexly regulated by other genetic elements (Mack et al., 2004, 2007). The ability of biofilm formation is an important factor involved in pathogenesis of *S. epidermidis* (Vadzvaloo & Otto, 2005) as well as in its surviving in the environment such as food processing plants (Carpentier & Cerf, 1993). During the recent time, *S. epidermidis* has been increasingly recognised in humans as one of the most important opportunistic pathogens of the genus *Staphylococcus*, causing infections in immuno-compromised individuals (Vuong & Otto, 2002).

## Materials and methods

### 1 Bacterial cultures

*S. epidermidis* field isolate SEP 1597 was used in this study. The isolate developed into biofilm in polystyrene microtitration plates according to Cucarella et al. (2001) and possessed the *ica* operon as determined according to Ziebuhr et al. (1997). The biofilm-positive *S. epidermidis* reference strain CCM 7221 and the biofilm-negative *S. epidermidis* reference strain ATCC 12228 were used as control strains.

### 2 Influence of milk temperature and flow on adherence

In nine independent experiments differing in milk temperature (three experiments at each temperature: 6, 22 and 28 °C), the effect of milk flow (velocity  $3.12 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ ) on adherence of SEP 1597 was investigated in comparison with static conditions. CFU of bacteria in the milk was monitored at 0.5, 1, 2, 4 and 6 h. At the same intervals, two chips were taken out, incubated in TSBg and stained with safranin O and processed for evaluation of potential biofilm development.

### 3 Biofilm formation of *S. epidermidis* in milk

The chips were incubated at 12 °C for 2 h in milk inoculated with *S. epidermidis* ( $1.2 - 3.2 \times 10^8$  CFU/ml). After the incubation, the chips were rinsed in phosphate buffered saline (PBS) to wash away non-adhered cells. To quantify the adhered cells, three chips were sonicated and CFU were calculated by triplicate blood agar plate counting. Simultaneously, four chips and 500 µL of milk were processed for isolation of RNA from adhered and planktonic cells. The remaining chips were further incubated in milk, milk with 5% glucose, milk with 5 % NaCl and milk with both 5 % glucose and 5 % NaCl. As a control medium for biofilm formation, TSB containing 0.25 % glucose was also included. The chips were incubated in the indicated medium at 30 °C for 20 h. For the isolation of RNA from biofilm cells, four chips per medium were removed after 20 h of incubation. At the same time, the CFU was determined on three chips as described above. On a genetic level, biofilm formation was evaluated by real-time quantitative PCR analysis of the *icaA* transcription.

## Results and discussion

### 1 Influence of milk temperature and flow on adherence

To determine whether such detachment is under the influence of bacterial growth, we performed experiments involving three different temperatures: 6 °C, which is a milk-handling temperature; 22 °C, which was closely below the growth limited under the conditions used in this study and 28 °C, which supports the growth. Furthermore, to assess the influence of flow, a flow rate of velocity was compared with static conditions. At 6 and 22 °C, the bacterial cells remained attached to the chips in amounts capable of biofilm formation during the whole period (6 h), under both static and dynamic conditions. At these temperatures, the number of planktonic cells (CFU) in the milk did not substantially increase. On the contrary, at 28 °C, a decrease in the adherence occurred after 2 h, but only under dynamic conditions. This was also accompanied with an increased number of planktonic cells in the milk.

### 2 Biofilm formation of *S. epidermidis* in milk

The results clearly indicated that *icaA* expression increased after 20 h of incubation at 30 °C in isolate SEP 1597 and all the tested media. In isolate SEP 1597, the presence of glucose in milk enhanced the expression of *icaA* in comparison with milk alone. However, NaCl has been shown to be a higher stimulant of *icaA* transcription than

glucose, which can also be observed in isolate SEP 1597. Furthermore, the synergistic effect of the glucose/NaCl combination was apparent. The highest expression of *icaA* was, however, found in TSB<sub>G</sub>. The numbers of CFU generally correlated with the levels of *icaA* expression. The increased CFU numbers after 20 h of incubation compared with those observed after adhesion indicate a certain degree of biofilm development in all the tested media. The highest CFU numbers were observed after incubation in TSB<sub>G</sub>; this was also accompanied by the highest levels of the *icaA* transcript. This study demonstrates that the presence of glucose in milk may increase transcription of *icaA*, however, such increase was especially marked when NaCl was added to milk. Enhanced transcription of *icaA* in the presence of NaCl was also reported for *S. epidermidis* grown in artificial culture media (Conlon et al., 2002; Rachid et al., 2000). Furthermore, a synergistic effect of the glucose/NaCl combination on the expression of *icaA* was obvious.

### Conclusions

Temperatures suboptimal for growth and stationary conditions represented the risk factors for adhesion of *S. epidermidis* to stainless steel in milk in amounts sufficient for biofilm formation. Conversely, temperatures allowing growth led to the cell detachment during milk flow when bacterial started to grow. This means that *S. epidermidis* can easily be washed away from the stainless steel surface when it starts to grow.

Under the conditions tested formation biofilm of *S. epidermidis* in this study, *ica*-mediated staphylococcal biofilms may develop on stainless steel in milk particularly in the presence of glucose and NaCl. It has been proven that NaCl is more risky for biofilm formation than glucose; however, the combination of glucose and NaCl is of the highest risk for biofilm development in milk.

### Acknowledgements

The work was supported by Ministry of Agriculture of the Czech Republic (project MZe0002716202) and Ministry of Education, Youth and Sport of the Czech Republic (projects 2B08074 and AdmireVet CZ 1.05/2.1.00/01.0006 – ED0006/01/01).

### Published in

MICHU, E.; CERVINKOVA, D.; BABAK, V.; KYROVA, K.; JAGLIC Z. Biofilm formation on stainless steel by *Staphylococcus epidermidis* in milk and influence of glucose and sodium chloride on the development of *ica*-mediated biofilm. *International Dairy Journal*. 2011, vol. 21, no. 3, s. 179-184.

JAGLIC, Z.; CERVINKOVA, D.; MICHU, E.; HOLASOVA, M.; ROUBAL, P.; VLKOVA, H.; BABAK, V.; SCHLEGLOVA, J. Effect of milk temperature and flow on the adherence of *Staphylococcus epidermidis* to stainless steel in amounts capable of biofilm formation. *Dairy Science and Technology*. doi:10.1007/s13594-011-0017-6.

### References

Literature is available at the author.

**Contact address:** Dana Červinková, Mgr., Veterinary Research Institute, Hudcova 70, 62100 Brno, H08356@vfu.cz



# **SEKCE 2**

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat a hygiena  
vegetábilí*





## Stanovení antokyanů v barevných pšenících

### Determination of Anthocyanins in Coloured Wheat

**Bartl Pavel, Tremlová Bohuslava, Ošťádalová Martina, Pokorná Jana,  
Tauferová Alexandra**

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

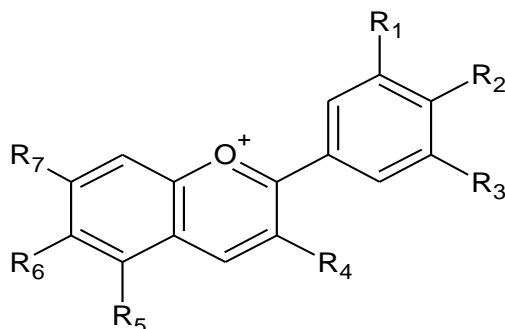
#### Summary

*Anthocyanins belong into wide group of natural pigments, they are situated in fruits and blossoms of plants. Anthocyanins have many positive effects for human health, they act as a prevention of cancer and they have significant antioxidative and inflammatory effect. The aim of this work was detection of anthocyanin compounds in purple and blue species of wheat. Our results confirm presence of the cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-galactoside.*

**Keywords:** *purple wheat; blue wheat; anthocyanins; determination*

#### Úvod

Antokyany (v řečtině znamená *anthos* květ, a *kyanos* znamená modrý) jsou nejdůležitější rostlinné pigmenty. Patří k rozsáhlé skupině fenolických sloučenin, která se souhrnně nazývá flavonoidy. Jsou to glykosidy polyhydroxy a polymethoxy deriváty 2 fenylobenzopyryliových nebo flavyliových solí (Kong a kol., 2003). Antokyany jsou nejrozšířenější a početně velice rozsáhlou skupinou rostlinných barviv. Skládají se z cukerné a necukerné složky. Necukerná složka se nazývá antokyanidin (obrázek 1) (Motohashi, Sajgami, 2009). Dosud bylo v přírodních zdrojích identifikováno asi 300 různých druhů antokyanů (Velíšek, 1999). Antokyany jsou největší skupinou ve vodě rozpustných přírodních pigmentů, které dávají červenou, fialovou a modrou barvu mnohým druhům ovoce, zeleniny, obilovin a jejich zrn. Nacházejí se v rostlinách v glykosylované formě, zpravidla s glukózou, galaktózou, arabinózou, rhamnózou a xylózou (Horbowicz a kol., 2008). Nejčastěji vyskytující se antokyanidiny v přírodě uvádí tabulka 1. Kyanidin je nejčastější antokyanidin obsažený v potravinách, následuje delfinidin, peonidin, pelargonidin, petunidin a malvidin. Delfinidin je odpovědný za modrou barvu, zatímco kyanidin a pelargonidin způsobují fialová a červená zbarvení rostlin nebo jejich částí (Hosseinian a kol., 2007). Kyanidin se vyskytuje jako červené barvivo v květech růží, zralých plodech třešní, malin, brusinek a ve slupce červené cibule. Spolu s dalšími antokyany je součástí barviv borůvek. Pelargonidin se vyskytuje ve květech červených pelargonií a v plodech zralých jahod. Delfinidin má purpurovou barvu a je obsažen především v červeném hroznovém víně a borůvkách. Malvidin je hlavní součástí barviv obsažených v borůvkách (Andersen, Markham, 2006). V barevných pšenících se vyskytují zejména deriváty kyanidinu, delfinidinu a peonidinu.



Obrázek 1: Strukturní vzorec antokyanů (Velíšek, 1999)

Tabulka 1: Přehled nejčastějších antokyanů (Andersen, Markham 2007; Velíšek, 1999; Naczka, Shahidi, 2006)

Antokyanidin	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Kyanidin	-OH	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Delfinidin	-OH	-OH	-OH	-OH	-OH	-H	-OH
Pelargonidin	-H	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Malvidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH
Peonidin	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-H	-OH	-OH	-H	-OH
Petunidin	-OH	-OH	-OCH <sub>3</sub>	-OH	-OH	-H	-OH

V posledních letech se stále zvyšuje zájem o přírodní látky a antokyaniny patří mezi ně. Hlavním důvodem rozvoje výzkumu antokyanů jsou jejich pozitivní účinky na lidské zdraví. Mezi nejdůležitější patří antioxidační účinky, které jsou vyšší než u vitamínů C a E, prevence aterosklerózy, antokyaniny mají také protizánětlivé a antikancerogenní účinky (Andersen, Markham 2007, Naczka, Shahidi, 2006). V poslední době je také trend ustupování od používání některých syntetických barviv v potravinářském průmyslu. Antokyaniny představují možnou alternativu, protože jsou jednou z největších skupin přírodních pigmentů. V dnešní době se antokyaniny používají jako potravinářská barviva, na obalech výrobků mají označení E163.

Cílem této práce byla identifikace hlavních antokyanů v purpurové a modré pšenici.

### Extrakce

Extrakce antokyanů z rostlinných materiálů probíhá pomocí přímé reakce rozpouštědla a extrahovaného vzorku. V našem případě je nejvhodnější rozpouštědlo ethanol. Barva antokyanů je velmi závislá na pH. V kyselém pH antokyaniny poskytují červenou barvu, v zásaditém prostředí převládá modrá barva. Z tohoto důvodu se pH rozpouštědla upravuje kyselinou. Velmi často se pro tyto účely používá kyselina chlorovodíková, která je ale velmi silná a může způsobovat degradaci antokyanů (Andersen, Markham 2007). Z tohoto důvodu se upřednostňuje používání kyselin organických. Z našeho pohledu se jako nejvhodnější kyselina jevila kyselina mravenčí. Vzorek pomletý na šrot byl extrahován v poměru 1:8 po dobu jedné hodiny na třepačce. Následně byl supernatant oddělen od pelety na odstředivce a poté byl extrakt odpařen na vakuové odparce při 30 °C.

### Stanovení antokyanů

Pro stanovení antokyanů se využívá kapalinová chromatografie. Jako stacionární fáze byla použita kolona RP–C18 s vnitřním průměrem 4.6 mm a délkou od 150 mm. Eluční systém byl binární, byl složen se z methanolu a kyseliny mravenčí. Měření probíhalo při vlnové délce 520 nm. Při použití RP kolon dochází k tomu, že se jako první extrahují polárnější fenolové kyseliny, po nich následují 3,5-diglykosidy antokyanů, 3-monoglykosidy antokyanů, potom aglykony a jako poslední acylované antokyany. Eluční pořadí antokyanidinů na RP koloně je následující: delfinidin, kyanidin, petunidin, pelargonidin, peonidin a malvidin.

### Výsledky a diskuze

Literatura uvádí, že v oplodí purpurové pšenice se v majoritním množství vyskytují zejména kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-galaktosid a peonidin-3-glukosid, nicméně v menším množství může být přítomno až 14 dalších antokyanů (Horbowicz a kol., 2008, Naczka, Shahidi, 2006). Z našich výsledků vyplývá přítomnost kyanidin-3-glukosidu, dále bylo zjištěno 5 antokyanů, které se nepodařilo identifikovat. V modré pšenici se podle literatury vyskytují zejména delfinidin-3-glukosid a delfinidin-3-rutinosid, dále mohou být v menším množství přítomny další antokyany (Horbowicz a kol., 2008, Naczka, Shahidi, 2006). V našich vzorcích byl identifikován kyanidin-3-glukosid, kyanidin-3-galaktosid a další 4 antokyany, které se nepodařilo identifikovat. V obou případech identifikace probíhala na základě srovnání se standardem.

### Závěr

Antokyany patří mezi látky, na které je v dnešní době upřena velká pozornost z důvodu jejich pozitivních účinků na zdraví člověka. V potravinářském průmyslu se využívají jako barviva. Stanovením antokyanů v purpurové a modré pšenici byla zjištěna přítomnost kyanidin-3-glukosidu a kyanidin-3-galaktosidu, jejich kvantifikace ještě nebyla provedena. Další přítomné antokyany nebyly identifikovány.

### Literatura

- ANDERSEN, O., M.; MARKHAM, K., R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 1. vyd., 2006. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis, 1197 s. ISBN 0-8493-2021-6.
- HORBOWICZ, M., KOSSON, R., GRZESIUK, A., DEBSKI, H. Anthocyanins of Fruits and Vegetables - Their Occurrence, Analysis and Role in Human Nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 2008, vol. 68, no. 3, p. 5–22.
- HOSSEINIAN, F., S., LI, W., BETA, T. Measurement of Anthocyanins and other Phytochemicals in Purple Wheat. *Food Chemistry*, 2008, vol. 109, no. 4, p. 916–924.
- KONG, J.-M., CHIA, L.-S., GOH, N., K., CHIA, T., F., BROUILLARD, R. Analysis and biological Activities of Anthocyanins. *Phytochemistry*, 2003, vol. 64, no. 5, p. 923–933.
- MOTOHASHI, N., SAKAGAMI, H. Anthocyanins as Functional Food Colors. *Topics of Heterocyclic Chemistry*, 2009, vol. 16, no. 2, p. 1–40.
- NACZKA, M., SHAHIDI, F. Phenolics in Cereals, Fruits and Vegetables: Occurrence, Extraction and Analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol. 41, no.5, p. 1523–1542.
- VELÍŠEK, J. *Chemie potravin*. 1. vyd., 1999. Tábor: Osis, 368 s. ISBN 80-902391-5-3.

**Kontaktní adresa:** Pavel Bartl, Mgr., Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09025@vfu.cz

## Carotenoid Pigments in Tomatoes

### Karotenoidní pigmenty v rajčatech

Tauferová Alexandra, Tremlová Bohuslava

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

#### Summary

*Carotenoids are isoprenoid molecules that are synthesized by all photosynthetic organisms and also by some fungi and nonphotosynthetic bacteria. In plants, they have several important roles, the most apparent being supposedly the participation in photosynthetic activity and protection against light stress. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) produces a good amount of these pigments. Several positive effects on human health have been already reviewed and new studies focused on new benefits are being published in recent years. This work reviews the most significant carotenoids in tomatoes, their function in the plant and previously unknown roles in human health.*

**Keywords:** *carotenoid; lycopene;  $\beta$ -carotene; lutein; tomato; human health*

#### Introduction

The role of foodstuffs of plant origin in human health is undeniable. Nowadays, we already have the basic knowledge of the major nutrients of fruits and vegetables and scientists are trying to discover functions of minor nutrients or phytochemicals. One example of such phytochemical is a group of carotenoid pigments naturally present in all photosynthetic organisms and synthesised also by some fungi and nonphotosynthetic bacteria (Apel and Bock, 2009). More than 600 carotenoids have so far been identified in nature. Humans aren't able to synthesize carotenoids, but they are receiving various doses of these phytochemicals from the diet. Only about 40 different carotenoids are present in a typical human diet. Of these 40 about 20 carotenoids have been identified in human blood and tissues. Close to 90 % of the carotenoids in the diet and human body is represented by  $\beta$ -carotene,  $\alpha$ -carotene, lycopene, lutein and cryptoxanthin (Rao and Rao, 2007)

#### Role of carotenoids in plants

In plants, carotenoids as ancillary pigments participate in photosynthetic light harvesting and in the protection of the photosynthetic reaction center from auto-oxidation caused by the light stress. Other biological functions include antioxidants, membrane stabilizers and phytohormone precursors. In addition, they accumulate to large levels as storage metabolites in chromoplasts of flowers, fruits, and taproots (Apel and Bock, 2009). During ripening, the green pigment chlorophyll degrades and carotenoids are synthesized. The ripening process is accompanied by a quantitative and qualitative change in the carotenoid profile. In chloroplast-containing tissues xanthophylls predominate, reflecting their association with photosynthetic function. In chromoplast-containing tissues, however, acyclic carotenoids (phytoene, phytofluene,  $\zeta$ -carotene, neurosporene and lycopene) accumulate (Fraser *et al.*, 2007). It is obvious that carotenoids are not just colors. In tomatoes, a scientific study has also proven their role in producing of tomato aroma and flavour designed not only to please our senses, but also to attract organisms engaged in seed dispersal (Lewinsohn *et al.*, 2005).

### **Tomato as a source of carotenoids**

Tomatoes and tomato-based foods may provide a convenient matrix by which carotenoids can be supplied to humans from at least two reasons: 1. Tomatoes are widely available and 2. Tomato belongs to vegetables with higher amounts of carotenoids, especially of lycopene. Tomato (*Lycopersicon esculentum*) is one of the world's major food crops. It is the second most consumed vegetable in the world, after potato. Tomatoes aren't consumed only in a fresh state, but very frequently in the form of processed tomato products and such consumption is rising in western countries. Between 1996 and 2001, the quantity of processed tomatoes increased from 7.88 to 8.45 million tons in the EU (Georgé *et al.*, 2011). Tomato is a climacteric fruit and continues to ripen after the harvest. Carotenoids, particularly lycopene, represents the primary component of ripe fruit pigmentation in tomato pericarp and is responsible for the characteristic deep red colour of ripe tomatoes (Liu *et al.*, 2009). Tomato and tomato products are the predominant source of lycopene, in fact it is the main source of lycopene in the western diet (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; Odriozola-Serrano *et al.*, 2009). At least 85 % of the dietary lycopene come from tomato fruit and tomato-based products, the remainder being obtained from watermelon, pink grapefruit, guava and papaya (Long *et al.*, 2006). In addition to lycopene, both  $\beta$ -carotene and lutein are also present in tomatoes, but in a much smaller amounts (Lin and Chen, 2005). Other minor individual carotenoids are violaxanthin, neoxanthin, zeaxanthin,  $\alpha$ -cryptoxanthin,  $\beta$ -cryptoxanthin,  $\alpha$ -carotene,  $\gamma$ -carotene,  $\zeta$ -carotene, neurosporene, phytoene, phytofluene, cyclolycopene and  $\beta$ -carotene-5,6-epoxide (Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes, 2009). Carotenoid biosynthesis in tomatoes is influenced by the variety, the cultivation area, the stage of ripening at harvesting, the agronomical practices and the storage conditions. The average concentration of carotenoids in eaten ripe tomatoes ranges around 10 mg per 100 g of product (Pernice *et al.*, 2010).

### **Positive effects of carotenoids**

#### **Lycopene**

This red pigment of tomato has already received much attention. Although it has no provitamin A activity, lycopene does exhibit a special ability to neutralize free radicals, almost twice as high as that of  $\beta$ -carotene. This is presumably because of the presence of unique long-chain molecular structure containing 13 double bonds, more than any other carotenoid. (Shi and Le Maguer, 2000).

#### **$\beta$ -carotene**

It is the main dietary precursor of vitamin A and therefore also referred to as provitamin A. Vitamin A deficiency in humans can cause xerophthalmia, blindness, and premature death and therefore represents a global health problem affecting approximately one third of the countries of the world (Apel and Bock, 2009; Long *et al.*, 2006)

#### **Lutein**

It is one particular member of the carotenoid family that may promote health and protect against chronic diseases. Especially the evidence for a role in eye health is significant. There are studies recommending lutein supplements either to inhibit the progression of age-related macular degeneration or to prevent cataract formation (Mares-Perlman *et al.*, 2002).

### Other minor carotenoids

Among these,  $\alpha$ -carotene and  $\beta$ -cryptoxanthin have provitamin A activity, since they are converted to retinal by mammals. Phytoene undergoes series of desaturation reactions, each of which creates a new double bond and extends the chromophore by two conjugated double bonds; the end product is lycopene, produced via the intermediates phytofluene,  $\zeta$ -carotene and neurosporene (Odriozola-Serrano *et al.*, 2009; Guil-Guerrero and Reboloso-Fuentes, 2009). Particular functions of these single carotenoids aren't known yet. But we can be sure that although in small quantities, the presence of these minor carotenoids in tomatoes isn't purposeless or useless. All these carotenoids contribute to the overall health. The protective effects of tomatoes and tomato products to prevent cell damage primarily may be due to the ability of lycopene and other minor carotenoids through synergistic interactions (Sánchez-Moreno *et al.*, 2006). Except for the already well known positive effects of tomatoes and tomato products naturally containing carotenoids (e.g. reduced risk of developing digestive tract and prostate cancers (Benner *et al.*, 2007), lower risk of ischaemic heart disease (Lavelli and Giovanelli, 2003), prevention of atherogenesis (Hsu *et al.*, 2008), reduction of skin aging and the risk of skin cancer development (Meinke *et al.*, 2010)), recent studies are showing that carotenoids may mediate their effects via other mechanisms such as cell growth regulation, modulating gene expression and as modulators of Phase I and II drug metabolizing enzymes (Rao and Rao, 2007). Lycopene has also been suggested to induce cell-to-cell communications and modulation of the hormonal and the immune system (Heredia *et al.*, 2009). Interestingly, it appears that lycopene also may play a protective role against cigarette smoke, although more research is needed on this subject (Kris-Etherton *et al.*, 2002). Dietary intervention studies with varying levels of lycopene are currently being conducted with the objective of demonstrating the beneficial effects of lycopene in the prevention and management of osteoporosis. There are also studies suggesting that carotenoids, especially xanthophylls may contribute to the prevention of neurodegenerative Alzheimer's and Parkinson diseases (Nakagawa *et al.*, 2011).

### Conclusions

We can expect that further research will show also many other positive effects of carotenoids and their role in prevention of other human diseases, for instance in the prevention of diabetes, rheumatoid arthritis or inflammatory disorders. Future areas of research include their bioavailability, metabolism, mechanisms of action and safety. As a result of their potential importance the carotenoids have long been targets for manipulation, tomatoes being one usual example. But also in this area there are many questions to be answered, because some genetic disturbances of carotenoid biosynthesis negatively affect total carotenoid content (Apel and Bock, 2009; Long *et al.*, 2006). Besides the well-known applications of  $\beta$ -carotene, lycopene is considered to be a pigment of potential commercial importance for pharmaceutical, food and cosmetic industries, but also in the emerging market for nutraceutical products (Cortés *et al.*, 2009).

### References

Literature is available on request at [tauferovaa@vfu.cz](mailto:tauferovaa@vfu.cz).

**Contact address:** Alexandra Tauferova, Ing., Department of Vegetable Foodstuffs and Plant Production, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, [tauferovaa@vfu.cz](mailto:tauferovaa@vfu.cz)

## Káva a její účinek na konzumenta Coffee and its effect on consumer

Pokorná Jana, Pažout Vladimír

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

### Summary

*Coffee is a term for a widely consumed beverage prepared from roasted coffee beans. This stimulant is valued especially for its flavour and aroma. Recent epidemiological studies support the opinion on its possible potential role in prevention of several chronic and degenerative diseases. Above all, it is because coffee contains specific bioactive compounds that may serve as a physiologically active substances. Some of the beneficial effects of coffee activity are the antioxidant properties, protection against carcinogenic effects, lower rate of colon cancer and many others. Due to the positive effects on the consumer's health, coffee is nowadays the object of interest in many studies.*

**Keywords:** *coffee; polyphenols; antioxidant properties; kahweol; chlorogenic acid*

### Úvod

Káva je jedním z nejoblíbenějších nápojů na světě, přičemž je ceněna pro svoji charakteristickou chuť a vůni, a také pro její potenciální blahodárné účinky na lidské zdraví (Perrone *et al.*, 2008). Pod pojmem káva si představujeme nápoj, připravený z pražených a mletých semen kávovníku, a podle Ferruzziho (2010) je to jeden ze dvou nejčastěji konzumovaných nápojů na světě. Zásadní význam pro celosvětovou produkci kávy mají dva druhy *Coffea arabica* a *Coffea canephora var. robusta* (Scharnhop and Winterhalter, 2009).

Nedávná epidemiologická a biologická data podporují potenciální roli kávy v prevenci některých chronických a degenerativních onemocnění. Podle Ferruzziho (2010) je káva bohatý zdroj bioaktivních sloučenin včetně methylxantinů, aminokyselin, fenolických kyselin a polyfenolů. Tyto patří mezi antioxidanty, mají protizánětlivé a protinádorové účinky. Experimentálními studiemi bylo prokázáno, že mají velký podíl i při prevenci kardiovaskulárního onemocnění.

### Kyselina chlorogenová

Nejvíce zastoupenou skupinou fenolických látek v kávě je chlorogenová kyselina. Vzhledem k její biologické účinnosti bývá řazena mezi intenzivní antioxidanty prospěšné zdraví člověka. Přispívá nejen k chuti kávy, ale také může mít potenciální farmakologický význam u lidí (Duarte *et al.*, 2010). Bohužel ale ještě veškeré informace o fenolech kávy nebyly plně objasněny a nejsou zcela známy (Ferruzzi, 2010).

Byly studovány její antioxidační vlastnosti a vliv na pozitivní ovlivnění chronických degenerativních onemocnění, kardiovaskulární onemocnění a rakoviny (Farah *et al.*, 2006).

### Diterpeny

Hlavními diterpeny kávy jsou kofeol a kofestol (Scharnhop and Winterhalter, 2009). Bylo zjištěno, že některé jsou biologicky aktivní a patří mezi ně např. taxol, kofestol a kofeol (Lozama and Prinszano, 2009). Mnohé studie, např. Scharnhop and Winterhalter

(2009) popisují vysokou fyziologickou aktivitu kofeolu a kofestolu, a to jak příznivých tak nepříznivých účinků. Autoři uvádí za nejvýznamnější negativum vliv těchto sloučenin na zvýšení hladiny cholesterolu v krvi lidí, což bylo potvrzeno i na zvířecích modelech.

Oproti tomu se Cavin *et al.* (2002) ve své práci zmiňuje o kávových složkách, které chrání proti působení známých karcinogenů, např. nitrosaminů nebo 1, 2 - dimethylhydrazinu. Bylo prokázáno, že zelená, stejně jako pražená kávová zrna brzdí rozvoj 7, 12 - dimethylbenz [a] anthracenu (DMBA). Stejných výsledků pozitivního vlivu uvádí ve své práci i Ji Young Kim *et al.* (2004), kdy studie na zvířatech prokázaly, že kofeol a kofestol poskytují ochranu proti působení karcinogenů, jako jsou 7,12-dimethylbenz [a] antracen, aflatoxin B1, a 2- amino-1methyl-6 phenylimidazo [4,5- b]-pyridin (PhIP).

### **Trigonellin**

Na zvířecích modelech bylo dokázáno, že tato látka vykazuje aktivitu proti nádorovým buňkám a může regenerovat dendrity a axony pro zlepšení paměti (Perrone *et al.* 2008). Vitamín niacin, který je tvořen ve větším množství z trigonellinu během procesu pražení, může být také důležitý z hlediska výživy lidí. Při pražení kávy se demetylací z trigonellinu vytváří kyselina nikotinová a ve vodě rozpustný vitamín B, známý také jako niacin. Kyselina nikotinová, vznikající při zpracování kávy má vysokou biologickou dostupnost v nápojích, na rozdíl od přirozených zdrojů, kde je přítomna ve vázané formě.

### **Kardiovaskulární onemocnění**

Mnoho epidemiologických studií zkoumalo vztah mezi konzumací kávy a rizikem onemocnění srdce. Dar'io Echeverri *et al.* (2010) ve své analýze uvádějí, že neexistuje žádný přímý vztah mezi konzumací kávy a zvýšením úmrtnosti, naopak někteří autoři popisují mírně inverzní vztah mezi spotřebou kávy a jejím přínosem v souvislosti se zánětlivými procesy, endoteliální funkcí a rizikem diabetu II. typu.

Jak uvádí Päivi Kleemol *et al.* (2000), dosud nebyl v žádné studii potvrzen pozitivní účinek mezi pitím kávy a ischemickou chorobou srdeční. Nefiltrovaná káva může zvyšovat sérové hladiny cholesterolu, a to zejména lipoproteiny s nízkou hustotou (LDL) a tím zvyšovat riziko cévních příhod, a také může působit jako spouštěcí mechanismus vedoucí k infarktu myokardu u lidí s chronickou ischemickou chorobou srdeční, spíše než by sama toto onemocnění způsobovala.

### **Antimikrobiální účinky**

*Streptococcus mutans* je Gram pozitivní bakterie a je hlavním původcem zubního kazu u lidí. Tyto bakterie jsou schopny syntetizovat ve vodě nerozpustné glukany ze sacharózy, které zprostředkovávají jejich přilnavost k zubnímu povrchu a přispívají tak k tvorbě zubního biofilmu. Biofilm je důležitý při tvorbě zubního kazu a tak inhibice tohoto faktoru bývá používána jako jedna ze strategií k prevenci zubního kazu. Závěrem této studie bylo konstatováno, že sloučeniny v pražené kávě jako glyoxal, methylglyoxal a diacetyl byly hlavními činiteli, odpovědnými za inhibiční efekt proti nepříznivému působení streptokoků v ústech, a také potencování tohoto vlivu v přítomnosti kofeinu. Autoři zjistili, že přirozeně se vyskytující látky v zelené kávě neměly efekt proti činnosti mikroorganismů. Navíc trigonellin a kávové kyseliny prokázaly inhibiční



účinek proti růstu *Streptococcus mutants* a proti růstu *Legionella pneumophila*. Výtažky z *Coffea canephora* Pierre (kávy robusta) lépe inhibovaly biofilm než-li *Coffea arabica* (Antonio *et al.*, 2010).

### **Vápníková bilance**

Nawrot *et al.* (2003) se ve své studii zabýval vlivem kofeinu na vápníkovou bilanci. Na základě zkoumaných údajů vyvodil závěr o existenci mnohých důkazů o tom, že pro normální populaci zdravých dospělých jedinců není střední příjem kofeinu (okolo 400 mg/den) spojen s negativními účinky, jako je celková toxicita, kardiovaskulární efekty, změny v chování dospělých, zvýšení výskytu rakoviny a účinky na plodnost mužů. Dále se ukázalo, že kofein nemá negativní vliv na vápníkovou bilanci, na stav kostí a rovnováhu vápníku v nich, pokud má konzument adekvátní příjem vápníku v běžné stravě.

### **Kofein**

Ve studii Lane *et al.* (2002) bylo prokázáno, že kofein může zvýšit plazmatické hladiny velkých stresových hormonů, včetně adrenalinu, katecholaminy, noradrenalinu a kortizolu. Li *et al.* (2010) uvádějí, že je mimo jiné důležitý při prevenci glaukomu (lidově zeleného zákalu), který je druhou nejčastější příčinou slepoty ve světě. Kofein má různé farmakologické účinky; může zvýšit nitrooční tlak, podporovat produkci nitrooční tekutiny nebo bránit jejímu odvodnění. Také zvýšení krevního tlaku po požití kofeinu může přispět ke zvýšení nitroočního tlaku. U zdravých jedinců bylo zjištěno, že zvýšení nitroočního tlaku je úměrné, kdežto u pacientů s glaukomem či jiným onemocněním očí došlo k vyššímu nárůstu.

### **Závěr**

Obecné povědomí o konzumaci kávy je obecně spojeno s velkým počtem chorob a zdravotními změnami. Nicméně rozsáhlé epidemiologické studie provedené v poslední době neprokázaly existenci vztahu mezi konzumací kávy a některými rizikovými faktory, jako jsou vysoký krevní tlak, srdeční infarkt, diabetes, dna či nádorové onemocnění. Studie dodnes nepřinesly jasný závěr, zejména kvůli nedostatku konkrétních a průběžných informací o četnosti spotřeby kávy, přesnému složení nápoje a ve vztahu k faktorům, spojených s nezdravým životním stylem (kouření cigaret, alkohol a sedavý způsob života), jelikož kombinace těchto aspektů pak může vést k chorobám a zdravotním problémům, které vyžadují další pečlivé studium.

### **Literatura**

Seznam literatury k nahlédnutí u autora.

**Kontaktní adresa:** Pokorná Jana, Mgr., Ústav vegetabilních potravin a rostlinné produkce, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, Brno 612 42, jana.pokorna3@seznam.cz

## Porovnání aminokyselinového složení u vybraných odrůd lupin Comparison of amino acids content in lupin varieties

Rusníková Lucie, Straková Eva, Suchý Pavel

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

### Summary

*In the study were compared contents of amino acids in lupin seeds of three species - *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius*, *Lupinus luteus*. Seventeen varieties of these species were chosen for analysis: *Lupinus albus* 7 varieties (Amiga, Butan, Dieta, LAL 1, Oležka, Prima and Watt), *Lupinus angustifolius* 7 varieties (APR 82, Boregine, Boruta, Karo, Probor, Rose and Sonet), *Lupinus luteus* 3 varieties (Bornal, Juno and Wodjil), respectively. We determined content of crude protein of whole seed on dry matter base. Next part of the study was determining of sixteen basic amino acids (aspartic acid, threonine, serine, glutamic acid, proline, glycine, alanine, valine, methionine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, histidine, lysine and arginine). The content of amino-acids (g/kg) in nitrogen substances of each variety was evaluated. Highly significant difference ( $P \leq 0.01$ ) was observed in the content of aspartic acid, leucine, tyrosine, histidine and lysine among species.*

**Keywords:** *protein content; *Lupinus albus*; *Lupinus angustifolius*; *Lupinus luteus**

### Úvod

Lupina je kulturní plodina z čeledi bobovitých. Ve výživě je využívána kvůli nutričnímu složení, speciálně pak kvůli vysokému obsahu dusíkatých látek a kvalitnímu obsahu aminokyselin. V našich pěstitelských podmínkách je považována za alternativu sóji. Ke krmným účelům se využívají především tři druhy lupiny. Lupina bílá (*Lupinus albus* L.), lupina žlutá (*Lupinus luteus* L.) a lupina úzkolistá (*Lupinus angustifolius* L.). V dřívější době bránil využití lupin vysoký obsah antinutričních látek. V dnešní době tomu tak není, využívají se vyšlechtěné odrůdy sladkých lupin, ve kterých je obsah antinutričních látek minimální. Cílem naší práce bylo porovnat chemické složení jednotlivých druhů lupin. V této studii jsme se zvláště zaměřili na obsah dusíkatých látek (NL) a aminokyselin (AMK).

Sujak et al. (2006) se zabývali podobnou tematikou, srovnávali jednotlivé druhy lupiny. Z jejich výsledků vyplývá, že nejvyšší obsah hrubého proteinu se nacházel v semenech lupiny žluté. Autoři se také zabývali aminokyselinovým složením. Za nejlépe vyhovující, z hlediska výživy člověka a hospodářských zvířat, označili lupinu bílou. Jezierny et al. (2010) ve své práci uvádí obsah hrubého proteinu a 17 AMK v sušině semene *Lupinus albus*, *Lupinus angustifolius* a *Lupinus luteus*. Olkowski (2011) sledoval obsah NL a AMK u lupiny žluté. Roth-Maier et al. (2004) uvádějí obsah nejčastěji limitujících AMK ve výživě zvířat u lupiny úzkolisté a žluté. Steinfeldt et al. (2003) se zabývali aminokyselinovým složením lupiny úzkolisté.

### Materiál a metodika

Analyzovali jsme celá semena 17 odrůd, tří druhů lupin a to konkrétně *Lupinus albus* L. - 7 odrůd, *Lupinus luteus* L. - 3 odrůdy, *Lupinus angustifolius* L. - 7 odrůd. Některé odrůdy patřily mezi registrované v ČR nebo v jiných státech EU, ostatní odrůdy pocházely ze soukromých sbírek. Materiál byl upraven mletím a homogenizací. Takto připravený vzorek byl analyzován. Ve vzorku jsme stanovili obsah sušiny a obsah

dusíkatých látek v g/kg sušiny. Obsah sušiny jsme stanovili klasicky vázkovou metodou. Ke stanovení dusíkatých látek jsme použili metodu dle Kjeldahla. Dále jsme stanovili obsah 16 základních AMK (kyselina asparagová, threonin, serin, kyselina glutamová, prolin, glycin, alanin, valin, methionin, isoleucin, leucin, tyrosin, fenylalanin, histidin, lysin a arginin). Před analýzou bylo nutné provést kyselou hydrolyzu. Vzorek se hydrolyzoval 24 hodin při 110°C v sušárně, v prostředí 6 M kyseliny chlorovodíkové. Aminokyseliny byly stanoveny na přístroji AAA INGOS 400.

### Výsledky a diskuse

U jednotlivých druhů lupin jsme vyjádřili výsledky dusíkatých látek a aminokyselin v gramech na kilogram sušiny celých semen. Nejnižších hodnot NL bylo dosaženo u lupiny úzkolisté (331,65 g/kg), dále u lupiny bílé (360,13 g/kg) a nejvyšších hodnot NL bylo dosaženo u lupiny žluté (440,62 g/kg). K obdobným hodnotám NL u lupiny úzkolisté (324 g/kg) a bílé (381g/kg) došel i kolektiv autora Jezierny (2010), pouze obsah NL u lupiny žluté (361 g/kg) nekorespondoval s naší prací (440,62 g/kg). Z námi uvedených výsledků dokonce vyplývá statisticky velmi vysoce významný rozdíl mezi obsahem NL u lupiny žluté a bílé. Obecně nejvyšší hodnoty NL jsou uváděny právě u lupiny žluté. To potvrzují i výsledky Sujak et al. (2006) a Olkowski (2011) hodnotami obsahu NL 467,9 g/kg. Sujak et al. (2006) stanovili obsah NL dokonce vyšší (465 ± 11 g/kg). V jejich práci však používali odlišné odrůdy. Výsledky statistického vyhodnocení obsahu dusíkatých látek i obsahu jednotlivých aminokyselin jsou vyjádřeny v Tabulce 1. Statisticky vysoce významný rozdíl (v tabulce znázorněn \*), byl prokázán v obsahu mezi jednotlivými odrůdami a to u následujících aminokyselin – kyselina asparagová (mezi žlutou a úzkolistou lupinou), leucin (mezi žlutou a úzkolistou lupinou), tyrosin (mezi bílou a žlutou; bílou a úzkolistou lupinou), histidin (mezi žlutou a bílou; žlutou a úzkolistou lupinou), lysin (mezi žlutou a úzkolistou lupinou). Sujak et al. (2006) zjistili, že u všech sledovaných odrůd lupin je methionin, lysin, tryptophan a valin v nedostatečném množství, zatímco množství leucinu je statisticky významné. Jezierny et al. (2010) ve výsledcích uvádí, že lupina bílá obsahuje největší množství téměř všech AMK, kromě histidinu a tryptofanu. Histidin se ve větším množství vyskytuje u lupiny žluté, která se svým aminokyselinovým obsahem řadí za lupinu bílou. Nejmenší množství všech sledovaných AMK obsahovala lupina úzkolistá. Tyto údaje se s našimi výsledky neshodují. Vyšší hodnoty se statistickou významností jsme prokázali u lupiny bílé pouze v obsahu tyrosinu. Všechny ostatní významné rozdíly v obsahu AMK byly prokázány ve prospěch lupiny žluté. I co se týče celkové sumy AMK (g/kg), bylo nejvyšší hodnoty dosaženo právě u lupiny žluté. Olkowski (2011) došel k obdobným výsledkům v obsah AMK u lupiny žluté, jako jsou uvedeny v předložené práci. Roth-Maier et al. (2004) uvádějí obsah AMK (Lys, Met, Thr, Trp), tyto výsledky se shodují s našimi, stejně tak jako výsledky obsahu AMK u lupiny úzkolisté, které uvádí Steinfeldt et al. (2003).

### Závěr

Naše práce poukazuje na odlišnost v obsahu dusíkatých látek a aminokyselin mezi jednotlivými druhy lupiny. Z konkrétnějších výsledků aminokyselinového složení jednotlivých odrůd také vyplývá velká odlišnost, to potvrzuje i srovnání s autory, kteří analyzovali semena jiných odrůd, ale stejných druhů lupin. Z tohoto faktu by se mělo vycházet při využití semen lupiny. Například lupina jako komponenta krmných směsí by se měla posuzovat nejen dle druhu, ale také podle odrůdy.

Tabulka 1: Obsah dusíkatých látek a jednotlivých aminokyselin u odrůd lupin (g/kg)

	<b>Bílá</b>	<b>Úzkolistá</b>	<b>Žlutá</b>
<b>NL</b>	360,13	331,65 *	440,62 *
<b>Asp</b>	36,72	30,01 *	40,43
<b>Thre</b>	13,11	9,57	11,22
<b>Ser</b>	18,01	13,84	17,59
<b>Glu</b>	61,68	61,55	80,83
<b>Pro</b>	13,29	12,45	12,64
<b>Gly</b>	13,33	12,24	14,13
<b>Ala</b>	9,93	7,95	11,34
<b>Val</b>	13,79	12,48	13,48
<b>Met</b>	1,13	1,42	1,44
<b>Iso</b>	14,34	11,95	13,25
<b>Leu</b>	24,85	21,39 *	28,61
<b>Tyr</b>	13,58 *	9,74	9,09 *
<b>Phe</b>	13,03	11,41	12,71
<b>His</b>	8,26	8,66 *	10,72 *
<b>Lys</b>	16,34	14,65 *	19,54
<b>Arg</b>	39,40	36,32	48,65
<b>ΣAA</b>	310,76	275,65	345,66

**Poděkování**

Předložená práce vznikla za podpory projektu č. MSM6215712402.

**Literatura**

JEZIERNY, D.; MOSENTHIN, R.; BAUER, E. The use of grain legumes as a protein source in pig nutrition: A review. *Animal Feed Science and Technology*. 2010, vol. 157, p. 111–128.

OLKOWSKI, B. Lupin as primary protein source in young broiler chicken diets: Effect of enzymes preparations catalyzing degradation of non-starch polysaccharides or phytates. *World J Microbiol Biotechnol*, 2011, vol. 27, p. 341–347.

ROTH-MAIER, D.; BÖHMER, M.B.; ROTH, X.F. Effects of feeding canola meal and sweet lupin (*L. luteus*, *L. angustifolius*) in amino acid balanced diets on growth performance and carcass characteristics of growing-finishing pigs. *Anim. Res*, 2004, vol. 53, p. 21–34.

STEENFELDT, S.; GONZÁLEZ, E.; BACH KNUDSEN, K.E. Effects of inclusion with blue lupins (*Lupinus angustifolius*) in broiler diets and enzyme supplementation on production performance, digestibility and dietary AME content. *Animal Feed Science and Technology*, 2003, vol. 110, p. 185-200.

SUJAK, A.; KOTLARS, B.; STROBEL, W. Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food Chemistry*, 2006, vol. 98, no. 4, p. 711-719.

**Kontaktní adresa:** Lucie Rusníková, Mgr., Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, rusnikoval@vfu.cz

## Analysis of plant oils used in poultry nutrition

### Analýza rostlinných olejů používaných ve výživě drůbeže

**Hudečková Petra, Straková Eva, Suchý Pavel**

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

#### Summary

*The object of this work was the comparison of four types of plant oils from the view of their composition. There were fatty acids analysed (the content of saturated and unsaturated fatty acids, the occurrence mono and polyunsaturated fatty acids and content and ratio n-3, n-6 and n-9 fatty acids). The soybean, sunflower, rapeseed and flaxseed (from fibre and oil species) oils were chosen from the plant oils for the analysis. The results show that the flaxseed oil (fibre species) is of the most quality. The rapeseed oil has the optimal ratio of n-3:n-6 FAs, 1:5 respectively. But it contains more MUFAs and less dietetic valuable PUFAs than the other oils. The sunflower oil was of the lowest quality.*

**Keywords:** *plant oil; rapeseed; sunflower; flaxseed; soybean; fatty acid*

#### Introduction

The lipids are the important part of food and feeds not only for their high energetic value but also for the content of essential fatty acids and fat-soluble vitamins.

The using of oils allows the achieving of higher energy concentration in feed mixtures. According to prescription composition it is necessary to consider not only the whole fat content in feed mixture but also its structure. Especially, it is necessary to take account of the content of linoleic acid and  $\alpha$ -linolenic acid that are the essential nutrients. Due to suitable plant oil selection we are able to change the profile of fatty acids in animal products (meat, egg) as mentioned Milinsk et al. (2003); Cobos et al. (1995); Wiecek and Skomial (2004). This information is mainly important for the affection possibility of saturated and unsaturated fatty acid ratio and also the n-6 and n-3 fatty acids ratio. The n-3 : n-6 1 : 1 ratio is thought to be optimal. Nowadays this ratio is 1 : 10 (n-3 : n-6) in people diet (Betti et al., 2009).

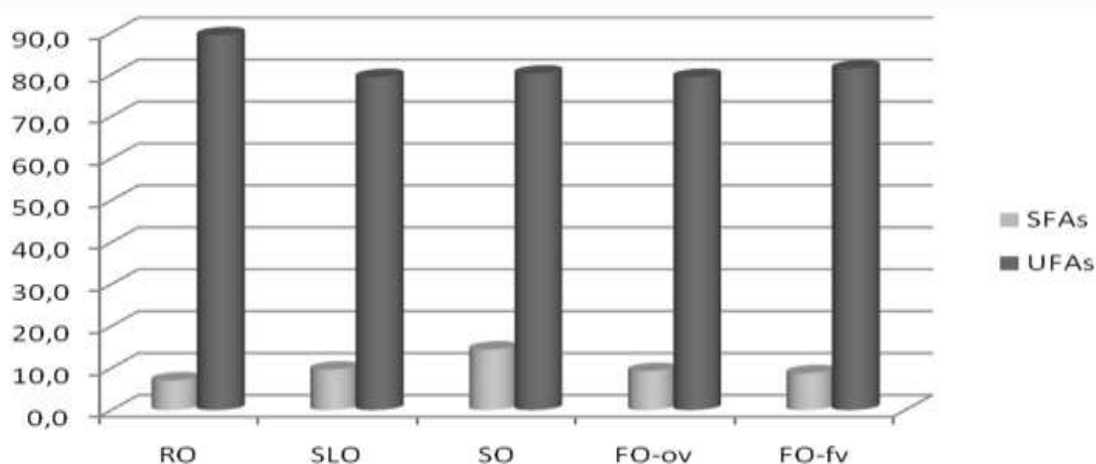
#### Materials and Methods

There were used soybean (SO), sunflower (SLO), rapeseed (RO) and flaxseed oils – fibre varieties, oil varieties (FO-fv, FO-ov) for the analysis. The fatty acids were determined using a gas chromatograph – analyzer GAS CHROMATOGRAPH GC – 2010 (firm Shimadzu). The oils were evaluated according to saturation of fatty acids (level of saturated (SFAs) and unsaturated fatty acids (UFAs), then monounsaturated (MUFAs) and polyunsaturated (PUFAs) fatty acids were evaluated and ratio between n-3 and n-6 fatty acids as well.

#### Results

Figure 1: The oil analysis – representation of SFAs and UFAs (g/100 g oil)

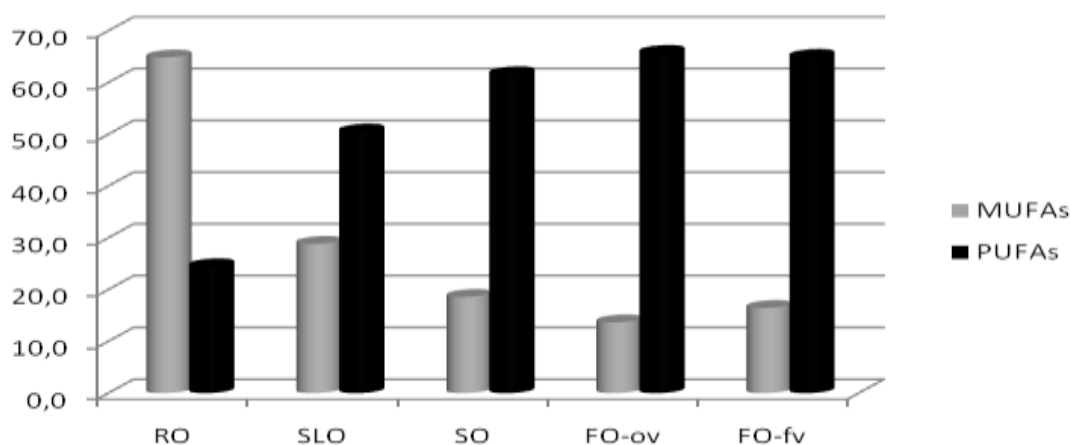
	RO	SLO	SO	FO-ov	FO-fv
SFAs	7,040	9,645	14,422	9,301	8,781
UFAs	89,368	79,383	80,216	79,416	81,428



Graph 1: The oil analysis – representation of SFAs and UFAs (g/100 g oil)

Figure 2: The oil analysis – representation of MUFAs and PUFAs (g/100 g oil)

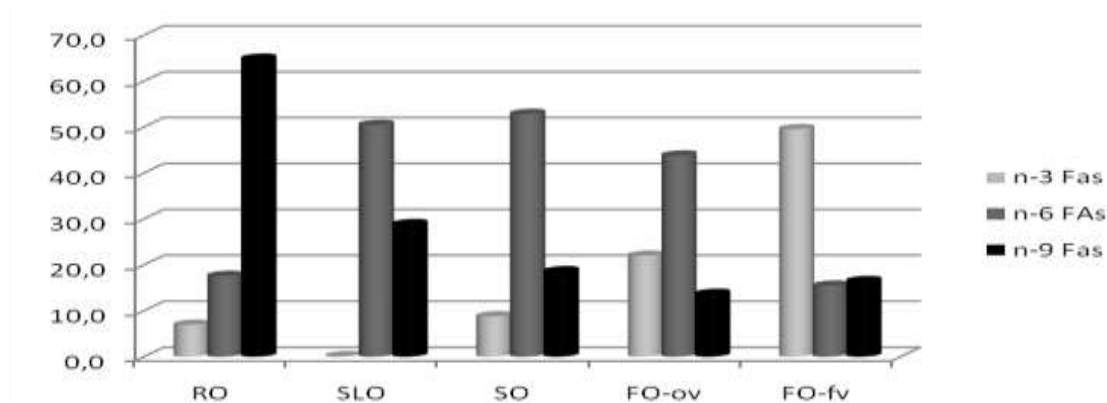
	RO	SLO	SO	FO-ov	FO-fv
MUFAs	64,851	28,845	18,593	13,670	16,451
PUFAs	24,517	50,538	61,623	65,746	64,977



Graph 2: The oil analysis – representation of MUFAs and PUFAs (g/100 g oil)

Figure 3: The oil analysis – content of individual groups of FAs (g/100 g oil)

	RO	SLO	SO	FO-ov	FO-fv
n-3 FAs	6,939	0,078	8,774	21,974	49,522
n-6 FAs	17,578	50,460	52,849	43,772	15,455
n-9 FAs	64,851	28,845	18,593	13,670	16,451



Graph 3: The oil analysis – content of the individual groups of FAs (g/100 g oil)

### Conclusion

The n-3 : n-6 FAs ratio in rapeseed oil was in the ideal interval of 1 : 5. It contains mainly MUFAs and less PUFAs than the other oils. Compared to rapeseed oil the sunflower oil is less suitable. From the view of dietetics the excessive supply of n-6 FAs together with the absence of n-3 FAs in foodstuffs or feeds can be valued negatively. From the view of dietetics the fibre varieties flaxseed oil is highly attractive (high content of n-3 FAs ( $\alpha$ -linolenic fatty acid) and lower content of n-6 FAs). The representation of these FAs forms the ideal ratio of n-3 : n-6 that is 1 : 0,3 in fibre flaxseed oil.

### Acknowledgements

Financial support of the Experimental program (Grant No MSM6215712402) “Veterinary aspects of safety and food quality” is gratefully acknowledged.

### References

- BETTI, M., PEREZ, I.T., ZUIDHOF, J.M., RENEMA, A.R. Omega-3-enriched broiler meat: 3. Fatty acid distribution between triacylglycerol and phospholipid classes, *Poultry Science*, 2009, vol. 88, no. 8, p. 1740-1754.
- COBOS, A. et al. 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
- WIECEK, J., SKOMIAL, J., Restricted feeding and linseed oil as modifiers of the fatty acid profile in pork, *Journal of Animal and Feed Science*, 2004, vol. 13, no. 2, p. 43 – 46

**Contact address:** Petra Hudečková, Mgr., Department of Nutrition, Animal Husbandry and Animal Hygiene, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, hudeckovap@vfu.cz

## **Složení parohů Jelena evropského (*Cervus elaphus*) jako podklad optimalizace výživy z hlediska kvality trofejí**

### **Composition of antlers of Red Deer (*Cervus elaphus*) as a groundwork for an optimization of nutrition in respect to the quality of a hunting trophy**

**Jámbor Márk, Suchý Pavel, Straková Eva**

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

#### **Summary**

*In this study are presented first results from an antlers analysis, which were focused on the specific gravity of antlers and of parts of antlers (brow tine, bay antler, royal antler, crown tine, upper and lower base of beam), which determinate the total weight of antlers, which is one of the most significant criterion during an assesment of a trophy value. First results of this study corroborate that the antler is not homogenous tissue, but it is significantly different in its particular parts, especilly in their specific gravidities. In this regard the highest specific gravidity has the bay antler 1,579 g.cm<sup>-2</sup>, the lowest specific gravidity has the upper base of beam 0,977 g.cm<sup>-2</sup>. Difference between these average values is statisticaly significant ( $P \leq 0,01$ ).*

**Keywords:** *Red Deer; weight; volume; specific gravidity of antlers and of parts of antlers*

#### **Úvod**

V současné době je předmětem velkého zájmu oborový nebo farmový chov jelení zvěře, za účelem produkce zvěřiny, ale i kvalitních trofejí. Chovatelé v evropských podmínkách se stále více setkávají s problémem, i u dobře vyvinutého paroží, s jeho nízkou hmotností, která je jedním z významných kritérií při posuzování kvality trofeje. Hmotnost parohu je dána jeho specifickou hmotností a je ovlivněna i jeho chemickým složením. Ve vědecké literatuře existuje jen málo exaktních prací zabývajících se touto problematikou. Na kvalitě parohů se podílejí jak vnitřní, tak i vnější faktory. Nejvýznamnější z vnitřních faktorů je genetická dispozice, z vnějších faktorů je rozhodující především výživa. I při vynikající genetické dispozici (genotypu) jedince, bez kvalitní výživy, se nemůže vytvořit kvalitní trofej. Tuto skutečnost potvrzuje i řada publikovaných výsledků studií na jelení zvěři, uváděných autory Tollefson et al. (2010), Krojerova-Prokesova et al. (2010), Gonzalez-Hernandez et al. (2000), Ceacero et al. (2009), Ceacero (2010), Gomez et al. (2008), Estevez (2009), Strickland -Demarais (2008) nebo Jeon et al. (2006). Citovaní autoři upozorňují na význam výživy na růst a vývoj paroží, a to nejen ve vztahu k dietárnímu příjmu minerálních látek (včetně stopových prvků), ale i organických živin, především proteinů.

#### **Materiál a metodika**

Cílem naší práce bylo zjistit, zda existují vztahy mezi hmotností parohů, jejich strukturou a chemickým složením parohů a na základě dosažených poznatků navrhnout optimalizaci výživy jelenů, především v období tvorby parohů. Výzkumná činnost probíhá ve spolupráci s Univerzitou v Kaposváru, jelení farma Zselice (Maďarsko).

Materiál (parohy) pro analýzy byly dovezeny v podobě shozů z roku 2010. Jednalo se o 16 kusů parohů stejné věkové kategorie (4 letí jeleni).



Metodicky byl každý paroh fotodokumentován, zvážen jako celek a po rozřezání i jeho jednotlivé části (očník, nadočník, opěrák, koruna, horní a dolní lodyha). Kromě hmotnosti byl u parohu a jeho částí stanoven objem v odměrném válci ve vodním médiu. Z hmotnosti a objemu byla vypočítána specifická hmotnost parohu a jeho částí. Nejnáročnější operací je příprava vzorků pro chemickou analýzu, což předpokládá převést paroh a jeho části do homogenní práškové podoby. V současné době probíhají chemické analytické práce. Při chemických rozborech je pozornost zaměřena na stanovení nejen anorganických (Ca, P, Mg, Na, K), ale i organických substancí (protein, aminokyseliny, tuk).

### Výsledky

Předmětem rozborů byl soubor 16 parohů (shozů) populace čtyřletých jelenů. Jednalo se o pravou část paroží. Individuální hmotnost analyzovaných parohů se pohybovala v rozmezí od 470 g do 1 440 g, objem od 410 cm<sup>2</sup> do 1 090 cm<sup>2</sup> a specifická hmotnost od 1,067 g.cm<sup>-2</sup> do 1 090 1,397 g.cm<sup>-2</sup>. V tabulce 1 jsou uvedeny průměrné hodnoty hmotnosti, objemu a specifické hmotnosti parohů a jejich částí u čtyřletých jelenů.

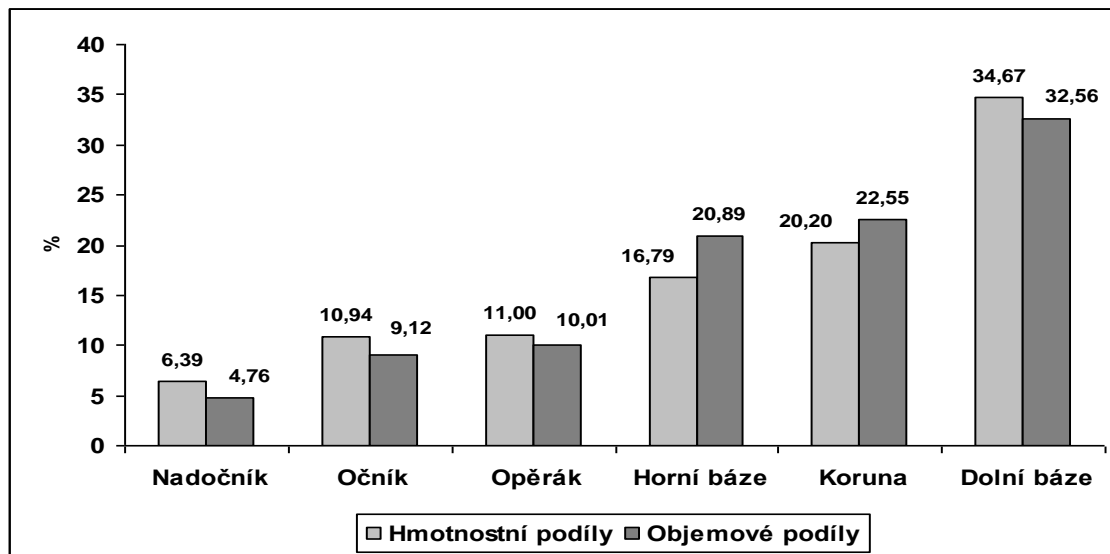
Tabulka 1: Průměrná hmotnost, objem a specifická hmotnost parohů jelena evropského (SD směrodatná odchylka)

	<i>Hmotnost parohu (g)</i>			<i>Objem (cm<sup>2</sup>)</i>		<i>Sp. hm. (g.cm<sup>-2</sup>)</i>	
	<b>n</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>	<b>Průměr</b>	<b>SD</b>
<b>Celý paroh</b>	16	955,69	252,64	792,00	201,26	1,198	0,104
<b>Očník</b>	16	106,13	33,63	73,94	22,16	1,465	0,120
<b>Nadočník</b>	10	62,00	27,91	39,50	17,67	1,579	0,212
<b>Opěrák</b>	15	106,67	35,14	81,20	27,75	1,330	0,108
<b>Koruna</b>	16	195,94	84,86	182,88	77,99	1,081	0,119
<b>Dolní báze</b>	16	336,25	96,05	264,06	70,11	1,278	0,128
<b>Horní báze</b>	16	162,81	30,87	169,38	37,32	0,977	0,139

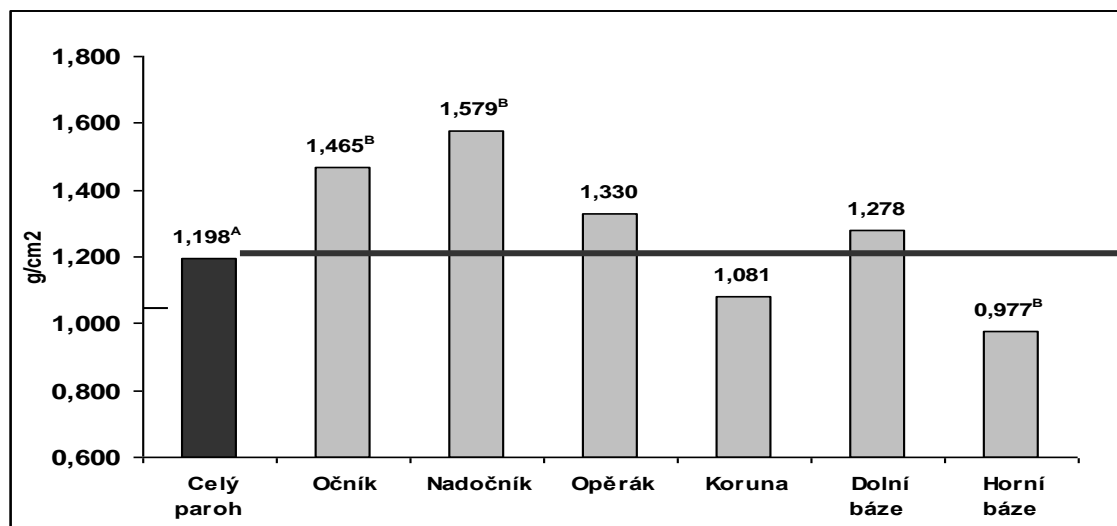
Z výsledků je zřejmé, jak dokumentuje graf 1, že hmotnostně zaujímá v rámci parohu nejnižší podíl nadočník (6,39 %) a nejvyšší podíl zaujímá dolní báze lodyhy. Z téhož grafu je zřejmé, že hmotnostním poměrům jednotlivých částí parohu, přibližně odpovídají i objemové parametry. I zde na celkovém objemu se nejméně podílí nadočník (4,76 %) a nejvíce dolní báze lodyhy (32,56 %).

O celkové hmotnosti parohu rozhoduje specifická hmotnost jeho částí. Celková průměrná specifická hmotnost analyzovaných parohů byla 1,198 g.cm<sup>-2</sup> (tabulka 2).

Z grafu 2 je zřejmé, že paroh není homogenní, ale že se jeho jednotlivé části vzájemně významně liší. Vyšší specifickou hmotnost od průměrné hodnoty má očník, nadočník, opěrák a dolní báze, naopak nižší má koruna a horní báze. Vysoce průkazně ( $P \leq 0,01$ ) vyšší specifickou hmotnost ve srovnání s průměrnou specifickou hodnotou parohu má očník a nadočník, vysoce průkazně nižší ( $P \leq 0,01$ ) horní báze lodyhy.



Graf 1: Průměrné hmotnostní a objemové podíly jednotlivých částí z celého parohu



Graf 2: Průměrné hodnoty specifické hmotnosti parohu a jeho částí ( $P \leq 0,01$  AB)

### Závěr

Prvé výsledky rozborů jeleních parohů dokládají, že paroh není homogenní tkáň, ale významně se liší jeho jednotlivé části, a to především jejich specifická hmotnost, která má přímý vztah k celkové hmotnosti parohu, která je významným kritériem při hodnocení trofeje.

### Literatura

V materiálech u autorů.

**Kontaktní adresa:** Márk Jámboř, MVDr., Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, jamborm@vfu.cz, H10394@vfu.cz

## Změny chemického složení bažantích těl v průběhu jejich výkrmu

### Variation in a chemical composition of pheasant bodies during their fattening

Karásková Kateřina, Jámboř Márk, Jůzl Radovan, Suchý Pavel, Straková Eva

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

#### Summary

*Changes in a chemical composition of pheasant body were measured at regular intervals during their fattening till the age of 119 days. Content of nitrogen substances, fat, ash, calcium, phosphorus and magnesium were measured in the whole body of pheasant (*Phasianus colchicus* L.). Content of nitrogen substances was in the range of 519.3 – 933.8 g/100g dry matter, content of fat 48.2 – 312.2 g/100g dry matter, ash 72.3 – 133.5 g/100g dry matter, calcium 15.3 – 41.3 g/100g dry matter, phosphorus 10.9 – 24.9 g/100g dry matter and magnesium 0.9 – 1.9 g/100g dry matter.*

**Keywords:** *pheasant; fattening; nitrogen substance; fat; ash; calcium; phosphorus; magnesium*

#### Úvod

Nejpočetnějším druhem pernaté zvěře chované u nás je bažant obecný (*Phasianus colchicus* L.). Jeho maso se díky svému složení jeví jako dobrý zdroj kvalitních nutrientů. Chemickým složením bažantího masa se ve své práci zabýval Petkov (1984), který uvádí vyšší nutriční hodnotu prsní svaloviny ve srovnání se svalovinou stehenní. Také Večerek et al. (2005) uvádí změny chemického složení svaloviny prsní a stehenní v souvislosti s intenzivním výkrmem bažantích kuřat. Pro konzumenta je však důležité nejen chemické složení, ale také sensorické vlastnosti. Barva, šťavnatost, křehkost a chuť masa patří mezi nejdůležitější charakteristiky masa u spotřebitele (Riskvik E, 1994). Sensorickými vlastnostmi bažantího masa se ve své práci zabýval Hofbauer et al. (2010).

Nutriční složení svaloviny je ovlivněno řadou faktorů. Významným vnějším faktorem ovlivňující chemické složení tkání a růst bažantů je výživa. Současné krmné směsi používané v umělých odchovnách bažantů však zcela neodráží svým složením jejich živinové a energetické nároky. Jako klíčový faktor ve výživě bažantích kuřat k získání optimální konečné váhy uvádí Dordevic et al. (2010) hladinu proteinů. Experimentálním zvýšením hladiny proteinů v dietě bažantích kuřat do věku 3 týdnů docílili také Ohlsson and Smith (2001) rychlejšího růstu.

Cílem této práce je zpřesnit požadavky bažantů v průběhu jejich odchovu na základě znalostí chemického složení těl bažantů a využít tyto poznatky k optimalizaci současných krmných směsí.

#### Materiál a metody

Jednodenní bažantí kuřata, která byla dovezena ze školního podniku ŠZP VFU Brno v Jinačovicích, byla odchovávána na hluboké podestýlce v akreditované experimentální stáji Ústavu výživy, zootechniky a zoohygieny s řízeným světelným, teplotním, zoohygienickým a krmně-technologickým režimem. Bažantím kuřatům byla podávána *ad libitum* voda a kompletní sypká krmná směs pro předvýkrm (BR 1) do věku 15 dnů,

krmná směs pro výkrm (BR 2) do věku 30 dnů a krmná směs pro dokrm (BR 3) do 119. dne výkrmu, tj. do ukončení pokusu.

V průběhu experimentu byl v pravidelných desetidenních intervalech náhodně vybrán určitý počet bažantů, od 50. dne věku s rozlišením pohlaví, kteří byli po omráčení a usmrcení podrobeni chemické analýze. Získané vzorky byly homogenizovány a analyzovány na obsah sušiny, hrubého proteinu ( $N \times 6.25$ ), tuku, mastných kyselin, aminokyselin, popele, vápníku (Ca), fosforu (P) a hořčíku (Mg). Sušina byla stanovena vysoušením vzorku za předepsaných podmínek vázkově při  $103 \pm 2^\circ\text{C}$  do konstantní hmotnosti. Dusikaté látky byly stanoveny analyzátozem Büchi (firma Centec automatika, spol. s.r.o.). Tuk byl stanoven analyzátozem ANKOM XT10 Fat Analyzer (firma O.K. SERVIS BioPro). Popel byl stanoven vázkově po zpopelnění při teplotě  $550^\circ\text{C}$  za předepsaných podmínek. Prvky vápník, fosfor, hořčík byly stanoveny zpopelněním a vyluhováním extrakcí a následnou titrací. Pro vyšší objektivitu jsou výsledky analýz vyjádřeny ve 100% sušině.

### Výsledky a diskuse

Tabulka č. 1 uvádí průměrné hodnoty měřených parametrů v 10denních intervalech. Obsah dusikatých látek se pohyboval v rozmezí 519.3 – 933.8 g/100g sušiny, jejich nejvyšší obsah byl zaznamenán ve věku 70 dnů. Obsah tuku se pohyboval v rozmezí 48.2 – 312.2 g/100g sušiny, nejvyšší obsah tuku byl zaznamenán ve věku 1 dne. Obsah popelovin se pohyboval v rozmezí 72.3 – 133.5 g/100g sušiny, jejich nejvyšší obsah byl zaznamenán ve věku 80 dnů. Obsah vápníku byl zaznamenán v rozmezí 15.3 – 41.3 g/100g sušiny, fosforu 10.9 – 24.9 g/100g sušiny a hořčíku 0.9 – 1.9 g/100g sušiny. Nejvyšší hodnoty vápníku i fosforu byly naměřeny v 80. dnu výkrmu.

Nárůst jednotlivých parametrů v průběhu výkrmu koresponduje s nárůstem hmotnosti bažantů, což dokládá také publikace Kuzniacka and Adamski (2010), kteří uvádí nárůst hmotnosti do věku 16ti týdnů, a to s největší intenzitou do stáří 8 týdnů.

Z hlediska vyšší objektivity jsou výsledky analýz všech měřených parametrů vyjádřeny v g/100g sušiny vzorku.

Tabulka 1: Nutriční složení sušiny bažantích těl v 10 denních intervalech (g/100g sušiny vzorku)

Den odběru	Měřený parametr ( $x \pm SD$ )					
	NL	Tuk	Popel	Ca	P	Mg
1.den	555.6 $\pm 5.19$	312.2 $\pm 3.82$	72.3 $\pm 1.62$	15.3 $\pm 0.58$	10.9 $\pm 0.18$	1.0 $\pm 0.15$
10.den	657.9 $\pm 11.67$	123.4 $\pm 18.25$	90.6 $\pm 2.90$	17.7 $\pm 1.11$	14.2 $\pm 0.55$	1.4 $\pm 0.22$
20.den	765.5 $\pm 7.03$	48.2 $\pm 5.59$	102.7 $\pm 1.62$	23.4 $\pm 0.47$	16.8 $\pm 0.17$	1.2 $\pm 0.21$
30.den	705.1 $\pm 6.38$	108.3 $\pm 10.70$	97.9 $\pm 3.67$	23.3 $\pm 0.83$	16.3 $\pm 0.33$	1.3 $\pm 0.16$
40.den	704.4 $\pm 38.12$	117.9 $\pm 40.01$	103.9 $\pm 5.50$	24.9 $\pm 0.94$	17.0 $\pm 0.59$	1.0 $\pm 0.22$
50.den	519.3 $\pm 33.36$	74.2 $\pm 30.75$	119.1 $\pm 8.61$	29.3 $\pm 2.37$	19.7 $\pm 1.52$	1.2 $\pm 0.24$

60.den	923.7 ± 54.77	113.6 ± 42.66	118.2 ± 4.09	28.6 ± 1.36	18.2 ± 0.85	0.9 ± 0.16
70.den	933.8 ± 36.80	103.1 ± 29.68	128.0 ± 6.78	34.2 ± 2.53	21.6 ± 1.09	1.5 ± 0.26
80.den	829.5 ± 41.98	117.6 ± 44.45	133.5 ± 8.38	41.3 ± 2.39	24.9 ± 1.77	1.3 ± 0.38
90.den	803.5 ± 54.47	145.0 ± 54.55	122.6 ± 7.70	34.1 ± 2.85	21.8 ± 1.97	1.7 ± 0.57
101.den	643.9 ± 44.55	181.2 ± 42.04	120.0 ± 8.82	34.3 ± 2.92	20.2 ± 3.53	1,9 ± 0.75
110.den	630.4 ± 51.63	210.3 ± 66.84	105.8 ± 6.80	30.2 ± 2.03	17.2 ± 1.12	1.6 ± 0.27
119.den	581.7 ± 64.40	284.0 ± 77.09	98.1 ± 11.59	28.3 ± 2.91	16.8 ± 1.97	1.6 ± 0,56

### Závěr

V průběhu výkrmu bažantích kuřat dochází k výrazným změnám v chemickém složení jejich těl. Postupně narůstá obsah proteinů, s vrcholem v 70. dnu výkrmu, obsah popela, vápníku a fosforu, s vrcholem v 80. dni výkrmu, následně byl zjištěn pokles obsahu těchto parametrů. Obsah tuku se zvyšoval v průběhu celého výkrmu. Množství hořčíku bylo signifikantně vyšší v druhé polovině výkrmu. Na základě výsledků pokusu lze zhodnotit živinové a energetické nároky bažantích kuřat v jednotlivých etapách výkrmu.

### Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu v rámci IGA 88/2010/FVHE VFU Brno.

### Literatura

- Dordevic M, Pecek S, Popovic Z, Dordevic N. Influence of dietary protein levels on production results and mortality in pheasants reared under controlled conditions. *Acta Veterinaria-Beograd*. 2010, 60: 79-88.
- Hofbauer P, Smulders FJM, Vodnansky M, Paulsen P, El-Ghareeb WR. A note on meat quality traits of pheasants (*Phasianus colchicus*). *European Journal of Wildlife Research*. 2010, 56, (5): 809-813.
- Kuzniacka J, Adamski M. Growth rate of body weight and measurements in pheasants reared up to the 24th week of life. *Archiv fur Tierzucht-Archives of Animal Breeding*. 2010, 53: 360-367.
- Ohlsson T, Smith HG. Early nutrition causes persistent effects on pheasant morphology. *Physiology and Biochemical Zoology*. 2001, 74: 212-218.
- Petkov R. Chemical composition of pheasant meat. *Veterinarno-meditsinski nauki*. 1984, 21: 106-110.
- Risvik E. Sensory properties and preferences. *Meat Science*. 1994, 36, (1-2): 67-77.
- Večerek V, Suchý P, Straková E, Vitula F, Mikundová M. Variation in the chemical composition of muscles in young pheasants during their growth. *Archiv für Tierzucht-Archives of Animal of Breeding*. 2005, 48: 290-298.

**Kontaktní adresa:** Kateřina Karásková, MVDr., Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09026@vfu.cz

## **Clinoptilolite effect on chicken efficiency and bone metabolisms** **Vliv klinoptilolitu na užítkovost a kostní metabolismus drůbeže**

**Macháček Miroslav, Straková Eva, Suchý Pavel**

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

### **Summary**

*The aim of our study was to describe the effect of clinoptilolite (ZeoFeed) on bone metabolism and growth intensity of broilers and its effect on growth intensity, performance, quality of eggshell and bone metabolism of layers. Our results show that clinoptilolite has a positive effect on live weight (broilers), quantity of eggs (layers), consumption of feed mixture for formation of one egg (layers), and distribution of calcium, magnesium and phosphorus in eggshells and bones (layers).*

**Keywords:** *clinoptilolite; bone metabolism; weight; egg; broiler; layers*

### **Introduction**

Feed additives are included in animal feeds to maximize animal growth and ensure animal optimum production. One of these feed additives is zeolite. Zeolite is crystalline aluminosilicate with cubic structure. Its addition in feed mixtures, has a positive effect on feedstuff conversion fleshiness. (Acosta a kol., 2005) Zeolite eliminates mycotoxines and reduces their negative effect. (Harvey a kol., 1993) Zeolites such as ammonium sorbent are also mixed with bedding, when conducive, to optimize animal health and production increase. (Eleroglu a Yalcin, 2005) Later examination results show improvement of feedstuff utilization, egg yield increasing and increasing egg shell stability. (Olver, 1997)

### **Materials and Methods**

#### **Clinoptilolite application during the fattening process of broiler chickens and effect on growth intensity and bone metabolism parameters**

For our study, we selected 400 one day old Ross 308 broiler chickens, and they were divided into two balanced groups according to sex-control (C) and experimental (E). We monitored their growing intensity and bone metabolism parameters while adding clinoptilolite to feedstuff mixture for broiler chickens. Chickens were kept in divided stables with automatic watering, manual feeding, and controlled light and temperature mode environment. Feeding mixtures for control and experimental groups were the same diet composition (BR1, BR2, BR3). Mixtures for the experimental group included 0,5; 1,5 a 2,5 % clinoptilolite (commercial additive ZeoFeed), which was a substitute for the same part of wheat. Feeding mixtures and drinking water were available in unlimited supplies at the all times.

#### **Longtime adding clinoptilolite for laying hens, have effect on growing intensity, efficiency, egg shell quality and bone metabolism parameters**

For the study, we selected 120 nineteen weeks old Bovans Goldline hybrid laying hens, with average weight 1735 g. They were divided into two balanced groups, control (C) and experimental (E). Laying hens were hatched in three levels cage technology with automatic watering, manual feeding, and controlled light and temperature mode environment. In one cage were two laying hens, floor surface for each one laying hen

was 0,1125 m<sup>2</sup>. Experiment start after 20 days long adaptation period in 22<sup>nd</sup> weeks old laying hens and experiment was finished in 68<sup>th</sup> weeks old laying hens. During caging, from 19<sup>th</sup> to 38<sup>th</sup> week old laying hens, eat the laying hens complete feeding mixture N1, consequential to the end of experiment they eat experimental feeding mixture N2. Feeding mixture control (C) and experimental (E) group have same composition, with the different, that feeding mixture for experimental group include 1 % clinoptilolite (commercial additive ZeoFeed), which was a substitute for the same part of wheat. Feeding mixtures and drinking water were available in unlimited supplies at the all times.

## Results

Live weight broiler chickens from control (C) group and experimental (E) group were during controlling period equal elevate and at the end of research were in hens and cocks from experimental (E) group higher over 3 % respective over 5 % than in chickens from control (C) group (hens E group 2416 g against 2345 g C group, cocks from E group 2829 g against 2694 g C group). Between groups were statistically consequence different from 30<sup>th</sup> days old chickens ( $P \leq 0,05$  a  $P \leq 0,01$ ). At the end of the experiment the chickens were destroyed and they were removed femur and tibia from right leg. In the bones were determined the dry matter, ash, calcium, phosphorus and magnesium. Part of ash in dry matter were in control (C) group from 53 to 54,1 %, in experimental (E) group were lower values, 51,7 to 53,2 %. In experimental (E) group were levels of calcium and phosphorus in dry matter lower than in control (C) group, excepting calcium and phosphorus values in tibia in cocks. The value of magnesium between groups and sex wasn't different. In both groups, without sex differences, was ash level higher in tibia then in femur. Because in experimental group was in bones higher value of fat, in hens over 19,5 (femur) to 21,3 % (tibia), in cocks over 22,0 (femur) to 26,3 % (tibia), and possible influence getting values fat capacity in bone tissue, were ash, calcium, phosphorus and magnesium set in fat-free dry matter. Values Trends set in original dry matter stay save, it mean lower value of ash, calcium and phosphorus in experimental group, excepting calcium in cocks in both bones. In fat-free dry matter compare with original dry matter were values relative higher.

Live weight of control (C) and experimental (E) group laying hens were during experimental period equable increasing. At beginning was average weight of control (C) group  $1730 \pm 0,13$ , in experimental (E) group  $1740 \pm 0,10$  g, at the end of the experiment it was  $2160 \pm 0,28$  and  $2120 \pm 0,28$  g. During all experiment we didn't set statistically consequence difference between both groups. Relative grown speed of laying hens in control (C) group compared with experimental (E) group was at the end higher over 3,1 %. Laying hens from experimental (E) group have had higher laying intensity over 1,1 %, that means increasing number of lay eggs over than 3,08 on hen. Average weight of lay eggs was in hens from control (C) group  $66,3 \pm 6,25$  g, in experimental (E) group hens was  $65,6 \pm 5,44$  g ( $P \leq 0,05$ ). In experimental (E) group was consumption of feed mixture for one egg lower, on 4.1 g, compare with control group. In 100% dry matter have had egg shells, from hens which got clinoptilolite (experimental (E) group) with compare control (C) group, statistically higher ( $P \leq 0,01$ ) content of crude protein, calcium and magnesium. Almost same, non-significantly different was found in ash and phosphorus. Values of same indicators was in both examined bones (*femur* a *tibiotarsus*) statistically consequence higher ( $P \leq 0,05$ ;  $P \leq 0,01$ ) when was in to the feed mixture added clinoptilolite (experimental (E) group),

except phosphorus in *femur*, where was non-significant increasing of her level. Most significant was increasing magnesium level in experimental (E) group, in *femur* over 50,4 %, in *tibiotarsus* over 32,4 %. If we compare the monitoring values in *femur* and *tibiotarsus* we can see, that levels of ash, calcium and phosphorus are higher in *tibiotarsus*, levels of crude protein and magnesium are lower. In most monitoring biochemical indicators wasn't in values between control (C) group and experimental (E) group important different and they were in reference values. Statistically consequence different was find only in concentration of total proteins ( $P \leq 0,1$ ), triacylglycerols ( $P \leq 0,05$ ) and magnesium ( $P \leq 0,1$ ), which were higher than in control (C) group and in enzyme AST ( $P \leq 0,05$ ), where was contrariwise the values in control (C) group lower than in experimental (E) group.

### Conclusion

In experiment was the clinoptilolite apply in to the nutrition of broiler chickens and in to the laying hens diet. They were higher weight of broiler chickens in experimental group at the end of experiment (over 5 %). Part of ash, calcium and phosphorus in dry matter was from remove femur and tibia in experimental group lower.

Between experimental and control group of laying hens wasn't note statistically consequence different in live weight. Relative growing speed was in control group compare with experimental group higher over 3,1 % at the end of the experiment. Laying hens from group E have higher laying intensity over 1,1 %. The quality of egg shell was in experimental group higher (higher content of crude protein, calcium and magnesium). Long time adding clinoptilolite in to the feed mixture have positive effect on depletion of calcium, phosphorus, magnesium and crude protein, in egg shell, too in bones. They have positive effect on increase egg production and decrease depletion of feeding mixture for one egg production. The good laying hens health was save.

### Acknowledgements

Financial support of the Experimental program (Grant No MSM6215712402) "Veterinary aspects of safety and food quality" is gratefully acknowledged.

### References

- 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
- ELEROGLU, H., YALCIN, H., Use of natural zeolite – supplemented liter increased broiler production. *South Africa Journal of Animal Science*, 2005, vol. 35, no. 2, p. 90-97
- HARVEY, R.B. et al. Efficacy of zeolitic ore compounds on the toxicity of aflatoxin to growing broiler-chickens. *Avian Diseases*, 1993, no. 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, no. 2, p. 220-222.

**Contact address:** Miroslav Macháček, MVDr., Department of Nutrition, Animal Husbandry and Animal Hygiene, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, machacekm@vfu.cz



## Vliv suplementovaného smektitu na kolonizaci enterotoxigenní *E. coli*, hematologické ukazatele a užítkovost odstavených selat

### The effect of smectite feed supplement on enterotoxigenic *E. coli* colonisation of intestinal mucosa, the haematological parameters and growth performance of weaning piglets

Vondrušková Hana, Trčková Martina, Slámová Ruth, Zralý Zdeněk, Alexa Pavel

*Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno, Česká republika*

#### Summary

*The effect of 2% smectite supplementation on enterotoxigenic E. coli (ETEC) colonisation of intestinal mucosa, ETEC shedding in faeces, haematological parameters of blood sera, and growth performance of piglets was estimated during the spontaneous coli-infection in this trial. Twenty weaned piglets at the age of 28 days were used for testing and were allocated to control (C; n=10) and experimental (S; n=10) group. The short-term (21 days) smectite supplementation had the positive effect on ETEC colonization of intestinal mucosa. The significant decrease of ETEC O149:K88 in the experimental group was recorded on days 9 (P=0.0017) and 11 (P<0.0001) post-infection in comparison with the control group. Moreover, the strain of ETEC O141:F18 was detected only in piglets from the C group. The smectite had also the positive effect on weight gains of piglets (P=0.034). Haematological profile did not show any significant differences among groups, merely a tendency of increased leukocyte count (P=0.066) was detected in the C group that could be probably caused by reaction on the infection and increased immunological response. Based on the results we concluded that smectite supplementation was effective in the reduction of ETEC shedding and improved growth performance of piglets. The further examinations are necessary for wider application of smectite in the prevention of diarrhoeal diseases in weaning pigs.*

**Keywords:** *E. coli* infection; haematology; montmorillonit; feed additives

#### Úvod

Průjmy odstavených selat (PWD–postweaning diarrhoea) jsou závažným problémem, který ovlivňuje nejen zdraví a růst selat, ale zejména ekonomickou stránku chovu prasat. Hlavními původci PWD jsou enterotoxigenní *Escherichia coli* (ETEC), jejichž incidence v chovu je stále na prvním místě v žebříčku infekčních agens (Alexa a kol., 2002). Od roku 2006 platí v celé Evropské unii zákaz používání antibiotik v prevenci enterálních onemocnění selat (Regulation, EC No 1831, 2003). Podstatou zákazu je zábrana kontaminace potravin a surovin živočišného původu antibiotickými rezidui a vzniku rezistentních bakteriálních kmenů z důvodu nadměrné aplikace antibiotických stimulantů růstu. V důsledku tohoto opatření jsou hledány různé alternativní suroviny se stejnou nebo alespoň podobnou účinností jako antibiotika, z nichž mnohé jsou komerčně dostupné (probiotika, prebiotika, organické kyseliny, ZnO, fytobiotika...). V poslední době je diskutována otázka efektivity jílových minerálů v prevenci průjmů a zlepšení užítkovosti selat (Yu a kol., 2008; Vondrušková a kol., 2010). Jílové minerály se vyznačují sorpční schopností, která umožňuje vázat různé antigeny jak v krmivu, tak v živém organismu. Účinnost je rovněž ovlivněna druhem minerálu a obsahem iontů a molekul v jeho mezivrstev (Williams a kol., 2008). Smektit je jílový minerál se zastoupením jílové frakce montmorillonitu (Guggenheim a kol., 2006) a je běžně užíván v humánní medicíně při léčbě průjmů. Cílem práce bylo posoudit vliv smektitu na

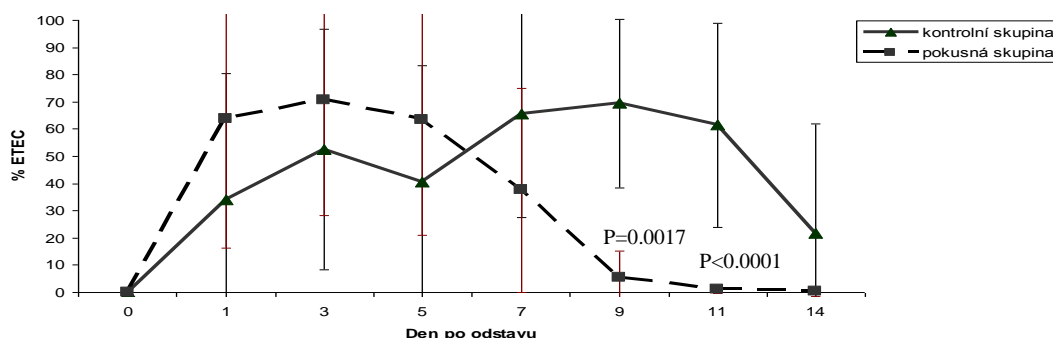
průběh průjmové koliinfekce, na vybrané hematologické ukazatele krve a růst odstavených selat.

### **Materiál a metody**

Testování bylo provedeno na 20 selatech rozdělených do dvou skupin na základě hmotnosti a pohlaví. Po dobu 21 dní skupina kontrolní (C) přijímala standardní krmnou směs (KS) pro odstavená selata, skupina pokusná (S) přijímala KS obohacenou o 2% smektitu. KS byly analyzovány na obsah základních živin. Selata byla vážena na začátku a na konci pokusu (LBW). Z hmotnostních přírůstků selat (BWG) a příjmu krmiva (FI) byla vypočítána konverze krmné směsi (FCR). Pro zjištění osídlení střevní sliznice selat ETEC byly prováděny v pravidelných intervalech rektální výtěry. Po kultivaci rektálních výtěrů na krevním a Mac Conkey agaru bylo posuzováno procentuální zastoupení hemolytických kolonií z celkového počtu (Alexa a kol., 2002). Typizace O-antigenů u izolátů *E. coli* a přítomnost kolonizačních faktorů byla prováděna sérologicky (Salajka a kol., 1992). Odběr vzorků krve v množství 10 ml pro vyšetření hematologických ukazatelů byl odebrán 21. den pokusu punkcí v. *cava cranialis*. Na přístroji Coulter Counter M4 byly vyšetřeny základní hematologické ukazatele, počet leukocytů byl určen mikroskopicky (Nikon Eclipse E600).

### **Výsledky a diskuze**

Průběh kolonizace ETEC u skupin C a S je znázorněn v grafu 1. U obou skupin bylo pozorováno vylučování ETEC O149:K88. Od 5. dne pokusu došlo však u skupiny C k převažující kolonizaci kmene ETEC O141:F18, která pokračovala až do 14. dne. U selat skupiny S byl 5. den pokusu pozorován zřetelný pokles v kolonizaci střevní sliznice ETEC, který byl 9. ( $P=0.0017$ ) a 11. den ( $P<0.0001$ ) statisticky průkazný. Signifikantně významný pokles kolonizace byl pozorován také v práci Trčková a kol. (2009) při suplementaci 1% kaolinu odstaveným selatům po infekci čelenžním kmenem ETEC. V humánní oblasti byly rovněž zaznamenány pozitivní účinky montmorillonitu při léčbě průjmů u dětí (Wang and Fang, 1995). Hematologické ukazatele krevního séra jsou uvedeny v tabulce 1 a odpovídají fyziologickému rozmezí kategorie odstavených selat (Thorn, 2000). Nebyly pozorovány významné rozdíly mezi selaty se standardní KS a selaty se suplementací smektitu. Vyšší imunologická odpověď organismu v důsledku masivní infekce se projevila zvýšením počtu leukocytů u selat skupiny C ( $P=0.066$ ). V některých studiích je diskutován možný vyvazovací účinek jílových sorbentů na obsah různých minerálních látek, zejména Fe, které se dále může projevit nižším počtem erytrocytů (Yu a kol., 2008). V naší práci i v jiných experimentech tento účinek prokázán nebyl (Papaioannou a kol., 2004). Stabilní hodnoty hematologického profilu byly pozorovány i dříve (Katsoulos a kol., 2005; Trčková a kol., 2009). Obsah živin v kontrolní a pokusné KS odpovídal doporučené dietě pro odstavená selata (NRC, 1998). KS byly selaty dobře přijímány. Selata přijímající suplementovanou KS s 2% smektitu vykazovala statisticky vyšší hmotnostní přírůstky ( $P=0.034$ ; Tabulka 2). Již v minulosti byly prokázány příznivé účinky jílu na užítkovost nejen odstavených, ale také rostoucích a výkrmových prasat (Papaioannou a kol., 2004; Trčková a kol., 2009).



Graf 1: Průběh kolonizace ETEC u selat kontrolní a pokusné skupiny

Tabulka 1: Hematologické parametry selat

Parametr	C	S
erythrocyty ( $10^{12}/l$ )	6.38±0.60	6.30±0.88
leukocyty ( $10^9/l$ )	22.27±6.44 <sup>a</sup>	17.16±5.18 <sup>b</sup>
hematokrit (%)	33.41±2.26	33.75±5.90
lymfocyty (%)	61.05±10.85	62.20±11.63
neutrofily (%)	38.05±11.27	35.85±11.97
monocyty (%)	0.25±0.35	0.75±0.68
eosinofily (%)	0.45±0.64	0.75±0.59
basofily (%)	0.20±0.26	0.45±0.37

<sup>a,b</sup> P=0.066

Tabulka 2: Hmotnost a přírůstek selat, příjem a konverze krmiva

Parametr	Den	C	S
LBW (kg)	1	8.50±0.59	8.59±1.01
	22	12.39±2.45	14.28±2.30
BWG (kg/s/d)	1-22	0.19±0.09 <sup>a</sup>	0.27±0.07 <sup>b</sup>
FI (kg/s/d)	1-22	0.46±0.21	0.52±0.22
FCR	1-22	2.42	1.93

<sup>a,b</sup> P=0.034

### Závěr

Sníženou kolonizací ETEC u selat přijímající suplementovanou KS s 2% smektitu lze považovat za významný ukazatel v prevenci průjmů odstavených selat. Rovněž příznivý vliv jílového sorbentu na růstové ukazatele selat přispěl k udržení lepšího zdravotního stavu. Využití jílových komponent v kritické fázi ontogenetického vývoje selat bude vyžadovat další studie.

### Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory grantů NAZV MZe ČR QH71054, MZE0002716202 a MŠMT ČR AdmireVet (CZ 1.05/2.1.00/01.0006-ED0006/01/01).

### Literatura

K dispozici u autorů.

**Kontaktní adresa:** Hana Vondrušková, Ing., Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, Hudcova 70, 621 00 Brno, vondruskova@vri.cz

## Vliv lykopenu a vitaminu E na růst, kvalitu a oxidativní stabilitu stehenního svalstva brojlerových kuřat

### The effect of lycopene and vitamin E on growth performance, quality and oxidative stability of leg meat in broiler

<sup>1</sup>Bubancová Ivana, <sup>2</sup>Straková Eva

<sup>1</sup> Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Praha Uhřetíněves, Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce  
<sup>2</sup> Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

A 2x3 factorial experiment was conducted to evaluate the effect of lycopene (L; 0 and 75 mg/kg) and  $\alpha$ -tocopheryl acetate (E; 0, 50 and 100 mg/kg) in the diet for chickens on growth traits, oxidative stability and chemical composition of leg meat and vitamins content in meat and liver. Significant interaction of L and E addition was found out in body weight in 21st day of age ( $P=0.005$ ), malondialdehyde content in raw ( $P<0.001$ ) and 3 days stored leg meat at temperature from 2.5 to 4°C ( $P=0.032$ ), cholesterol content in leg meat ( $P<0.001$ ) and L content in liver ( $P=0.006$ ). The chickens with the highest body weight came from group fed 75 mg/kg of L with 50 mg/kg of E. The  $\alpha$ -tocopheryl acetate supplement increased ( $P<0.001$ ) oxidative stability of raw and stored leg muscle. The lowest value of cholesterol content in meat was recorded in broilers fed 75 mg/kg of L (3.49 g/kg of DM) contrary to control treatment (3.93 g/kg of DM). Dietary E reduced fat content ( $P=0.033$ ) and increased ash content in leg meat. The highest concentration of L in liver was determined after supplementation of diet by the highest level of E and L (2.82 mg/kg of DM) in comparison with control group (0.28 mg/kg of DM).

**Keywords:** lycopene;  $\alpha$ -tocopheryl acetate; chicken; performance; leg meat quality

#### Úvod

Úloha antioxidantů pro zdraví přitahuje v současné době stále větší pozornost. Mezi antioxidanty patří i lykopen. Lykopen je karotenoid a jeho hlavním zdrojem jsou rajčata a výrobky z nich. Lykopen je mimořádně účinný při kontrole degenerativních onemocnění, je preventivní proti kardiovaskulárním chorobám a rakovině prostaty, zažívacího traktu a kůže, snižuje riziko vzniku rakoviny slinivky břišní, děložního čípku a blokuje tvorbu škodlivého cholesterolu. Riziko vzniku volných radikálů se zvyšuje se stresem. Rychlý růst, vysoká intenzita metabolismu a vysoká míra reprodukce je pro drůbež jistou formou stresu. Účinnost lykopenu na užitkovost a kvalitu masa u brojlerů sledovali Leal et al. (1999) a Ševčíková et al. (2008).

Alfa tokoferol je nejvíce aktivní přírodní antioxidant používaný k výživě zvířat. Dietní suplementace antioxidanty je účinný způsob jak udržet stabilitu lipidů v mase. Tokoferoly mohou také poskytovat zdravotní přínos především v prevenci rakoviny a koronárních chorob. Suplementace krmných směsí vitaminem E má tendenci ke zlepšení růstu a využití krmiva brojlerů a podstatně zvyšuje stabilitu masa před oxidativním poškozením (Skřivan et al., 2010).

Tato studie hodnotí vliv lykopenu, doplněného do krmné směsi samostatně nebo společně s vitaminem E, na užitkovost brojlerových kuřat a oxidační stabilitu masa.

## Materiál a metody

Pět set čtyřicet kohoutků Ross 308 (0 dní věku) bylo náhodně rozděleno do 6 skupin v závislosti na obsahu lykopenu (0 a 75 mg/kg) a vitamínu E (0, 50 a 100 mg/kg) v krmné směsi. Jako zdroj lykopenu byl použit Lycopene powder (Alchimica Company). Vitamin E byl přidán ve formě Rovimix E-50 adsorbát (Biofaktory, s.r.o. Praha). Krmivo a voda byly poskytnuty *ad libitum*. Kuřata byla ustájena při 24 hodinovém konstantním osvětlení v kotcích 2 x 3,3 m na dřevěných hoblinách. Byla sledována spotřeba krmiva, živá hmotnost a úhyn. Kuřata byla vážena 0., 21. a 35. den věku. Z každé skupiny bylo vybráno a poraženo deset brojlerů, u kterých bylo odebráno a zmrazeno stehenní svalstvo a játra k analýzám.

Sušina masa byla stanovena při teplotě 105 °C, obsah popela žháním při 550 °C (AOAC, 1997), obsah tuku na přístroji Soxtec 1045 (Tecator Comp., Švédsko) a obsah dusíkatých látek pomocí Kjeltec Auto 1030 (Tecator Comp., Švédsko). Stanovení obsahu cholesterolu bylo realizováno na plynovém chromatografu s SAC-5 kapilární kolonou (Supelco, Bellefonte, USA) izotermicky při 285 °C. Oxidace lipidů ve vzorcích stehenního svalstva byla měřena metodou Piette a Raymond (1999) a výsledky byly vyjádřeny jako TBARS (thiobarbiture acid reactive substances) v mg malondialdehydu (MDA)/kg svalstva. Před analýzou byla stehenní svalovina rozmrazena a skladována v chladničce při teplotě v rozmezí 2,5 až 4 °C po dobu 0 a 3 dnů. Obsahy  $\alpha$ -tokoferolu a retinolu ve stehenním svalstvu a lykopenu a luteinu v játrech byly stanoveny v souladu s EN 12822 Evropská norma (2000) pomocí HPLC (Shimadzu, VP série).

## Výsledky

Při sledování hmotnosti kuřat byly zaznamenány průkazné rozdíly v 21. dni věku ( $P=0,005$ ). Konverze krmiva nebyla ovlivněna ani přidavkem lykopenu ani přidavkem vitamínu E. Kombinace vitamínu E s lykopenem průkazně ovlivnila obsah MDA v syrovém stehenním svalstvu ( $P<0,001$ ) a v mase po 3 dnech skladování ( $P=0,032$ ). Přídavek 50 mg/kg vitamínu E bez lykopenu (0,271 mg/kg) a 100 mg/kg vitamínu E s lykopenem (0,276 mg/kg) průkazně ( $P<0,001$ ) snížil MDA v nultém dni oproti 0 mg/kg krmné směsi vitamínu E spolu s 75 mg/kg lykopenu (0,511 mg/kg). Přídavek vitamínu E průkazně ( $P<0,001$ ) snížil obsah MDA v mase, které bylo skladováno při teplotě 2,5 - 4 °C 3 dny. Z chemických ukazatelů kvality stehenního svalstva byla interakce zaznamenána u obsahu cholesterolu ( $P<0,001$ ). Samotný přídavek lykopenu snížil obsah cholesterolu (3,49 g/kg sušiny) oproti kontrole (3,93 g/kg sušiny). Vitamin E snížil ( $P=0,033$ ) tuk a zvýšil ( $P=0,020$ ) popel ve stehenním svalstvu. Přídavek lykopenu do krmné směsi pro brojlerová kuřata průkazně ( $P=0,002$ ) snížil obsah vitamínu E a zvýšil ( $P<0,001$ ) obsah vitamínu A ve stehenním svalstvu. Neprůkazně vyšší nárůst vitamínu E ve stehenním svalstvu po suplementaci krmné směsi vitaminem E byl zaznamenán u skupin bez přídavku lykopenu. Současný přídavek lykopenu s vitaminem E do krmné směsi průkazně zvýšil ( $P=0,006$ ) obsah lykopenu v játrech. Přídavek lykopenu ani vitamínu E neměl průkazný vliv na ukládání luteinu v játrech.

## Diskuze

V souladu s našimi výsledky Jain et al. (1999) shodně uvádějí, že živá hmotnost ani spotřeba krmiva nebyly ovlivněny doplňkem lykopenu. Zvýšení spotřeby krmné směsi v důsledku suplementace lykopenem bylo pozorováno pouze v chovu při vyšších teplotách (Sahin et al., 2006). V případě této studie přídavek vitamínu E průkazně snížil živou hmotnost kuřat na konci výkrmu. Zatímco Attia et al. (2001) popisují zvýšení živé

hmotnosti v šesti týdnech věku v souvislosti se zvyšováním dávek vitamínu E. Dále uvádějí, že vliv hladiny vitamínu E na spotřebu krmné směsi a konverzi zaznamenán nebyl. Kombinace lykopenu s vitamínem E průkazně snížila koncentraci MDA v mase. Samotný vliv lykopenu nebyl prokázán. V pokusu Leal et al. (1999) došlo k neprůkazné redukci produkce MDA v mase po 3 dnech skladování u kuřat krmných směsí obohacenou o lykopen. Snížení cholesterolu v mase bylo zaznamenáno u kuřat kterým byla zkrmována směs obohacená o samotný lykopen, ale i v kombinaci s vitamínem E. Rao a Shen (2002) navíc zjistili pokles cholesterolu v krevní plazmě na základě suplementace krmné směsi lykopenem. Z jiné studie (Sahin et al., 2006) je patrný nárůst koncentrace HDL cholesterolu v krevní plazmě japonských křepelek, zatímco koncentrace LDL cholesterolu se průkazně snížila.

### **Závěr**

Naše výsledky prokazují pozitivní vliv přídatku lykopenu a vitamínu E v krmné směsi brojlerových kuřat na kvalitu produktů. Po přídatku lykopenu došlo ke snížení obsahu cholesterolu a ke zvýšení obsahu vitamínu A ve svalstvu. Samostatný vitamin E měl pozitivní vliv na obsah tuku v mase. Při kombinaci lykopenu a vitamínu E došlo ke snížení obsahu MDA a cholesterolu ve svalstvu a ke zvýšení obsahu lykopenu v játrech.

### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem Ministerstva zemědělství České republiky číslo MZe 0002701404.

### **Literatura**

ATTIA, A.A., ABOU-ZEID, A.E., MOHAMED, F.F., YAKOUT, H.M. Enhancement of broiler performance and immune response by  $\alpha$ -tocopherol supplemented in diets. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 2001, vol 8, no 4, s. 1029–1035.

JAIN, C.K., AGARWAL, S., RAO, A.V. The effect of dietary lycopene on bioavailability, tissue distribution, in-vivo antioxidant properties and colonic preneoplasia in rats. *Nutrition Research*. 1999, vol. 19, no. 9, s. 1383-1391.

LEAL, M., SHIMADA, A., RUÍZ, F., DE MEJÍA, G. Effect of lycopene on lipid peroxidation and glutathione-dependent enzymes induced by T-2 toxin in vivo. *Toxicology Letters*. 1999, vol. 109, no. 1-2, s. 1-10.

RAO, A.V., SHEN, H.L. Effect of low dose lycopene intake on lycopene bioavailability and oxidative stress. *Nutrition Research*. 2002, vol. 22, no. 10, s. 1125-1131.

SAHIN, K., ONDERCI, M.C., SAHIN, N. Effects of lycopene supplementation on antioxidant status, oxidative stress, performance and carcass characteristics in heat-stressed Japanese quail. 2006, vol. 31, no. 4, s. 307-312.

SKŘIVAN, M., DLOUHÁ, G., ENGLMAIEROVÁ, M., ČERVINKOVÁ, K. Effects of different levels of dietary supplemental caprylic acid and vitamin E on performance, breast muscle vitamin E and A, and oxidative stability in broilers. *Czech Journal of Animal Science*. 2010, vol. 53, no. 10, s. 167-173.

ŠEVČÍKOVÁ, S., SKŘIVAN, M., DLOUHÁ, G. The effect of lycopene supplementation on lipid profile and meat quality of broiler chickens. *Czech Journal of Animal Science*. 2008, vol. 53, no. 10, s. 431-440.

**Kontaktní adresa:** Ivana Bubancová, Ing., Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i., Přátelství 815, 104 00 Praha Uhřetěves, bubancova.ivana@vuzv.cz

## Vliv podávání lupiny (*Lupinus* spp.) na užítkovost brojlerových kuřat

### Effects of feeding lupin (*Lupinus* spp.) on production parameters of broiler chickens

Vopálenský Josef, Suchý Pavel, Straková Eva

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno  
Pokusná akreditovaná stáj Ústavu výživy, zootechniky a zoohygieny

#### Summary

The objective of the experiment was to investigate how diets containing lupin meal influence production parameters and conversion of the feed formula in fattened broiler chickens. As compared to the control group, in the experimental diet P1, 1/3 of nitrogen-containing substances (NS) from extracted soybean meal was replaced with NS from lupin meal and in P2 group, 2/3 of the NS were replaced. Feeding experimental diets did not significantly effect the mean live weight of chickens at the end of the fattening period at 42 days of age.

**Keywords:** fattening chickens; live weight; feed conversion

#### Úvod

Použití lupiny v dietách drůbeže testovala řada autorů, např. Schams-Schargh et al. (1994). V experimentu byl ověřován účinek sladkých lupin v dietách, zejména variety *Amiga*, v dávkách 6, 12 a 18 % lupiny. Autoři dospěli k závěrům, že mezi skupinami nebyly zjištěny signifikantní rozdíly týkající se výkrmnosti, procenta tuku a procenta hodnotných jatečních částí. RothMaier and Kirchgessner (1994), kteří testovali diety obsahující až 45 % lupiny bílé dospěli k závěru, že až 20 % lupiny bílé může být přidáno do diet brojlerů, aniž by to mělo nepříznivé účinky na jejich užítkovost. K obdobným závěrům dospěli Lettner and Zollitsch (1995), Sitko and Čermák (1998) nebo Teixeira and Dos (1995). Egorov et al. (2001) uvádějí, že nejlepší výsledky byly dosaženy s 20% zastoupením lupiny v dietě. Obsah 25 % lupiny v dietě se projevil signifikantním ( $P \leq 0.05$ ) snížením tělesné hmotnosti. Ke stejným závěrům došli i RothMaier and Paulicks (2003). Významným přínosem pro zlepšení nutriční hodnoty semen je jejich odslupkování, jak uvádějí Rubio et al. (2003), případně doplnění exogenních enzymů, což dokumentuje práce Mieczkowska and Smulikowska (2005).

Předložená práce rozšiřuje dosavadní poznatky a přispívá k využití lupinových semen jako významného zdroje proteinů v dietách určených pro výkrm brojlerových kuřat.

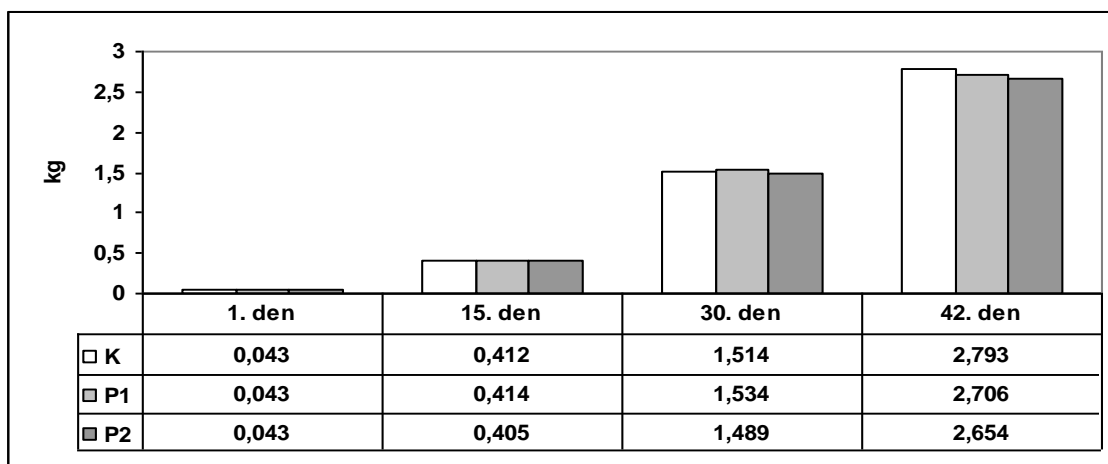
#### Materiál a metodika

Cílem předložené práce bylo ověřit, do jaké míry jde v dietách určených pro výkrm brojlerových kuřat nahradit sojový extrahovaný šrot, šrotem z lupinových semen (*Lupinus*) a vliv této komponenty na jejich užítkovost. V experimentu byla použita odrůda *Amiga* ze skupiny bílé kvetoucích lupin. Experiment byl realizován v pokusné akreditované stáji Ústavu výživy, zootechniky a zoohygieny, Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. Byly vytvořeny 3 skupiny sexovaných kuřat Ross 308, a to skupina kontrolní K 70 kuřat (35 slepiček a 35 kohoutků), skupina pokusná P1 (35 slepiček a 35 kohoutků) a skupina P2 (35 slepiček a 35 kohoutků). Kuřata byla vykrmována dle technologického postupu pro výkrm brojlerových kuřat Ross 308. Pokusné krmné směsi se lišily od kontroly tím, že u skupiny P1 byla 1/3 dusíkatých

látek (NL) sojového extrahovaného šrotu nahrazena NL z lupinového šrotu a u skupiny P2 byla náhrada 2/3 NL. Z hlediska zajištění požadované potřeby aminokyselin byly diety s lupinovým šrotem doplněny syntetickými aminokyselinami L-lysinem, L-threoninem a D, L-methioninem. V průběhu experimentu byla kuřata vážena 1., 15., 30. a 42. den výkrmu a stanovena jejich živá hmotnost. Dosažené výsledky byly zpracovány statistickým programem Unistat CZ verze 5.6 for Excel (2005).

### Výsledky a diskuse

Dosažené výsledky užitekosti ukazují na možnost náhrady sojového extrahovaného šrotu v dietách pro výkrm brojlerových kuřat šrotem z lupinových semen, které významně neovlivnily vývoj živé hmotnosti kuřat v průběhu výkrmu (graf 1). Z grafu je zřejmé, že ke konci výkrmu byl zaznamenán mírný, statisticky nevýznamný, pokles živé hmotnosti u skupiny P1 a P2. Podávání experimentálních diet významně neovlivnilo průměrnou hmotnost kuřat ve 42 dnu výkrmu.



Graf 1: Vývoj živé hmotnosti kuřat (kg) v průběhu pokusného období (K – kontrolní skupina, P1 a P2 – pokusné skupiny)

U pokusných skupin (P1 a P2) byla rovněž zaznamenána vyšší spotřeba krmných směsí na 1 kg přírůstku živé hmotnosti (1.82 kg a 1.87 kg) oproti kuřatům kontrolní skupiny (1.70 kg). Výsledky korespondují se závěry práce RothMaier and Kirchgessner (1994) nebo Schams-Schargh et al. (1994), kteří dospěli k obdobným závěrům, že dávky do 20 % lupiny v dietě signifikantně neovlivnily užitekost vykrmovaných kuřat. Z výsledků lze usuzovat, že v poslední fázi výkrmu, tj. od 30. dne výkrmu, nižší průměrnou živou hmotnost a vyšší spotřebu krmiva pravděpodobně ovlivnila i nižší hladina zejména esenciálních aminokyselin v krmných směsích u experimentálních skupin kuřat (tabulka 1).



Tabulka 1: Obsah aminokyselin v podávaných krmných směsích u jednotlivých skupin zařazených do experimentu

Aminokyseliny (g/kg)	BR 1			BR 2			BR 3		
	K	P 1	P 2	K	P 1	P 2	K	P 1	P 2
Asp	24.0	20.7	20.0	19.3	19.7	17.8	15.8	<b>13.8</b>	<b>12.5</b>
Thr	9.3	8.7	8.6	7.6	8.0	7.4	7.6	<b>6.7</b>	<b>6.0</b>
Ser	11.1	9.8	9.9	9.7	9.7	9.2	8.8	<b>7.8</b>	<b>7.4</b>
Glu	42.7	41.6	41.5	41.1	41.9	40.7	39.6	<b>36.8</b>	<b>32.7</b>
Pro	13.4	12.4	11.1	12.9	12.5	11.3	12.8	12.9	<b>8.8</b>
Gly	9.5	8.6	8.4	8.4	8.6	7.9	5.4	<b>4.8</b>	6.5
Ala	9.6	8.2	7.7	8.3	8.2	7.1	7.1	<b>5.9</b>	<b>6.6</b>
Val	10.9	9.4	8.3	8.6	8.5	7.5	8.0	<b>7.1</b>	<b>6.7</b>
Met	4.9	4.4	3.3	5.0	4.9	6.0	4.2	<b>4.0</b>	5.3
Ileu	10.0	9.3	8.6	8.5	8.7	7.9	6.5	5.6	<b>6.1</b>
Leu	17.8	16.6	16.0	15.6	15.9	14.6	12.9	11.2	11.9
Tyr	7.0	6.8	7.0	6.1	6.7	7.3	4.8	<b>4.6</b>	5.5
Phe	11.5	9.9	9.2	10.2	9.6	8.8	8.4	<b>7.1</b>	<b>7.2</b>
His	6.3	5.5	5.3	5.7	5.6	5.1	4.6	<b>3.5</b>	<b>4.0</b>
Lys	14.3	13.8	14.2	11.3	11.7	10.4	8.8	<b>7.6</b>	<b>8.6</b>
Arg	18.4	19.2	20.7	15.0	16.9	18.1	12.2	<b>11.9</b>	13.7

#### Poděkování

Práce vznikla jako součást VZ č. MSM 6215712402.

#### Literatura

- EGOROV IA, CHESNOKOVA NY, TAKUNOV IP 2001: Feed value of lupin for broiler chickens and laying hens. Kormoproizvodstvo, no. 1, p. 28-30
- LETTNER F, ZOLLITSCH W 1995: Lupins in broiler feeds. Forderungsdienst, **43**, 285-288
- MIECZKOWSKA A, SMULIKOWSKA S, NGUYEN CV 2004. Effect of enzyme supplementation of white lupin (*Lupinus albus* var. Butan)-containing diets on performance, nutrient digestibility, viscosity, pH, and passage rate of digesta in broiler chickens. J Anim Feed Sci, **13**, 475-486
- ROTHMAIER DA, PAULICKS BR 2003. Feeding and nutritional value of sweet blue and yellow lupin seed (*Lupinus angustifolius* L., *Lupinus luteus* L.) for broiler chicks. Arch Geflügelkd, **67**, 175-178
- ROTHMAIER DA, KIRCHGESSNER M 1994 White lupins (*Lupinus albus*, L) as a replacement for soybean meal in diets for fattening chickens. Arch Geflügelkd, **58**, 111-114
- RUBIO LA, BRENES A, CENTENO C 2003 : Effects of feeding growing broiler chickens with practical diets containing sweet lupin (*Lupinus angustifolius*) seed meal. Br Poult Sci, **44**, 391-397
- SCHAMS-SCHARGH M, ZOLLITSCH W, KNAUS W, LETTNER F 1994: Der Einsatz von Lupinen in der Hühnerfütterung. Bodenkultur, **45**, 163-175
- SITKO VA, ČERMÁK B 1998: Influence of lupin seed on performance and meat quality of broilers. Sborník Zemědělské Fakulty Jihočeské Univerzity, České Budějovice: Zootechnická řada, **15**, 3-9
- TEIXEIRA AS, DOS R 1995: Replacement of soyabeans by lupins (*Lupinus luteus*) in the feeding of broiler fowls. Rev Portug Ciênc Veter, **90**, 20-28

**Kontaktní adresa:** Josef Vopálenký, Ing., Ústav výživy, zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, j112@seznam.cz

## **Changes in inorganic substances in broiler chickens in relation to age and sex**

### **Změny anorganických substancí těla brojlerů v závislosti na věku a pohlaví**

**Navrátil Petr, Straková Eva, Suchý Pavel**

*Department of Nutrition, Animal Husbandry and Animal Hygiene*

#### **Summary**

*The objective of the experiment was to monitor changes in the composition of mineral substances in broiler chickens, hens and cockerels, hybrid combination ROSS 308, during their fattening period. Analyses of body composition were performed at 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 days of age. We assessed the content of ash, calcium, phosphorus and magnesium in chicken carcass dry matter. Our results suggest that there are considerable changes in the carcass mineral composition during the fattening of broiler chickens.*

**Keywords:** *broiler fattening; changes in body composition; ash; calcium; phosphorus; magnesium*

#### **Introduction**

The objective of the experiment was to investigate changes in the content of selected inorganic substances in broiler females and males which take place during their fattening. Regarding the development of skeletal structure, we focused on Ca, P and Mg, which are the most important elements for bone formation. Many authors such as Zelenka (1999), Kodeš and Výmola (2003), Zeman et al. (2006) or Zelenka et al. (2007) dealt with their role in poultry nutrition. Nowadays, very little information is available on changes in mineral composition in chickens' bodies during their development. One of the few publications that deal with chemical composition of whole chicken body is the paper by Macháček et al. (2009). The most of the publications, such as Suchý et al. (2002), Večerek et al. (2003) or Straková et al. (2003), are focused only on chemical composition of chicken breast and thigh muscles.

#### **Methods**

The objective of the experiment was to monitor changes in mineral composition of broiler chickens' bodies during their fattening. ROSS 308 chickens were kept on deep litter with automatic system of feeding and watering. Technological instructions for ROSS 308 chicken fattening were used to fatten the chickens. Each 5 days including the first day, 20 chickens were randomly selected (10 hens and 10 cockerels) to analyze body composition. The chickens were killed and their bodies were completely homogenized. The bodies were dried at 105° C and homogenized again using laboratory grinder. In the collected samples, we determined the content of ash, calcium, phosphorus and magnesium.

## Results and discussion

### Ash content

As shown in Figure 1, the ash content (mineral substances) increased markedly from 1 to 5 days of age. From 10 days of age to the end of the fattening period (40 days), we noticed the gradual decrease in ash content. We did not observe significant differences between mean values of ash content in relation to sex of the chickens. From 25 days of age on, we observed significant ( $P \leq 0.05$ ) and highly significant ( $P \leq 0.01$ ) differences in the ash content, which was higher in cockerels as compared to hens.

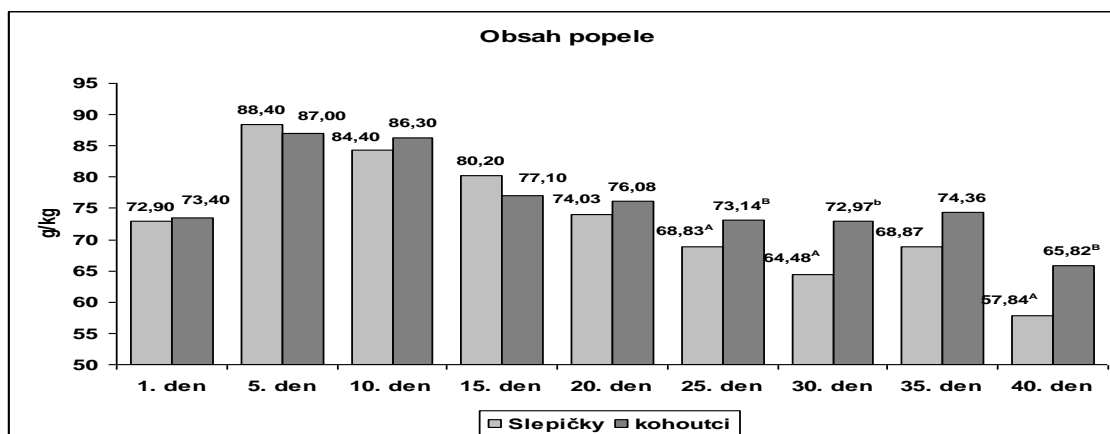


Figure 1: The mean ash content in dry matter of broiler chickens' bodies during the fattening period (AB  $P \leq 0.01$ , Ab  $P \leq 0.05$ )

### Calcium content (Ca)

Regarding the mean calcium content, we observed gradually increasing content in the dry matter until 20 days of age. From that day on, the mean Ca content in fattened chickens was gradually decreasing until the end of the fattening period. We did not find significant differences in mean values of Ca content during the fattening between males and females.

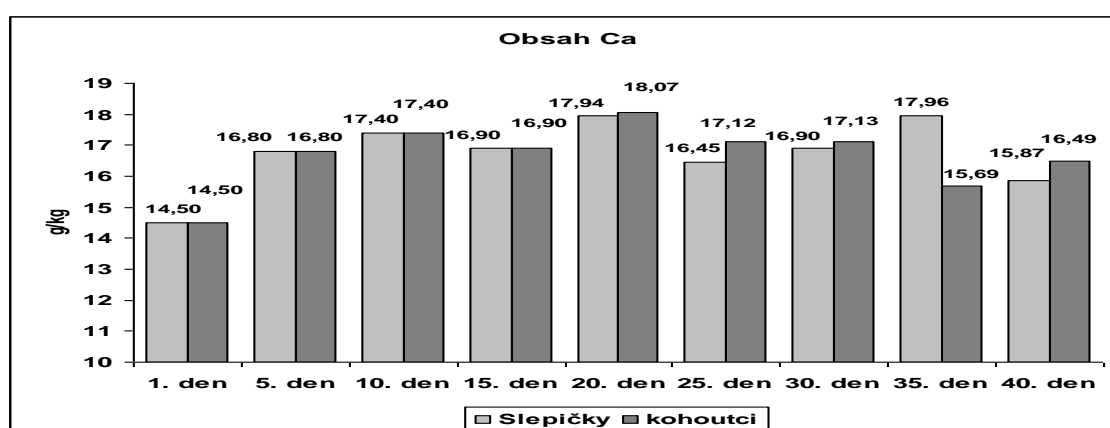


Figure 2: The mean content of Ca in dry matter of broiler chickens' bodies during the fattening period

### Phosphorus content (P)

Big differences between particular stages of the fattening period as well as between the sexes were observed in the content of phosphorus in dry matter, as documented in Figure 3. During the fattening period, up to day 10, the mean content of P in dry matter of the chickens' bodies was gradually increasing. From day 15 of the fattening period until its end, we recorded a gradual decrease of P content in broiler chickens' bodies. We also observed differences between the sexes; up to 15 days of age, hens' bodies contained more phosphorus than the bodies of cockerels. On the other hand, from 20 days of age, P content in cockerels' bodies was higher than in hens. At the end of the fattening period, this difference between the sexes was assessed as highly significant ( $P \leq 0.01$ ).

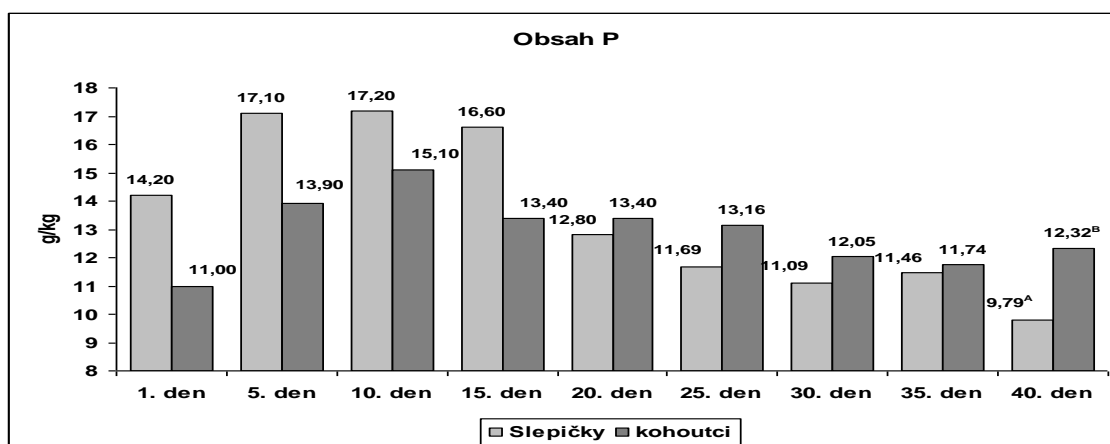


Figure 3: The mean content of P in dry matter of broiler chickens' bodies during the fattening period ( $AB P \leq 0.01$ )

### Magnesium content (Mg)

The highest magnesium content was observed in young chickens up to 10 days of age, as shown in Figure 4. The results do not allow a clear conclusion regarding differences in Mg content between the sexes.

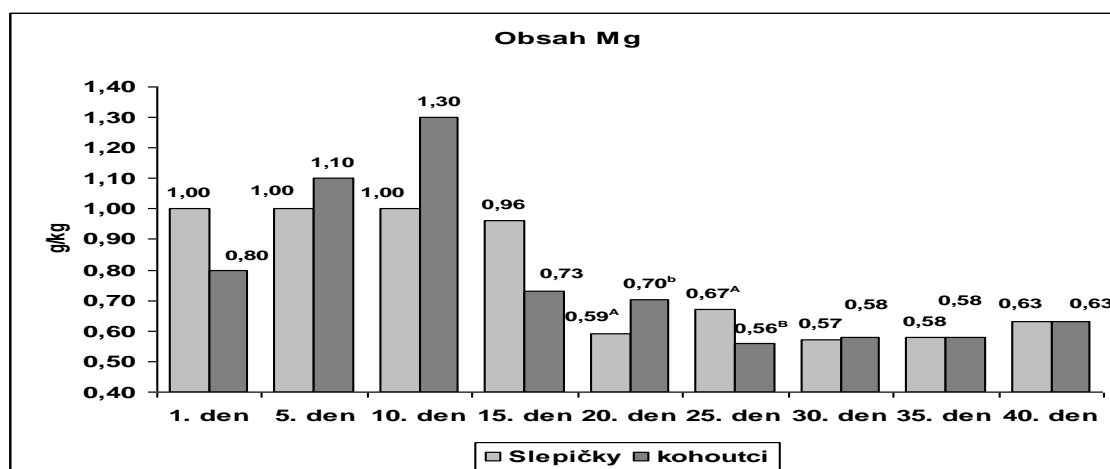


Figure 4: The mean content of Mg in dry matter of broiler chickens' bodies during the fattening period ( $AB P \leq 0,01$ ,  $Ab P \leq 0,05$ )

The results of our experiment on changes in the content of mineral substances in chickens' bodies are related to the development of the chickens' body tissues, especially to the development of the skeletal structure in the initial period. The results approximately correspond with those observed by Macháček et al. (2009). Our results of ash, Ca, P and Mg are higher than those observed by Suchý et al. (2002) who examined similar parameters in chicken breast and thigh muscles.

### **Conclusion**

We can conclude that changes in the composition of chickens' bodies can be described as a gradual increase in the ash content from 1 to 10 days of age, which gradually decreased until the end of the fattening period. The mean Ca content in the dry matter was gradually increasing until 20 days of age, with the following decrease until the end of the fattening. The mean P content in chickens' body was increasing during the fattening period until 10 days of age, with the following decrease until the end of the fattening period. A similar trend was observed in Mg content. Its mean values were increasing in the chickens' body until 10 days of age, when the values started to decrease markedly until 20 days of age. From that day, the mean values of Mg content were not significantly different until the end of the fattening period. Regarding differences between the sexes, the ash content in cockerels was significantly higher as compared to hens, especially from 25 days of age. In Ca content, there were no significant differences between the sexes during the fattening period. The highest differences between the sexes were observed in P content; until 15 days of age, higher P content in dry matter was found in hens, from 20 days of age, higher values were found in cockerels. We did not observe differences in Mg content between the sexes in the dry matter of chickens' bodies.

### **Acknowledgements**

This paper was supported by the research grant No. MSM 6215712402 of Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology.

### **References**

Upon request.

**Contact address:** Petr Navrátil, Ing., Wanklova 12, 779 00 Olomouc, petr.navratil@sano.cz



# **SEKCE 3**

*Veterinární ekologie*





## Colonization of wild waterbirds by cephalosporin and fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* strains

### Kolonizace volně žijících vodních ptáků kmeny *Escherichia coli* rezistentními k cefalosporinům a fluorochinolonům

<sup>1</sup>Janoszowská Dagmar, <sup>1</sup>Dolejská Monika, <sup>2</sup>Čížek Alois, <sup>1</sup>Hanušová Ladislava, <sup>1</sup>Hrušáková Jolana, <sup>1</sup>Svoboda Ondřej, <sup>1</sup>Literák Ivan

<sup>1</sup> Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup> Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

#### Summary

The aim of this study was to analyze the occurrence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)- and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR)-positive *Escherichia coli* isolated from cormorants (*Phalacrocorax carbo*) and mallards (*Anas platyrhynchos*) in the central Europe, and to determine the importance of these birds in spreading of these bacteria. The samples were cultivated parallelly on MacConkey agar (MCA) with cefotaxime (2 mg/L) to isolate ESBL-producing *E. coli* and MCA with ciprofloxacin (0.05 mg/L) to isolate fluoroquinolone-resistant *E. coli*. PCR was used to detect specific antibiotic resistance genes. Plasmids carrying ESBL and/or PMQR genes were transferred by conjugation or transformation and characterized by PCR-based replicon typing and restriction analysis. From waterbirds, ten ESBL-producing *E. coli* with the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> or *bla*<sub>CTX-M-27</sub> genes were isolated. In most isolates with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, the *aac*(6')*Ib-cr* gene was also detected. The *bla* genes were harbored by F and II conjugative plasmids. PMQR genes were detected in 25 *E. coli*. Six strains carried *aac*(6')*Ib-cr* and nineteen strains were positive for *qnrS1*. The genes were located on transferable plasmids of incompatibility groups N or X2. The finding of CTX-M-type ESBLs and PMQR genes in these animal species indicates rapid spread of bacteria with these resistance genes in the environment.

**Keywords:** *Escherichia coli*; waterbirds; extended-spectrum beta-lactamases; PMQR genes; resistance

#### Introduction

The emergence of antibiotic multiresistant bacteria in natural environments constitutes a serious risk for animal and human health. Contamination of water sources by antibiotic resistant bacteria is caused by waste waters from human agglomerations and livestock (Yan and Sadowsky 2007). Wild living animals that are not influenced by antibiotic practices can be colonized by these bacteria and afterwards they can work as important reservoirs and vectors of resistant bacteria in the environment (Dolejska et al. 2009, Literak et al. 2010).

The aim of this study was to examine cloacal smears or faeces from mallards and cormorants occurring commonly on surface waters of central Europe (Czech and Slovak Republic) for the presence of antibiotic-resistant *E. coli*, including strains producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) and/or *E. coli* harbouring plasmid-mediated quinolone resistance determinants (PMQR).

### Material and methods

During 2006–2009, the samples from cormorants (*Phalacrocorax carbo*; n = 349) and mallards (*Anas platyrhynchos*; n = 305) were collected in the Czech Republic. That time, cormorant faeces (n = 150) were taken also in the Slovakia.

*E. coli* strains were isolated from the samples using a selective isolation on MacConkey agar with cefotaxime (2 mg/L) or ciprofloxacin (0.05 mg/L) and screened for ESBL genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub>) or the presence of *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *qnrC*, *qnrD*, *aac(6')Ib-cr* and *qepA* genes, respectively. PCR was also used to detect additional specific antibiotic resistance genes as described previously (Literak et al. 2010).

The transferability of *bla* and PMQR genes was tested by conjugation or transformation. The size of plasmids with these genes was designated by S1-PFGE. Plasmid DNA were characterized by PCR-based replicon typing and were digested with *EcoRV* and *HincII* (Literak et al. 2010).

### Results

From waterbirds, ten ESBL-producing *E. coli* with the *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (7) and *bla*<sub>CTX-M-27</sub> (2) genes were isolated. One ESBL-producing isolate was negative for all *bla* genes tested. In most isolates with *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, the *aac(6')Ib-cr* gene was detected. The *bla* genes were located on IncFIA+FIB and IncII conjugative plasmids with size ranging from 100 to 120 kb. One IncF plasmid with *bla*<sub>CTX-M-15</sub> also harboured additional antibiotic resistance genes as *bla*<sub>OXA</sub>, *aac(6)Ib-cr*, *tetA*, *tetB*, *cat*, *sulI*, *int1* and class 1 integron 1.7 kb with gene cassettes *dfrA17-aadA5*.

PMQR genes were detected in 25 *E. coli*. Six strains carried *aac(6')Ib-cr* and nineteen strains were positive for *qnrS1*. Most of the strains showed unique PFGE profile and belonged to A or B1 phylogenetic groups. The *qnrS1* genes were located on transferable plasmids of incompatibility groups N or X2 with size ranging from 30 to 45 kb. Most of the IncX2 plasmids showed the same restriction profile and the plasmids of the IncN showed two related RFLP profile.

### Discussion

Although populations of wild birds do not naturally come into contact with antibiotics, the occurrence of antimicrobial-resistant strains in these animal was demonstrated.

The antibiotic resistant bacteria carrying plasmid-encoded antibiotic resistance genes have the potential to negatively impact on future public health through horizontal gene transfer. The emergence and wide dissemination of this strains represent a serious problem for the treatment of infectious diseases (Paterson and Bonomo 2005, Strahilevitz et al. 2009).

CTX-M-27 type ESBL has been predominantly documented in only human *Enterobacteriaceae* in different parts of the world (Pitout et al. 2009, Song et al. 2009). This enzyme was also detected in isolates from pets (Sun et al. 2009) and farm animals (Liu et al. 2007), but to our knowledge, this is the first report of CTX-M-27-producing *E. coli* in wild animal.

The finding of CTX-M-type ESBLs and PMQR genes in species like cormorants and mallards indicates rapid spread of these resistance genes in the environment. Faecal water contamination in central and eastern Europe is common and thus we supposed that these birds were colonized by antibiotic resistance *E. coli* strains of water origin.

Cormorants and mallard then become important reservoirs and vectors of these antibiotic resistance strains in human sources of drinking water.

### Aknowledgements

This study was funded by grant no. MSM6215712402 from the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and grant no. P502/10/P083 from the Czech Science Foundation.

### References

- DOLEJSKA, M., BIEROSOVA, B., KOHOUTOVA, L., LITERAK, I., CIZEK, A. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *J. Appl. Microbiol.* 2009, 106, p. 1941-1950.
- LITERAK, I., DOLEJSKA, M., JANOSZOWSKA, D., HRUSAKOVA, J., MEISSNER, W., RZYSKA, H., BZOMA, S., CIZEK, A. 2010. Antibiotic-resistant *Escherichia coli* bacteria, including strains with genes encoding the extended-spectrum beta-lactamase and QnrS, in waterbirds on the Baltic Sea Coast of Poland. *Appl. Environ. Microbiol.* 2010a, 76, p. 8126-8134.
- LIU, J.H., WEI, S.Y., MA, J.Y., ZENG, Z.L., LÜ, D.H., YANG, G.X., CHEN, Z.L. Detection and characterisation of CTX-M and CMY-2 beta-lactamases among *Escherichia coli* isolates from farm animals in Guangdong Province of China. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2007, 29, p. 576-81.
- PATERSON, D.L., BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18, p. 657-86.
- PITOUT, J.D., CAMPBELL, L., CHURCH, D.L., GREGSON, D.B., LAUPLAND, K.B. Molecular characteristics of travel-related extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from the Calgary Health Region. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009, 53, p. 2539-43.
- SONG, W., LEE, H., LEE, K., JEONG, S.H., BAE, I.K. KIM, J.S., KWAK, H.S. CTX-M-14 and CTX-M-15 enzymes are the dominant type of extended-spectrum beta-lactamase in clinical isolates of *Escherichia coli* from Korea. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58, p. 261-6.
- STRAHILEVITZ, J., JACOBY, G.A., HOOPER, D.C., ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clin. Microbiol. Rev.* 2009, 22, p. 664-89.
- SUN, Y., ZENG, Z., CHEN, S., MA, J., HE, L., LIU, Y., DENG, Y., LEI, T., ZHAO, J., LIU, J.H. High prevalence of *bla* extended-spectrum beta(CTX-M)-lactamase genes in *Escherichia coli* isolates from pets and emergence of CTX-M-64 in China. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009.
- YAN, T., SADOWSKY, M.J. 2007. Determining sources of fecal bacteria in waterways. *Environ. Monit. Assess.* 2007, 129, p. 97-106.

**Contact address:** Dagmar Janoszovská, RNDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09003@vfu.cz

## Usage of manganese-dependent superoxide dismutase gene *sodA* for rapid species identification of enterococci

### Identifikace bakterií rodu *Enterococcus* pomocí genu *sodA*

Frolkova Petra<sup>1</sup>, Svec Pavel<sup>2</sup>, Zurek Ludek<sup>3</sup>, Literak Ivan<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackeho 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Czech Collection of Microorganisms, Department of Experimental Biology, Faculty of Science, Masaryk University, Tvrdeho 14, 602 00 Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Departments of Entomology and Diagnostic Medicine and Pathobiology, Kansas State University, Manhattan, KS 66506, USA

#### Summary

The 18 newly described strains of enterococci and *E. faecalis* and *E. faecium* from Czech Collection of Microorganisms (CCM) and previously identified 35 strains from birds gut were analyzed by sequencing of partial sequence of *sodA* gene. This gene encodes the manganese-dependent superoxid dismutase and his sequencing allowed us to identify all the strains to the species level. This study proved that sequencig of *sodA* gene is the fast and cheep method for species identification of enterococci.

**Keywords:** *Enterococcus*; identification; *sodA* gene

#### Introduction

The enterococci are an important group of bacteria for humans and animals. Some strains are used for the manufacture of foods, others can cause serious human and animal infections (Facklam et al., 2002).

Devriese et al. (1993) divided enterococcal species on the basis of comparative 16S rRNA analysis to „species group“. The first group is called group „*E. faecium*“ and contains *E. canis*, *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. ratti* and *E. villorum*. The second group is called „*E. faecalis*“ which contains *E. caccae*, *E. faecalis*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis*, *E. silesiacus* and *E. termitis* (Sukontasing et al., 2007). The third group is called group „*E. avium*“ and contains *E. avium*, *E. raffinosus*, *E. devriesei*, *E. gilvus*, *E. malodoratus* and *E. pseudoavium* (Devriese et al., 1993; Sukontasing et al., 2007). The fourth group is called group „*E. gallinarum*“ and contains *E. casseliflavus* and *E. gallinarum*. The fifth group is called „*E. cecorum*“ and contains *E. cecorum* and *E. columbae* (Devriese et al., 1993). The separate phylogenetical groups create *E. aquimarinus*, *E. asini*, *E. camelliae*, *E. canintestini*, *E. dispar*, *E. hermanniensis*, *E. italicus*, *E. pallens*, *E. phoeniculicola*, *E. saccharolyticus* and *E. sulfureus* (Sukontasing et al., 2007).

Identification of enterococci at its species level was provided mostly by phenotypic methods. But, these methods are laborious and time consuming. Moreover, there are also many strains with intermediate characteristics and the accurate identification of rare species is also problematic (Devriese et al., 1995).

Recently, many molecular methods have been described for identification of enterococci, but these techniques are of various sensitivity and it is difficult to adapt them for use in routine laboratories due to their high cost and the requirement for highly skilled personnel (Kirschner et al., 2001).

Poyart et al. (2000) used target sequence of *sodA* gene of gram-positive cocci which encodes the manganese-dependent superoxid dismutase for their identification. They use degenerated primers designed for identification of streptococcus (Poyart et al., 1998) and constructed a database of specific sequences of 19 enterococcal species (Poyart et al., 2000).

We used the same method like Poyart et al. (2000) and sequenced partial *sodA* gene sequences of newly described species of genus *Enterococcus*.

### Material and methods

A collection of 20 *Enterococcus* strains from Czech Collection of Microorganisms and others 35 strains from guts of birds (*Upupa epops*, *Alcedo atthis* and *Coracias garrulus*) which were identified before by rep-PCR (Svec et al., 2008) were used in this study.

We used *sodA* degenerate primers d1 (5'-CCI TAY ICI TAY GAY GCI YTI GAR CC-3') and d2 (5'-ARR TAR TAI GCR TGY TCC CAI ACR TC-3') which amplify an internal fragment of *sodA* gene. PCRs were performed in a final volume of 25 µl containing 2 µl of DNA template, 12.5 µl of Combi PPP Master Mix, 9.5 µl PCR H<sub>2</sub>O and 0,5 µl 10M each primer. Compared to Poyart et al. (2000) we change PCR protocol: the initial denaturation were 3 min at 95 °C, than followed by 35 cycles of denaturation 30 sec at 95 °C, amplification 60 sec at 48 °C and elongation 60 sec at 72 °C. The final extension was 7 min at 72 °C. A single DNA band corresponding with the expected length 438 bp was observed in all cases on agarose gel with ethidium bromide. PCR product were purified with the help of Jet Quick gel extraction spin kit (Genomed, Germany) and Gel/PCR DNA fragments extraction kit (Geneaid, Taiwan). DNA measuring was performed by nanodrop ASP-3700(ACTGene, United States) and send for sequencing to Macrogen, South Korea.

### Results and discussion

The nucleotide sequences of the partial *sodA* gene were determined in all strains of enterococci from CCM and from the birds. Each species has its own special sequencion.

Strains from CCM were compared with results from BLAST. We carried out multiple alignment of these *sodA* DNA sequences with the program MEGA 5.03 and on the basis of variation of these sequences we constructed phylogenetic tree by the neighbor-joining method (Saitou and Nei., 1987).

On our dendrogram we distinguished some „species groups“ as Devriese et al. (1993) indicated - group „*E. faecium*“, *E. faecium* and *E. villorum* were together, but *E. canis* was out of this group. Group „*E. faecalis*“ according our results involved *E. caccae*, *E. haemoperoxidus*, *E. moraviensis* and *E. silesiacus*, but *E. faecium* was out of this group. We distinguished group „*E. avium*“ where is *E. devrisei* and *E. gilvus* and we observed separate species *E. aquimarinus*, *E. asini* and *E. phoeniculicola*. Distinguishing to phylogenetic groups was possible, but not totally. It could be caused in that our PCR product length was 438 bp and amplified just approximately 85 % of *sodA* gene (Poyart et al., 2000).

Then we compared identification of 35 enterococcal isolates from birds using both rep-PCR and *sodA* gene sequencing. The results from rep-PCR and from *sodA* gene analysis

were the same. We identified 22, 3, 6, 2 and 2 isolates of *E. faecalis*, *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii* and *E. hirae* respectively.

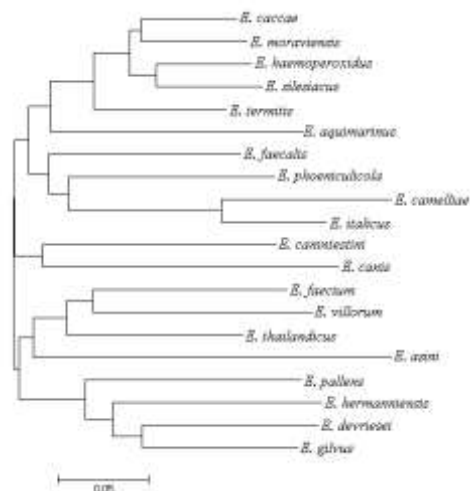


Figure 1. Dendrogram based on sequencing partial sequence of *sodA* gene

## Conclusion

Sequencing of *sodA* gene is reliable and fast method for species identification of enterococci.

## Acknowledgements

This study was funded by Grants No. MSM6215712402 of the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic.

## References

- Devriese L.A., Pot B., Collins M.D. (1993): Phenotypic identification of the genus *Enterococcus* and differentiation of phylogenetically distinct enterococcal species and species groups. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 399-408.
- Facklam R. R., da Gloria S. Carvalho M. and Teixeira L. M. (2002): History, Taxonomy, Biochemical Characteristics, and Antibiotics Susceptibility Testing of Enterococci. *In: Gilmore M. S., Clewell D. B., Courvalin P., Dunny G. M., Murray B. E., Rice L. B. (eds), The Enterococci: Pathogenesis, Molecular Biology, and Antibiotics Resistance*, 1-54. ASM Press, Washington, D.C.
- Kirschner C., Maquelin K., Pina P., Ngo Thi N. A., Choo-Smith L. P., Sockalingum G. D., Sandt C., Ami D., Orsini F., Doglia S. M., Allouch P., Mainfait M., Puppels G. J. and Naumann D. (2001): Classification and identification of enterococci: a comparative phenotypic, genotypic, and vibrational spectroscopic study. *J. Clin. Microbiol.* 39:1763-1770.
- Poyart C., Quesnes G. and Trieu-Cuot P. (2000): Sequencing the gene encoding manganese-dependent superoxide dismutase for rapid species identification of enterococci. *J. Clin. Microbiol.* 38:415-418.
- Saitou N. and Nei M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Sukontasing S., Tanasupawat S., Moonmangmee S., Lee J. and Suzuki K. (2007): *Enterococcus camelliae* sp. nov., isolated from fermented tea leaves in Thailand. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 57: 2151-2154.
- Svec, P., Novakova, D., Zackova, L., Kukletova, M. and Sedlacek, I. (2008): Evaluation of (GTG)<sub>5</sub>-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. *Anton Leeuw Int J G* 94, 573–579.

**Contact address:** Petra Frolkova, RNDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackeho 1-3, 612 42 Brno, email: H08003@vfu.cz

## Šíří se klíšťata pozitivní na *Babesia canis canis* územím Slovenska? Do *Babesia canis canis* positive ticks expand throughout Slovakia?

<sup>1</sup>Kubelová Michaela, <sup>2,3</sup>Tkadlec Emil, <sup>2</sup>Bednář Marek, <sup>4</sup>Roubalová Eva,  
<sup>1</sup>Široký Pavel

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

<sup>3</sup>Ústav biologie obratlovců Akademie věd České republiky, Studenec

<sup>4</sup>Biologické centrum Akademie věd České republiky, České Budějovice

### Summary

*Babesia canis canis* is causative agent of tick-borne disease in dogs causing destruction of erythrocytes leading to anaemia, and, in case of massive infection, even to death. New endemic foci and growing incidence of canine babesiosis were recorded in Slovakia during last years. We collected tick vector of *B. c. canis* – *Dermacentor reticulatus* and studied prevalence of *B. c. canis* using diagnostic PCR method. A total of 3366 *D. reticulatus* ticks from 30 localities distributed in 3 separated areas in eastern, south-western and western Slovakia were collected by flagging. Nested PCR-RFLP analysis was carried out on 2406 *D. reticulatus* ticks and the results were verified by sequencing. We found considerable differences of *B. c. canis* prevalence in *D. reticulatus* ticks among studied areas. The results obtained showed a west-to-east increase in *B. c. canis* prevalence in ticks. We cannot except following spreading north-westwards which could threaten *Babesia canis*-free regions including Czech Republic.

**Keywords:** *Babesia canis canis*; *Dermacentor reticulatus* ticks; nested PCR-RFLP

### Úvod

Psí babesióza patří mezi klíšťaty přenosná onemocnění, jejímž původcem je intraerytrocytární prvok z kmene Apicomplexa. Klinicky se projevuje zejména akutní hemolytickou anémií, hemoglobinúrií a ikterem. Při absenci terapie může dojít až k exitu pacienta a to nejčastěji v důsledku akutního renálního selhání (Máthé *et al.*, 2006). V podmínkách střední Evropy je nejvýznamnějším původcem psí babesiózy *Babesia canis canis*, jejímž vektorem a zároveň definitivním hostitelem je klíště *Dermacentor reticulatus* (píják lužní). Počet popsaných přírodních ohnisek psí babesiózy v Evropě během posledních let výrazně vzrostl, a to pravděpodobně v důsledku rozšiřování areálu výskytu píjaka lužního (Gray *et al.*, 2009).

Na Slovensku byl první případ tohoto onemocnění u psa popsán v roce 2000, a to na jihovýchodě území - v okolí Čierne nad Tisou (Chandoga *et al.*, 2002). Následovalo potvrzení výskytu psí babesiózy na jihozápadním Slovensku (Swan *et al.*, 2001). V roce 2002 byla *B. c. canis* detekována v klíštěti *D. reticulatus* z oblasti Čunova – na západním Slovensku (Duh *et al.*, 2006). Klinické případy psí babesiózy jsou v současné době hlášeny z okolí Bratislavy, nejbliže českým hranicím se onemocnění objevilo v Malackách.

Cílem předložené práce bylo zjistit a porovnat prevalence *B. c. canis* v klíšťatech *D. reticulatus*, získaných ze třech geograficky odlišných areálů – východního, jihozápadního a západního Slovenska.

### Materiál a metody

V průběhu září a října 2009 byla metodou vlnajkování (Sonenshine, 1993) z vegetace získána adultní stádia klíšťat *D. reticulatus*. Po druhové determinaci a určení pohlaví v laboratoři byli všichni jedinci vloženi do plastových zkumavek s 96% etanolem. DNA z klíšťat byla vyextrahována metodou alkalické hydrolyzy, s použitím NH<sub>4</sub>OH (Rijpkema *et al.*, 1996). K detekci části rRNA genu 18S ribosomální podjednotky *Babesia* sp. o velikosti 800 párů bazí byla použita dvoukroková nested-PCR s externím (BTF1, BTR1) a interním (BTF2, BTR2) párem primerů. Štěpení pozitivních PCR produktů z druhého kroku proběhlo s využitím restričních endonukleáz *HincII*, *BslI* a *HinfI* (Jefferies *et al.*, 2007). Výsledky PCR i restričního štěpení byly vizualizovány na 1,2% agarózovém gelu s obsahem ethidium bromidu. Vybrané pozitivní vzorky byly poslány na sekvenaci (Macrogen, Korea), výsledné sekvence byly porovnány se sekvencemi v databázi GenBank pomocí programu BLAST.

### Výsledky a diskuze

Celkem na 30 lokalitách bylo navlajkováno 3366 klíšťat *D. reticulatus*, z toho 2406 jedinců bylo vyšetřeno na přítomnost DNA *B. c. canis*. Celková prevalence *B. c. canis* ve vzorcích z přírodních sběrů byla 3.2 % (76; n = 2406). Výsledky restriční analýzy jsme potvrdili sekvenací 30 náhodně vybraných pozitivních vzorků, přičemž všechny sekvence byly s 98-100 % shodné se sekvencí *B. c. canis* AY072926 (Caccio *et al.*, 2002). U samic klíšťat *D. reticulatus* byla zjištěna 3.5% prevalence *B. c. canis* (45 z 1276), oproti tomu 1.9 % (21 z 1130) všech samců *D. reticulatus* bylo pozitivních na přítomnost tohoto patogenu.

Tabulka 1: Počty klíšťat *D. reticulatus* a rozložení prevalence *B. c. canis* v jednotlivých oblastech

Oblast/počet lokalit	<i>B. c. canis</i> pozitivní klíšťata /klíšťata <i>D. reticulatus</i> celkem (prevalence %)		
	Samci	Samice	Celkem
Západ/10	0/392 (0)	0/482 (0)	0/874 (0)
Jihozápad/15	12/591 (2)	16/614 (2.6)	28/1205 (2.3)
Východ/5	19/147 (12.9)	29/180 (16.1)	48/327 (14.7)

Největší počet pozitivních vzorků (48) pocházel z východoslovenské oblasti, kde byl v roce 2000 zaznamenán první případ klinické babesiózy u psa (Chandoga *et al.*, 2002). Výrazně nižší prevalenci (2.3 %) jsme zaznamenali ve vzorcích klíšťat pocházejících z okolí Vodního diela Gabčíkovo (jihozápadní Slovensko). Tento výsledek je porovnatelný s prevalencí *B. c. canis* v klíšťatech *D. reticulatus* z přilehlé oblasti (obec Čunovo), kterou uvádí Duh *et al.* (2006). Přestože klinické případy psí babesiózy jsou hlášeny i ze západního Slovenska, přírodní ohnisko *B. c. canis* jsme v oblasti Záhorské nížiny nedetekovali. Jedním z důvodů může být i to, že klíšťata byla navlajkována na poměrně malém areálu, v blízkosti obcí Zohor a Vysoká pri Morave.

### Závěr

Z porovnání zjištěných prevalencí *B. c. canis* v klíšťatech *D. reticulatus* z východního, jihozápadního a západního Slovenska je patrný západo-východní gradient, který v podstatě kopíruje směr šíření klinických případů psí babesiózy na Slovensku. Podle



našich prozatímních výsledků je riziko nákazy v oblasti západního Slovenska, a tedy i hranic s Českou republikou minimální. Tyto výsledky ale mohou být zkresleny omezeným vzorkováním v dané oblasti. Nejbližším cílem jsou tedy rozsáhlé sběry klíšťat *D. reticulatus* na západním Slovensku, nezbytné k vytyčení severní hranice výskytu *B. c. canis* v přírodních ohniscích.

#### Poděkování

Studie byla financována z projektu Grantové Agentury České republiky (GAČR 524/09/0715). Autorka je držitelkou stipendia Brno Ph.D. Talent, které vzniklo za podpory statutárního města Brna.

#### Literatura

CACCIO, S.M.; ANTUNOVIC, B.; MORETTI, A.; MANGILI, V.; MARINCULIC, A.; BARIC, R.R.; SLEMENDA, S.B.; PIENIAZEK, N.J. Molecular characterization of *Babesia canis canis* and *Babesia canis vogeli* from naturally infected European dogs. *Veterinary Parasitology*. 2002, vol. 106, no. 4, s. 285-292.

DUH, D.; SLOVÁK, M.; SAKSIDA, A.; STRAŠEK, K.; PETROVEC, M.; AVŠIČ-ŽUPANC, T. Molecular detection of *Babesia canis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in Slovakia. *Biologia*. 2006, vol. 61, no. 2, s. 231-233.

GRAY, J.S.; DAUTEL, H.; ESTRADA-PENA, A.; KAHL, O.; LINDGREN, E. Effect of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2009, vol. 2009, no. 1, s. 1-12.

CHANDOGA, P.; GOLDOVÁ, M.; BARANOVÁ, D.; KOZÁK, M. First cases of canine babesiosis in the Slovak Republic. *Veterinary Record*. 2002, vol. 150, no. 3, s. 82-84.

JEFFERIES, R.; RYAN, U.M.; IRWIN, P.J. PCR-RFLP for the detection and differentiation of the canine piroplasm species and its use with filter paper-based technologies. *Veterinary Parasitology*. 2007, vol. 144, no. 1-2, s. 20-27.

MÁTHÉ, A.; VOROS, K.; PAPP, L.; REICZIGEL, J. Clinical manifestations of canine babesiosis in Hungary (63 cases). *Acta Veterinaria Hungarica*. 2006, vol. 54, no. 3, s. 367-385.

RIJPKEMA, S.; GOLUBIC, D.; MOLKENBOER, M.; VERBEEK-DE KRUIF, N.; SCHELLEKENS, J.F. Identification of four genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks collected in a Lyme borreliosis endemic region of northern Croatia. *Experimental and Applied Acarology*. 1996, vol. 20, no. 1, s. 23-30.

SONENSHINE, D.E. Biology of ticks. *Oxford University Press*. 1993, vol. 2, s. 465.

SWAN, M.; JURÁŠIK, D.; KOVAČIČOVÁ, H. Babesióza na západnom Slovensku. *Veterinárství*. 2001, vol. 51, no. 2, s. 60-62.

**Kontaktní adresa:** Michaela Kubelová, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09010@vfu.cz

## Stanovení inhibičních účinků platinových kovů na růst vybraných druhů rostlin

### Determination of inhibitory effects of platinum group metals on growth of selected plant species

<sup>1</sup>Mikulášková Hana, <sup>2</sup>Kryštofová Olga, <sup>2</sup>Kizek René, <sup>1</sup>Beklová Miroslava

<sup>1</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Fakulta agronomická, Mendelova univerzita v Brně

#### Summary

*The continuous increase of an automotive transport results in the marked emissions with the negative impacts on air, water and soil pollution. In term of the food chain contamination, platinum group metals which are contained in the combustion emissions produced by transport are classified as hazardous. The aim of the thesis is a research and a knowledge enrichment of platinum group metals effects on plants. The experiments with selected types of superior plants – corn (*Zea mays* L.) and pea (*Pisum sativum* L.) which are the important parts of the food chain of domestic animals, eventually humans, were performed. The influence of platinum on young seedlings was done according to the modified methodology of Máchová et al. (1994) and the inhibitory effects of platinum metals group on the growth of plants in their initiative growth periods were evaluated and analysed.*

**Keywords:** platinum group metals; *Zea mays*; *Pisum sativum*

#### Úvod

Neustálý nárůst především automobilové a silniční nákladní dopravy má za následek výraznou emisní zátěž s nepříznivými dopady na kvalitu ovzduší, vody a půdy. Fragmentace krajiny související s výstavbou a využíváním dopravní infrastruktury přispívá ke snížení biologické rozmanitosti rostlinných i živočišných druhů. Nepříznivý vliv dopravy na abiotické i biotické složky prostředí můžeme posuzovat i s ohledem na důsledky havárií a odpadů z dopravy.

Z hlediska kontaminace potravních řetězců se mezi nebezpečné řadí platinové kovy, které jsou součástí spalovacích emisí produkovaných dopravou. Směs platinových kovů – platina (Pt), rhodium (Rh) a palladium (Pd) se používá v katalyzátorech automobilů jako katalyticky účinná substance, která snižuje produkci škodlivin tím, že urychluje oxidaci vznikajícího CO a uhlovodíků a redukcí NO<sub>x</sub>. Vzhledem k velkým tepelným rozdílům, kterým jsou katalyzátory vystaveny, však dochází k uvolňování platinových kovů do životního prostředí (Adamec a kol., 2008; König et al., 1992; Palacios et al., 2000).

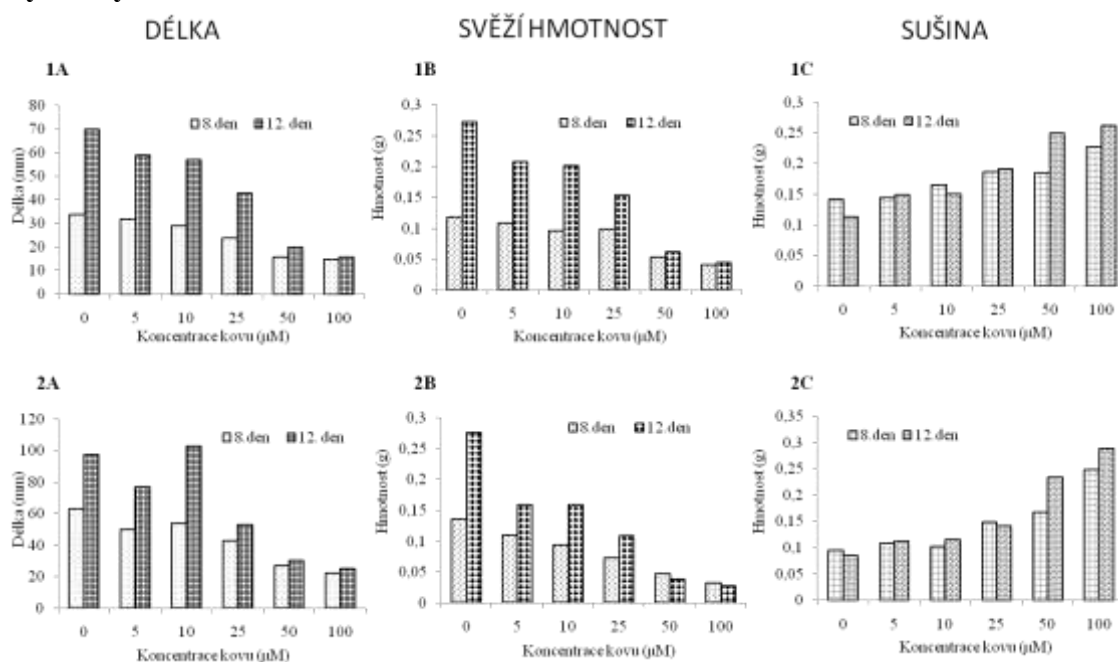
Experimentální studie, např. Schäfer et al., 1998 prokázaly přenos platinových kovů (Pt, Rh a Pd) z kontaminované půdy do rostlin. Stejní autoři zjistili rozdíly v biodostupnosti jednotlivých kovů. Ze skupiny sledovaných platinových kovů se jako nejvíce biologicky dostupné jeví palladium.

#### Materiál a metody

Ke stanovení inhibičních účinků platiny (Pt) na růst vybraných druhů rostlin byla jako testovací materiál použita semena hrachu *Pisum sativum* a kukuřice *Zea mays*.

V experimentu byla semena hrachu a kukuřice vystavena působení  $\text{PtCl}_4$  v koncentracích 0; 5; 10; 25; 50; a 100  $\mu\text{M}$ . V experimentu bylo pro každou variantu vybráno 100 semen rozmístěných na klíčcích destičkách pokrytých buničinou. Do nádoby pod klíčnicí destičkou bylo aplikováno 300 ml roztoku kovu o různých koncentracích, tak aby konce buničiny byly smáčeny v roztoku a docházelo k jeho vzlínání k semenům. Následně byla semena klíčena v kultivačním boxu po dobu 8 a 12 dnů ve tmě při teplotě 25 °C a vlhkosti 60 %. V osmém a dvanáctém dnu experimentu byly provedeny odběry klíčků, u kterých byly zjištěny metrické údaje (délka, hmotnost) nadzemní a kořenové části.

## Výsledky



Graf 1: Vliv  $\text{PtCl}_4$  na nadzemní (1 A, B, C) a kořenové (2 A, B, C) části klíčků hrachu

## Diskuse

U vybraných druhů rostlin byl sledován vývoj a růst jejich jednotlivých částí, které byly vystaveny působení platiny ve formě platiničitých iontů.

Prvním ze sledovaných parametrů u klíčků vystavených působení  $\text{PtCl}_4$  byl vliv na růst. Z grafů 1A a 2A je patrné, že aplikovaný kov způsobuje u klíčků hrachu výraznou růstovou inhibici v nadzemních i kořenových částech v 8. i 12. dnu experimentu se vzrůstající koncentrací aplikovaného kovu. Nejvyšší inhibice růstu v porovnání s kontrolou byla pozorována u koncentrací 50 a 100  $\mu\text{M}$ , a to u nadzemních částí rostlin 4x a u kořenových částí rostlin 5x. Obdobné výsledky byly zjištěny i u experimentu s kukuřicí.

Dalším sledovaným parametrem byl vliv  $\text{PtCl}_4$  na hmotnost biomasy. V 8. i 12. dnu experimentu dochází se vzrůstající koncentrací aplikovaného kovu k viditelnému snížení svěží hmotnosti. Ve srovnání s kontrolou bylo toto snížení až pětinasobné u nadzemních částí a šestinasobné v kořenových částech (graf 1B, 2B). Podobné výsledky byly stanoveny i u klíčků kukuřice.

Posledním parametrem, který byl v experimentu sledován byl obsah sušiny v jednom gramu klíčků vystavených působení  $\text{PtCl}_4$ . Z grafů 1C a 2C můžeme usoudit, že se vzrůstající koncentrací aplikovaného kovu dochází k nárůstu množství sušiny u jednotlivých částí hrachu. V porovnání s kontrolou byl u koncentrace  $100 \mu\text{M}$  zaznamenán nárůst v nadzemních částech až 1,5x (graf 1C) a u kořenových částí až 2,5x (graf 2C). V případě kukuřice byl sledován nárůst množství sušiny v porovnání s kontrolou převážně u koncentrací 25, 50,  $100 \mu\text{M}$ .

### **Závěr**

Těžké kovy se v současnosti řadí k závažným environmentálním polutantům. Nárůst koncentrací platinových kovů v životním prostředí vzbuzuje obavy z možných zdravotních rizik ve vztahu k obyvatelstvu.

V případě platiny (ve formě  $\text{PtCl}_4$ ), která byla použita v experimentu je prokázána zvýšená biologická dostupnost. Z předložených výsledků lze konstatovat, že vliv platiny na růst hrachu a kukuřice je srovnatelný.

Získané výsledky jsou součástí širšího výzkumu, které budou následně rozšířeny a prohloubeny o množství dalších získaných informací.

### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 83/2011/FVHE a MSM 6215712402.

### **Literatura**

ADAMEC, V. a kol. Doprava, zdraví a životní prostředí. *Grada Publishing, a.s.*. 2008, 160 s.

KÖNIG, H. P., HERTEL, R.F., KOCH, W., ROSNER, G. Determination of platinum emissions from a three-way catalyst-equipped gasoline engine. *Atmospheric Environment*. 1992, vol. 26A, no. 5, s.741-745.

PALACIOS, M., et al. Platinum-group elements: quantification in collected exhaust fumes and studies of catalyst surfaces. *The Science of the Total Environment* 257. 2000, s. 1-15.

SCHÄFER, J. Uptake of traffic – related heavy metals and platinum group elements (PGE) by plants. *The Science of the Total Environment* 215. 1998, s. 59-67.

**Kontaktní adresa:** Mikulášková Hana, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10007@VFU.cz

## Izolace PAH z biotické tkáně

### Isolation of PAHs from biotic tissues

Štilárková Edita, Vávrová Milada, Stoupalová Michaela, Večerek Vladimír

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

#### Summary

*The work was focused on the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in biotic tissue. PAHs persist in the environment for a long time, are toxic, carcinogenic and mutagenic properties. The catch of fish was carried out in accordance with applicable legislation, workers Morava River. The analysis was performed on samples of fish (skin and muscle) from two locations. The first site is the confluence of Svatka and Svitava rivers in the town of Modřice and the second location is close to the town of Rajhradice. For the determination of PAHs were selected following isolation procedures: extraction of fat by cold extraction and sonication, clean-up by column chromatography and for determination was used gas chromatography with mass spectrometer (GC/MS). The values of determined compounds were measured in muscle tissue below the skin. The bioconcentration factor was also calculated.*

**Keywords:** PAH; fish; gas chromatography; mass spectrometer

#### Úvod

Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs) jsou skupinou látek, do které patří více než 100 aromatických sloučenin (Gomez – Ruiz et al., 2009).

PAH jsou typickými představiteli perzistentních organických polutantů (POPs), vznikají antropogenní a neantropogenní činností. Největším zdrojem PAH jsou zejména nedokonalé spalovací procesy. Mohou však vznikat i v důsledku biosyntézy řas a bakterií, případně jako produkt metabolismu fytoplanktonu (Pitter, 2009; Tomaniová et al., 1997).

Doba setrvání PAHs v ovzduší je různá a výrazně ovlivňuje kontaminaci suchozemské vegetace; asi 45% PAHs je zachyceno vegetací, 10% je deponováno do půdy, 5% do vodních ploch a zbytek, tj. asi 40%, je buď chemicky transformován, nebo transportován větrem do vzdálenějších oblastí. Ve vodním prostředí se šíří resuspendací kontaminovaných sedimentů (Velíšek, 2009).

#### Materiál a metodika

Práce byla zaměřena na stanovení polycyklických aromatických uhlovodíků (PAH) v biotické tkáni ryb. Odlov ryb byl prováděn pracovníky Povodí Moravy, v souladu s platnou legislativou. Analyzovány byly tkáně ryb (kůže a svalovina) odlovených ze dvou lokalit. První lokalitou byl soutok Svatky a Svitavy v Brně-Modřicích, lokalizovaný před čistírnou odpadních vod, druhé odběrové místo bylo za čistírnou odpadních vod, v obci Rajhradice. Odloveno bylo celkem 60 jelců tloušťů, z toho 30 v první lokalitě a 30 v druhé lokalitě. Komplexní metodika zahrnovala izolaci analytů pomocí extrakce za studena a sonikací, čištění extraktu kolonovou chromatografií. Podrobný popis preanalytické úpravy vzorků bude součástí přednášky na konferenci. Vlastní stanovení bylo provedeno plynovou chromatografií s hmotnostním detektorem GC/MS na přístroji Agilent Technologies, model 6890N USA, s hmotnostním

detektorem 5973N (Agilent Technologies, USA) za následujících chromatografických podmínek: kapilární kolona DB5-MS (20 m x 0,18 mm x 0,18 µm), J & W Scie (USA), nástřík metodou splitless, teplota nástříkového prostoru 50 °C, aplikovaný objem 1 µl. Teplotní režim termostatu byl následující: 70 °C po dobu 2 min, 8 °C/min do 120 °C (zádrž 0,1 min), 5°C/min do 300°C (zádrž 5 min). Celková doba analýzy byla cca 50 min. Jako nosný plyn bylo použito helium o konstantním průtoku 0,8 ml.min<sup>-1</sup>.

### Výsledky a diskuze

Získané výsledky jsou zpracovány do přehledné tabulky; průměrné hodnoty zde prezentované byly zpracovány z 8 ryb. Údaje (nd) uvedené v tabulkách představují hodnoty pod mezí detekce použité metody a do průměrných hodnot je nd započítáno jako polovina detekčního limitu. V tabulce je uveden také vypočtený BAF.

Tabulka 1: Průměrné hodnoty PAHs ve svalovině a kůži [ $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  tkáň]

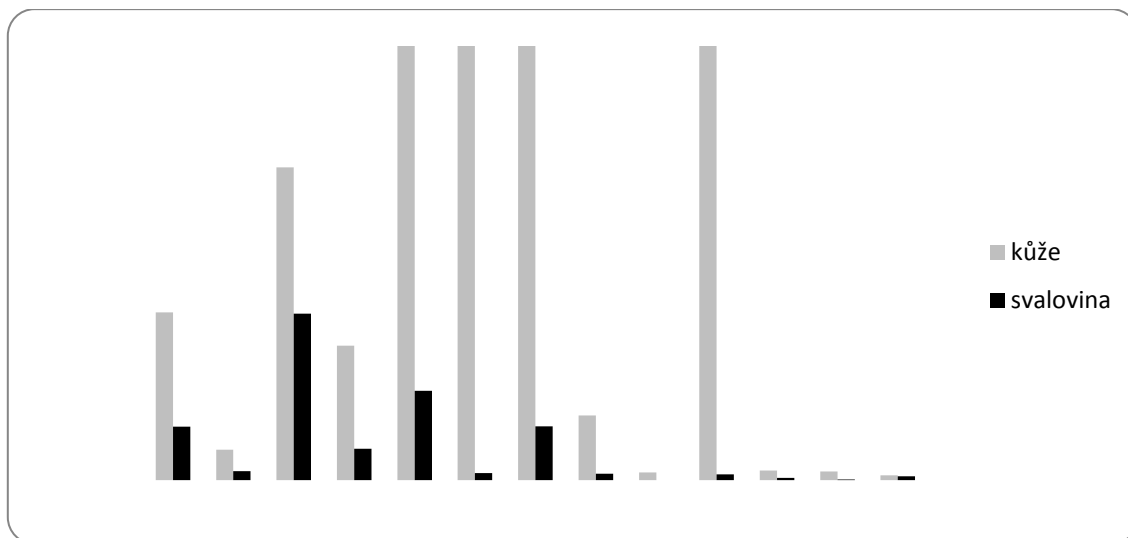
		kůže	svalovina	BAF
naftalen	NAP	19,36	6,158	0,318
acenaftylen	ACL	3,518	1,046	0,297
acenaften	ACE	36,08	19,21	0,533
fluoren	FLR	15,51	3,606	0,233
phenanthren	PHE	387,4	10,29	0,027
anthracen	ANT	335,6	0,81	0,002
fluoranten	FLU	141,9	6,200	0,044
pyren	PYR	7,460	0,749	0,100
benzo[a]anthracen	BaA	0,887	nd	-
chrysen	CHR	382,6	0,920	0,002
benzo[b]fluoranten	BbF	1,118	0,266	0,238
benzo[k]fluoranten	BkF	0,984	0,084	0,085
benzo[a]pyren	BaP	0,542	0,430	0,791
indeno[1,2,3-c,d]pyren	INP	nd	nd	-
benzo[a,h]anthracen	DBA	nd	nd	-
benzo[g,h,i]perylen	BPE	nd	nd	-

PAHs patří mezi lipofilní organické polutanty, a proto byl zjišťován i obsah tuku ve tkáních, který se v kůži pohyboval v rozmezí od 5,49 % do 15,89 %, u svaloviny v rozmezí 0,9 % až 3,7 %. Svalovina byla v rámci studie posuzována jako potravina, kůže naopak jako matrice, na základě které lze hodnotit bioakumulaci v příslušném vodním ekosystému. Hodnocení a následný výpočet koncentrací byl prováděn metodou kalibrační křivky pomocí standardů (1 - 1000 ng.ml<sup>-1</sup>); rovněž byla vypočtena rovnice regrese. Koncentrace PAHs prokázaných ve vzorcích kůží ryb dosahovaly vyšších hodnot než koncentrace stanovené ve svalovině. Nejvyšší koncentrace byla zjištěna v kůži u phenanthrenu, chrysenu a anthracenu. Ve svalovině byla nejvyšší koncentrace stanovena u acenaftenu a phenanthrenu. Vypočítán byl také bioakumulační faktor BAF =  $c_{\text{PAHs}}^{\text{svalovina}}/c_{\text{PAHs}}^{\text{kůže}}$  (Johnson et al., 2002).

### Závěr

Předmětem této studie bylo stanovení PAHs ve svalovině a kůži ryb. Zjištěné koncentrace nepřesahují hygienické limity stanovené pro tyto kontaminanty. Bylo

prokázáno, že koncentrace PAHs v kůži ryb dosahovaly vyšších hodnot než koncentrace stanovené ve svalovině. Rovněž byl vypočten bioakumulační faktor umožňující zhodnotit přestup kontaminantů z vodního prostředí do tkání ryb.



Graf 1: Průměrný obsah PAHs ve svalovině a kůži [ $\mu\text{g.kg}^{-1}$  tkáně]

#### Poděkování

Studie byla zpracována za finančního přispění MŠMT České republiky Výzkumný záměr č. MSM 6215712402.

#### Literatura

GOMEZ-RUIZ, J.A.; CORDEIRO, F.; LOPEZ, P.; WENZL, T. Optimisation and validation of programmed temperature vaporization (PTV) injection in solvent vent mode for the analysis of the 15 + 1 EU-priority PAHs by GC-MS. *Talanta*. 2009, vol. 80, s. 643–650.

JOHNSON, D.L.; JONES, K.C.; LANGDON, C.J.; PIERCE, T.G.; SEMPL, K.T. Temporal changes in earthworm availability and extractability of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 2002, vol. 34, s. 1363-1370.

PITTER, Pavel. *Hydrochemie*. 4. vyd. Praha: Vydavatelství VŠCHT Praha, 2009. 592 s. ISBN 978-80-7080-701-9.

TOMANIOVÁ, M.; KOCOUREK, V.; HAJŠLOVÁ, J. Polycyklické aromatické uhlovodíky v potravinách. *Chemické listy*. 1997, vol. 91, s. 357-366.

VELÍŠEK, Jan.; HAJŠLOVÁ, Jana. *Chemie potravin* 2. 3. vyd. Tábor: Osis, 2009. 644 s. ISBN 978-80-86659-16-9.

**Kontaktní adresa:** Edita Štilárková, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H09004@vfu.cz

## Study of the impact of selected platinum group metals on producers in aquatic ecosystems

### Studium účinků vybraných platinových kovů na zástupce producentů ve vodních ekosystémech

<sup>1</sup>Soukupova Ivana, <sup>1,2</sup>Strakova Lenka, <sup>1</sup>Beklova Miroslava, <sup>2</sup>Kizek Rene

<sup>1</sup>Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

<sup>2</sup>Department of Chemistry and Biochemistry, Faculty of Agronomy, Mendel University in Brno

#### Summary

The study of platinum group elements (PGEs), particularly platinum (Pt), palladium (Pd) and rhodium (Rh) is demanding much more of our attention, especially in the evaluation of the environmental burden. The significant source of these metals is road traffic and the residues of widely used platinum based cytostatics. Wastewater from hospitals and physical conditions inside of the automobile catalysts (high temperature, mechanical, chemical reactions) can cause the emission of these metals to the environment. The aim of our work was to investigate the influence of platinum (PtCl<sub>4</sub>) on duckweed (*Lemna minor*). For the test conditions we used a modified OECD 221 (CSN EN ISO 20079). The modification consists in using polystyrene macroplates. We studied the impact of various platinum concentrations (1, 10 and 100 μmol.l<sup>-1</sup>) on the antioxidant activity of plants. The samples were collected 2nd, 4th and 6th day of the experiment. Photometric analysis was used to monitor the content and changes in enzyme activity of ALT and AST as a marker of stress reactions in plants. These results were compared to a control group without platinum influence. These results are only a part of a wide research.

**Keywords:** platinum group elements (PGEs); *Lemna minor*; antioxidant activity; spectrometry

#### Introduction

Due to increasing population around the world, coming changes in climate and limited sources of drinking water, wasting of water supplies has become a concern. Recently, acute environmental load assessment focuses increasingly also on platinum metals, namely platinum (Pt), palladium (Pd) and rhodium (Rh), which enter to the environment from automobile catalytic converters and waste the water supplies. Moreover it could be assumed that other source of environment contamination comes from hospital waste waters, where treatment of cancer patients take place using platinum based cytostatics (Supalkova et al., 2007). These metals migrate into sewage systems and thus pollute the aquatic ecosystem (surface water, sediments) and subsequently soil as well as living organisms.

Commonly used bioindicator of ecotoxicological changes in aquatic environment is duckweed *Lemna minor*. This plant has a wide range of qualities e.g. minimal laboratory requirements and fast vegetative growth and it is often used for testing toxic effects of waste water, pesticides, or metals in aquatic environment (Fairchild et al., 1997; Wang et al. 1995).

In our experiment we observed affecting of duckweed (*L. minor*) by various doses of platinum (PtCl<sub>4</sub>). We focused on the antioxidant activity of this plant employing photometric analysis to study changes in enzyme activity. At the end the evaluation we



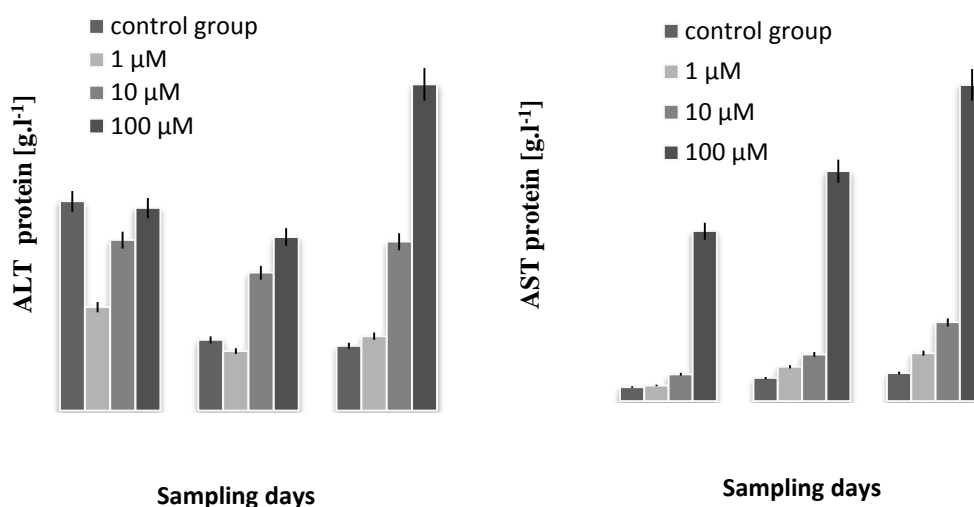
compared platinum-loaded (test group) and the control group (platinum-unloaded) plants.

### Material and methods

The experiment has been carried out according modified OECD 221 (CSN EN ISO 20079) we used polystyrene macroplates to reduce the amount of the solutions. Control groups of *Lemna minor* were cultivated under the recommended conditions and in SIS (Swedish standard) medium. The test groups of duckweed were cultivated by 1, 10 and 100  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  concentration of platinum ( $\text{PtCl}_4$ ). The samples were collected 2nd, 4th and 6th day of the experiment.

The results were calculated on a basis of total protein amount measured following the principle of reaction with red pyrogallol. Spectrometric measurements were carried out using an automated chemical analyser BS-200 (Mindray, China). Reagents and samples were placed on cooled sample holder (4 °C) and automatically pipette directly into plastic cuvettes. Incubation proceeded at 37 °C. The mixture was consequently stirred. The washing steps with distilled water (18 m $\Omega$ ) were done in the midst of the pipetting. Absorbance was measured after 10 min. at wavelength 530 nm. The apparatus was operated using the BS-200 software (Mindray, China).

### Results



Graf 1: ALT content

Graf 2: AST content

### Discussion

There is still not much available information about the significance of some commonly analyzed enzymes as markers of stress reactions in plants. On a basis of previous work we focused our attention on the activity of alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST). Transaminases catalyze the transfer of the amino groups of amino acids to 2-oxoacids. In plants, transaminases participate very effectively in transformations of nitrogen compounds. They are important for the synthesis of amino acids from oxo-acids in the citrate cycle and for other crucial biochemical pathways. They also play key roles in the synthesis of secondary metabolites as well as chlorophyll (Krystofova et al., 2009; 2010).

We have recalculated the results with the help of the total protein amount because the major components of enzymes are proteins. Therefore, we can obtain more exact information about the amount of transaminases in certain weight. AST and ALT activities were increased during the experiment in comparison to control plants, especially at the highest concentration of platinum (PtCl<sub>4</sub>). During the experiment the growth of platinum-loaded groups of *Lemna minor* was inhibited and the fronds had necrotic areas.

### Conclusions

Our results showed a good correlation with the increase of enzymatic activities and growing platinum concentrations during the experiment. This increase corresponds well with the higher metabolic activity under the metal conditions.

Within few weeks we are expecting more results from differential pulse voltammetry and the fully automated spectrometric methods so we will be able to estimate the stress reactions of duckweed *Lemna minor* more precisely and deeply. Our samples will be measured again and possible mistakes will be minimized.

### Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the support from MSMT 6215712402 and IGA 82/2011/FVHE.

### References

- FAIRCHILD, J.F., RUESSLER, D.S., HAVERLAND, P.S., CARLSON, A.R. Comparative sensitivity of *Selenastrum capricornutum* and *Lemna minor* to sixteen herbicides. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 1997, vol. 32, no. 4, s. 353-357.
- KRYSTOFOVA, O., SHESTIVSKA, V., GALIOVA, M., NOVOTNY, K., KAISER, J., ZEHNALÉK, J., BABULA, P., OPATRILOVA, R., ADAM, V., KIZEK, R. Sunflower Plants as Bioindicators of Environmental Pollution with Lead (II) Ions. *Sensors*. 2009, vol. 9, no. 6, s. 5040-5058.
- KRYSTOFOVA, O., TRNKOVA, L., ADAM, V., ZEHNALÉK, J., HUBALÉK, J., BABULA, P., KIZEK, R. Electrochemical Microsensors for the Detection of Cadmium(II) and Lead(II) Ions in Plants. *Sensors*. 2010, vol. 10, no.6, s. 5308-5328.
- SUPALKOVA, V., BEKLOVA, M., BALOUN, J., SINGER, CH., SURES, B., ADAM, V., HUSKA, D., PIKULA, J., RAUSCHEROVA, L., HAVEL, L., ZEHNALÉK, J., KIZEK, R. Affecting of aquatic vascular plant *Lemna minor* by cisplatin revealed by voltammetry. *Bioelectrochemistry*. 2008, vol. 72, no. 1, s. 59-65.
- WANG, W., FREEMARK, K. The Use of Plants for Environmental Monitoring and Assessment, *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 1995, vol. 30, s. 89-301.

**Contact address:** Ivana Soukupova, MVDr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackeho 1 – 3, 612 42 Brno, H08001@vfu.cz

## Stanovení methylrtuti v biotických a abiotických složkách životního prostředí

### Determination of methylmercury in biotic and abiotic components of the environment

Králová Zuzana, Vávrová Milada, Večerek Vladimír

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

#### Summary

*This report deals with the determination of methylmercury in fish muscle and skin. Methylmercury is considered the most toxic form of mercury, there is methylation of inorganic forms of mercury by certain bacteria living in sediments. Then get into the water and aquatic organisms and forward the food chain. It was examined muscle and skin of fish caught in two locations. After extraction of the tissue methylmercury was determined by gas chromatography with electron capture detector (GC/ $\mu$ ECD). The resulting values were calculated bioconcentration factor.*

**Keywords:** methylmercury; extraction; GC/ $\mu$ ECD; HBr

#### Úvod

Rtuť patří mezi rizikové prvky obsažené ve všech složkách ekosystému. Díky svému akumulárnímu a perzistentnímu charakteru je zařazována mezi nejtoxičtější látky přítomné v abiotických a biotických složkách ŽP (Dong, et al., 2004), do kterého se dostává jak z přírodních zdrojů, tak v důsledku antropogenní činnosti člověka (Cibulka a kol., 1986; Remy, Prudent, Probst, 2006).

Anorganické sloučeniny rtuti mohou být procesem biomethylace přeměněny na sloučeniny methylrtuti (Wright, Welbourne, 2002); biologická methylace rtuti je mikrobiálně řízený proces probíhající za aerobních i anaerobních podmínek. Pro tento proces je důležitá přítomnost mikroorganismů vyskytujících se v sedimentech. Mezi bakterie methylující rtuť patří např. druhy rodů *Bifidobacterium*, *Chromobacterium*, *Clostridium*, *Enterobacter*, aj. (Velíšek, Hajšlová, 2009; Houserová et al., 2006).

Methylrtuť vstupuje ve vodním ekosystému do potravinového řetězce, který tvoří fytoplankton – zooplankton – malé ryby – velké ryby. Na vrcholu řetězce jsou živočišné živíci se rybami. Nejvyšší koncentrace methylrtuti byly prokázány ve tkáních žraloka, mečouna, platýze, tuňáka, makrely, štiky a okouna (Urban, 2006; Conaway et al., 2008).

Z historie známe několik případů rozsáhlých otrav rtutí způsobených právě konzumací ryb. Mezi nejznámější intoxikace methylrtuti patří ekologická havárie v zátocce Minamata u Tokia v Japonsku (Maršálek, 2006).

#### Materiál a metodika

Ke stanovení byly použity ryby druhu jelec tloušť. Ryby byly odloveny pracovníky Povodí Moravy, kteří mají pro tuto činnost akreditaci; odběrovými místy byl soutok Svratky a Svitavy a lokalita poblíž obce Rajhradice. Ihned po usmrcení byly ryby vykuchány a podrobeny veterinární prohlídce. Kůže a svalovina ryb byly označeny; do začátku analýzy byly uchovávány v mrazáku při teplotě  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Pro stanovení byla zvolena metoda zahrnující extrakci analytů do toluenu, čištění extraktu a stanovení metodou plynové chromatografie s detektorem elektronového záhytu. Podrobný popis metodiky bude součástí experimentální části disertační práce. Stejný metodický postup byl použit při přípravě extraktů ze svaloviny a z kůže.

Pro validaci metody byl použit certifikovaný referenční materiál (ERM® - CE464; IRMM, Belgie), pro jehož analýzu byl použit shodný postup, jak při analýze bioty. Certifikovaná hodnota methylrtuti je 5,50 mg.kg<sup>-1</sup>, námi zjištěná hodnota byla 5,311 mg.kg<sup>-1</sup>, což představuje 96,6 %.

Použité chromatografické podmínky jsou prezentovány v tabulce č. 1. Před samotným měřením kalibračních roztoků a vzorků byla kolona upravena 10 nástřiky 30 mM HBr.

Tabulka 1: Optimalizované experimentální podmínky GC /  $\mu$ ECD

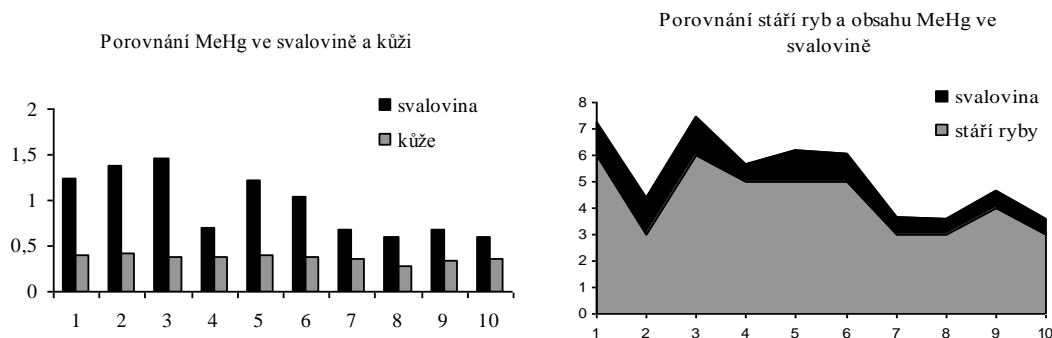
Kolona	DB-17 capillary 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 $\mu$ m film J & W Scientific, Folsom, CA, USA
Program	80°C - 1 min zadrž 15°C/1 min do 180°C 5°C/1 min do 220°C
Detektor	280°C
Nástřík	1 $\mu$ l

### Výsledky a diskuze

Získané výsledky byly zpracovány do následujících tabulek a grafů.

Tabulka 2: Výsledky methylrtuti ve svalovině a kůži ryb z místa odlovu č. 1:

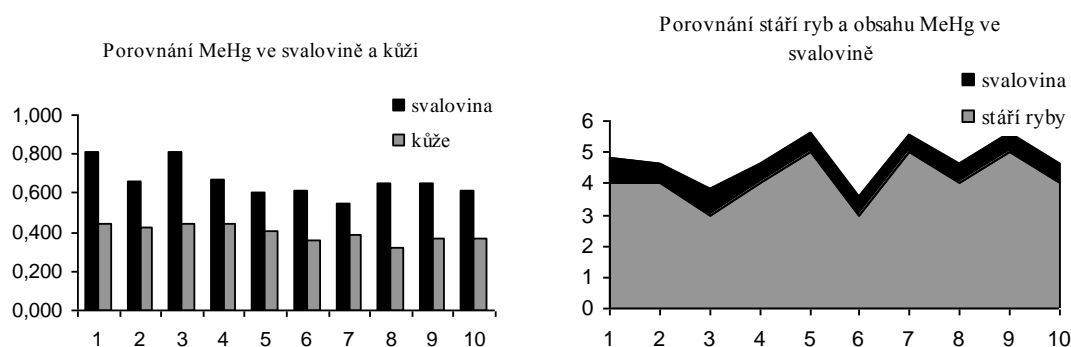
	MeHg ve svalu (mg.kg <sup>-1</sup> )	MeHg v kůži (mg.kg <sup>-1</sup> )	Stáří ryby
1.	1,248	0,392	6+
2.	1,385	0,411	3+
3.	1,451	0,381	6+
4.	0,695	0,383	5+
5.	1,212	0,406	5+
6.	1,046	0,372	5+
7.	0,688	0,363	3+
8.	0,604	0,287	3+
9.	0,677	0,331	4+
10.	0,595	0,370	3+



Graf č. 1: Porovnání obsahu MeHg ve svalovině a kůži u ryb z místa odlovu č. 1

Graf č. 2: Porovnání stáří ryb a obsahu MeHg ve svalovině ryb z místa odlovu č. 1  
 Tabulka 3: Výsledky methylrtuti ve svalovině a kůži ryb z místa odlovu č. 2:

	MeHg ve svalu ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	MeHg v kůži ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	Stáří ryby
11.	0,810	0,440	4+
12.	0,660	0,427	4+
13.	0,812	0,446	3+
14.	0,668	0,439	4+
15.	0,602	0,402	5+
16.	0,609	0,361	3+
17.	0,549	0,386	5+
18.	0,650	0,323	4+
19.	0,647	0,364	5+
20.	0,612	0,370	4+



Graf č. 1: Porovnání obsahu MeHg ve svalovině a kůži u ryb z místa odlovu č.2  
 Graf č. 2: Porovnání stáří ryb a obsahu MeHg ve svalovině ryb z místa odlovu č.2

### Závěr

Předložená studie řešila aktuální problematiku stanovení methylrtuti ve tkáních ryb. Analyzována byla svalovina a kůže; důvodem byla možnost posouzení přestupu sledovaného analytu z vodního prostředí do biotických tkání ryb; kůže je indikátorem znečištění vodního ekosystému, rybí svalovina je posuzována jako potravina. Námi předložené hodnoty převyšují hodnoty udané v Nařízení Evropské komise č. 1881/2006/ES; důvodem bude patrně to, že odběrová místa byla zvolena tak, aby v rámci komplexní studie bylo možné posoudit vliv velkokapacitní čistírny odpadních vod na znečištění vodního ekosystému.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena VZ MŠMT ČR č. MSM 6215712402.

### Literatura

K dispozici u autora.

**Kontaktní adresa:** Zuzana Králová, Mgr., Ústav veterinární ekologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, zuzanakralova@centrum.cz

## Optimalizace metody SPE/HPLC pro stanovení vybraných léčiv Optimization of SPE/HPLC method for determination of selected pharmaceuticals

<sup>1</sup>Járová Kateřina, <sup>1</sup>Vávrová Milada, <sup>1</sup>Stoupalová Michaela, <sup>2</sup>Večerek Vladimír

<sup>1</sup> Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ČR

<sup>2</sup> Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ČR

### Summary

*Antibiotics are a large group of pharmaceuticals whose consumption in both human and veterinary medicine is growing annually. Most of these biologically active substances occur in waste or surface waters. Sulfonamides are antimicrobial substances of synthetic origin, known as chemotherapeutics, often classified as a group of antibiotics.*

*The work was focused on the optimization and selection of suitable method for the determination of selected sulfonamides in water samples. The tap water purposely contaminated with four sulfonamides (sulfathiazol, sulfamethoxazole, sulfapyridin, sulfadimidin) was used as a blank sample. Optimization of SPE method (Solid Phase Extraction) included comparing of sample extraction by SPE columns ENVI-18 and Oasis HLB. Extraction efficiency was evaluated within different experimental conditions. Determination of selected sulfonamides concentration is performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) with diode array detector (DAD).*

**Keywords:** *pharmaceuticals; sulfonamides; water samples; SPE; HPLC/DAD*

### Úvod

Antibiotika tvoří skupinu léčiv používaných k léčbě a prevenci různých infekčních onemocnění. Jsou definovány jako látky produkované různými mikroorganismy, plísněmi, ale i rostlinami nebo živočichy, se schopností inhibovat růst a množení jiných mikroorganismů (bakteriostatika) nebo je usmrcovat (baktericidy). Většina starších antibiotik má přirozený původ, v současnosti jsou vyráběny spíše polosynteticky nebo synteticky. Sulfonamidy patří mezi tzv. chemoterapeutika, což jsou látky, které se v přírodě vůbec nevyskytují, ale mají antimikrobní účinky (Hampl a Paleček, 2002; Hejzlar, 1995). V dnešní době je tato skupina léčiv aplikována především v lékařství a zemědělství. Zvířata spotřebují až 60 % antibiotik nejen při veterinární léčbě, ale také jako doplněk krmiv. Nadměrné užívání antibiotik má však i negativní dopad, tj. vznik rezistence mikroorganismů, snížená aktivita přátelských bakterií, alergické reakce apod. Antibiotika jsou v těle lidí a zvířat metabolizována a vylučována močí nebo stolicí, přičemž 30 až 90 % antibiotik se vylučuje v aktivní formě (Cooper et al., 2008). Takto se antibiotika v původní nebo metabolizované formě dostávají do životního prostředí, kde jsou toxické zejména pro vodní organismy.

Sulfonamidy jsou nejdéle známá protiinfekční chemoterapeutika; jsou širokospektrá a bakteriostaticky působící, využívaná především při terapii infekcí močových cest, horních a dolních cest dýchacích a některých lokálních infekcí. Výskyt nežádoucích účinků po podání sulfonamidů je však velmi častý a dosahuje frekvence až 5 %; tyto projevy jsou často odlišné, od nepříjemných až po velmi závažné (Hynie, 1999; Května aj., 2000).

Poměrně nízká aktivita a rychlý vývoj rezistence byly hlavními důvody, proč bylo od terapie sulfonamidy z velké části upuštěno. V současnosti je ze skupiny sulfonamidů aplikováno pouze několik zástupců, které se používají už jen jako alternativní léčba. Stále se však ještě uplatňují především v kombinaci s jinými látkami, např. s trimethoprimem. I přes útlum v používání jsou zatím pátou nejvíce používanou skupinou veterinárních antibiotik v EU. Ve Velké Británii a Nizozemí jsou dokonce na druhém místě nejvíce používaných veterinárních antibiotik; v roce 2002 to bylo přibližně 82 tun za rok, což činí 21 % celkové produkce veterinárních antibiotik v těchto zemích (Boxall et al., 2002).

### **Materiál a metodika**

Předmětem této studie byl výběr vhodného komplexního analytického postupu pro stanovení vybraných léčiv ze vzorků vody. Proto budou dále v této kapitole popsány jednotlivé dílčí postupy komplexní metodiky. Jako modelový vzorek byla použita destilovaná voda cíleně kontaminovaná standardy sulfonamidů. Metoda zahrnuje přečištění vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE) a analytické stanovení metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s detektorem diodového pole (DAD).

SPE je moderní metoda používaná pro extrakci reziduí léčiv z vody. Jedná se o nejvýkonnější dostupnou techniku umožňující rychlou a selektivní přípravu vzorků. SPE je používána nejčastěji při zpracování kapalných vzorků, především pro extrakci středně těkavých a netěkavých látek, jejich zakoncentrování a odstranění balastních látek. Základním předpokladem úspěšné extrakce je výběr vhodného sorbentu. Při analýze byl využíván systém SPE s vakuovou pumpou, fy Labicom.

Pro stanovení léčiv ve vodách se nejčastěji používá kapalinová chromatografie. Tato metoda je vhodná právě pro separaci netěkavých sloučenin, mezi které patří i většina léčiv. Pro analýzu byl použit kapalinový chromatograf Agilent 1100 Series, Agilent, USA s detektorem diodového pole (DAD). Byly zvoleny následující chromatografické podmínky: kolona ZORBAX Eclipse XDB, C18, velikost 4,6 x 150 mm, velikost částic 5  $\mu$ m.

### **Výsledky a diskuze**

V rámci zpracování metody byla posuzována účinnost SPE extrakce za různých experimentálních podmínek. Srovnávané parametry jsou zpracovány do tabulky 1.

Nejdůležitějším krokem extrakce pomocí SPE je výběr vhodného typu extrakční kolonky. Jelikož sulfonamidy patří mezi amfoterní látky, jako nejvhodnější se jeví kolonky typu HLB (hydrophilic-lipophilic balance), které umožní separovat analyty na základě jejich hydrofobních a polárních vlastností (Babic et al., 2006). Další vhodnou kolonkou by mohla být i kolonka typu ENVI-18.

Postup při přečištění vzorku na SPE spočívá v následujících krocích: kondicionace kolonky, nanesení vzorku, sušení, promývání vzorku a jeho eluce. Zvolení vhodných rozpouštědel a látek pro tento postup je dalším posuzovaným parametrem. Nami prováděné experimenty byly v souladu s metodou publikovanou v literatuře, při které byla pro kondicionaci i pro eluci použita kombinace kyseliny mravenčí s methanolem (Díaz-Cruz et al., 2008).

Tabulka 1: Parametry SPE extrakce

Typ kolonky	Kondicionace kolonek	Promývání kolonek	Eluce vzorku	pH prostředí roztoků vzorků
C 18 (J.T.Baker)	5 ml methanolu 5 ml vody	2 ml methanolu (2%)	2 x 5 ml methanolu	2
ENVI-18 (Supelclean)	2 ml 0,1 M kys. mravenčí v MetOH 2 ml 5% methanolu	2 ml methanolu (5%)	5 ml 0,1 M kys. mravenčí v MetOH	4
Waters Oasis HLB	5 ml vody 5 ml methanolu 5 ml vody o daném pH	3 ml vody	5 ml methanolu	7

Pro extrakci látek obsahujících disociující skupiny je často nutná úprava pH vzorku, kterou lze dosáhnout toho, že molekula zůstane v nedisociované formě a tím bude lépe interagovat s nepolárním sorbentem. Proto bylo při výběru metody nezbytné provést úpravu pH modelové vody, případně vody určené ke kondicionaci nebo k promývání kolonek. Nejúčinnější byla úprava na pH 4, což bylo doloženo i porovnáním s literaturou (Babic et al., 2006).

### Závěr

Byl proveden výběr metody pro stanovení sulfonamidů ve vodě. Tato metoda byla ověřena experimentálně pomocí modelové vody; její výtěžnost dosahovala cca 100 %.

### Poděkování

Studie byla zpracována za finančního přispění MŠMT ČR VZ č. MSM 6215712402.

### Literatura

- BABIC, S. et al. Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater. *Talanta*, 2006, vol. 70, no. 4, pp. 732-738.
- BOXALL, A. B. A. et al. The sorption and transport of a sulphonamide antibiotic in soil systems. *Toxicology Letters*, 2002, vol. 131, no. 1-2, pp. 19-28.
- COOPER, R. E., SIEWICKI, C. T., PHILLIPS, K. Preliminary risk assessment database and risk ranking of pharmaceuticals in the environment. *Science of the Total Environment*, 2008, vol. 398, no. 1-3, pp. 26-33.
- DÍAZ-CRUZ, S. M., GARCÍA-GALÁN, J. M., BARCELÓ, D. Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion trap-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2008, vol. 1193, no. 1-2, pp. 50-59.
- HAMPL, F., PALEČEK, J. *Farmakochemie*. 1. vyd. Praha: VŠCHT Praha, 2002. 413 s. ISBN 80-7080-495-5.
- HEJZLAR, M. *Antibiotika v praxi*. 2. přeprac. vyd. Praha: Makropulos, 1995. 499 s. ISBN 80-901776-4-6.
- HYNIE, S., *Speciální farmakologie – Díl VI: Protinádorová a protiinfekční chemoterapeutika*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 1999. 261 s. ISBN 80-7184-942-1.
- KVĚTINA, J.; HERINK, J.; VOPRŠALOVÁ, M. *Základy farmakologie (3. díl)*. 1. vyd. Brno: VFU Brno, 2000. 233 s. ISBN 80-7305-391-8.

**Kontaktní adresa:** Kateřina Járová, Mgr., Ústav veterinární ekologie a ochrany životního prostředí, FVHE VFU Brno, Palackého 1/3, 612 42 Brno, H09369@vfu.cz



# **SEKCE 4**

*Veterinární biochemie, chemie a biofyzika*



## Accumulation of Arsenic during Growing Period of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* L.)

### Akumulace arzenu během růstu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss* L.)

Harkabusová Veronika, Čelechovská Olga, Macharáčková Blanka,  
Lavičková Alena

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

#### Summary

The objective of this study was to monitor the accumulation of arsenic in tissues of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* L.) during intensive rearing and assess the content of organically bonded arsenic and the total content of arsenic. Fish were monitored for the duration of one year, from 2 to 14 months of age. Homogenized samples of rainbow trout bodies and samples of muscle, liver, spleen and bile were analysed. The total arsenic was determined by hydride technique AAS and arsenobetaine by high performance liquid chromatography (HPLC) combined with the detection by atomic fluorescence spectrometry. The highest accumulation of As occurred in muscle throughout the whole period of growing, in summer months the total arsenic in muscle was bonded in form of AsB, in winter months the content of AsB dropped to 50% of As. The accumulation of As in tissues ranked in order muscle > liver > spleen, bile.

**Keywords:** arsenobetaine; muscle; liver; spleen; bile; atomic adsorption spectrometry; hydride generation; atomic fluorescence spectrometry

#### Introduction

Arsenic compounds enter environment naturally by volcanic eruptions, forest fires and weather impacts – e.g. erosion. The most serious anthropogenic sources of arsenic (including industrial emissions) are the ore mining and processing industry, thermal power plants, agriculture (application of insecticides, herbicides, algicides) and the wood-working industry (chemical preservation of wood) (Tamaki and Frankenberger 1992). Arsenic exists in a wide variety of chemical forms and oxidation states, which influences its bio-availability and toxicity. More than 50 arsenic compounds were detected in marine organisms. Arsenobetaine (AsB), which is stable, metabolically inactive and non-toxic, predominates over all the arsenic species in edible parts of fish (Sloth et al. 2005). Inorganically bonded arsenic, although it is not the main component of total arsenic content in fish and crustaceans, represents a potential risk of toxicity. It was experimentally proved that inorganic form of As<sup>III</sup> and As<sup>V</sup> is bio-accumulated in some species of fish, including trout, bluegill sunfish and minnow (EPA, 2000).

#### Materials and Methods

The rainbow trout were kept in tanks with through-running water from the reservoir of water processing plant Kružberk (river Moravice, North Moravia, Czech Republic). The rainbow trout were hatched in October 2007. Sampling was done in about two-month's intervals during growing period from December 2007 to December 2008. From June 2008 (the 8<sup>th</sup> months of rearing) to December 2008 (the 14<sup>th</sup> months of rearing) immediately after killing we took samples of individual internal organs. All the samples were kept at the temperature of -18°C until they were analysed. The determination of

arsenic was done in homogenized body samples, and in muscle, liver, spleen and bile. The feeding mixtures were analysed as well.

The total amount of arsenic was determined by high-resolution continuum source atomic adsorption spectrophotometry (HR-CS AAS, apparatus ContrAA 700, Analytik Jena AG, Germany). We applied hydride technique with electrothermal atomisation in iridium coated graphite tube preheated to 300°C (Hydrae 60, Analytik Jena AG, Germany). Prior to the determination of total arsenic, samples were mineralised with nitric acid and hydrogen peroxide in a microwave-heated laboratory autoclave (ETHOS SEL, Milestone, Italy). Detection limit of total arsenic ( $3\sigma$ ) and limit of determination ( $10\sigma$ ) were  $1.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  and  $4.1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  respectively.

The method of arsenic species assessment comprised of the separation by high performance liquid chromatography and the detection by atomic fluorescence spectrometry with the generation of hydrides (HPLC-HG-AFS), apparatus Millenium Excalibur (PS Analytical, UK). Arsenic species were extracted from tissue samples by ultra-pure deionized water. The main compound of arsenic detected in fish tissues was arsenobetaine (AsB). The measurement was performed at wavelength 193.7 nm. Detection limit ( $3\sigma$ ) was  $0.33 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ .

The accuracy of both measurements was validated by means of standard reference material DORM-2. The resulting data were processed by statistical package Unistat 5.1.(Unistat Ltd, GB). Nonparametric Kruskal-Wallis analysis of variance was used for determining the significance of differences of metal concentrations.

## Results and Discussion

Since the analysed fish were kept in tanks with running water from the basin of water processing plant, the ingested feed mixtures were the main source of arsenic. After feed mixture analysis it was found the prevailing part of arsenic in inorganic form (from 78% to 95% of the total arsenic amount).

We analysed homogenized fish bodies from the 2<sup>nd</sup> to 9<sup>th</sup> month of rearing. Concentration of total arsenic in these samples ranged from  $0.177 \pm 0.012 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $0.741 \pm 0.210 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ , content of arsenic in arsenobetain from  $0.096 \pm 0.0031 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $0.357 \pm 0.142 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The concentration of As significantly increased ( $P < 0.01$ ) to the 3<sup>rd</sup> month of rearing. From the 6<sup>th</sup> month there was not found any statistically significant variance in total content of arsenic. The concentration of AsB in homogenized fish during first months of rearing was very low, statistically significant increase ( $P < 0.05$ ) occurred in the 6<sup>th</sup> month.

Total arsenic and arsenobetaine in rainbow trout muscle were determined in fish from the 8<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> month of rearing. The value of As ranged from  $0.76 \pm 0.22 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $1.62 \pm 0.19 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The AsB concentration in muscle samples ranged from  $0.71 \pm 0.06 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  to  $1.15 \pm 0.09 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  (Fig. 1). Amlund et al. (2006) proved that AsB contained in muscle and other tissues is not only the product of detoxication but also comes from the feedstuff. In summer months (from June to October) from the 8<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> month of fish rearing, that is in the period of an intensive metabolism the values of As and AsB were very similar, which means that the entire arsenic was in the form of AsB. In winter months the content of As in muscle increased while AsB content significantly decreased ( $P < 0.01$ ). The content of AsB in liver corresponds to this.

The concentration of AsB in liver was slowly increasing with maximum in the 11<sup>th</sup> month of rearing (October) in the following month it significantly dropped ( $P < 0.05$ ) and stayed at this level until the end of monitoring. Over the whole monitoring (in summer and winter months) the values of As in liver did not show any statistically significant difference and the mean concentration was  $0.486 \pm 0.036 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ . The limited accumulation of As in liver confirms that organism has a lower capacity to accumulate arsenic. Ventura-Lima et al. (2009) reported similar results during the short term monitoring of the impact of various concentrations of inorganic arsenic in carp. The ratio of AsB/As in liver reached the maximum at the end of summer (27%), in winter months it dropped to 7% of As. The arsenic in liver was transformed into arsenobetaine and this arsenobetaine accumulated in muscle, whereas in winter months arsenic accumulated in muscle (Figure 1). The drop in transformation of arsenic into arsenobetaine during winter was caused by lower metabolic rate (Svobodová et al. 2002).

From the 11<sup>th</sup> month of trout age we sampled spleen and bile. Concentration of arsenobetaine in them copied the concentration found in liver. During the entire monitoring the concentration of total arsenic in spleen and bile was consistent, when compared with concentration in liver it was lower. But unlike in liver, the concentration of total arsenic decreased ( $P < 0.05$ ) in winter months while retaining the constant content of arsenobetaine. Elimination of arsenobetaine via bile appeared to be negligible and is in accordance with findings of Amlund et al. (2006).

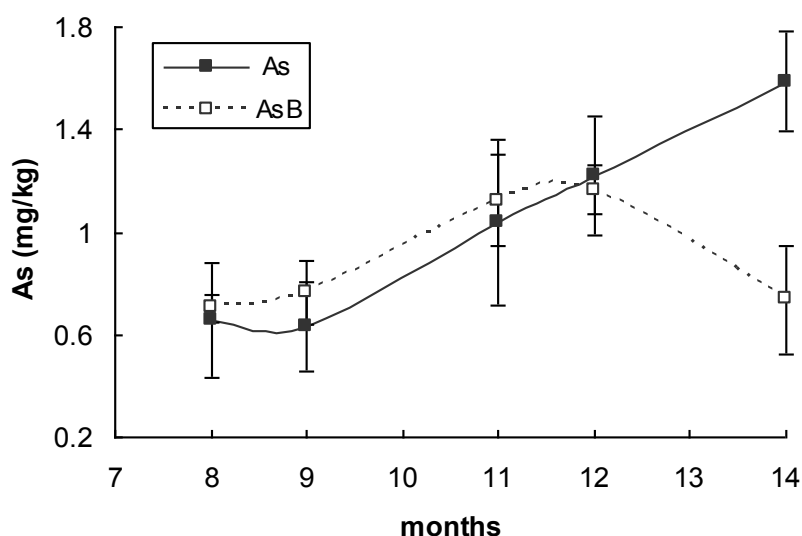


Figure 1: Dependence of concentrations of total arsenic and arsenobetaine in muscle on rearing period (months)

#### Acknowledgements

This research was supported by Ministry of Education, Youth and Physical Training of the Czech Republic, Project MSM No 6215712402.

### References

AMLUND H, INGEBRIGTSEN K, HYLLAND K, RUUS A, ERIKSEN DO, BERNTSSEN MHG 2006: Disposition of arsenobetaine in two marine fish species following administration of a single oral dose of [C-14]arsenobetaine. *Comp Biochem Phys C* **143**: 171-178.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) 2000: Target analytes. <http://www.epa.gov/ostwater/fishadvice/vol1/ch4.pdf>.

SLOTH JJ, JULSHAMN K, LUNDEBYE AK 2005: Total a content arsenic and inorganic arsenic in Norwegian fish feed product. *Aquacult Nutr* **11**: 61-66.

SVOBODOVÁ Z, ČELECHOVSKÁ O, MÁCHOVÁ J, RANDÁK T 2002: Content of arsenic in market-ready rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Acta Vet Brno* **71**: 361-367.

TAMAKI S, FRANKENBERGER WT Jr 1992: Environmental biochemistry of arsenic. *Rev Environ Contam Toxicol* **124**:79-110.

VENTURA-LIMA J, FATTIRINI D, REGOLI F, MONSERRAT JM 2009: Effect of different inorganic arsenic species in *Cyprinus carpio* (Cyprinidae) tissues after short-time exposure: Bioaccumulation, biotransformation and biological response. *Environ Pollut* **157**: 3479-3484.

**Contact address:** Veronika Harkabusová, Ing., Ústav biochemie, chemie a biofyziky, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H10373@vfu.cz

**Štúdium vhodnosti použitia druhovo špecifických primerových párov  
ECUITSf/ecfITSr a EHITSf/ecfITSr na určenie genotypov u druhov  
*Encephalitozoon* spp.**

**Suitability study of using species-specific primer pairs  
ECUITSf/ecfITSr and EHITSf/ecfITSr to determine the genotypes of  
the *Encephalitozoon* spp. species.**

<sup>1</sup>Malčeková Beáta, <sup>1</sup>Valenčáková Alexandra, <sup>1</sup>Luptáková Lenka,  
<sup>1</sup>Ravaszová Petra, <sup>2</sup>Halánová Monika

<sup>1</sup>Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Košice, SR

<sup>2</sup>Ústav verejného zdravotníctva, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice, SR

**Summary**

*Microsporidia* are a diverse group of obligate, intracellular spore-forming parasites that are capable of infecting a wide range of invertebrates and vertebrates, including humans. Since the discovery of genetic variability in most frequently occurring species *Encephalitozoon cuniculi*, *Encephalitozoon hellem*, and *Enterocytozoon bieneusi* not only interested in the genotyping of these species has increased, but also interest to develop methodologies for their easy and quick identification in clinical samples and to study the various genotypes. Their genotyping is mainly based on polymorphism and deletions in the ITS rRNA genes. Species-specific primer pairs ECUITSf/ecfITSr (PCR product size 349 bp), EHITSf/ecfITSr (359 bp) and gender-specific primer pair ecfITSf/ecfITSr (*Encephalitozoon cuniculi* – 349 bp, *Encephalitozoon hellem* – 359 bp and *Encephalitozoon intestinalis* – 334 bp) created by us amplified ITS region and part of the SSU rRNA gene. ECUITSf/ecfITSr and EHITSf/ecfITSr represent the first species-specific primer pairs, under which, after PCR product sequencing, genotype can be determined.

**Keywords:** *Encephalitozoon cuniculi*; *Encephalitozoon hellem*; genotypes; primers; real-time PCR

**Úvod**

Mikrosporídie predstavujú obligátne spóry tvoriace intracelulárne parazity, ktoré sú schopné infikovať široké spektrum bezstavovcov a stavovcov, vrátane ľudí. U cicavcov bolo opísaných 15 druhov, z ktorých *Encephalitozoon cuniculi* (*E. cuniculi*) a *Encephalitozoon hellem* (*E. hellem*) predstavujú najčastejšie sa vyskytujúce mikrosporídie.

Od objavenia genetickej variability u druhov *E. cuniculi* a *E. hellem*, zaradených do rodu *Encephalitozoon* spp., vzrástol záujem o genotypizáciu týchto druhov, čo môže prispieť k pochopeniu epidemiologickej situácie týchto patogénov. Do tohto rodu je zatriedený aj *Encephalitozoon intestinalis*, u ktorého neboli dokázané žiadne genotypy. Genotypizácia je hlavne založená na polymorfizme a delécií v ITS oblasti rRNA génov a SSU rRNA génov, ktoré sa často používajú ako genetické markery pri určovaní genotypov.

Pomocou imunologických a molekulových metód sa dokázala existencia troch genotypov *E. cuniculi* (genotyp I, II, III) a rozdiel medzi nimi je v počte repetitívnych sekvencií 5'-GTTT-3' v ITS oblasti rRNA génu. Genotyp I („králičí genotyp“) obsahuje tri 5'-GTTT-3' repetície, veľkosť ITS oblasti je 37 bp, genotyp II („myšací genotyp“) obsahuje dve 5'-GTTT-3' repetície, veľkosť ITS oblasti je 33 bp a genotyp III („psí

genotyp“) obsahuje štyri 5'-GTTT-3' repetície a veľkosť ITS oblasti je 41 bp (Didier a kol., 1995). Repetitívna sekvencia 5'-GTTT-3' v ITS oblasti je spoľahlivým a široko použiteľným genetickým markerom u tohto druhu.

Prvotné štúdie druhu *E. hellem*, ktoré sa zameriavali na analýzy SSU rRNA génu a ITS oblasti viedli k záverom, že izoláty sú geneticky homogénne. Tieto závery sa podarilo vyvrátiť, potvrdením existencie troch genotypov (genotyp 1, genotyp 2 a genotyp 3), ktoré boli navrhnuté na základe rozdielov v ITS oblasti (Mathis a kol., 1999). Karyotypizáciou a multilokusovou analýzou zameranou na kódované (PTP gén a SSU rRNA gén) a nekódované (ITS oblasť) oblasti sa dokázalo šesť rôznych genotypov: 1A, 1B, 1C, 2A, 2B a 2C (Xiao a kol., 2001). Rozdiely medzi jednotlivými genotypmi v SSU rRNA génu a ITS oblasti sú na základe sekvenčných rozdielov a delécií v daných oblastiach. Najčastejšie sa určujú genotypy na základe ITS oblasti, pričom genotyp 1 je totožný s genotypmi 1A, 1B a 1C; genotyp 2 sa premenoval na 2A a genotyp 3 na 2C.

Naším cieľom bolo vytvoriť druhovo špecifické primerové páry pre druhy *E. cuniculi* a *E. hellem* a rodovo špecifický primerový pár pre *Encephalitozoon* spp. amplifikujúce ITS oblasť a časť SSU rRNA génu na určenie genotypov.

### Materiál a metodika

Spóry *E. cuniculi* (genotyp I) boli izolované z obličiek králika plemena Maličký, ktorý mal encefalitozoonózu, spóry *E. intestinalis* a spóry *E. hellem* (genotyp IA) boli poskytnuté profesorkou Didierovou (Tulane University School of Public Health and Tropical Medicine, LA). Pred samotnou extrakciou DNA spóry boli podrobené mechanickej disrupcii: 200 µL spór [100 µL suspenzie spór spolu so 100 µL lyzačného pufru (NET 50 + sarcosine)] najprv 30 min. var a následne 8 x striedavo ponorené do dusíka a rozmrazované pri 100 °C). Na extrakciu DNA sa použil komerčný izolačný kit DNA Sorb B (Ecoli) a postup bol dodržaný podľa inštrukcií výrobcu.

Pre rod *Encephalitozoon* spp. ako aj pre druhy *E. cuniculi* a *E. hellem* boli vytvorené jeden rodový a dva druhovo špecifické primerové páry pomocou programu Primer Express® Software v 2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA) amplifikujúce celú ITS oblasť, malé časti SSU rRNA a LSU rRNA génov. Rodovo špecifický primerový pár (forward primer ecfITSf 5'-TGTACACACCGCCCGTCG-3' a reverse primer ecfITSr 5'-TTTCACTCG CCGCTACTC-3'). U druhu *E. cuniculi* druhovo špecifický primerový pár: forward primer ECUITSf 5'-CCTTTGACGGTGTCTACGGA-3' a reverse primer ecfITSr 5' - TTTCACT CGCCGCTACTC - 3' (AJ005581.1). U druhu *E. hellem* primerový pár: forward primer EHITSf 5'-GTGAGTGTGAGAGTGTTTTA-3' a reverse primer ecfITSr 5' - TTTCACTCG CCGCTACTC - 3' (AF272836.1).

Na celkový objem 25 µL sa napipetovalo 12,5 µL FastStart Universal SYBR Green Master (Roche), 0,5 µL z každého z primerov (30 pmol/µL) a 5 µL templátu. PCR reakcia prebehla v BIOER Line-Gene v programe: po 2 min pri 50 °C nasleduje iníciaľna denaturácia 10 min. pri 95 °C, amplifikácia 40 cyklov (denaturácia 15 s. pri 95 °C a hybridizácia 1 min. pri 60 °C). Amplifikácia, detekcia a analýza dát bola vykonaná v real-time detekčnom termocykleri (BIOER Line-Gene).

### Výsledky

*Encephalitozoon* spp. Rodovo špecifický primerový pár vytvoril fragmenty veľkosti 349 bp (*E. cuniculi*), 359 bp (*E. hellem*) a 334 bp (*E. intestinalis*). U druhu *E. cuniculi*



druhovo špecifický primerový pár ECUITSf/ecfITSr vytvoril fragment veľkosti 551 bp a u druhu *E. hellem* primerový pár EHITSf/ecfITSr vytvoril fragment veľkosti 663 bp. PCR produkty boli osekvenované z oboch strán a získané sekvencie boli zarovnané (ChromasPro Programe). Zo sekvencií sa dali určiť jednotlivé genotypy.

### Diskusia

Od objavenia genetickej variability u druhov *E. cuniculi* a *E. hellem* vzrástol nielen záujem o ich genotypizáciu, ale aj vytvorenie metódik na ich jednoduché a rýchle určenie v klinických vzorkách ako aj o štúdium jednotlivých genotypov.

Doteraz opísané druho špecifické primerové páry u týchto druhov amplifikovali len SSU rRNA gén pri klasickej PCR (ECUNF/ECUNR, EHELf/EHELr, SINTF1/SINTR, V1/Si500, V1/Sep1), nested PCR (prvá reakcia: MSP1/MSP2A, druhá reakcia: MSP3/MSP4A; prvá reakcia: Mic3U/Mic421U, druhá reakcia: Mic266/Ec378, Eh410, Ei395) alebo u real-time PCR (sonda: *EcephP1*, EcunF1/EcunR2, EhelF1/EhelR2, EintF1/EintR2; sonda, FEI1/REI1). Na určenie genotypov na základe ITS oblasti u uvedených druhov mikrosporídií boli vytvorené len rodovo a kmeňovo špecifické primerové páry (klasická PCR - 530f/580r, int530f/int580r; real-time PCR - sonda: *Eint82rev*, MSP/Eint213R).

Nami vytvorené druho špecifické primerové páry ECUITSf/ecfITSr a EHITSf/ecfITSr predstavujú prvé druho špecifické primerové páry pre druhy *E. cuniculi* a *E. hellem* amplifikujúce ITS oblasť a časť SSU rRNA génu pomocou, ktorých sa dajú po sekvenácii určiť genotypy.

### Záver

Štúdium genotypovej variability mikrosporídií môže prispieť k urýchleniu vývoja citlivejších a presnejších diagnostických metód ako aj nových liečebných postupov. Poznanie genotypovej variability umožní z veterinárneho tak aj z medicínskeho hľadiska predvídať ohniská nákazy a tým predísť možným infekciám pri zoonotických mikrosporídiách.

### PodĎakovanie

Táto práca bola riešená v rámci grantových projektov VEGA MŠ SR No. 1/0108/10, No. 1/0412/09 a No. 1/0271/11.

### Literatúra

DIDIER, E.S.; VOSSBRINCK, C.R.; BAKER, M.D.; ROGERS, L.B.; BERTUCCI, D.C.; SHADDUCK, J.A. Identification and characterization of three *Encephalitozoon cuniculi* strains. *Parasitology*. 1995, vol. 111, s. 411–421.

MATHIS, A.; TANNER, I.; WEBER, R.; DEPLAZES, P. Genetic and phenotypic intraspecific variation in the microsporidian *Encephalitozoon hellem*. *Int. J. Parasitol.* 1999, vol. 29, no. 5, s. 767-770.

XIAO, L.; LU, L.; MOURA, H.; SULEIMAN, I.; LAL, A.A.; GATTI, S.; SCAGLIA, M.; DIDIER, E.S.; VISVESVARA, G.S. Genotyping *Encephalitozoon hellem* Isolates by Analysis of the Polar Tube Protein Gene. *J. Clin. Microbiol.* 2001, vol. 39, no. 6, s. 2191–2196.

**Kontaktná adresa:** Beata Malčeková, RNDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, SR, malcekova@uvlf.sk

## Determination of Acrylamide in Food and Feed by Adsorption Voltammetry

### Stanovení akrylamidu v potravinách a krmivech adsorpční voltametrií

Talašová Helena, Šucman Emanuel

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

#### Summary

*The new electroanalytical method for determination of acrylamide was developed and applied for analysis of food/feed. Sample preparation procedure was optimized. Effects of different concentrations of HCl and various alcohols were investigated. Methanol, ethanol and propanol were used. The pH range (pH=0,8–1,6) was also tested. The best results were found for the ethanol-water mixture (1:2). Samples were extracted in an ultrasound bath and 1 ml of centrifuged extracts were taken for measurement. Voltammetric measurements were made using three-electrode configuration with the hanging mercury drop electrode as the working electrode. Peak heights and peak areas were well-defined under applied measurement conditions. The accuracy of the method was verified by standard reference materials. Acrylamide was also measured in extracts of dog feed (granules) samples.*

**Keywords:** *acrylamide; stripping voltammetry; food; feed*

#### Introduction

Acrylamide is a chemical substance formed in food at high temperatures. The major pathway of acrylamide formation is the reaction between an amino acid and a carbonyl group of a reducing sugar, called Maillard reaction. Acrylamide is present in many types of food especially in potato chips, biscuits, bread, cereals and coffee<sup>1</sup>.

Acrylamide can be absorbed and distributed relatively rapidly into tissues of animals and humans. It was found mainly in the thymus, liver, heart, brain, kidneys, placenta and in breast milk. The NOEL (no observed effect level) has been determined from 0.2 to 10 mg/kg body wt/day in rodents for neurotoxic effects. WHO indicates average human dietary intake from 0.3 to 0.8 µg/kg body wt/day. The International Agency for Research on Cancer (IARC) has classified acrylamide in Group 2A (probably carcinogen to humans).<sup>2,3,4</sup>

Most of the analytical methods used for determination of acrylamide are based on gas chromatography (GC) with precolumn derivatization or liquid chromatography (HPLC). Methods without derivatization were also reported. Mass spectrometry (MS) is the major detection technique in use.<sup>5</sup> Possibilities for electrochemical determination of acrylamide have not been described in the literature yet. The optimal parameters for voltammetry were determined. The aim of this study was to find the best conditions for sample preparation for the electrochemical determination of acrylamide in food and feed and to determine acrylamide in granules for dogs.

#### Material and methods

Potato chips commonly available in food stores were used for experiments. Crispbread (European Reference Material ERM<sup>®</sup>-BD272, Germany) was used as the standard reference material. Dog granules were bought in general feed stores. Mercury (polarographic grade) and acrylamide (electroforesis grade) were supplied by Merck

(Germany). Ag/AgCl reference electrode was filled with 3 mol/l KCl solution (ORION research Inc., USA). As the standard of nickel, the solution Asastol (Analytika, Czech Republic) was used ( $1,000 \pm 0,005$  g/l). Argon (Linde Technoplyn a.s., Czech Republic) was used to remove dissolved oxygen from solutions. All other chemicals were of analytical grade (Merck, Germany). Ultra pure water of specific conductivity  $< 1\mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$  was used to prepare all solutions. Measurements were performed by Autolab measuring unit (Eco Chemie B.V., Netherlands) and polarographic analyzer VA Stand 663 (Metrohm, Switzerland) equipped with software Nova 1.5 (Eco Chemie B.V., Netherlands) for measurement evaluations. Polarographic equipment was used in three-electrode configuration with the hanging mercury drop electrode as working electrode, the Ag/AgCl reference electrode, and the glassy carbon auxiliary electrode.

Samples of potato chips were crushed in agate mortar and extracted in alcohol/water mixtures. Methanol, ethanol and propanol were added in varying proportions with water to samples. The water/ethanol mixture (ratio 2:1) was found to be the most suitable. The pH range was also tested by addition of 30 % hydrochloric acid. The pH = 1.38 was found to be the optimum. The samples were extracted for 1 hour in an ultrasonic bath (Sonic 10, Polsonic, Poland) and then centrifuged for 20 minutes at 4000 rpm (Table Top Centrifuge Z 300, HERMLE Labortechnik GmbH, Germany). 1 ml of the extract was immediately taken for the voltammetric measurement.

The technique of differential pulse anodic stripping voltammetry was used for the analysis of acrylamide in samples. All samples were measured in ammonia buffer of pH=10.0 containing 500  $\mu\text{mol/l}$  of Ni. Oxygen was removed by argon. Voltammograms were recorded from initial potential ( $E_i$ ) -0.75 V to final potential ( $E_f$ ) -0.1 V. Scan rate (SR) was 10 mV/s, deposition time ( $T_d$ ) 300 s and drop size 3 (instrumental setting). The method of standard additions was used for evaluation purposes.

## Results

Peak maxima appeared at the potential of -0.30 V. Peak heights were a function of acrylamide concentrations and of deposition time. The peak current increased with the increasing deposition time. The acrylamide concentrations on average of 1000  $\mu\text{g/kg}$  were found in analysed samples of potatoes chips. The acrylamide content of 100  $\mu\text{g/kg}$  was determined in the reference material (crispbread).

Acrylamide was also found in feed for dogs. The peak of acrylamide appears at voltammograms of extracts from dog granules (see Figure 1).

## Discussion

Extractions of samples in water with ethanol at the ratio of 1:2 and 1:1 provided similar results but peak current was marginally better at a ratio of 1:2. Peak of acrylamide didn't appear on voltammogram after extraction in propanol. Methanol is not suitable as extraction reagent because of its higher polarity.

Concentrations found in potato chips are in the same range as other results reported in different chromatographic studies for this material. The reference material has been tested to check the accuracy of measurements. The measured concentrations of acrylamide in the reference material were in good agreement with the data the specified in the certificate ( $980 \mu\text{g/kg} \pm 90 \mu\text{g/kg}$ ).

Production technology of granules for animals indicates the possibility of formation of acrylamide. Therefore samples of dog granules were also analyzed. Well-defined peaks were observed at voltammograms. The voltammetry methods seem to be a reliable, sensitive, rapid and low-cost analytical technique for the determination of acrylamide in food and feed.

### Conclusion

The present study deals with sample preparation for voltammetric determination of acrylamide. Extraction of samples in alcohol/water mixture in the acid medium proved to be adequate for the determination of acrylamide. Further research will focus on the determination of acrylamide in different types of feed for animals.

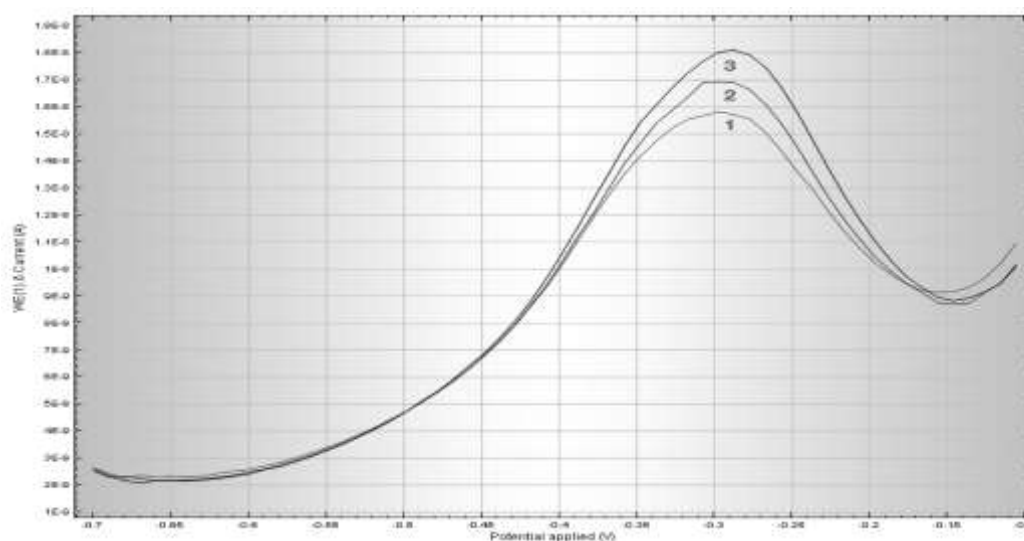


Figure 1: Peak heights of acrylamide in granules for dogs ( $E_d=E_i=-0,7$  V;  $E_f=-0,1$ V;  $T_d= 300$  s;  $SR=10$ mV/s; curves:1 – sample; 2 – stand.addition 5  $\mu$ mol/l; 3 - stand. addition 10  $\mu$ mol/l)

### References

1. TAEYMANS, D. et al. Acrylamide: Update on Selected Research Activities Conducted by the European Food and Drink Industry. *Journal of AOAC International*, 2005, vol. 88, no.1, p. 234-241.
2. CAPUANO, E.; FOGLIANO, V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT – Food Science and Technology*, 2011, vol. 44, p. 793-810.
3. TÖRNQVIST, M. Acrylamide in food: The discovery and its implications. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2005, vol. 561, p. 1-19
4. VON MÜHLENDAHL, K. E.; OTTO, M. Acrylamide: more than just another food toxicant? *European Journal of Pediatrics*, 2003, vol. 162, no.7-8, p. 447-448.
5. KERAMAT, J. et al. Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A Review. *Food and bioprocess technology*, 2011, vol.4, no.3, p.340-363

**Contact address:** Helena Talašová, MVDr., Department of Biochemistry, Biophysics and Chemistry, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H08359@vfu.cz

## Vplyv záťaže na vnútorné prostredie poštových holubov

### Effect of load on the internal environment of racing pigeons

<sup>1</sup>Zigo František, <sup>1</sup>Vasiľ Milan, <sup>2</sup>Chripková Martina

<sup>1</sup>Univerzita Veterinárskeho Lekárstva a Farmácie, Ústav chovu zvierat, Košice

<sup>2</sup>Univerzita Pavla Jozefa Šafárika, Ústav farmakológie, Košice

#### Summary

Ten racing pigeons were observed for reference values of seven blood biochemical parameters during individual stages of race load and race distances. The blood was sampled twice from each pigeon during 300 km and 500 km races in the following way: the first time before placing pigeons into race baskets and the second time two hours after finishing the race. When evaluating the levels of blood biochemical parameters determined in our study we obtained the following results corresponding to the reference values: mean level of total proteins 31.05 g.l<sup>-1</sup>, uric acid 412.4 μmol.l<sup>-1</sup>, glucose 20.94 mmol.l<sup>-1</sup>, cholesterol 7.93 mmol.l<sup>-1</sup>, mean activity of alkaline phosphatase 11.87 μkat.l<sup>-1</sup>, activity of aspartate aminotransferase 3.52 μkat.l<sup>-1</sup> and activity of alanine aminotransferase 0.45 μkat.l<sup>-1</sup>. Significant differences were observed for the levels of glucose and cholesterol with lower levels after both races compared to levels before the races. The level of total proteins after the first 300 km race was higher than the level before the race. On the other hand, total proteins after the second 500 km race reached lower level in comparison with the level before the race. The levels of uric acid, ALP, AST and ALT were significantly higher after both races.

**Keywords:** racing pigeons; reference values; biochemical parameters; race distances

#### Úvod

Chov poštových holubov má u nás bohatú a dlhoročnú tradíciu. Chovatelia sú organizovaní v 36 oblastných združeniach, ktoré riadi Slovenský zväz chovateľov poštových holubov (SZCHPH) a zároveň stanovuje podmienky členstva a pretekania na Slovensku. Náročné pretekové podmienky v súčasnosti si vyžiadali okrem iného aj zásah do pretekových plánov jednotlivých oblastných združení. Počet pretekov sa oproti minulým rokom navýšil takmer na dvojnásobok. Nadmerné zaťaženie poštových holubov počas pretekovej sezóny oslabuje ich organizmus, zvyšuje jeho náchylnosť k stresu a k rôznym ochoreniam. Z týchto dôvodov je veľmi dôležité poznať fyziológiu a biochemické zmeny prebiehajúce v organizme zvierat počas takýchto extrémnych výkonov. Tieto poznatky nám napomáhajú pri individuálnej selekcii vhodných jedincov, ktorých môžeme zaťažiť intenzívnym tréningom a očakávať adekvátny výsledok (Zigo, 2009).

Obzvlášť veľký význam má v tomto smere včasná a rýchla diagnostika porúch zdravotného stavu, čo nám umožňuje najmä biochemické vyšetrenie. Biochemická diagnostika je dôležitou súčasťou veterinárnej činnosti a poukazuje už na predklinické poruchy v zdravotnom stave, ktoré sa klinickými vyšetovacími metódami nedajú zistiť a tiež umožňuje posúdiť stupeň či priebeh poškodenia orgánov.

Kľúčový význam pri posúdení biochemických zmien vnútorného prostredia organizmu holubov po zaťažení, majú biochemické parametre namerané z krvného séra zvierat pred pretekom. Tieto hodnoty sú rozdielne medzi jednotlivými druhmi zvierat a môžu byť ovplyvňované rôznymi faktormi ako sú celkový zdravotný stav, tréningová záťaž,

pohlavnou aktivitou, podávanie rôznych vitamínových a minerálnych doplnkov a iné (Butler and Turner, 1988).

### **Materiál a metódy**

Z krvného séra poštových holubov bolo stanovených 7 biochemických ukazovateľov a to: aktivita enzýmov alanínaminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST), alkalickéj fosfatázy (ALP) a obsah glukózy (Glu), kyseliny močovej (UA), cholesterolu (Chol), celkových bielkovín (TP).

Vyšetrenia ALT, AST, ALP, UA, Glu a Chol boli robené na spektrofotometrickom analyzátore Reflotron IV. (Boehringer Mannheim, NSR).

TP boli stanovované spektrofotometricky Bio-La testami (Pliva- Lachema Brno) na UV-VIS spektrofotometri UV-1601 Shimadzu (Japonsko).

Pre stanovenie priemerných hodnôt sledovaných biochemických ukazovateľov v krvnom sére sa použilo 10 poštových holubov (5 holubov a 5 holubíc) línie Janssen, Meulemans, Klinghammer, Janssen x Aarden, Herbots z celkového chovu 100 holubov, ktoré pochádzali zo súkromného chovu (okr. Pov. Bystrica).

Pred pretekovými vzdialenosťami (približne 300 km a 500 km) podľa plánu Oblastného združenia v Považskej Bystrici (OZPB) boli odobraté vzorky krvi na biochemické vyšetrenia vytvorenej pretekárskej skupiny poštových holubov. Krv bola odoberaná z *vena tarso metatarsica*, dvakrát u každého holuba a to: prvýkrát šesť hodín pred košovaním a druhýkrát dve hodiny po prilete z preteku.

Namerané hodnoty sledovaných biochemických ukazovateľov boli vyhodnocované podľa jednotlivých odberov pred začiatkom a po skončení pretekových vzdialeností a taktiež boli stanovené ich priemerné referenčné hodnoty. Hodnoty biochemických ukazovateľov boli štatisticky vyhodnocované programom Microsoft Office.

### **Výsledky**

Z nameraných hodnôt sme zistili zvýšenie TP po 300 km preteku o 3,2% a po 500 km preteku bol o 10,6% vyšší oproti nameraným hodnotám pred každým pretekom.

Hodnoty UA po 300 km preteku v krvnom sére sa zvýšili o 42% a po 500 km preteku sa zvýšili až o 97% v porovnaní s hodnotami pred každým pretekom.

Obsah glukózy po 300 km preteku sa znížil o 28% a po 500 km preteku jej hodnoty klesli takmer o polovicu (47%) oproti hodnotám pred začiatkom preteku.

Obsah cholesterolu po obidvoch pretekoch sa znížil približne o 30% v porovnaní s nameranými hodnotami pred každým pretekom.

Výrazne zvýšenie sme zaznamenali v enzymatickej aktivite, kedy po 300 km preteku hodnoty ALP boli vyššie o 137%, hodnoty AST sa zvýšili o 133% a najvyššie zvýšenie bolo u ALT až o 148% oproti hodnotám pred začiatkom preteku.

Po 500 km preteku bolo najvýraznejšie zvýšenie o 155% v enzymatickej aktivite ALP a u AST sa zvýšila aktivita o 108%, taktiež sme zaznamenali zvýšenie o 68% u ALT v porovnaní s hodnotami pred pretekom.

Tabuľka 1: Vyhodnotenie biochemických ukazovateľov po 300 km a 500 km preteku a ich porovnanie s nameranými hodnotami pred každým pretekom.

Ukazovateľ	Jednotka	Pred 300 km	Po 300 km	Pred 500 km	Po 500 km	X <sup>0</sup>
TP	g.l <sup>-1</sup>	30,78	31,75	33,56	37,56	32,17
UA	μmol.l <sup>-1</sup>	467,2	664,6	357,6	704,3	412,4
Glu	mmol.l <sup>-1</sup>	22,54	16,62	19,34	10,25	20,94
Chol	mmol.l <sup>-1</sup>	9,54	6,77	9,72	6,81	9,63
ALP	μkat.l <sup>-1</sup>	14,33	33,97	9,16	23,34	11,75
AST	μkat.l <sup>-1</sup>	3,85	8,98	3,2	6,66	3,53
ALT	μkat.l <sup>-1</sup>	0,386	0,959	0,447	0,752	0,417

X<sup>0</sup> - priemerná hodnota sa vypočítala z priemerných nameraných biochemických hodnôt pred 300 km a 500 km pretekom u vybranej skupiny holubov

### Diskusia

Nami nameraná zvýšená enzymatická aktivita ALT, AST je dobrým indikátorom svalového zaťaženia počas preteku a spolu so zvýšenou ALP a sérovou koncentráciou intracelulárnych bielkovín nám udáva mieru svalového poškodenia po preteku ako aj dobu regenerácie celého jedinca.

Z našich pozorovaní vyplýva, že obsah cholesterolu v sére holubov klesal po každom preteku, ktorý mal za následok redukciiu koncentrácie cirkulujúcich voľných mastných kyselín v sére.

Taktiež sa preukázalo že so zvýšenou oxidáciou voľných mastných kyselín v sére korešponduje i pokles hladiny glukózy, ktorý priamoúmerne klesá so zvýšeným stupňom záťaže a predlžujúcou vzdialenosťou trate (Hawley, 2002).

### Záver

Dosiahnuté výsledky v našej práci poukazujú na dôležitosť jednotlivých biochemických parametrov, ktoré sú nevyhnuté pri komplexnej diagnostike zdravotného stavu poštových holubov, pri celkovej regenerácii organizmu a ich znovunzaradení do pretekového plánu jednotlivých oblastných združení.

### Literatúra

BUTLER, P. J., Turner, D.L.: Effect of training on maximal oxygen uptake and aerobic capacity of locomotory muscles in tuffed ducks, *Aythya fuligula*. *J. Physiol*, Vol. 401, 1988, p. 347 - 359.

HAWLEY, J. A.: Adaptations of skeletal muscle to prolonged, intense endurance training. *Clin. Exp. Pharmacol Physiol*, 2002, Vol. 29, p. 218 - 222.

ZIGO, F: Vplyv záťaže na vnútorné prostredie poštových holubov, Diplomová práca, 2009, Klinika vtákov, exotických a voľne žijúcich zvierat, Vyd. UVLF v Košiciach, s. 11-56.

**Kontaktná adresa:** František Zigo, MVDr., Ústav chovu zvierat, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika, zigo.f@azet.sk

## **Působení ionizujícího záření na *Artemia franciscana*** **Alterations of *Artemia franciscana* induced by ionizing irradiation**

**<sup>1</sup>Zd'árský Michal, <sup>1</sup>Dvořák Petr, <sup>2</sup>Beňová Katarína, <sup>2</sup>Renčko Andrej,  
<sup>2</sup>Špalek Milan**

*1 Department of Biochemistry, Chemistry and Biophysics, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1-3, 612 42 Brno,  
Czech Republic*

*2 Department of Biology and Genetics, University of Veterinary Medicine and Pharmacy in Kosice,  
Komenskeho 73, 041 81 Kosice, Slovak Republic*

### **Summary**

*Freshly hatched nauplii were exposed to gamma irradiation of 100, 250, 500, 1000 Gy (<sup>60</sup>Co, 2.7 kGy per h) and fixed with formaldehyde 72 or 96 hrs after the hatching. While development of the 2nd larval stage exposed to 100 Gy was not altered at all, the doses of 250, 500 or 1000 Gy induced the anomalous development (24, 48 hrs after the irradiation). Another effect of irradiation was the atypical formation of intestinal epithelium. While in the control group the ratio of the thickness of epithel to intestinal lumen was approximately 1:1.5-2, in the group irradiated by 100 Gy the intestinal epithelium was thinner with this ratio 1:4. In dose of 250 Gy the effect was variable reaching the ratio as low as 1:7. And in higher doses the ratio decreased to 1:7-1:10, or even the layer of epithelium was not observed at all (in 500 Gy sporadically, and in 1000 Gy regularly). The results are in correspondence with similar experiments on vertebrates. This finding may be explained by the high radiosensitivity of epithelial cells in general, caused by their high mitotic activity. From this point of view the Biotest of 2nd generation may substitute some toxicity tests on vertebrates.*

**Keywords:** *Artemia franciscana; ionizing irradiation; morphological alterations*

### **Úvod**

Různé druhy bezobratlých byly využívány ve výzkumu vlivu ionizujícího záření již v 50. letech (Grosch and Erdman, 1955). Důležitým rozdílem, který odlišuje pokus na zvířeti od jiných, například tkáňových kultur, je složitost živých soustav, jež nelze zjednodušit. Použijeme-li k výzkumu tkáň či buňky, jde o studium dílčích systémů, nikoli o zjednodušený organizmus. V dílčím systému nemohou plně fungovat veškeré reparační mechanismy, které má organismus k dispozici. Naproti tomu Evropská konvence o ochraně obratlovců používaných pro pokusné a jiné vědecké účely však požaduje omezit počet pokusů na zvířatech na minimum. The Three R's concept of Reduction, Refinement and Replacement defined according to the Council of Europe 1976 was adopted (Council of Europe 1976).

Výše uvedeným požadavkům vyhovují různá uspořádání subakutního biotestu na *Artemia franciscana* (nebo *A. salina*). Výhodou je líhnutí organismů z klidových stádií, tedy příprava homogenních jedinců v dostatečném množství. Výše uvedených faktů již bylo využito například při srovnání ozáření klidových stádií a účinků kosmického záření (Gaubin et al., 1986) nebo při sledování účinků gama záření <sup>60</sup>Co a rychlých neutronů (29 MeV) na klidová stadia *Artemia* a následnou mortalitu a změny po vylíhnutí (Ywasaki and Maruyama, 1971).

Těž v projektu Biostack byl na palubě Apolla 16 zkoumán vliv kosmického záření na klidová stadia u nichž vlivem kosmického záření byla snížena líhivost z 90 % na 10 %



a dále v jiných pracech účinky kosmického záření (Gaubin et al., 1990). Rovněž jsou známy dlouhodobé účinky kosmického záření na klidová stádia *Artemia* (Planel et al., 1994). Některé práce se dále zabývaly sterilitou a dále účinkům ionizujícího záření na biochemické pochody.

Naše předchozí práce byly zaměřeny zejména na sledování letality *Artemia franciscana* v závislosti na dávce ionizujícího záření. Bylo stanoveno LD<sub>50</sub> za 96 hodin po expozici na 600-700 Gy. Vzhledem k tomu, že *Artemia franciscana* prochází poměrně rychlými vývojovými stádii (instar), je možné sledovat morfologické změny organismu v poměrně krátkém časovém období v závislosti na obdržené dávce ionizujícího záření.

### **Materiál a metodika**

In our experiments we used salt water with the salinity of 47 g·L<sup>-1</sup> and pH 7,6 ± 0,1 (Sterba 1983; Dvořák et al. 2010). Složení [g·L<sup>-1</sup>] 23.9 NaCl; 10.83 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 2.25 CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.68 KCl; 9.06 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>·10 H<sub>2</sub>O; 0,20 NaHCO<sub>3</sub>; 0.04 SrCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 0.099 KBr; 0.027 H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>.

Líhnutí bylo prováděno při teplotě 26 °C po dobu 36 hodin. Naupliová stádia byla přenesena do 6 polyethylenových lahví o objemu jeden litr. V lahvi bylo 200 ml roztoku slané vody se 100 ± 3 jedinci. Pět lahví s organismy bylo vystaveno za 40 hodin od počátku líhnutí působení záření gama (<sup>60</sup>Co) o dávce 250; 500; 1000 a 2500 Gy (dávkový příkon 1,875 kGy·h<sup>-1</sup>). Šestá lahev sloužila jako soubor kontrolních jedinců.

Naupliová stádia ve stáří 24, 48 a 72 h od ozáření byla přenesena na podložní sklíčko Devitalizace a fixace jedinců byla provedena 36% formaldehydem. Po překrytí krycím sklíčkem byla odsáta přebytečná tekutina. Následné stanovení velikostí bylo provedeno pomocí zařízení Olympus focus micro.

### **Výsledky**

Naupliová stádia, která obdržela dávku 500; 1000 a 2500 Gy se i ve stáří 96 hodin podobají larvám prvního instaru. U kontrolní skupiny je tělo protáhlé, u skupiny ozářené dávkou 500 Gy je tělo výrazně kratší a rozšířené v torakální oblasti.

U larev druhého instaru kontrolní skupiny v průběhu vývoje pozorujeme segmentaci v thorakální části. Dále zakládání apendiklů, ze kterých se později formují phylopoda pro dýchání a příjem potravy.

U jedinců exponovaných dávkou 250 Gy je segmentace již méně znatelná. U jedinců exponovaných 500 Gy se segmentace vyvíjí mnohem pomaleji a je ještě méně znatelná. U jedinců, kteří obdrželi dávku 1 000 Gy je segmentace téměř neznatelná nebo úplně chybí. Jedinci, kteří obdrželi dávku 2 500 Gy se nevyvíjejí a segmentace zde vůbec neprobíhá. Naprostá většina jich hyne do 72 hodin po ozáření.

Další pozorovanou morfologickou odchylkou je změna utváření střevní výstelky. U kontrolní skupiny je neporušená střevní výstelka tvořena epiteliálními buňkami. Poměr výšky epitelu k lumenu střeva je přibližně 1:1,5-2. U jedinců, kteří obdrželi dávku 250 Gy je zřetelné oploštění střevního epitelu. Jeho poměr je variabilní až do poměru 1:7. U skupiny ozářené dávkou 500 Gy pozorujeme nejen oploštění v poměru 1:7-1:10, ale i lokální vymizení. U skupiny ozářené 1 000 Gy již není ve většině případů možné střevní epitel rozeznat. U jedinců ozářených dávkou 2500 Gy nedochází vůbec k vývinu střevního epitelu.

### Diskuse

Výsledky dávky 250 Gy lze považovat za pouze orientační, neboť vzhledem k vysokému dávkovému příkonu, bylo dodržení přesné dávky obtížné.

Výsledky působení ionizujícího záření na vývin střevní výstelky korýšů rodu *Artemia* jsou analogické jako poškození enterocytů u savců. Je obecně známo, že buňky střevního epitelu obratlovců patří vzhledem k vysoké mitotické aktivitě mezi buňky s velmi vysokou radiosenzitivitou.

### Závěr

Morfologické změny pozorujeme u jedinců, kteří obdrželi dávku 250 Gy a vyšší. Z tohoto pohledu by mohl biotest částečně nahradit konvenční testy na obratlovcích.

### Poděkování

Tato práce byla finančně podpořena projektem Interní Grantové Agentury VFU Brno IG 202112.

### Literatura

COUNCIL OF EUROPE. European convention for the protection of animals kept for farming purposes. *European Treaty Series Nr. 87, Strasbourg, European Council* 1976, 20:62-65

DVOŘÁK, P.; BEŇOVÁ, K.; ŽDÁRSKÝ, M.; SKLENÁŘ, Z.; HAVELKOVÁ, A. Use of the Crustacean *Artemia franciscana* for altrenatove Biotests. *Acta Vet Brno*. 2010, 79:47-53

GAUBIN, Y.; DELPOUX, M.; PIANEZZI, B.; GASSET, G.; HEILMANN, C.; PLANEL, H. Investigations of the effects of osmic-rays on *Artemia* cysts and tobacco seeds – results of exobloc – II experiment, flown aboard biocosmos 1887. *Nucl Track Radiat Meas*. 1990, 17, 2:133-143

GAUBIN, Y.; PIANEZZI, B.; GASSET, G.; PLANNEL, H.; KOVALEV, E.E. Stimulating effect of space-flight factors on *Artemia* cysts – comparison with irradiation by gamma-rays. *Aviat Space Environ Med*. 1986, 57, 6:583-590

GROSCHE, D.S.; ERDMAN, H.E. X-Ray effects on adult *Artemia*. *Biological Bulletin*. 1955, 108, 3:277-282

IWASAKI, T., MARUYAMA, T. Comparative effects of Co-60 gamma-rays and 29 MeV electrons on *Artemia*. *Int J Radiat Biol Rel Stud P*. 1971, 20, 5:493

PLANEL, H.; GAUBIN, Y.; PIANEZZI, B.; DELPOUX, M.; BAYONOVE, J.; BES, J.C.; HEILMANN, C.; GASSET, G. Influence of a long-duration exposure, 69-months, to the space-flight factors in *Artemia* cysts, tobacco and rice seeds. *Adv Space Res*. 1994, 14, 10:21-32

STERBA, G. Ansetzen des Seewassers und seine Kontrolle. In: *Aquarienkunde, Band 2, 9<sup>th</sup> ed. Urania-Verlag, Jena, Germany*. 1983, pp. 283-285

**Kontaktní adresa:** Michal Žďárský, Mgr., Ústav biochemie, chemie a biofyziky, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Michal.Zdarsky@email.cz

# **SEKCE 5**

*Veřejné veterinářství a ochrana zvířat*



## Útulky a karanténne stanice pre opustené a túlavé zvieratá na území Slovenskej republiky s ohľadom na súčasnú právnu úpravu Slovenskej republiky

### Shelters and quarantine stations for abandoned and stray animals in the Slovak Republic with respect to the current law of Slovak Republic

<sup>1</sup>Kovács Kamil, <sup>2</sup>Takáčová Jana, <sup>3</sup>Bartoš Boris, <sup>1</sup>Špalek Milan

<sup>1</sup>Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF - Košice

<sup>2</sup>Ústav súdneho a verejného veterinárskeho lekárstva a ekonomiky, UVLF – Košice

<sup>3</sup>Súkromný veterinársky lekár

#### Summary

According to the available resources in the Slovak Republic is currently 29 shelters for abandoned or stray animals and 17 quarantine stations. These facilities are operated by cities, civic organizations, or individuals. Each of these facilities is subject to the legislation of the Slovak Republic.

**Keywords:** shelter; stray; animals; legislation

#### Úvod

V rámci problematiky výskytu túlavých a nechcených spoločenských zvierat, je dôležité zriaďovanie karanténnych staníc a útulkov pre ne, čo je podľa platnej legislatívy SR možné na základe § 22, zákona č. 39/2007 o veterinárnej starostlivosti a z neho vyplývajúcej vyhlášky MP SR č. 123/2008. V oboch prípadoch ide o náhradnú starostlivosť o tieto zvieratá, ktorou sa rozumie držba nechceného, alebo odchyteného túlavého zvierat'a do času jeho smrti, alebo odovzdania vlastníčkovi.

#### Materiál a metódy

Na základe analýzy dostupných údajov z rôznych zdrojov, sme vypracovali aktuálny zoznam karanténnych staníc a útulkov pre opustené a túlavé zvieratá na území Slovenskej republiky, aby sme získali reálny pohľad o počte a stave tohto druhu zariadení na Slovensku.

#### Výsledky

Nami získané údaje ukazujú, že karanténne stanice (KS) a útulky pre opustené a túlavé zvieratá sa nachádzajú v týchto mestách a obciach:

##### Útulky pre opustené a túlavé zvieratá

1. Bratislava
2. Komárno
3. Lučenec
4. Nitra
5. Piešťany
6. Skalica
7. Matejovce nad Hornádom
8. Dubnica nad Váhom
9. Prešov
10. Banská Štiavnica

##### Karanténne stanice

1. Bardejov
2. Bojnice
3. Brezno
4. Bytča
5. Dolný Kubín
6. Galanta
7. Košice
8. Levoča
9. Liptovský Mikuláš
10. Malacky

11. Prievidza
12. Kežmarok
13. Košice
14. Nové Mesto nad Váhom
15. Nové Zámky
16. Partizánske
17. Pezinok
18. Považská Bystrica
19. Revúcke Podzámčie
20. Revúca
21. Ružomberok
22. Senica
23. Trnava
24. Turzovka
25. Zlaté Moravce
26. Handlová
27. Martin
28. Poprad
29. Žiar na Hronom

11. Myjava
12. Senec
13. Spišská Nová Ves
14. Topoľčany
15. Trebišov
16. Trenčín
17. Zvolen

### **Diskusia**

Je treba povedať, že do roku 1990 nebol vo vtedajšom Československu žiadny oficiálny útulok (Burda, 1997) a v Československu a neskôr v Českej a Slovenskej republike boli veľké počty útulkov založené až po roku 1989 (Dousek a Dousek, 2002). K dnešnému dňu je podľa dostupných údajov na našom území 17 karanténnych staníc, pričom podľa § 9, vyhlášky MP SR číslo 123/2008 je KS zariadenie, ktoré slúži na držbu odchytených túlavých zvierat s neznámym zdravotným stavom, najmenej do vykonania nutného ošetrenia a potrebných vyšetrení, testov a preventívnych opatrení potrebných na vylúčenie a predchádzanie choroby prenosnej na iné zviera alebo na človeka. Na území SR sa tiež nachádza 29 útulkov, pričom ako je známe, útulky v SR prevádzkujú mestá, súkromní veterinársky lekári či súkromné podnikateľské subjekty a samozrejme Sloboda zvierat a iné neziskové organizácie (Bugarský a kol. 2009). Podľa § 10 už spomínanej 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, pričom nechceným zvierateľom sa rozumie zviera, ktoré jeho vlastník nemôže, alebo nechce ďalej chovať a ktoré nepreviedol do vlastníctva inej osoby, alebo ho neumiestnil do náhradnej starostlivosti najmenej počas predchádzajúcich dvoch mesiacov. V rámci vyššie uvedeného zoznamu, prvých 10. útulkov prevádzkuje Sloboda zvierat Slovenskej republiky, útulok v Prievidzi spravuje súkromná spoločnosť na základe dohody z mestom, 4. z týchto útulkov prevádzkujú samotné mestá (Handlová, Martin, Poprad, Žiar nad Hronom), ostatné útulky prevádzkujú rôzne neziskové občianske združenia. Podľa našich ďalších zistení je zrejme, že v niektorých mestách a obciach Slovenska sa v súčasnosti budujú ďalšie útulky alebo karanténne stanice, alebo je budovanie týchto zariadení plánované, ale podľa nášho názoru je pokrytie územia SR zatiaľ nedostačujúce, pretože v niektorých, najmä väčších mestách Slovenska, sa nenachádza nielen žiadny útulok, ale ani len karanténna stanica, ktoré by tvorili takpovediac záchytné body pre túlavé a opustené zvieratá a to najmä z hľadiska

welfare týchto zvierat, ako aj zdravia ľudí kvôli možnému riziku prenosu nebezpečných nákaz.

### **Záver**

Ako ukazujú nami získané údaje, na území Slovenskej republiky sa v súčasnosti nachádza 29 útulkov pre opustené a túlavé zvieratá a tiež 17 karanténnych staníc, ktoré sú zriaďované na základe platnej právnej úpravy SR. Podľa nášho názoru ja to vzhľadom na stále sa zvyšujúci počet nechcených a túlavých zvierat nedostačujúci stav, najmä z pohľadu geografického rozmiestnenia týchto zariadení v rámci územia Slovenska.

### **Pod'akovanie**

Štúdia bola finančne podporená projektom KEGA 3/7296/09.

### **Literatúra**

BURDA, Z. : Výstavba a provozování útulků pro zvířata, Sborník přednášek IMPROF, České Budějovice, 1997, s.13-40.

DOUSEK, J, DOUSEK, J. Jr. : Pes v zrcadle předpisů. Praha, ORAC, vyd. 1., 2002, s. 10-38.

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.

Zákon č. 39 / 2007 o veterinárnej starostlivosti, v znení neskorších predpisov.

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

[www.slobodazvierat.sk](http://www.slobodazvierat.sk)

[www.psiadusa.sk](http://www.psiadusa.sk)

**Kontaktná adresa:** Kamil Kovács, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, UVLF Košice, Komenského 71, 041 81 Košice, SR, [kovacs@uvm.sk](mailto:kovacs@uvm.sk)





# **SEKCE 6**

*Veterinární toxikologie a toxikologie potravin*



## **Akutní toxicita vybraných léčiv pro akvarijní ryby *Danio rerio***

### **The acute toxicity of selected pharmaceuticals for aquarium fish *Danio rerio***

**Prášková Eva, Voslářová Eva, Mácová Stanislava, Plhalová Lucie,  
Pištěková Vladimíra, Svobodová Zdeňka**

*Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

#### **Summary**

*The aim of this study was to compare the acute toxicity of diclofenac and ketoprofen to embryonic and juvenile stages of *Danio rerio*. The tests were performed according to OECD 203 and OECD 212 methodology using semistatic method. The results revealed significantly higher sensitivity of embryonic stages to diclofenac ( $p < 0.05$ ) and ketoprofen ( $p < 0.01$ ) when compared to the juvenile fish *Danio rerio*.*

**Keywords:** NSAIDs; diclofenac; ketoprofen; OECD; fish

#### **Úvod**

Koncentrace léčiv ve vodách bývají sice řádově nízké, ale o jejich ekotoxikologickém vlivu není dosud mnoho informací. Diklofenak a ketoprofen patří do skupiny nesteroidních protizánětlivých léčiv (NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drugs), která vzhledem k jejich častému použití bývají v prostředí detekována nejvíce.

Diklofenak má protizánětlivé a protibolestivé účinky, uplatňuje se zejména v léčbě revmatických onemocnění. Místně působí příznivě zejména u zánětů (nikoliv mikrobiálních) měkkých tkání, šlach, vazů, svalů a kloubních pouzder, u poúrazových a pooperačních otoků a zánětů. Jeho výskyt byl potvrzený ve vodách Švédska, Německa (Bendz et al. 2005), Itálie, Řecka a Francie (Ferrari et al. 2003). Zjištěné koncentrace diklofenaku v povrchových vodách se pohybují řádově v  $\mu\text{g/l}$  (Ternes 2001, Hallare et al. 2004). Podle informací z monitoringu našich vod provedeném v roce 2009 byl diklofenak naměřen v koncentracích 7-18  $\text{ng/l}$  (Prášková a kol. 2010).

Ketoprofen působí stejně jako diklofenak proti bolesti a zánětu. Používá se zejména k léčbě artritidy a revmatismu. Je účinnou složkou preparátu orudis a fastumgel. Detekován byl ve vodách Švýcarska, Německa a Švédska v koncentracích řádově v  $\mu\text{g/l}$  (Ternes 1998, Trixier et al. 2003). V našich vodách byl při monitoringu v roce 2009 zjištěn pozitivní pouze 1 vzorek na ketoprofen, a to v koncentraci 53  $\text{ng/l}$  (Prášková a kol. 2010).

Léčiva se po použití dostávají do odpadních systémů, kde dochází k jejich částečnému zachytu v čistírnách odpadních vod (ČOV). Eliminace v případě diklofenaku se pohybuje podle použité metody od 0 do 90 %. U ketoprofenu je zachyt v některých případech větší, a to 8 až 100 % (Fent et al. 2006). Vlivem nedostatečné eliminace v ČOV, průsakem ze skládek a z odpadů farmaceutických společností, se léčiva dostávají do vodního prostředí, ale jejich další osud a působení na vodní organismy není znám. Z tohoto důvodu jsme pro naši studii vybraly k testům toxicity ryby druhu danio pruhované (*Danio rerio*), které patří mezi časté modelové organismy u akutních i embryonálních testů toxicity.

Cílem této práce bylo určit a porovnat akutní toxicitu diklofenaku a ketoprofenu pro juvenilní a embryonální stádium ryb *Danio rerio*.

### **Materiál a metodika**

Testy akutní toxicity proběhly podle metodiky OECD č. 203 (Fish, acute toxicity test). Provedeny byly na 2-3 měsíčních rybách danio pruhované (*Danio rerio*) semistaticky s výměnou roztoků po 48 hodinách. V případě diklofenaku byly roztoky měněny po 24 hodinách kvůli dodržení validity testu, a to koncentrace testované látky neklesající pod 80 %. Testovaná léčiva (výrobce Sigma-Aldrich) bylo nutno kvůli špatné rozpustnosti ve vodě rozpouštět pomocí ultrazvuku.

Použité testované koncentrace: diklofenak (DCF): 100, 130, 160, 190, 220 mg/l, ketoprofen (KET): 550, 600, 650, 700, 750 mg/l. Do každé koncentrace a kontroly bylo nasazeno po 10 kusech ryb. Pro účely statistického hodnocení byly testy opakovány. Základní fyzikální a chemické parametry ředící vody byly následující:  $\text{KNK}_{4,5}$  4,2 mmol/l;  $\text{CHSK}_{\text{Mn}}$  2,8 mg/l; BSK 0,72 mg/l; celkový amoniak pod mezí stanovitelnosti;  $\text{NO}_3^-$  23,48 mg/l;  $\text{NO}_2^-$  pod mezí stanovitelnosti;  $\text{Cl}^-$  18,11 mg/l;  $\Sigma \text{Ca} \pm \text{Mg}$  14 mg/l. Teplota testovací lázně se pohybovala na úrovni  $22 \pm 2$  °C. Koncentrace rozpuštěného kyslíku neklesla pod 60 %, pH bylo v rozmezí 6,3-8,3 (DCF), 6,1-8,3 (KET).

Testy toxicity na embryích *D. rerio* proběhly podle metodiky OECD č. 212 (Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages). Pro každý test byla použita serie 5 koncentrací testované látky. Použité testované koncentrace: DCF: 1, 5, 10, 15, 20 mg/l; KET: 1, 3, 6, 9, 12 mg/l. Do každé koncentrace a kontroly bylo nasazeno 20 oplozených embryí. Testy probíhaly do doby vykulení a absorpce žloutkového vajíčku u všech jedinců v kontrole, což bylo 96-144h po nasazení. Výměna roztoků probíhala semistaticky po 24 hodinách. Sledována byla mortalita, gastrulace, pohyb, pigmentace, srdeční činnost a průběh kulení. Teplota v inkubátoru se pohybovala v rozmezí  $25 \pm 0,5$  °C. Základní fyzikální a chemické parametry ředící vody byly stejné jako u akutních testů.

Během všech testů byl zaznamenáván počet uhynulých jedinců. Ze získaných hodnot (mortalita v jednotlivých koncentracích) se probitovou analýzou pomocí počítačového programu EKO-TOX 5.2 stanovila hodnota 96h LC50 pro test akutní toxicity na rybách a 144h LC50 pro test na embryích. Pro srovnání embryonálních a juvenilních hodnot LC50 byl použit neparametrický Mann-Whitney test a program Unistat 5.1.

### **Výsledky**

Stanovené hodnoty akutní toxicity obou testovaných látek jsou uvedeny v tabulce 1. Mezi hodnotami 96h LC50 a 144h LC50 diklofenaku byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ). Testy embryonální toxicity ukázaly delší dobu kulení embryí u všech koncentrací v porovnání s kontrolou. U testovaných embryí byl od koncentrace 10 mg/l a vyšších zaznamenán hydroedém.

U léčiva ketoprofen byl zjištěn mezi hodnotami 96h LC50 a 144h LC50 statisticky vysoce významný rozdíl ( $p < 0,01$ ). Také u tohoto léčiva byla doba kulení embryí v jednotlivých testovaných koncentracích delší ve srovnání s kontrolou.

Při statistickém porovnání akutní toxicity diklofenaku a ketoprofenu u juvenilních ryb byl zjištěn statisticky významný rozdíl ( $p < 0,05$ ), naopak u stejného srovnání v případě embryí statisticky významný rozdíl zjištěn nebyl ( $p > 0,05$ ).

Tabulka 1: Výsledky testů akutní toxicity vybraných léčiv pro *Danio rerio*

Testovaná látka	96h LC50 juvenilní ryby	144h LC50 embrya
<i>Diklofenak</i>	180,4 ± 1,3 mg/l	6,11 ± 2,48 mg/l
<i>Ketoprofen</i>	632,3 ± 10,1 mg/l	6,44 ± 2,22 mg/l

### Diskuze

Srovnání hodnot 96h LC50 diklofenaku a ketoprofenu pro juvenilní ryby *D. rerio* ukazuje, že akutní toxicita je výrazně vyšší u diklofenaku, a to i přesto, že tato léčiva patří do stejné skupiny, a je u nich popsán stejný mechanismus účinku (Vane and Botting 1998; Gierse et al. 1999). Hodnoty LC50 u embryí byly u obou léčiv srovnatelné, navíc v obou případech statisticky významně nižší, než u juvenilních ryb.

Testy akutní toxicity diklofenaku provedené na embryích danií ukázaly delší dobu kulení u všech testovaných koncentrací, což odpovídá výsledkům Hallare et al. (2004) a Van den Brandhof and Montforts (2010), kteří se také zabývali testováním tohoto léčiva s použitím různé metodiky.

Podobně jako u diklofenaku, také ketoprofen způsobil opožděné kulení embryí. Z výsledků lze tedy usuzovat, že citlivost embryí na obě léčiva oproti juvenilním rybám je vyšší. Rozdílná citlivost mezi embryonálním vývojovým stádiem ryb a dospělými jedinci stejného druhu může být způsobena nedostatečně vyvinutým enzymatickým systémem u embryí ryb, rozdílným způsobem příjmu toxické látky nebo rozdílným metabolismem (Van Leeuwen et al. 1985).

Diklofenak podávaný ve vysokých dávkách u savců prokazatelně způsobuje poškození buněk ledvin a jater (Revai and Harnos 1999; Schwaiger et al. 2004). Podobně u ketoprofenu podávaného ve vysokých dávkách může nastat zhoršení funkce ledvin, případně infarkt myokardu (Juric et al. 2010). U ryb působení diklofenaku a ketoprofenu ve vysokých dávkách zatím nebylo popsáno. Histologické vyšetření ryb, které byly vystaveny diklofenaku v námi sledovaných koncentracích ve vodním prostředí, žádné změny neprokázalo.

### Závěr

Letální koncentrace diklofenaku a ketoprofenu pro ryby *D. rerio* jsou ve srovnání s koncentracemi zjištěnými ve vodních tocích řádově vyšší, z čehož lze usuzovat, že akutní nebezpečí pro ryby je v současné době nízké. Nelze však vyloučit negativní účinky dlouhodobého působení, zejména na vývojová stadia ryb vzhledem k jejich mnohonásobně vyšší citlivosti.

### Poděkování

Práce byla finančně podpořena projekty IGA VFU 68/2010/FVHE a MSM6215712402.

### Literatura

U autorů.

**Kontaktní adresa:** Eva Prášková, Mgr., Ústav veřejného veterinárního lékařství a toxikologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, epraskova@vfu.cz

## Effects of subchronic exposure of atrazine and simazine on *Danio rerio* Účinky subchronického působení atrazinu a simazinu na *Danio rerio*

<sup>1</sup>Plhalová Lucie, <sup>1</sup>Haluzová Ivana, <sup>1</sup>Mácová Stanislava, <sup>1</sup>Doleželová Petra,  
<sup>1</sup>Prášková Eva, <sup>1</sup>Maršálek Petr, <sup>2</sup>Škorič Miša, <sup>1</sup>Svobodová Zdeňka, <sup>1</sup>Pišťeková  
Vladimíra, <sup>1</sup>Bedáňová Iveta

<sup>1</sup>Department of Veterinary Public Health and Toxicology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology,  
<sup>2</sup>Department of Pathological Morphology, Faculty of Veterinary Medicine,  
University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

### Summary

Atrazine and simazine are triazine herbicides which have been used for a long period in agriculture and in the aquatic environment for control of weeds and algae. The aim of this study was to investigate effects of subchronic exposure to atrazine and simazine on growth and development of histopathological changes in *Danio rerio*. Juvenile fish were exposed to environmental concentrations of atrazine and simazine detected in the Czech rivers (atrazine of  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ , simazine of  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and a range of sublethal concentrations of atrazine (3.0, 30.0 and  $90.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and simazine (0.6, 6.0 and  $60.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) for 28 days. The environmental concentrations of atrazine and simazine in the Czech rivers did not have any effects on growth and development of histopathological changes in *D. rerio*. The values of NOEC obtained were atrazine of  $30 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and simazine of  $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and the values of LOEC were atrazine of  $90 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and simazine of  $60.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

**Keywords:** zebrafish; growth test; histopathology; triazine herbicide

### Introduction

Atrazine and simazine belong to the triazine group of herbicides which are widely used for the pre- and post-emergence control of annual grasses and broad-leaved weeds. Atrazine and simazine are selective systemic herbicide which act as photosynthesis inhibitors (Roberts et al., 1998). The preparations containing atrazine and simazine have not been registered in the Czech Republic (atrazine since 2006, simazine since 2004), but these compounds are still detected in the environment. According to data of the Czech Hydrometeorological Institute in 2008, the highest concentrations in the surface water were  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  for atrazine and  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  for simazine. The aim of this study was to investigate effects of subchronic exposure of atrazine and simazine on growth and on development of histopathological changes in *Danio rerio*.

### Material and methods

Tests of subchronic exposure of juvenile fish (at the age of 20 days to simazine and at the age of 30 days to atrazine) were performed on *D. rerio* according to OECD No. 215 Fish, Juvenile Growth Test in series of two tests. We dissolved atrazine and simazine in water using dimethyl sulfoxide. The tests were carried out with 40 fish used for each concentration and for the control groups (one control group was held only in dilution water and one control group was held in dilution water with solvent – DMSO in quantities of 0.01%). After weighing the fish were placed in test aquariums and exposed to a range of sublethal concentration of atrazine ( $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  – environmental concentration in Czech rivers, 3.0, 30.0 and  $90.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) and simazine ( $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  – environmental concentration in Czech rivers, 0.6, 6.0 and  $60.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). The duration of

these flow-through tests (the solutions were renewed at 12-hour intervals) was 28 days. Fish were fed with dried *Artemia salina* without nutshells in amount of 8 % of their body weight per day, the food ration was based on initial fish weights and was recalculated after 14 days. At the end of the tests the fish were weighed and their tank-average specific growth rate was determined. Food was withheld from the fish 24 h prior to weighing. During the tests, the living conditions were checked at 24-hour intervals and the number of dead fish was recorded in each concentration. Parameters of the test solutions were the following: temperature  $23 \pm 2$  °C, oxygen saturation above 60 %, pH 7.98–8.33.

Obtained data were subjected to Kruskal-Wallis one-way ANOVA and subsequently to Dunnett's test in order to assess the statistical significance of differences in tank-average fish specific growth ( $r$ ) between test groups with different concentrations and that of the control group. The estimation of the LOEC and NOEC was based on ANOVA followed by Dunnett's test for the identification of the lowest concentration for which this difference of specific growth rate is (is not) significant at a 0.05 probability level and on results of histopathological examination.

### Results and discussion

The results of specific growth rate of the test groups with atrazine in comparison with the control group showed a significant decrease ( $p < 0.05$ ) in the atrazine concentration of  $90 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ . Histopathological examination revealed pathological lesions in pesticide-exposed fish only in the experimental group with the highest concentration of atrazine ( $90.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Morphological changes were observed in the liver and were represented by moderate dystrophic lesions of hepatocytes. On the basis of these results we determined NOEC (no observed effect concentration) and LOEC (lowest observed effect concentration) values.

For atrazine, the value of NOEC was  $30.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and the value of LOEC was  $90.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  for the exposure period of 28 days. Alvarez and Fuiman (2005) found reduced growth rate in red drum larvae (*Sciaenops ocellatus*) caused by atrazine of  $80.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  after only 9-day exposure.

The results of specific growth rate of the test groups with simazine in comparison with the control group did not show any significant differences ( $p > 0.05$ ). Histopathological examination revealed pathological lesions in pesticide-exposed fish in the experimental group in the simazine concentration of  $60 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (in the liver, kidney and gills). The value of NOEC was  $6.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and the value of LOEC was  $60.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  for the exposure period of 28 days. For *Sparus aurata* Arufe et al. (2004) reported simazine NOEC of  $2.25 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$  and LOEC of  $4.50 \text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ , according to results of larval survival and growth. However, these values were obtained for 72-hour exposure. Oropesa-Jimenez et al. (2005), Oropesa et al. (2009) and Velisek et al. (2009) described pathological changes in liver, kidney and gills in common carp exposed to low concentrations of simazine similar to those in our study. Velisek et al. (2009) observed more distinct changes in the histology of liver in the simazine concentration of  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and  $20 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  (steatosis, hyperaemia and necrosis); the most pronounced pathologies were found in the concentration of  $50 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ .

## Conclusion

The environmental concentrations of atrazine and simazine which have been detected in the Czech rivers (atrazine of  $0.3 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  and simazine of  $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$ ) had no effects on growth and development of histopathological changes in *D. rerio*.

## Acknowledgements

This research was supported by IGA 87/2010/FVHE and by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM Project No. 6215712402).

## References

- ALVAREZ, M.d.C., FUIMAN, L.A. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquatic Toxicology*. 2005, vol. 74, no. 3, p. 229–241.
- ARUFE, M.I., ARELLANO, J., MORENO, M.J., SARASQUETE, C. Comparative toxic effects of formulated simazine and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) larvae. *Chemosphere*. 2004, vol. 57, no. 11, p. 1725-1732.
- OROPESA, A.L., GARCIA-CAMBERO, J.P., GOMEZ, L., RONCERO, V., SOLER, F. Effect of long-term exposure to simazine on histopathology, hematological, and biochemical parameters in *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology*. 2009, vol. 24, no. 2, p. 187-199.
- OROPESA-JIMENEZ, A.L., GARCIA-CAMBERO, J.P., GOMEZ-GORDO, L., RONCERO-CORDERO, V., SOLER-RODRIGUEZ, F. Gill modifications in the freshwater fish *Cyprinus carpio* after subchronic exposure to simazine. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 2005, vol. 74, no. 4, p. 785-792.
- 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, p. 647-650.
- VELISEK, J., STASTNA, K., SUDOVA, E., TUREK, J., SVOBODOVA, Z. Effect of subchronic simazine exposure on some biometric, biochemical, hematological and histopathological parameters of common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Neuroendocrinology Letters*. 2009, vol. 30, suppl. 1, p. 236–241.

**Contact address:** Lucie Plhalová, Mgr., Department of Veterinary Public Health and Toxicology, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, lplhalova@vfu.cz



## Kombinované účinky gama žiarenia a kadmia u *Poecilia reticulata*

### Interactions between ionising radiation and cadmium in *Poecilia reticulata*

<sup>1</sup>Renčko Andrej, <sup>2</sup>Žďárský Michal, <sup>1</sup>Špalek Milan

*1 Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

*2 Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*The aim of this work was to establish mutual effect of ionising radiation and various concentrations cadmium chloride (CdCl<sub>2</sub>) on the organism of the fish *Poecilia reticulata*. In the first experiment, fish exposed to effects of cadmium chloride in concentrations of 20 mg/l. In the second experiment fish were irradiated with a 20 Gy of gamma-rays. Cadmium chloride in concentrations 20 mg.l<sup>-1</sup> was added to water in aquarium. We observed the letality, food intake, all round lifetime and clinical symptoms, and compared with control group during 30 days.*

**Keywords:** *cadmium; ionising radiations; *Poecilia reticulata**

#### Úvod

Aj napriek tomu, že pri dodržiavaní všetkých bezpečnostných opatrení predstavujú jadrové elektrárne ideálny zdroj energie s minimálnym vplyvom na životné prostredie, vždy existuje reálne riziko úniku radiácie do vonkajšieho prostredia. Nasvedčujú tomu aj najnovšie udalosti v jadrovej elektrárni Fukušima v Japonsku. Je preto nevyhnutné skúmať a analyzovať informácie týkajúce sa ochrany živých organizmov pred ožiarení. Kontaminácia životného prostredia ťažkými kovmi je závažným ekologickým problémom. Tieto sa vo zvýšenej miere dostávajú aj do vodných tokov a následne i do biologických cyklov živých organizmov (Holéczyová a Hudák, 2008). Informácií o vplyvu žiarenia na organizmus je zhrnutých pomerne dosť (Beňová a kol. 2003, Falis a kol. 2004), avšak doposiaľ nie sú podrobnejšie poznatky o interakciách žiarenia a vplyvov niektorých kovov kolujúcich v prostredí. Keďže organizmus je v prostredí vystavený viacerým polutantom súčasne, nie oddelene, je potrebné skúmať spolupôsobenie týchto javov na zdravie zvierat a človeka.

Cieľ práce je sledovanie kombinovaného účinku dvoch potenciálne škodlivých faktorov na zdravie rýb, priebeh, klinické príznaky a vyústenie ožiarenia a otravy. Skúmanie podobných interakcií nám pomáha lepšie pochopiť dopad znečistenia na životné prostredie, jednotlivé vzťahy medzi živou a neživou prírodou, a v konečnom dôsledku prispieť k ochrane zdravia ľudí.

#### Materiál a metódy

Pokus bol prevedený v dvoch krokoch, pričom boli ryby rozdelené podľa pohlavia a dve akvária z toho slúžili ako negatívna kontrola. Celkovo bolo v pokuse použitých 60 jedincov (30 samíc a 30 samcov). V prvom kroku boli ryby vystavené účinkom samotného kadmia v koncentrácií 20 mg/l. V druhej časti som sledoval ryby ožiarené jednorázovou dávkou 20 Gy gama lúčmi (<sup>60</sup>Co- zdroj Chisostat pri príkone 11,36 Gy/min) a následne vystavené kadmium (CdCl<sub>2</sub>) o koncentrácií 20 mg/l.

Ožarovanie rýb prebiehalo v Petriho miskách v akváriovej vode. Zdanlivo boli ožiarené aj kontrolné ryby. To znamená, že prešli celou procedúrou ako pokusné ryby, okrem samotného ožiarenia.

V oboch prípadoch som sledoval vznikajúce klinické príznaky a letalitu. Na 20. deň bola vykonaná patologicko - anatomická pitva pod mikroskopom. Ryby boli fixované v chrbtovej polohe na Petriho miske vyplnenej parafínom, pomocou entomologických špendlíkov. Vždy sa súčasne s exponovanými rybami pitvala aj jedna kontrolná ryba.

### **Výsledky a diskusia**

Nástup klinických príznakov v skupine vystavenej kadmiu bol pozvoľný a v priebehu celého pozorovacieho obdobia sa len mierne stupňoval. Na rozdiel od rýb vystavených kombinovanému účinku, kde klinické príznaky boli zreteľné prakticky už od prvého dňa pokusu. Pozoroval som sťaženie dýchania a stiahnutie plutiev. Adspekčne bolo zreteľné výrazné nastrieknutie ciev žiabí až krvácaniny (Beňová a kol. 2006). Toto zistenie koreluje s klinickým príznakom sťaženého dýchania a zdržiavania sa rýb v okolí vzduchovača a hladiny, kde je najvyššia koncentrácia kyslíka. Takýmto spôsobom pravdepodobne ryby kompenzovali nedostatočnú saturáciu kyslíkom. Na povrchu tela a plutvách boli viac alebo menej výrazné zmeny v podobe nálepor bielych vlákien, pravdepodobne zmožený kožný sliz. Tvorba vláknitých útvarov v okolí plutiev môže súvisieť s poruchou tvorby kožného slizu, alebo so zvýšenou iritáciou povrchu tela a následnou nadprodukciou slizu. Znížený príjem potravy mal za následok postupné chudnutie a stratu kondície. Nechutenstvo je súčasťou gastrointestinálneho syndrómu, pri ktorom okrem iného dochádza k odumretiu enterocytov, prerušeniu obnovy črevnej sliznice a následnej strate funkcie GITu akými sú motilita, schopnosť resorpcie, schopnosť tvorby enzýmov a nepriepustnosť pre črevné baktérie (Beňová a kol. 2002 a 2007). Všetky ryby vystavené kombinovanému účinku gama žiarenia a chloridu kademnatého (20 mg/l) postupne uhynuli do 20. dní.

### **Záver**

Skúmanie podobných interakcií nám pomôže lepšie pochopiť vzájomné vzťahy medzi jednotlivými zložkami životného prostredia, ich skutočný dopad na ekosystém a živý organizmus a môže tým prispieť k ochrane zdravia ľudí.

### **PodĎakovanie**

Práca bola podporená projektom IGA 202 112.

### **Literatúra**

BEŇOVÁ K., CIGÁNKOVÁ V., FALIS M., ŠMAJDA B.: Histological changes and clinical symptoms in *Poecilia reticulata* after irradiation with gamma-rays. Acta Vet Brno 2006, 75: 557-560

BEŇOVÁ, K., FALIS, M., TOROPILA, M., SEHNALKOVÁ H., PASTVOVÁ L.: Influence of a single gamma irradiation on rat microflora. Folia Microbiol. 47, 4, 461-462, 2002.

BEŇOVÁ K., STRIŠKOVÁ K., DVOŘÁK P.: Postirradiational changes in hematologic parameters and in intestinal microflora in rats. Acta Facultatis Ecologiae, 16: Suppl. 1,33-36, 2007

BEŇOVÁ K., TOROPILA M., FALIS M., DVOŘÁK P.: Influence of ionising radiation on the activity of selected adaptive enzymes in chickens and rats. ACTA VET. Brno, 2003, 72: 201-205.

FALIS M., BEŇOVÁ K., TOROPILA M., SESZTÁKOVÁ E., LEGÁTH J.: Changes in the activity of selected adaptive enzymes in chicken liver after single gamma irradiation. Bull. Vet. Inst. Pulawy 48, 503-506, 2004.

HOLÉCZYOVÁ, G., HUDÁK, A.: Výskyt kadmia, ortuti a olova vo vodnom prostredí a v rybách, Slovenský veterinársky časopis, č 5, 2008 str. 320-321,ISBN 1335-0099

**Kontaktná adresa:** Andrej Renčko, MVDr., Katedra biológie a genetiky, UVLF, Komenského 73, 041 81 Košice, rencko@uvlf.sk

## Do cyanotoxins and lead influence avian reproduction?

### Ovlivňují cyanotoxiny a olovo reprodukci ptáků?

<sup>1</sup>Damkova Veronika, <sup>1</sup>Sedlackova Jana, <sup>1</sup>Bandouchova Hana, <sup>1</sup>Peckova Lucie,  
<sup>1</sup>Vitula Frantisek, <sup>2</sup>Hilscherova Klara, <sup>2</sup>Paskova Veronika, <sup>1</sup>Kral Jiri,  
<sup>1</sup>Osickova Jitka, <sup>1</sup>Ondracek Karel, <sup>3</sup>Pohanka Miroslav, <sup>1</sup>Pikula Jiri

<sup>1</sup> Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Research Centre for Toxic Compounds in the Environment (RECETOX), Faculty of Science, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup> Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

#### Summary

Previous studies demonstrated the toxic effects of cyanobacteria in Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) in various experimental set-ups including acute, sub-chronic and reproduction toxicity, co-exposures with toxic metals and the Newcastle vaccination. This study aimed to assess the testicular toxicity of a complex cyanobacterial biomass administered to Japanese quails in the feed for eight weeks (daily dose of 61.62 µg microcystins pro toto including 26.54 µg MC-RR, 7.62 µg MC-YR and 27.39 µg MC-LR). There was no mortality in the controls or the biomass-exposed birds. However, males exposed to cyanobacteria in the feed showed moderate to marked atrophy of the seminiferous tubular epithelium with only sparse numbers of the developmental stages of spermatozoa and Sertoli cells. Biomass-exposed birds had elevated katalase activities but decreased glutathione peroxidase activities and surprisingly lower levels of lipid peroxides in the testes. The other biochemical parameters studied (i.e., glutathione level and glutathione reductase, glutathione-S-transferase and superoxide dismutase activities) showed no differences. The cell defensive system protecting testicular tissue from the damage associated with toxic effects of the complex cyanobacterial biomass seemed to be insufficient and partly depleted after the chronic exposure of male birds to this biomass.

**Keywords:** birds; microcystins; sub-lethal exposure; histopathology; testicular atrophy; oxidative stress

#### Background

Birds, like other groups of animals and humans, may be subject to mortality or adverse biological effects due to the action of both natural toxins and man-made pesticides and industrial chemicals. One important form of pollution is nutrient pollution, especially with phosphorus but also with nitrogen, that leads to the trophication of aquatic ecosystems and consequently to the accelerated growth of algae and cyanobacteria as well as higher forms of plant life capable of upsetting the balance of organisms present in the water and impairing the quality of the water concerned. Cyanobacterial proliferations, also known as blooms, can have major impacts on ecosystem functioning and on the health of animals and humans (Briand et al. 2003). The most serious consequences of bloom formation are poisonings by secondary metabolites of cyanobacteria – cyanotoxins (Carmichael 1992). Cyanobacterial products have also been recognized to play a role in avian wildlife mortality (Alonso-Andicoberry et al. 2002, Chittick et al. 2002, Henriksen et al. 1997, Krienitz et al. 2002 and Matsunaga et al. 1999). Our previous studies demonstrated toxic effects of cyanobacteria in birds

(Japanese quails) in various experimental set-up including acute, sub-chronic and reproduction toxicity, co-exposures with toxic metals and vaccination.

### Materials and methods

Effects of cyanobacterial biomass were evaluated using adult Japanese quails (*Coturnixcoturnix japonica*) and the OECD method 206. Birds were randomly divided into reproductive pairs and placed into breeding cages at the age of two months. A total of 16 control and 16 experimental pairs (with 32 males and 32 females) were formed. Following a 14-day period of accommodation, the experiment lasting 8 weeks was started. Experimental animals were once a day supplied with a complete feeding mixture supplemented with the cyanobacterial biomass containing microcystins in such a concentration that is environmentally relevant under natural conditions (cf. Table 1.). Control animals were fed the same mixture but without cyanobacteria. Eggs were collected once daily, marked, weighed, and kept under standard conditions until set into the hatching device once a week. After 8 weeks of exposure, blood was collected from all experimental and control birds for haematology and biochemistry. Then, birds were killed by decapitation in order to collect tissue samples (liver, brain, kidney, spleen, testes, pectoral muscles, gall bladder and bile) for histopathology, electron microscopy, oxidative stress parameters and analysis of microcystin concentration. Hatched chicks were examined so as to determine body weight immediately after hatching and after 14 days.

Table 1

Exposure group	Cyanobacterial biomass		Microcystin structural variants ( $\mu\text{g}$ )				
	Cells	Mg of dry weight	MC-RR	MC-unidentif.	MC-YR	MC-LR	Sum of MCs
E4	3 x 10 <sup>9</sup>	123,348	17,496	6,915	4,158	17,475	46,044

### Results

There was no mortality in both controls and biomass-exposed birds. Control birds were without pathological findings in the testicular tissue, there was marked atrophy in the testes of cyanobacterial-biomass-exposed males. These results were also supported by findings of biochemical examination aimed at antioxidants and oxidative stress in the testes.

Biomass-exposed birds had elevated activities of catalase (cf. Figure 1.)but decreased activities of glutathione peroxidase(cf. Figure 2.)and surprisingly lower levels of lipid peroxides (cf. Figure 3.)in testes. Other studied biochemical parameters (i.e. glutathione level and activities of glutathione reductase, glutathione-S-transferase and superoxide dismutase) were not affected by cyanobacteria. Surprisingly, reproductive parameters such as egg viability, hatchability, and the effect of hatching in cyanobacterial-biomass-exposed birds were better than in the control group. This can be explained by the fact that female birds store sperm for days or even weeks in sperm storage tubules. Fertilization of eggs by sperm from experimental males showing testicular atrophy thus had to be due to this sperm storage from early mating. However, further research into this issue is necessary.

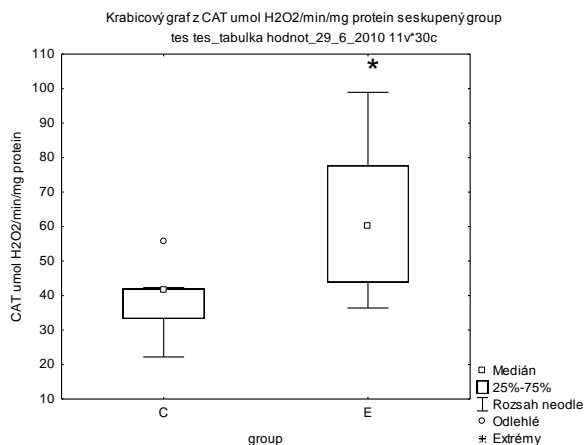


Figure 1

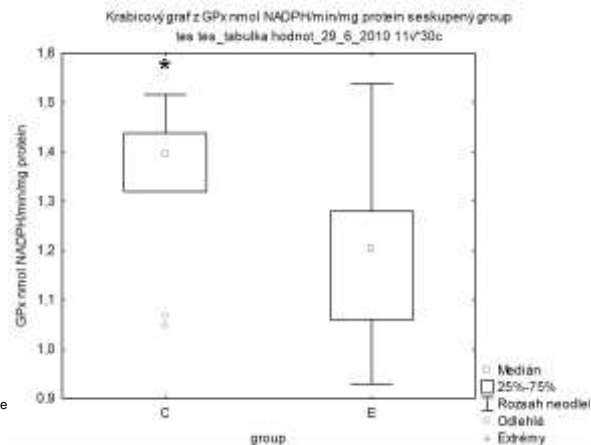


Figure 2

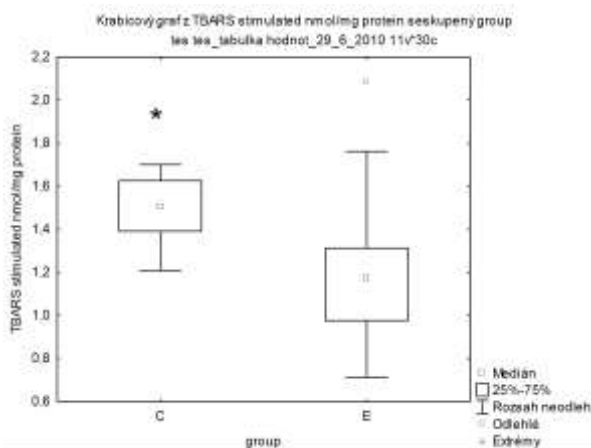


Figure 3

### Acknowledgement

The present study was supported by the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Grant No. 79/2010FVHE.

### References

From the author.

**Contact address:** Veronika Damková, Mgr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic, H08005@vfu.cz

## Vplyv nízkych dávok ionizujúceho žiarenia a lipkavca na sacharidový a lipidový metabolizmus u kura domáceho

### Effect of low doses of ionising radiation and catchweed on the metabolism of sacharids and lipids at chicken

Špalek Milan, Štofániková Jana, Renčko Andrej, Kovács Kamil

*Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach*

#### Summary

*Observing of influence of ionising radiation and of influence of toxic substances of coumarinuous type on the laboratory animals helps us to develop methods of protection against its negative impacts and either to investigate interactions various pollutants. In this document we observe the effect of low doses of ionising radiation and of low concentration of coumarine glycoside contained in catchweed on the chicken. Chickens was distributed into four groups – one controller and three experimental groups (irradiated, irradiated and fed with catchweed and fed with catchweed). We observed changes of serum level of glucose and cholesterol in the time interval 1, 10 and 21 days after unique all-body irradiation by dose of 3 Gy gamma rays and after feeding with catchweed. Level of serum glucose was significantly decreased in 10<sup>th</sup> day after irradiation in group of irradiated chickens in compare with other groups. Level of serum cholesterol was significantly decreased in 10<sup>th</sup> day in all experimental groups in compare with controller group.*

**Keywords:** *ionising radiation; catchweed; chicken; cholesterol; glucose*

#### Úvod

Ionizujúce žiarenie, napriek tomu, že je nepostrehnuteľné zmyslami, je aj v relatívne nízkych dávkach škodlivé. Nízke dávky ionizujúceho a nepriamo ionizujúceho žiarenia emitujú bežné veci v živote človeka, ako napr. televízna obrazovka alebo mobilný telefón. Mimoriadne aktuálnou je otázka vplyvu nízkych dávok ionizujúceho žiarenia z dôvodu havárie jadrového reaktora Fukušima v Japonsku v dôsledku zemetrasenia zo dňa 11. marca 2011. Sacharidy sú konštantnou súčasťou všetkých organizmov. V bunkách majú rozličné funkcie. Využívajú sa ako zdroj energie (glukóza), zásobná energetická surovina (škrob, glykogén), vystužujú a chránia bunku pred vonkajšími vplyvmi (celulóza, chytín), ale môžu byť aj zložkami rôznych biologických látok (koenzýmy, rozpoznávacie glykoproteíny, hormóny, antibiotiká) (Škárka a Ferencík, 1987).

Cholesterol je typický živočíšny sterol, ktorý sa vyskytuje vo všetkých bunkách a v telových tekutinách. Miera endogénnej syntézy cholesterolu v pečeni závisí od množstva prijatého potravou. So stúpajúcou resorpciou cholesterolu sa znižuje jeho syntéza v pečeni. Cholesterol transportovaný žľou sa z väčšej časti spätne resorbuje v tenkom čreve (Falis a kol., 2003).

Lipkavec obyčajný, ktorý patrí do čeľade Morenovité, je jedným z najhojnejších druhov našej flóry, rastie predovšetkým na pôdach bohatých na dusík a vyskytuje sa ako poľná burina v obilninách a na ľane. Veľmi závažný je fakt, že v poslednom období sa zvýšil jeho výskyt v poľnohospodárskych kultúrach (Čermáková, 1988). Rastliny a semená obsahujú niektoré triesloviny, saponíny, asperulozidy, kyselinu chitínovú, glykozidy a látky kumarínového typu. Kumarín je v čerstvej rastline glykozidicky viazaný

a uvoľňuje sa sušením. Voči herbicídom je značne odolný. Klíčivosť býva zachovaná i po prechode tráviacim traktom zvierat (Lhotská a kol., 1987).

### **Materiál a metodika**

V experimente bolo použitých 72 kurčiat brojlerového typu vo veku 28 dní na začiatku experimentu. Zvieratá boli chované v experimentálnych priestoroch po predchádzajúcej dezinfekcii priestorov (Kočišová, 2005) od 1. dňa veku. Kurčatá boli rozdelené do štyroch skupín – jedna kontrolná a tri experimentálne (ožiarené kurčatá, ožiarené kurčatá s lipkavcom a s lipkavcom v krmnej zmesi) a do každej skupiny bolo zaradených 6 kusov kurčiat. Voda a krmivo im boli podávané ad libitum. Bola im skrmovaná krmná zmes pre kurčatá BR II. Lipkavec sa aplikoval v krmive v koncentrácii 1%, pričom takto upravená zmes sa podávala ad libitum. Ožarovanie sa vykonávalo na PF UPJŠ v Košiciach, kde boli kurčatá z dvoch pokusných skupín ožiarené celotelovou dávkou gama žiarenia 3 Gy, pri príkone  $0,0123 \text{ Gy} \cdot \text{min}^{-1}$  ( $^{60}\text{Co}$ , Chisostat, Chirana). Analýzy séra sa vykonali 1., 10. a 21. deň po ožiarení z krvi odobranej z *vena ulnaris cutanea*. Experiment prebiehal v letnom období. Štatistické vyhodnotenie bolo robené jednocestnou Anovou v programe Graph Pad Prism 3.

### **Výsledky a diskusia**

Koncentrácia sérovej glukózy bola na 1. deň zvýšená u skupiny ožiarených kurčiat oproti kontrolnej skupine. Podobne ako u iných modelových laboratórnych zvierat – potkanov a myši, aj v našom experimente zvýšenie koncentrácie glukózy ukazuje na celkovú postradiačnú hyperglykémiu, ktorá súvisí so zvýšenou glukoneogenezou z aminokyselín, ktoré sú uvoľňované z tkanivových proteínov po ožiarení (Kendyš, 1970, Moroz a Kendyš, 1975). Okrem toho v počiatočnom štádiu sa môže prejaviť znížený účinok inzulínu a zvýšený účinok kontraintzulínových látok, napr. glukagónu (Kilberg a Neuhouse, 1976). Dôležitým faktorom v rozvoji metabolických zmien po ožiarení je vplyv ionizujúceho žiarenia na vstrebávanie glukózy v tenkom čreve (Beňová a kol., 2007 a 2009, Toropila, 1993). Na 10. a na 21. deň bola sérová glukóza znížená u ožiarených kurčiat oproti kontrole a aj oproti zvyšným pokusným skupinám. U skupiny kurčiat vystavenej účinkom lipkavca bola koncentrácia glukózy oproti kontrolnej skupine zvýšená na 1., 10. aj 21. deň. Naproti tomu, u skupiny kombinovaných účinkov ionizujúceho žiarenia a lipkavca bola koncentrácia glukózy len málo odlišná od kontrolnej skupiny. Zatiaľ, čo po ožiarení došlo na 10. a 21. deň k zníženiu a po účinkoch lipkavca k zvýšeniu glukózy, pri kombinovaných účinkoch sa vplyv týchto faktorov minimalizoval.

Koncentrácia cholesterolu bola znížená u ožiarených kurčiat na 1. a 10. deň oproti kontrolnej skupine. Na 21. deň došlo k zvýšeniu cholesterolu oproti kontrole. Obdobné výsledky zaznamenali v experimente Falis a kol. (2001 a 2003), kedy pri dávke 4,5 Gy došlo k zvýšeniu koncentrácie sérového cholesterolu u ožiarených kurčiat, zatiaľ, čo pri dávke 5 Gy zaznamenali Beňová a kol. (2001) štatisticky významne zvýšenie cholesterolu už 6, 24 a 48 hodín po ožiarení. Vplyvom ionizujúceho žiarenia môže dôjsť k vystupňovaniu lipolýzy a lipomobilizácie, ktoré vedú k zvýšenej ponuke neesterifikovaných mastných kyselín rôznym tkanivám. V pečeni sa zvyšuje koncentrácia a tvorba celkového cholesterolu a triacylglycerolov (Toropila, 1993). U všetkých pokusných skupín bola koncentrácia cholesterolu znížená oproti kontrolnej skupine.



**Záver**

Záverom možno uviesť, že výsledky nami dosiahnuté u hydiny po ožiarení sú v mnohých prípadoch porovnateľné s výsledkami iných autorov získaných u cicavcov. Určité odlišnosti v našich experimentoch pripisujeme nielen odlišnosti druhu, ale aj rozdielnosti fyziologicko-anatomickej stavby tráviacej sústavy. Z výsledkov nášho experimentu vyplýva, že vplyv ionizujúceho žiarenia v kombinácii s účinkami lipkavca na koncentráciu glukózy v krvi u kurčiat je málo odlišný od kontroly, na rozdiel od samostatných účinkov lipkavca, resp. samotného ožiarenia.

**PodĎakovanie**

Táto práca bola financovaná z projektu VEGA 1/0590/09.

**Literatúra**

- BEŇOVÁ, K., DVOŘÁK, P., HALÁN, M., KALENIČOVÁ, Z., SEHNÁLKOVÁ, H., CIGÁNKOVÁ, V., 2009: Effects of Gamma-Irradiation on Microbial Contamination and on Histological Changes of Muscle in *Poecilia reticulata*, Acta Vet. Brno, 78, 173 – 177.
- BEŇOVÁ, K., DVOŘÁK, P., FALIS, M., SKLENÁŘ, Z., 2007: Interaction of low doses of ionising radiation, potassium dichromate and cadmium chloride in *Artemia franciscana* biotest, Acta Vet. Brno, 76, 35 – 40.
- BEŇOVÁ, K., FALIS, M., TOROPILA, M., SEZSTÁKOVÁ, E., ONDRAŠOVIČ, M., 2001: Zmeny niektorých metabolických ukazovateľov po stresovom účinku ionizujúceho žiarenia u brojlerových kurčiat, Zborník prednášok z medzinárodnej vedeckej konferencie z príležitosti 50 rokov založenia I. internej kliniky UVL v Košiciach, ISBN 80-88985-42-0, 119 – 121.
- ČERMÁKOVÁ, J., 1988: Plevely svízelu v krmných smesích pro drůbež, Veterinářství, 38, 8, 361 – 362.
- FALIS, M., BEŇOVÁ, K., SEZSTÁKOVÁ, E., MICHĽAKOVÁ, Z., HROMADA, R., SZILÁRDIOVÁ, B., 2003: Sledovanie vplyvu ionizujúceho žiarenia na lipidový metabolizmus kurčiat v závislosti od veku, V. Konferencie mladých vedeckých pracovníkov s mezinárodní účastí, VFU Brno, ISBN 7305-461-2, 123 – 124.
- FALIS, M., TOROPILA, M., BEŇOVÁ, K., BULECA, J., ONDRAŠOVIČ, M., ŠEBÁK, P., SOSŇÁKOVÁ, L., 2001: Účinok ionizujúceho žiarenia na lipidový metabolizmus brojlerových kurčiat, Ochrana zvířat a welfare, VFU Brno, ISBN 80-7305-417-5, 54 – 56.
- KENDYŠ, I., N., 1970: O přírode postiradiacionnoj giperглиkemii, Radiobiologia, 10, 552 – 555.
- KILBERG, M., S., NEUHOUSE, O., W., 1976: The role of stimulated acid transport in promoting glycogenesis in the irradiated rat, Radiat. Res., 66, 597 – 608.
- KOČIŠOVÁ, A.: Dezinfekcia prostredia – súčasť preventívnych opatrení pri infekčných chorobách a parazitózach v chovoch zvierat, Dezinfekce, Dezinfekce, Deratizace, 4, ročník XIV, 2005, 149 – 153.
- LHOTSKÁ, M., KRIPPELOVÁ, T., CIGÁNOVÁ, K., 1987: Lipkavec obyčajný, Ako sa rozmnožujú rastliny, Bratislava, s. 224.
- MOROZ, V., V., KENDYŠ, I., N., 1975: Radiobiologičeskij afekt i endokrynnyje faktory, Atomizdat Moskva, s. 228.
- ŠKÁRKA, B., FERENČÍK, M., 1987: Biochémiá, Alfa – vydavateľstvo technickej a ekonomickej literatúry, Bratislava, s. 744.
- TOROPILA, M., 1993: Praktické cvičenia z rádiobiológie, Magnus Košcie, ISBN 80-85569-18-3, s. 75.

**Kontaktná adresa:** Milan Špalek, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmacie, Komenského 73, 041 81 Košice, spalek@uvm.sk



# SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat  
zoologických zahrad*



## Geomykóza netopierov v opustených baniach v okolí Dubníka (Východné Slovensko)

### Geomycosis in bats in abandoned mines near Dubník (eastern Slovakia)

<sup>1</sup>Korytár Ľuboš, <sup>1</sup>Ondrejka Róbert, <sup>1</sup>Ondrejková Anna, <sup>1</sup>Beníšek Zdenek,  
<sup>1</sup>Prokeš Marián, <sup>1</sup>Slepecká Eva, <sup>2</sup>Pjenčák Peter

*1 Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, Univerzita veterinárskeho lekárstva  
a farmácie v Košiciach, Košice, Slovenská republika*

*2 Vlastivedné múzeum v Hanušovciach nad Topľou, Hanušovce n. Topľou, Slovenská republika*

#### Summary

*This paper describes the occurrence of geomycosis in wintering bats in abandoned mines near the top Dubník in eastern Slovakia. Winter bat censuses in 2010 and 2011 showed that geomycosis hibernujúcich is at present in three bat species and year on year shows a slight decrease in incidence.*

**Keywords:** *Geomyces destructans; bats; Dubník*

#### Úvod

Pleseň *Geomyces destructans* je spájaná so syndrómom bieleho nosa (White nose syndrome - WNS), ktorý podľa dostupných štatistík spôsobil úhyn už vyše jedného milióna jedincov insektivorných netopierov na severovýchode USA. Syndróm bieleho nosa sa klinicky manifestuje ako kožné mykotické ochorenie postihujúce hibernujúce netopiere. Ochorenie bolo prvýkrát zdokumentované počas zimy na prelome rokov 2006 a 2007 v jaskyni Howes Cave, 52 kilometrov západne od mesta Albany v USA (Gargas a kol., 2009). Z tiel napadnutých netopierov bol izolovaný a identifikovaný nový druh oportúnnej psychrofilnej huby: *G. destructans*. Huba vykazuje optimálny rast v teplotnom rozmedzí 3°C - 14°C (Gargas a kol., 2009). Rod *Geomyces* zahŕňa kozmopolitne rozšírené druhy terestriálnych saprofytických húb, ktoré sa špecializujú na oblasti s chladnou klímou (Blehert a kol., 2009).

Počas zimného monitoringu netopierov vo Francúzsku bol 12. marca 2009 na zimovisku blízko mesta Périgeux objavený jeden kus netopiera veľkého (*Myotis myotis*) s bielym porastom plesne v oblasti nosa. Nález nápadne pripomínal prípady z USA. Pleseň bola izolovaná a identifikovaná ako *G. destructans*. Daný jedinec však napriek rozvinutému plesňovému povlaku nejavil známky ochorenia, bol v dobrej kondícii a mal normálnu váhu (Puechmaille a kol., 2010).

Na potvrdenie definitívnej diagnózy syndrómu bieleho nosa sa okrem mikroskopického vyšetrenia vzoriek plesňového povlaku a bioptátov z lietacích blán ofarbených hematoxylín-eozínom (Meteyer a kol., 2009), využíva sa kultivácia a izolácia *G. destructans* na mykologických médiách a genetická identifikácia prostredníctvom PCR metódy (Puechmaille a kol., 2010).

#### Materiál a metódy

V priebehu hibernačného obdobia netopierov v marci 2010 a 2011 sme realizovali sčítanie netopierov na zimovisku v opálových baniach na Dubníku. V podzemných

priestoroch sme vyhľadávali všetky netopiere voľne visiace na stenách alebo ukryté v puklinách a otvoroch po banickej činnosti.

Vzorky plesní boli zo suspektných jedincov odoberané priesvitnou lepiacou páskou a sterilnými vatovými tampónmi za účelom následnej kultivácie plesní z povrchu tiel netopierov. Vzorky zachytené na lepiacej páske boli podrobené mikroskopickému vyšetreniu svetelným mikroskopom. Vatové tampóny boli vkladané do sterilných vzorkovníc.

Stery z netopierov boli nanosené na platne so Sabouraudovým agarom, na ktorom počas 21 dní pri teplote 8 °C vyrástla zmes rôznych druhov plesní. Na základe morfológických vlastností boli vyselektované kolónie najviac podobné kolóniám *G. destructans* a tieto boli následne preočkované na nové platne so živným médiom. Po nasledujúcich 14 dňoch boli izolované vzorky podrobené genetickej analýze podľa Puechmaille a kol., (2010) s použitím izolačného kitu Qiagen, Hilden, Germany.

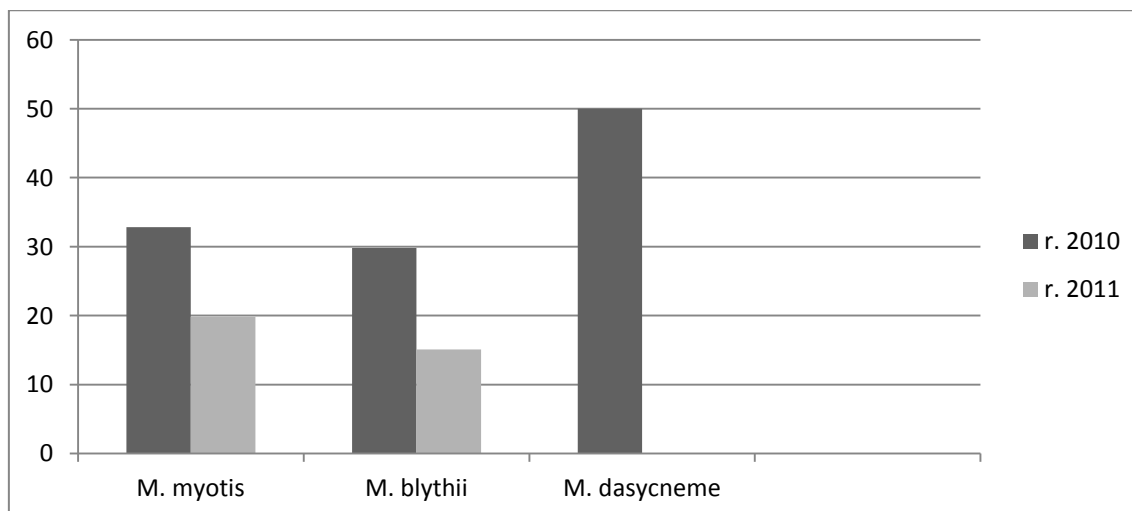
### Výsledky a diskusia

Počas zimných kontrol v priestoroch baní na Dubníku v rokoch 2010 a 2011 sme zistili prítomnosť bieleho plesňového povlaku v rostrálnej oblasti, na ušniciach a na lietacej blane u príslušníkov druhov netopier obyčajný (*Myotis myotis*), netopier ostrouchý (*Myotis blythii*) a netopier pobrežný (*Myotis dasycneme*). Prehľad počtu nájdených netopierov bez voľným okom viditeľného porastu plesne a počtu netopierov s prítomným plesňovým porastom na povrchu tela uvádza Tabuľka 1.

Tabuľka 1: Prehľad netopierov s viditeľným plesňovým porastom a bez neho

	r. 2010		r. 2011	
	Bez plesne	S plesňou	Bez plesne	S plesňou
<i>Myotis myotis</i>	305	100	343	68
<i>Myotis blythii</i>	57	17	53	8
<i>Myotis dasycneme</i>	4	2	2	0

Počas zimného sčítania v roku 2011 sme zistili percentuálny pokles suspektných jedincov všetkých troch druhov v pomere ku klinicky asymptomatickým jedincom (Graf 1).



Graf 1: Percentuálne zastúpenie netopierov s plesňou v jednotlivých rokoch

Všetky vzorky zachytené priesvitnou lepiacou páskou vykazovali prítomnosť hubových hýf morfológicky zhodných s hýfami *G. destructans*. Prítomnosť *G. destructans* bola potvrdená v troch vykultivovaných vzorkách prostredníctvom PCR metódy.

V priestoroch dubníckych baní sa odhaduje zimovanie viacerých druhov netopierov v počte až 4000 exemplárov (Danko, 1997). Z dôvodov neprístupnosti niektorých úsekov baní a prehliadnutia netopierov v ťažko viditeľných úkrytoch sa počet nami zisteného počtu netopierov s geomykózou môže líšiť od reálneho počtu.

Napriek preukázanému výskytu *G. destructans* na zimoviskách doiaľ sme nezdokumentovali žiadny prípad úhynu netopierov, ktorý by sa mohol dávať do spojitosti s geomykózou.

### Záver

Z doterajších poznatkov vyplýva, že zimovisko netopierov v baniach v okolí vrchu Dubník sa radí ku najviac postihnutým geomykózou v rámci Európy.

### Pod'akovanie

Tento článok bol vytvorený realizáciou projektu „INFEKTZOON – centrum excelentnosti pre nákazy zvierat a zoonózy“, na základe podpory operačného programu Výskum a vývoj financovaného z Európskeho fondu regionálneho rozvoja.“

### Literatúra

BLEHERT, D.S.; HICKS, A.C.; BEHR, M.; METEYER, C.U.; BERLOWSKI-ZIEHR, B.M.; BUCKLES, E.L. a kol. Bat white-nose syndrome: an emerging fungal pathogen? *Science*. 2009, 323, s. 227.

DANKO, Š. Kvalitatívne a kvantitatívne zmeny spoločenstva zimujúcich netopierov v opustených banských dielach v okolí Dubníka (Slanské vrchy). *Vespertilio*. 1997, 2, s. 5–8.

GARGAS, A.; TREST, M.T.; CHRISTENSEN, M.; VOLK, T.J., BLEHERT, D.S. *Geomyces destructans* sp. nov. associated with bat white-nose syndrome. *Mycotaxon*. 2009, 108, s.147–154.

METEYER, C.U.; BUCKLES E.L.; BLEHERT D.S.; HICKS A.C.; GREEN D.E.; SHEARN-BOCHSLER V.; THOMAS N.J.; GARGAS A.; BEHR M.J. Histopathologic criteria to confirm white-nose syndrome in bats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2009, 21, s.411–414.

PUECHMAILLE, S.J.; VERDEYROUXS, P.; FULLER, H.; GOUILH, M.A.; BEKAERT, M.; TEELING, E.C. White nose syndrome fungus (*Geomyces destructans*) in bat, France. *Emerg. Infect. Dis.* Feb 2010; [Epub ahead of print].

**Kontaktná adresa:** Ľuboš Korytár, MVDr., Ústav epizootológie a preventívnej veterinárskej medicíny, UVLF v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice, korytar.uvm@gmail.com

## ***Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars (*Sus scrofa*) in the Czech Republic**

### **Výskyt *Cryptosporidium suis* a *Cryptosporidium* pig genotype II u prasat divokých (*Sus scrofa*) v České republice**

<sup>1</sup>Němejc Karel, <sup>2</sup>Sak Bohumil, <sup>2</sup>Květoňová Dana, <sup>1,3</sup>Hanzal Vladimír,  
<sup>1,2</sup>Kváč Martin

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice

<sup>2</sup>Biology Centre of the Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i., České Budějovice

<sup>3</sup>Faculty of Forestry and Wood Sciences, Czech University of Life Sciences Prague

#### **Summary**

A total of 193 faecal samples of adult Eurasian wild boars were collected at 12 enclosures across the Czech Republic and examined for *Cryptosporidium* infection using both microscopic and molecular tools. Generally, low *Cryptosporidium* spp. infection intensity was revealed. No presence of *Cryptosporidium* oocysts in any examined smears was proved using the aniline-carbol-methyl violet staining method. No association between diarrhoea and the presence of *Cryptosporidium* infection in Eurasian wild boars was demonstrated. Thirty-two positive cases of *Cryptosporidium* infection were detected using either genus- or species-specific nested PCR. Mono-infection with *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II was revealed in 13 and 7 cases, respectively. Species-specific PCR revealed 2.4 times more cases of mixed infections than PCR/RFLP based on genus-specific PCR.

**Keywords:** *Cryptosporidium suis*; *Cryptosporidium* pig genotype II; Eurasian wild boar; PCR

#### **Introduction**

In pigs, *Cryptosporidium* infection was first described in the USA in 1977. Since then, natural cryptosporidiosis in pigs has been reported worldwide and four *Cryptosporidium* species and three genotypes have been reported to be infectious for domestic pigs (Xiao et al., 2006). Recent studies revealed the presence of two major porcine specific *Cryptosporidium* spp. in pigs: *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II (Ryan et al., 2003).

Besides the risk of introducing diseases into a pig farm by newly purchased infected pigs, the poor separation barrier between the stable interior and its surroundings represent potential source and ways of infection by wild animals, especially by Eurasian wild boars. Although the epidemiology of cryptosporidial infections of domestic pigs have been thoroughly reported in the past decade worldwide and risk of pig specific *Cryptosporidium* spp. to public health has been proved (Kváč et al., 2009b), no relevant data about molecular epidemiology of *Cryptosporidium* spp. in Eurasian wild boars have been published.

To evaluate the occurrence of *Cryptosporidium* spp. in Eurasian wild boars living in their natural habitat in the Czech Republic, to identify *Cryptosporidium* genotypes using molecular methods and to compare the data with occurrence of *Cryptosporidium* spp. in domestic pigs, the present study was undertaken.



## Material and Methods

A total of 193 faecal samples of adult Eurasian wild boars were collected at 12 randomly selected enclosures across the Czech Republic during the years 2009-2010. The samples were collected directly from rectum of hunted animals or from the ground around feeding places in forests. Fresh faecal samples were individually placed into sterile plastic containers and analyzed staining method previously described by Miláček and Vítovec (1985). Two hundred milligrams of each faecal sample was homogenized by bead disruption using FastPrep-24. Total DNA was extracted using the QIAamp DNA Stool Kit and was kept frozen at -20°C until PCR amplification. The presence of *Cryptosporidium* species and genotypes was determined by a two-step nested PCR protocols previously described by Jiang et al. (2005) and Jeníková et al. (2011). The amplicons and products of PCR/RFLP analyses were electrophoresed in 2 % agarose gels and visualized with 0.2 mg/ml ethidium bromide under ultraviolet light.

## Results

A total of 193 faecal samples of adult Eurasian wild boars were microscopically examined. Nevertheless, examination did not prove presence of *Cryptosporidium* oocysts in any examined slides. No diarrhoea was observed.

The amplicons of parts of SSU rRNA were obtained in 32 cases using genus-specific primers. Their digestion with endonucleases revealed 18 mono-infections with *Cryptosporidium suis*, 9 mono-infections with *Cryptosporidium* pig genotype II, and 5 mixed infection with *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. No other *Cryptosporidium* species or genotypes have been detected. On the basis of species-specific PCR the more accurate prevalence of porcine *Cryptosporidium* spp. was revealed. Similarly, 32 positive cases of *Cryptosporidium* infection were detected, nevertheless, mono-infection with *Cryptosporidium suis* was revealed in 13 cases, *Cryptosporidium* pig genotype II in 7 cases. Whereas, genus-specific PCR and PCR/RFLP identified mixed infection in 5 cases, species-specific PCR revealed 2.4 times more cases (12) of mixed infections.

Generally, low *Cryptosporidium* spp. infection intensity is supposed due to negative results during microscopical examination. Also low *Cryptosporidium* spp. infection extensity (mean 16.5 %; 0-35 %) at animal-level was observed, however the average 66.7 % prevalence at enclosure-level was recorded. *Cryptosporidium suis* infection was detected more often than *Cryptosporidium* pig genotype II.

## Discussion

In this study the specific diagnosis of *Cryptosporidium* spp. on randomly selected enclosures in the Czech Republic was described. In accordance with previous studies concerning domestic pigs (Vítovec et al., 2006; Kváč et al., 2009a) also our results did not reveal an association between diarrhoea and the presence of neither *C. suis* nor *Cryptosporidium* pig genotype II in Eurasian wild boars.

Generally, *Cryptosporidium* infections in domestic pigs are more often in animals aged 1-6 months reaching 24-60 % prevalence. We identified that 16.5 % of the tested adult Eurasian wild boars had *Cryptosporidium* infection. These results correspond with generally accepted theory, that adult pigs are less parasitized (Quílez et al., 1996; Vítovec et al., 2006). Both pig specific *Cryptosporidium* were described in a wide range of pig ages and the occurrence of *C. suis* was reported most frequently from pre-

weaners and *Cryptosporidium* pig genotype II from weaners (Kváč et al., 2009a). Surprisingly, on the contrary to the reports that dealt with age-specificity in domestic pigs, we detected *C. suis* as a dominant species infecting adult Eurasian wild boars.

Our results support the theory, that adult domestic pigs as well as Eurasian wild boars could be infected with both porcine *Cryptosporidium* simultaneously and epidemiology of pig specific *Cryptosporidium* is underdiagnosed (Jeníková et al., 2011). Although both porcine *Cryptosporidium* have been found in animals of wide age range, mixed infections have been detected in limited numbers (Kváč et al., 2009a). We diagnosed 2.4 times more mixed infection using species-specific primers compared to genus-specific primers in combination with PCR-RFLP.

Whereas both porcine *Cryptosporidium* have been reported to be human pathogenic (Kváč et al., 2009b), Eurasian wild boars represent hidden source of *Cryptosporidium* oocysts with a consequent risk to public health.

#### Acknowledgements

This work was supported by the project of the Grant Agency of the University of South Bohemia (022/2010/Z) and the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (MSM 6007665806).

#### References

- JENÍKOVÁ, M.; NĚMEJC, K.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D.; KVÁČ, M. New view on the age-specificity of pig *Cryptosporidium* by species-specific primers for distinguishing *Cryptosporidium suis* and *Cryptosporidium* pig genotype II. *Vet. Parasitol.* 2011, vol. 176, no. 2-3, pp. 120–125.
- JIANG, J.; ALDERISIO, K.A.; XIAO, L. Distribution of *Cryptosporidium* genotypes in storm event water samples from three watersheds in New York. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, no. 8, pp. 4446–4454.
- KVÁČ, M.; HANZLÍKOVÁ, D.; SAK, B.; KVĚTOŇOVÁ, D. Prevalence and age-related infection of *Cryptosporidium suis*, *C. muris* and *Cryptosporidium* pig genotype II in pigs on a farm complex in the Czech Republic. *Vet. Parasitol.* 2009a, vol. 160, no. 3-4, pp. 319–322.
- KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; SAK, B.; DITRICH, O. *Cryptosporidium* pig genotype II in immunocompetent man. *Emerg. Infect. Dis.* 2009b, vol. 15, no. 6, pp. 982–983.
- MILÁČEK, P.; VÍTOVEC, J. Differential staining of *Cryptosporidia* by aniline-carbol-methyl violet and tartrazine in smears from faeces and scrapings of intestinal mucosa. *Folia Parasitol.* 1985, vol. 32, no. 1, pp. 50.
- QUÍLEZ, J.; SÁNCHEZ-ACEDO, C.; CLAVE, A.; DEL CACHO, E.; LÓPEZ-BERNAD, F. Prevalence of *Cryptosporidium* infections in pigs in Aragón (northeastern Spain). *Vet. Parasitol.* 1996, vol. 67, no. 1-2, pp. 83–88.
- RYAN, U.M.; SAMARASINGHE, B.; READ, C.; BUDDLE, J.R.; ROBERTSON, I.D.; THOMPSON, R.C. Identification of a novel *Cryptosporidium* genotype in pigs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, vol. 69, no. 7, pp. 3970–3974.
- VÍTOVEC, J.; HAMADEJOVÁ, K.; LANDOVÁ, L.; KVÁČ, M.; KVĚTOŇOVÁ, D.; SAK, B. Prevalence and pathogenicity of *Cryptosporidium suis* in pre- and post-weaned pigs. *J. Vet. Med. B.* 2006, vol. 53, no. 5, pp. 239–243.
- XIAO, L.; MOORE, J.E.; UKOH, U.; GATEI, W.; LOWERY, C.J.; MURPHY, T.M.; DOOLEY, J.S.; MILLAR, B.C.; ROONEY, P.J.; RAO, J.R. Prevalence and identity of *Cryptosporidium* spp. in pig slurry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, no. 6, pp. 4461–4463.

**Contact address:** Karel Němejc, Ing., Department of Veterinary Sciences and Quality of Products, Faculty of Agriculture, University of South Bohemia in České Budějovice, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, nemejc@ivp.czu.cz

## Diagnostika kryptosporidiózy u voľne žijúcich zvierat pomocou ELISA metódy

### Diagnosis of cryptosporidiosis in free range animals by ELISA method

<sup>1</sup>Ravaszová Petra, <sup>2</sup>Goldová Mária, <sup>3</sup>Halánová Monika, <sup>1</sup>Valenčáková Alexandra, <sup>1</sup>Malčeková Beáta

<sup>1</sup>Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>2</sup>Ústav parazitológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach

<sup>3</sup>Ústav verejného zdravotníctva, Univerzita Pavla Jozefa Šafárika v Košiciach

#### Summary

Wild carnivores can be involved in the epidemiology of many important diseases and often act as reservoirs of pathogens, which cause disease in domestic animals and humans. This paper aims the role of red fox (*Vulpes vulpes*) in the circulation of coccidian parasites from genus *Cryptosporidium*. Cryptosporidiosis is known as a important enteric pathogen, symptoms range from mild to severe diarrhea and dehydration in immune-compromised individuals, which could be fatal. Fecal samples from 15 red foxes shot during April – June 2010 and collected in National Park Low Tatras and Pieniny were examined for the qualitative determination of *Cryptosporidium* spp. antigens in feces by sandwich ELISA kit. Overall 73,3 % of red foxes were positive. Our preliminary results emphasize the high prevalence of *Cryptosporidium* spp. amongst red foxes in Slovakia, highlights the potential risk for transmission of cryptosporidiosis to humans using the countryside for professional or recreational purposes.

**Keywords:** *Cryptosporidium* spp.; red foxes (*Vulpes vulpes*); ELISA; Slovak republic

#### Úvod

Rozsah, v akom zohrávajú divo žijúce zvieratá úlohu rezervoára infekčných agensov, spôsobujúcich ochorenie u domácich zvierat, miláčikov, či ľudí, doteraz nie je známy. Publikované štúdie poukazujú na to, že *Cryptosporidium* spp. je nepravdepodobnou hrozbou pre verejné zdravie, keďže líščie izoláty obsahovali oocysty *Cryptosporidium canis* psí genotyp, *Cryptosporidium canis* líščí genotyp a *Cryptosporidium ondatrí* genotyp (Zhou a kol., 2004), ktoré sú zriedka etiologickým agensom kryptosporidiózy u ľudí. V každom prípade, líšky sa často o svoje prirodzené prostredie delia s druhmi vysokej zveri, u ktorých sa môže vyskytovať kryptosporidiálna infekcia a môžu tak byť hrozbou pre verejné zdravie (Hamnes a kol., 2006, Robertson a kol., 2006). Keďže líšky zohrávajú úlohu prirodzených čističov prostredia, je možné, že sa tieto líšky stanú prenášateľmi kryptosporidiálnych oocyst a umožnia tak ďalšiu cestu disseminácie. Navyše, líšky sú na vrchole potravinového reťazca divožijúcich zvierat, a preto sú v súvislosti so zvyšujúcou sa urbanizáciou pokladané za možný zdroj priamej alebo nepriamej (cez farmové a spoločenské zvieratá) transmisie zoonóz prenášaných zo zvierat na ľudí. Taktiež majú kontakt s niektorými ďalšími zvieracími druhmi, ktoré sú dobre opísanými hositeľmi *Cryptosporidium* spp., hlavne hovädzí dobytok (Nagano a kol., 2007). Navyše, rozširovanie obytných zón na úkor krajiny zväčšuje predmestia, čím sa zároveň rozširuje nika pre výskyt tzv. mestskej líšky, ktorej výskyt môže byť v daných oblastiach oportunistický.

### Materiál a metódy

Vzorky trusu pätnástich líšok, ktoré boli zozbierané 10. a 13.09.2010 v okolí Prešova, na Východnom Slovensku, boli vyšetrené metódou sendvičovej ELISA, za použitia anti-*Cryptosporidium* protilátok, na zachytenie antigénu zo vzorky trusu. Druhá anti-*Cryptosporidium* protilátka, ktorá sendvičuje zachytený antigén, je potom pridaná do zmesi, pričom reakcia je vizualizovaná pridaním protilátky proti druhej protilátke, ktorá je konjugovaná s peroxidázou a chromogénom tetrametylbenzidínom (TMB). Výsledkom väzby *Cryptosporidium* antigénov s anti-*Cryptosporidium* protilátkami je žlté zafarbenie, ktoré sa dá interpretovať vizuálne aj spektrofotometricky.

### Výsledky

Z pätnástich vyšetrených vzoriek bolo jedenásť (73,3%) vzoriek pozitívnych. Použitý bol komerčne vyrábaný ELISA kit (Diagnostic automation, INC, Calabasas, CA) na detekciu kryptosporidiálnej infekcie. Absorbancia bola odčítavaná duálne pri 450/630 nm (ELISA Reader Opsys MR Thermo Labsystems). Za pozitívnu bola vzorka považovaná pri absorbancii 0,15 OD jednotiek a vyššej. Absorbancia nižšia, ako 0,15 OD jednotiek indikovala, že vzorka neobsahuje detegovateľnú úroveň kryptosporidiálneho antigénu.

Tabuľka 1: Pozitívne výsledky kryptosporidiózy u líšok ELISA metódou (tučne vyznačené sú pozitívne vzorky).

Poradové číslo	Dátum zberu vzorky	Nameraná absorbancia
1	10.09.2010	<b>0,216</b>
2	10.09.2010	<b>0,154</b>
3	10.09.2010	<b>0,269</b>
4	10.09.2010	<b>1,056</b>
5	13.09.2010	0,101
6	13.09.2010	0,139
7	13.09.2010	<b>0,219</b>
8	13.09.2010	0,072
9	13.09.2010	0,055
10	13.09.2010	<b>0,418</b>
11	13.09.2010	<b>0,426</b>
12	13.09.2010	<b>0,414</b>
13	13.09.2010	<b>0,332</b>
14	13.09.2010	<b>0,337</b>
15	13.09.2010	<b>0,317</b>

### Diskusia

*Cryptosporidium* spp. sa bežne nachádzajú u malých hlodavcov (Sturdee a kol., 1999) a keďže malé hlodavce sú normálnou potravou líšok, nález kryptosporidiálnych oocýst u líšok nie je prekvapujúci. Otázkou je, či tieto oocysty len prechádzajú tráviacim traktom líšok, alebo dochádza k infekcii a aktívnemu vylučovaniu kryptosporidiálnych oocýst. Hamnes a kol., (2007) opisuje relatívne nízku (2,2%), avšak rozšírenú prevalenciu *Cryptosporidium* spp. vo vzorkách líšok. Jeho výsledky podporili aj výsledky predchádzajúcich štúdií, ktoré tiež preukázali nízku (< 10) prevalenciu. Zhou a kol. (2004) opisuje 7,9% (6/76) prevalenciu *Cryptosporidium* spp. u líšok v Marylande,

USA a Sturdee a kol. (1999), veľmi podobne, opísal prevalenciu 8,7% (2/23) vo Warwickshire, Anglicko.

Zhou a kol. (2004) vo svojej práci opisuje infekciu líšok *Cryptosporidium canis* líščím genotypom, *Cryptosporidium canis* psím genotypom a aj *Cryptosporidium* ondatrím genotypom, čo dokazuje, že líšky môžu byť infikované ako psím genotypom, tak aj vlastným kryptosporidiálnym genotypom. Z pohľadu možného zoonotického prenosu kryptosporidiálnej infekcie je dôležitý fakt, že *C. canis* psí genotyp bol nájdený aj u ľudí, či už imunokompromitovaných alebo imunokompetentných (Fayer a kol., 2001, Xiao a kol., 2001).

### Záver

Čiastkové výsledky prezentované v tejto práci sú súčasťou skriningového vyšetrenia populácií líšok a medveďov v NP Nízke Tatry a Pieniny, Slovensko, na prítomnosť kryptosporidiálnej infekcie. Aj keď líšky a medvede nepredstavujú významný zdroj kryptosporidiálnych oocýst pre zoonotické šírenie sa infekcie, pravdepodobne zohrávajú úlohu rezervoára kryptosporidií. Práve preto je monitorovanie prevalence kryptosporidiálnej infekcie u týchto zvierat, žijúcich vo voľnej prírode, avšak prichádzajúcich do priameho či nepriameho kontaktu s človekom, veľmi dôležité.

### PodĎakovanie

Práca bola riešená v rámci grantových úloh VEGA 1/0108/10; 1/0144/10, 1/0271/11.

### Literatúra

- FAYER, R., TROUT, J.M., XIAO, L., MORGAN, U.M., LAL, A.A., DUBEY, J.P. *Cryptosporidium canis* n.sp. from domestic dogs. *Journal of Parasitology*. 2001, vol. 87, s. 1415–1422.
- HAMNES, I.S., GJERDE, B.K., FORBERG, T., ROBERTSON, L.J. Occurrence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in Norwegian red foxes (*Vulpes vulpes*). *Veterinary Parasitology*. 2007, vol. 143, s. 347–353.
- ZHOU, L., FAYER, R., TROUT, J.M., RYAN, U.M., SCHAEFER III, F.W., XIAO, L. Genotypes of *Cryptosporidium* species infecting furbearing animals differ from those species infecting humans. *Applied Environmental Microbiology*. 2004, vol. 70, s. 7574–7577.
- STURDEE, A.P., CHALMERS, R.M., NULL, S.A. Detection of *Cryptosporidium* oocysts in wild mammals of mainland Britain. *Veterinary Parasitology*. 1999, vol. 80, s. 273–280.
- NAGANO, Y., FINN, M.B., LOWERY, C.J., MURPHY, T., MORIARTY, J., POWER, E., TOOLAN, D., O'LOUGHLIN, A., WATABE, M., MCCORRY, K.A., CROTHERS, E., DOOLEY, J.S.G., RAO, J.R., ROONEY, P.J., MILLAR, B.C., MATSUDA, M., ELBORN, J.S., MOORE, J.E. Occurrence of *Cryptosporidium parvum* and bacterial pathogens in faecal material in the red fox (*Vulpes vulpes*) population. *Veterinary Research Communications*. 2007, vol. 31, s. 559–564.
- ROBERTSON, L.J., HERMANSEN, L., GJERDE, B.K., STRAND, E., ALVSVÅG, J.O., LANGELAND, N. Application of genotyping during an extensive outbreak of waterborne giardiasis in Bergen, Norway during autumn and winter 2004. *Applied Environmental Microbiology*. 2006, vol. 72, s. 2212–2217.
- HAMNES, I.S., GJERDE, B., ROBERTSON, L., VIKØREN, T., HANDELAND, K. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Veterinary Parasitology*. 2006, vol. 141, s. 30–41.
- XIAO, L., BERN, C., LIMOR, J., SULAIMAN, I., ROBERTS, J., CHECKLEY, W., CABRERA, L., GILMAN, R.H., LAL, A.A. Identification of 5 types of *Cryptosporidium* parasites in children in Lima, Peru. *Journal of Infectious Diseases*. 2001, vol. 183, s. 492–497.

**Kontaktná adresa:** Petra Ravaszová, MVDr., Ústav biológie, zoológie a rádiobiológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Komenského 73, 04181 Košice, ravaszova@uvm.sk

## ***Mycoplasma gallisepticum* infection in the grey partridge *Perdix perdix*** **Infekce *Mycoplasma gallisepticum* u koroptve polní (*Perdix perdix*)**

<sup>1</sup>Peckova Lucie, <sup>1</sup>Vitula Frantisek, <sup>1</sup>Bandouchova Hana, <sup>2</sup>Pohanka Miroslav,  
<sup>3</sup>Novotny Ladislav, <sup>1</sup>Jira David, <sup>1</sup>Kral Jiri, <sup>1</sup>Ondracek Karel, <sup>1</sup>Osickova Jitka,  
<sup>4</sup>Zendulková Dagmar, <sup>4</sup>Rosenbergova Katerina, <sup>4</sup>Treml Frantisek, <sup>1</sup>Pikula Jiri

<sup>1</sup> Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Centre of Advanced Studies, Faculty of Military Health Sciences, University of Defence, Hradec Kralove, Czech Republic

<sup>3</sup> Department of Pathological Morphology and Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup> Department of Infectious Diseases and Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

### **Summary**

The grey partridge is an important game bird in Europe that has declined considerably over the last decades. The objective of this study was to describe changes in the parameters of oxidative stress in a flock of grey partridges naturally infected with *Mycoplasma gallisepticum*. Morbidity and mortality rates were 100% and 60%, respectively. The antioxidant parameters were assayed in tissues (liver, lungs et al.) Significant correlations among responses of the antioxidant parameters were found namely in lungs and liver. There were also numerous significant inter-tissue correlations of all the studied antioxidant parameters.

The present study demonstrates the high susceptibility of grey partridges to natural infection by *M. gallisepticum*

**Keywords:** *Mycoplasma gallisepticum*; *Perdix perdix*; antioxidant parameters; oxidative stress

### **Background**

The grey partridge (*Perdix perdix*), a famous bird native to Europe and introduced to many parts of the world, has shown a marked population decline throughout Europe since the second half of the 20th century. Factors driving this decline include a sharp decrease in chick survival due to pesticide use, habitat loss due to agricultural intensification and mechanisation, lower hatching success, and increased predation (Kuijper et al., 2009).

Captive-bred grey partridges are widely used for repopulation purposes. Birds originating from infected captive flocks may introduce new agents into the wild populations or suffer from adverse effects of the parasite burdens they carry (Millan et al., 2004; Villanua et al., 2008).

An outbreak of mycoplasmosis occurred at a game bird farm (Moravia, Czech Republic) producing birds for release and affected a flock of breeding grey partridges in 2010. Laboratory diagnosis confirmed *Mycoplasma gallisepticum*, the most economically significant mycoplasma pathogen of poultry (Bradbury JM, 2005). Mycoplasma infections are known to be associated with oxidative damage of host cells and tissues (Almagor et al., 1983). Resistance to oxidative stress, therefore, seems to be crucial for mycoplasmas to survive within the host (Jenkins et al., 2008).

With the exception of one study on the oxidative stress and alterations of antioxidant status in blood samples from goats infected with *Mycoplasma agalactiae* (Kizil et al., 2007), there are no in vivo reports concerning other animal species and birds in particular. Little is known about the effect of the pathogen on the avian host regarding oxidative stress. The molecular and cellular events that lead to the development of lesions and clinical disease are still obscure (Bradbury 2005).

### Methods

One-year-old captive-bred adult grey partridges were used in the study. The birds were kept at a game bird farm (Moravia, Czech Republic). Control healthy birds (44 males and 44 females) were blood sampled for gender differences. A total of 5 suspected *Mycoplasma*-infected pairs of birds were blood sampled and then sacrificed by decapitation in order to collect samples for bacterial laboratory diagnosis and measurements of antioxidant parameters. A control group of 5 healthy pairs were also sampled in this way.

The *Mycoplasma spp.* isolates were identified using the nested polymerase chain reaction (PCR). Clinical specimens were collected and cultured as previously recommended (Bradbury 1998).

The antioxidant parameters were assayed in tissues (liver, lungs et al.) and plasma samples were collected at the time of autopsy and kept at -80 °C until use. The tissues were fixed parameters of katalase (CAT), glutathione-S-transferase (GST), reduced glutathione (GSH), glutathione reductase (GR), total thiobarbituric acid reactive species (TBARS) and ferric reducing antioxidant power assay (FRAP).

Statistica for Windows® 7.0 (StatSoft, Tulsa, OK, USA) was used to compare different groups. Values of  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  were considered statistically significant and highly significant, respectively.

### Results

An outbreak of respiratory disease occurred in a flock of adult grey partridges kept at a game bird farm (Moravia, Czech Republic) in April to May 2010. Morbidity was 100% and 60% (i.e., a total of 68 partridges) died within three to four weeks. Clinical signs included nasal and ocular discharge and dyspnoea with laboured open-mouth breathing, eyelid and infraorbital sinus swelling, lethargy, poor intake of feed and weight loss. There was a marked drop in egg production. Culture revealed *Mycoplasma spp.* in tracheal swabs only. The isolated strain was further identified as *M. gallisepticum* using the nested PCR methods.

Differences in antioxidant parameters between healthy control and *Mycoplasma*-infected grey partridges are shown in Table 1.

### Discussion

The outbreak of respiratory disease occurred at the peak of the laying period four months after the introduction of new partridges, i.e., the supposed source of infection in the game bird farm. While the high morbidity in the grey partridge flock corresponds with rates observed both in poultry and other avian species infected by *M. gallisepticum* as the sole pathogen, the high mortality is rather typical for mycoplasmosis complicated by some other infectious agent (Levisohn S, 2000; Nunoya T et al., 1995). Indeed, *E.*

*coli* was cultured from infraorbital sinuses, lungs and air sacs of some mycoplasmal birds.

The research presented here showed modulations of antioxidant parameters, the total antioxidant capacity and oxidative damage in the form of lipid peroxidation associated with the respiratory disease. Oxidative stress is an unspecific biochemical process. There is a clear association between oxidative stress and immune responses of birds (Costantini D, 2009).

Endogenous antioxidant defences of an enzymatic and non-enzymatic nature are essential for the control of reactive-molecular-species-mediated oxidative damage of biomolecules (Halliwell B, 1999). Interestingly, changes in oxidative stress parameters were not restricted to the respiratory apparatus of mycoplasmal birds, but also occurred in non-respiratory organs and plasma. Statistical analysis also revealed significant correlations among responses of the oxidative stress parameters in the lungs, liver et al. of all the studied oxidative stress parameters. Significant correlations among the studied parameters observed in the liver confirm the major metabolic role of this organ in birds.

Avian mycoplasmosis was associated with increased lipid peroxidation in the lungs. *M. gallisepticum* has the capability of entering nonphagocytic host cells, where it resists host defences and antibiotic therapy. Once *M. gallisepticum* has been introduced, the breeding flock of grey partridges should be depopulated rather than used for repopulation.

Table 1: Differences in antioxidant parameters between healthy control and *Mycoplasma*-infected partridges

Parameters	Tissues	Groups of birds	
		Healthy control birds	<i>Mycoplasma</i> -infected birds
CAT	Lungs	61.33±16.16	38.34±11.34*
	Liver	63.15±14.38	43.36±6.43*
GST	Lungs	67.70±35.61	69.44±34.74
	Liver	389.80±92.82	254.33±98.20*
GSH	Lungs	1.76±0.05	1.73±0.17
	Liver	2.35±0.30	1.59±0.12**
GR	Lungs	57.55±13.07	26.34±9.31**
	Liver	53.32±15.68	36.70±9.55
TBARS	Lungs	0.09±0.02	0.14±0.02*
	Liver	0.14±0.01	0.17±0.04
FRAP	Lungs	1.72±0.44	1.77±0.43
	Liver	1.72±0.44	1.77±0.43

Values represent mean ± SD; n = 10 in healthy control birds (5 males and 5 females), n = 10 in *Mycoplasma*-infected birds (5 males and 5 females); \* = p<0.05, \*\* = p<0.01. CAT = catalase (µmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/min/mg protein), GST = glutathione-S-transferase (µkat/g), GSH = reduced glutathione (µmol/g), GR = glutathione reductase (µkat/g), TBARS = total thiobarbituric acid reactive species (µmol/g), FRAP = ferric reducing antioxidant power assay (µmol/g).

### Conclusions

The present study demonstrated the high susceptibility of grey partridges to a natural infection with *M. gallisepticum*. Antioxidant parameters of tissues and plasma may prove useful as future references in experimental studies.



### **Acknowledgements**

This study was supported by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic and the Internal Grant Agency of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (Projects MSM 6215712402 and 80/2010/FVHE, respectively).

### **References**

from the author

**Contact address:** Lucie Pecková, MVDr., Department of Veterinary Ecology and Environmental Protection, FVHE VFU, 612 42 Brno, Czech Republic, peckoval@vfu.cz

## Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from the Passeriformes from Costa Rica

### Všenky (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) pěvců (Passeriformes) Kostariky

<sup>1</sup>Kounek Filip, <sup>1</sup>Sychra Oldrich, <sup>2</sup>Capek Miroslav, <sup>1</sup>Lipkova Alexandra, <sup>1</sup>Literak Ivan

<sup>1</sup>Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Czech Republic. [sychrao@vfu.cz](mailto:sychrao@vfu.cz)

<sup>2</sup>Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v. v. i., Kvetna 8, 603 65 Brno, Czech Republic.

#### Summary

We collected ectoparasites from wild-living birds in Costa Rica in 2004, 2009 and 2010. A total of 1878 individuals of 217 species of birds were examined. A total of 537 individuals of 48 bird species belonging to the families Cardinalidae (38 birds of 5 species), Emberizidae (232 birds of 17 species), Fringillidae (55 birds of 6 species) and Thraupidae (207 birds of 19 species) were examined. A total of 453 birds (84 %) of 37 species were parasitised with chewing lice. Chewing lice belonging to 6 genera were found.

**Keywords:** chewing lice; passerine birds; Costa Rica

#### Introduction

At present there are 55 recognized species of the genus *Myrsidea* Waterston from passerine hosts in the families Cardinalidae, Emberizidae, Fringillidae and Thraupidae (as defined in Clements *et al.* 2010). Subsequently 13 species of *Myrsidea* from these host families have been described by Sychra *et al.* (2007), Price *et al.* (2008), Price and Johnson (2009). Chewing lice of the genus *Myrsidea* is the most speciose menoponid genus parasitizing mainly passerines;

The aim of this study is to follow up on our previous work and present new data on the distribution of chewing lice found on passerines of the families Cardinalidae, Emberizidae, Fringillidae, and Thraupidae in Costa Rica.

#### Material and methods

We conducted fieldwork during the 2004, 2009 and 2010 rainy seasons at five study sites in Costa Rica. They included Tapanti NP, Rincon de la Vieja NP, Braulio Carillo NP, Sector Barva; Tapanti NP, Sector Cerro de la Muerte; Zona Protectora Las Tablas on the Pacific slope of the Cordillera de Talamanca;

At these sites, dawn-to-dusk mist-netting was conducted to capture as many bird species and individuals as possible, and to collect their ectoparasites. Every individual bird was identified, sexed and aged using Stiles & Skutch (1989). Lice were collected using the fumigation chamber method (Clayton & Drown 2001). Lice were stored in 70% ethanol and subsequently cleared and then slide-mounted in Canada balsam as permanent slides for proper identification.

## Results

A total of 1878 individuals of 217 species of birds were examined. Our contribution deals with the incidence of chewing lice (Phthiraptera) from the most numerous bird families examined. A total of 537 individuals of 48 bird species belonging to the families Cardinalidae (38 birds of 5 species), Emberizidae (232 birds of 17 species), Fringillidae (55 birds of 6 species) and Thraupidae (207 birds of 19 species) were examined. A total of 453 birds (84 %) of 37 species were parasitised with chewing lice. Chewing lice belonging to 6 genera were found: Amblycera – *Myrsidea* (dominance 74, n = 1716; prevalence 32, n = 537), *Machaerilaemus* (5; 4), *Menacanthus* (7; 1), *Ricinus* (2; 1) and Ischnocera – *Brueelia* (7; 6), *Philopterus* (5; 2).

## Discussion

Twelve records represent new louse-host associations. This is also the first record of *Philopterus* from birds from the Thraupidae. The highest number of species of chewing lice (5 species) was found on *Euphonia laniirostris*, which were found in five species of lice. Paper with descriptions of four new species of *Myrsidea* is submitted for publication. This paper includes first records of chewing lice from three of the 35 bird species examined, i.e. *Ramphocelus costaricensis*, *Ramphocelus sanguinolentus* and *Euphonia hirundinacea*. Three species of *Myrsidea* – *M. patersoni*, *M. rozsai* and *M. valimi* – are recorded for the first time from Costa Rica;

In this paper, there are four other examples of new host-louse associations of known species of *Myrsidea*, i.e. *M. bonariensis*, *M. fusca* and *M. violaceae*;

Price *et al.* (2003) cited Clay (1968: 236) for the association of *M. bonariensis* with *Tangara mexicana*, *T. gyrola* and *Euphonia violacea*. Here we present a new association of *M. bonariensis* with *T. dowii*;

*Myrsidea fusca* originally described by Carriker (1903) and subsequently redescribed by Price and Dalgleish (2006) from *Ramphocelus passerini* was found on *R. costaricensis*;

*Myrsidea violaceae*, originally described from *Euphonia violacea* (Price and Dalgleish 2006) and subsequently recorded from *E. gouldi* (Sychra *et al.* 2007), was found on *E. hirundinacea*. It have appeared that this species is restricted to birds of the genus *Euphonia* (family Fringillidae), but we found it also on *Chlorospingus ophthalmicus* that was recently placed into the family Emberizidae (Clements *et al.* 2010);

On the other hand, this record it is also interesting because *C. ophthalmicus* is known as host of *M. ophthalmici* described by Price and Dalgleish (2006) from birds from Venezuela;

In this paper, there are three further examples: *Arremon brunneinucha*, *Chlorospingus ophthalmicus* (Emberizidae) and *Habia rubica* (Cardinalidae). Couples of *Myrsidea* from *C. ophthalmicus* and *H. rubica* have different geographical distribution. – *M. ophthalmici* and *M. violaceae* from *C. ophthalmicus* were collected on birds from Venezuela and Costa Rica, respectively and *M. laciniaesternata* and *M. rubicae* from *H. rubica* were collected on birds from Bolivia and Trinidad, and Costa Rica, respectively (Price and Dalgleish 2006). Conversely the type series of *M. dolejskiae* from *A. brunneinucha* was collected in Costa Rica at a site quite close to that where series of *M. brunneinuchi* was collected. It is consistent with Price *et al.* (2008), who even mentioned one case of co-occurrence of two different species of *Myrsidea* on the same individual bird. These results suggest either that a recent successful host-switching

event or duplication (speciation of *Myrsidea* in the absence of host speciation) occurred on these hosts. Anyway, these results also show that during determination of chewing lice it is necessary to examine carefully each specimen even it is collected from bird with known species of lice.

### Acknowledgments

The field part of the study was permitted by the Ministerio de Ambiente, Energia y Telecomunicaciones de Costa Rica (Resoluciones No. 136-2009-SINAC and No. 120-2010-SINAC). Funding was provided by the Grant Agency of the Academy of Sciences of the Czech Republic (Grant No. IAA601690901). Miroslav Capek was also supported in part by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (Grant No. LC06073).

### References

- Carriker, M.A., Jr. (1903) Mallophaga from birds of Costa Rica, Central America. *University of Nebraska Studies*, 3, 123–197.
- Clay, T. (1968) Contributions towards a revision of *Myrsidea* Waterston, III. (Menoponidae: Mallophaga). *Bulletin of the British Museum (Natural History) Entomology*, 21, 203–243.
- Clayton, D. H. & Drown, D. M. (2001) Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology*, 87(6), 1291–300.
- Clements, J.F., Schulenberg, T.S., Iliff, M.J., Sullivan, B.L. & Wood, C.L. (2010) *The Clements checklist of birds of the world: Version 6.5*. Available from: <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/Clements%206.5.xls/view>. (Accessed 18 January 2011).
- Price, R.D. & Dalglish, R.C. (2006) *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from tanagers (Passeriformes: Thraupidae), with descriptions of 18 new species. *Zootaxa*, 1174, 1–25.
- Price, R.D. & Dalglish, R.C. (2007) *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from the Emberizidae (Passeriformes), with descriptions of 13 new species. *Zootaxa*, 1467, 1–18.
- Price, R.D., Hellenthal, R.A. & Palma, R.L. (2003) World checklist of chewing lice with host associations and keys to families and genera. In: Price, R.D., Hellenthal, R.A., Palma, R.L., Johnson, K.P. and Clayton, D.H. *The Chewing Lice: World Checklist and Biological Overview*. Illinois Natural History Survey Special Publication 24, pp. 1–448.
- Price, R.D. & Johnson, K.P. (2009) Five new species of *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from tanagers (Passeriformes: Thraupidae) in Panama. *Zootaxa*, 2200, 61–68.
- Price, R.D., Johnson, K.P. & Dalglish, R.C. (2008) Five new species of *Myrsidea* Waterston (Phthiraptera: Menoponidae) from saltators and grosbeaks (Passeriformes: Cardinalidae). *Zootaxa*, 1873, 1–10.
- Stiles, F.G. & Skutch, A. (1989) *A Guide to the Birds of Costa Rica*. Christopher Helm, London. 511 pp.
- Sychra, O., Literak, I., Capek, M. & Havlicek, M. (2007) Chewing lice (Phthiraptera) from buntings, cardinals and tanagers (Passeriformes: Emberizidae, Cardinalidae, Thraupidae) from Costa Rica, with descriptions of two new species of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae). *Zootaxa*, 1631, 57–68.

**Contact address:** Filip Kounek, Ing., VFU Brno, Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, (FVHE), Palackého 1-3, 612 42 Brno, filipkounek@seznam.cz

## Identifikace a kvantifikace proteinů střevního nálevníka lidoopů *Troglodytella abrasarti*

### Protein identification and quantification of *Troglodytella abrasarti*, an intestinal ciliate of African great apes

<sup>1,2</sup>Profousová Ilona, <sup>3</sup>Kopfová Ingrid, <sup>1,4</sup>Modrý David, <sup>3</sup>Šimůnek Jiří

<sup>1</sup> Ústav morfologické patologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup> Ústav biologie obratlovců AV ČR, Brno

<sup>3</sup> Ústav živočišné fyziologie a genetiky, AV ČR, Praha

<sup>4</sup> Ústav parazitologie, Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice

#### Summary

*Troglodytella abrasarti* is a commensal ciliate commonly occurring in colon ecosystem of African great apes. The function of these ciliates has not been yet explained. The knowledge of enzymatic activities of *T. abrasarti* is a prerequisite for understanding of role of these ciliates in colon ecosystem and energy metabolism. Using SDS PAGE electrophoresis (zymograms) and mass spectrometry (MALDI-TOF) we studied the enzymatic activities of these ciliates. We showed that *T. abrasarti* actively participate in digestion of storage and structural polysaccharides in colon of chimpanzees. Several isoenzymes of xylanase, CM-cellulase, inulinase,  $\alpha$ -amylase involved in enzymatic activities of *T. abrasarti* were detected.

**Keywords:** *Pan troglodytes*; *Troglodytella abrasarti*, enzyme activities; zymograms, MALDI

#### Úvod

Z množství studií zaměřujících se na prvoky osídlující trakt lidoopů se naprostá většina zaměřila na parazitární infekce lidoopů, dosud žádná se však hlouběji nezabývala významem komensálních nálevníků. Ty běžně obývají ekosystém tlustého střeva afrických lidoopů. Pro posouzení jejich významu pro hostitele je nutné posoudit schopnost těchto nálevníků degradovat zásobní a stavební polysacharidy pomocí jejich hydrolytických enzymů. Cílem práce bylo modifikovat vhodné metody na vizualizaci proteinů *T. abrasarti* v gelu, aktivní enzymy vizualizovat a následně je blíže specifikovat pomocí hmotnostní spektrometrie.

#### Materiál a metodiky

Projekt kombinoval metody kvantifikace bílkovin pomocí zymografie (modifikovanou SDS PAGE) (Flint et al, 1994) a jejich následnou identifikaci pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Živé buňky *T. abrasarti* byly izolovány z čerstvého trusu šimpanzů (Zoo Liberec), promyty McDougallovým pufrem a zamrazeny při -70 °C. Před samotnou elektroforézou byly buňky *T. abrasarti* homogenizovány sonikací v pufru s inhibitory proteáz a zahuštěny na MiliPore PES membráně (Cut Off 10kDa). V případě stanovování xylanázových a celulázových aktivit byl 0,1% roztok substrátu zapolymerován do gelu a po rozdělení proteinů byly jednotlivé fragmenty vizualizovány barvením gelu v roztoku kongo červeně a odbarvením v roztoku 1 M NaCl. Při detekci amylázových a inulinázových aktivit, byly gely inkubovány v 1% roztoku škrobu nebo 2% roztoku inulinu (Kang et al, 1998; Machaiah et Vakil 1984) a následně fragmenty jednotlivých aktivních proteinů vizualizovány v 0,1% roztoku 2,3,5-triphenyl tetrazolium hydrochloridu v 1N NaOH (inulináza) a 0,003M roztoku I<sub>2</sub> (amyláza).

Jednotlivé gely s viditelnými fragmenty byly vyhodnocovány na Molecular Imager® Gel Doc™ XR denzitometricky. Vybrané aktivní fragmenty proteinů byly z gelů vyříznuty, eluovány a blíže specifikovány pomocí MALDI-TOF. Zjištěné aminokyselinové sekvence byly porovnány s dostupnými databázemi proteinů (BLAST a pod.) a porovnány s již známými sekvencemi enzymů symbiotických nálevníků přežvýkavců a monogastrů.

### **Výsledky**

Modifikací běžných metod a vhodným upravením reakčních podmínek se nám podařilo detekovat několik izoform jednotlivých enzymů *T. abrasarti* a následně je blíže charakterizovat pomocí MALDI. Inulináza byla reprezentovaná 4 izoformami o molekulové hmotnosti 25-80 kDa, CM-celuláza 3 izoformami o molekulové hmotnosti 29-45 kDa a xylanáza 3 izoformami o velikosti 23-28 kDa. Amylázová aktivita byla přítomna ve 3 izoformách. Naše výsledky ukázaly, že *T. abrasarti* se aktivně podílí na trávení stavebních a zásobních rostlinných polysacharidů v tlustém střevě šimpanzů. Vůbec poprvé byla demonstrována inulinázová aktivita u nálevníků.

### **Diskuze**

Doposud bylo publikováno mnoho prací zabývajících se fibrolytickými aktivitami mikroorganismů osidlující bachor přežvýkavců, včetně protozoí, jež jsou nedílnou součástí tohoto složitého ekosystému (Devillard et al. 1999; Michalowski et al. 2001; Wereszka et al. 2004; Béra-Maillet et al., 2005). Byla popsána řada metodik, zabývajících se stanovováním enzymatických aktivit těchto protozoí (Bailey et al., 1992; Garcia et al., 1993; Kenealy, Jeffries, 2003), avšak žádná ze studií se doposud nezabývala stanovováním metabolických aktivit nálevníků trávicího traktu lidoopů. Jedinou výjimkou byl pokus Colleta et al. (1984), který experimentálně v podmínkách *in vitro* demonstroval hydrolytickou aktivitu *Troglodytella gorillae* při trávení celulózy. Z metodického hlediska byl ale jeho pokus nevyhovující. Z tohoto důvodu bylo potřeba vyzkoušet více sofistikovaných metod pro objektivní posouzení hydrolytických aktivit nálevníků trávicího traktu lidoopů.

### **Závěr**

V bezbuněčné suspenzi *T. abrasarti* jsme zjistili všechny sledované enzymatické aktivity ( $\alpha$ -amyláza, CM-celuláza, xylanáza, inulináza). Analýza zymogramů ukázala, že na CM-celulázové, inulinázové,  $\alpha$ -amylázové a xylanázové aktivitě se podílí více izoform těchto enzymů ( $\alpha$ -amyláza - 3 izoenzymy, inulináza - 4 izoenzymy, celulóza - 3 izoenzymy a xylanáza - 3 izoenzymy). Naše výsledky potvrdily, že *T. abrasarti* se významně podílí na trávení rostlinných polysacharidů v GIT lidoopů. Všechny doposud běžně používané metodiky bylo potřeba vhodně modifikovat a upravit tak, aby jednotlivé fragmenty proteinů *T. abrasarti* byly ostře viditelné a při inkubaci a barvení se nerozpíjeli na gelu. Nejzásadnější změny byly provedeny v protokolech při detekci amylázových a inulinázových aktivit.

### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 245/2009/FVL, IGA 41/2010/FVL.

**Literatura**

BAILEY, M. J.; BIELY, P.; POUTANEN, K. Interlaboratory testing of methods for assay of xylanase activity. *Journal of Biotechnology*. 1992, vol. 23, s. 257-270.

BÉRA-MAILLET, C.; DEVILLARD, E.; CEZETTE, M.; JOUANY, J. P.; FORANO, E. Xylanases and carboxymethylcellulases of the rumen protozoa *Polyplastron multivesiculatum*, *Eudiplodinium maggii* and *Entodinium* sp. *FEMS Microbiology Letters*. 2005, vol. 244, s. 149-156.

COLLET, J. Y.; BOURREAU, E.; COOPER, R. W., TUTIN, C. E. G.; FERNANDEZ, M. Experimental demonstration of cellulose digestion by *Troglodytella gorillae*, an intestinal ciliate of lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*). *International Journal of Primatology*. 1984, vol. 5, no. 4, s. 328-328.

DEVILLARD, E.; NEWBOLD, C. J.; SCOTT, K. P.; FORANO, E.; WALLACE, R. J.; JOUANY, J. P.; FLINT, H. J. A xylanase produced by the rumen anaerobic protozoan *Polyplastron multivesiculatum* show close sequence similarity to family 11 xylanases from grampositive bacteria. *FEMS Microbiology Letters*. 1999, vol. 181, s. 145-152.

FLINT, H. J.; ZHANG, J. X.; MARTIN, J. Multiplicity and expression of xylanases in the rumen cellulolytic bacterium *Ruminococcus flavefaciens*. *Current Microbiology*. 1994, vol. 29, s. 129-143.

GARCIA, E.; JOHNSON, D.; WHITAKER, J. R.; SHOEMAKER, S. P. Assessment of endo-1,4-beta-D-glucanase activity by a rapid colorimetric assay using disodium 2,2'-bicinchoninate. *Journal of Food Biochemistry*. 1993, vol. 17, s. 135-145.

KANG, S.; CHANG, Y. J.; OH, S. J.; KIM, S. Purification and properties of an endo-inulinase from an *Arthrobacter* sp. *Biotechnology Letters*. 1998, vol. 20, no.10, s. 983-986.

KENEALY, W. R.; JEFFRIES, T. W. Rapid 2,2'-bicinchonic-based xylanase assay compatible with high throughput screening. *Biotechnology Letters*. 2003, vol. 25, s. 1619-1623.

MACHAIAH, J. P.; VAKIL, U. K. Isolation and characterization of  $\alpha$ -amylase components evolved during early wheat germination. *Journal of Biological Sciences*. 1984, vol.6, no. 1, s. 47-59.

MICHALOWSKI, T.; RYBICKA, K.; WERESZKA, K.; KASPEROWICZ, A. Ability of the rumen ciliate *Epidinium ecaudatum* to digest and use crystalline cellulose and xylan for in vitro growth. *Acta Protozoologica*. 2001, vol. 40, s. 203-210.

WERESZKA, K.; MICHALOWSKI, T.; NEWBOLD, C. J.; McEWAN, N. R.; McINTOSH, F. M. Xylanolytic activity of the rumen protozoan *Diploplastron affine*. *Reproduction Nutrition Development*. 2004, vol. 44, s. 81.

**Kontakní adresa:** Ilona Profousová, Ing., Ústav morfologické patologie a parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, v10265@vfu.cz

## Sdílíme tasemnice s našimi nejbližšími příbuznými? Molekulární a morfologické studie anoplocephalidních tasemnic z primátů

### Do we share the tapeworms with our closest relatives? Molecular and morphological study on anoplocephalid tapeworms from non-human primates

<sup>1</sup> Petrášová Jana, <sup>2</sup> Vallo Peter, <sup>2,3</sup> Petrželková Klára Judita, <sup>4</sup> Foitová Ivona, <sup>4</sup> Koubková Božena, <sup>4</sup> Mašová Šárka, <sup>5</sup> Jirků Milan, <sup>5</sup> Scholz Tomáš, <sup>1,5</sup> Modrý David

<sup>1</sup> Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup> Ústav biologie obratlovců, AV ČR, Brno

<sup>3</sup> Zoologická zahrada Liberec, Liberec

<sup>4</sup> Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

<sup>5</sup> Parazitologický ústav, Jihočeská univerzita, České Budějovice

#### Summary

*Bertiella studeri* is an anoplocephalid tapeworm typically found in primates in Asia, Africa and America. Sporadic findings in humans suggest human-ape transmission and the low host specificity is anticipated. The host distribution of *Bertiella* provides an interesting model situation for the phylogenetic study by a multi-gene approach. Highly variable nuclear (5.8S-ITS2) and mitochondrial genes (COI; NADH) of *Bertiella* isolates were sequenced from different primates (*Callicebus oenanthe*, *Gorilla gorilla*, *G. beringei*, *Pan troglodytes*, *Pongo abelii*) and humans from various regions (South America, Africa, Indonesia). The molecular analyses showed that genus *Bertiella* forms a monophyletic group within the family Anoplocephalidae. *Anoplocephala gorillae* (isolated from *Gorilla beringei*) clustered in *Bertiella* group, though morphometric analyses of eggs showed the similarity with *Anoplocephala perfoliata* and *A. magna*. High similarity of human and non-human isolates supports the hypothesis of cross-transmissions between these hosts.

**Keywords:** anoplocephalid tapeworms; *Bertiella*; primates

#### Úvod

Ze všech parazitů na světě jsou tasemnice nejzajímavějšími formami, zejména svým komplikovaným životním cyklem (Jacobson, 1941). Anoplocephalidní tasemnice rodu *Bertiella* patří do řádu Cyclophylidea s výskytem zejména u primátů, hlodavců, vačnatců, ale také letuch a psů. Mezihostitelé jsou půdní roztoči a k infekci dochází jejich náhodnou ingestí definitivním hostitelem, kterým může být i člověk. Popsáno je více než 20 druhů v rámci rodu *Bertiella*, z nichž *B. studeri* a *B. mucronata* způsobují infekce lidí v Indii, Africe a Americe. I když mnoho infekcí probíhá bez klinických příznaků, je diagnostika bertielózy důležitou součástí ochrany lidského zdraví (Galan-Puchades et al., 2000).

Tato studie rozpracovává systematické postavení rodu *Bertiella* v rámci čeledi *Anoplocephalidae* a příbuznost jednotlivých izolátů z primátů a lidí na základě fylogenetické analýzy vysoce variabilních úseků jaderné (5.8S-ITS2) a mitochondriální DNA (COI, NADH) a zhodnocení morfometrických údajů z měření vajíček a proglotid.

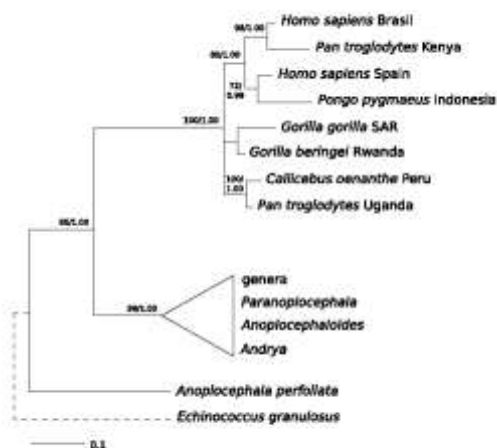
#### Materiál a metody

V průběhu let 2006-2010 byly získány proglotidy anoplocephalidních tasemnic rodu *Bertiella* ze šimpanze učenlivého (*Pan troglodytes* - Uganda, Keňa), gorily nížinné



(*Gorilla gorilla* - Středoafriická republika), orangutana (*Pongo abelii* - Indonésie) a vajíčka *Anoplocephala gorillae* z trusu gorily horské (*Gorilla beringei* - Rwanda). Ve spolupráci se zahraničními kolegy byly do studie zahrnuty izoláty rodu *Bertiella* z titi peruánského (*Callicebus oenanthe* - Peru) a lidí (*Homo sapiens* - Brazílie, Španělsko). Ze všech vzorků (proglotidy, trus) z primátů i lidí, které byly fixovány v 96 % molekulárním etanolu, jsme pomocí fenol-chloroformové extrakce vyizolovali DNA. Pro získání sekvencí jaderných (5.8S-ITS2 - internal transcribed spacer) a mitochondriálních genů (COI- cytochrome oxidase 1; NADH-Nad dehydrogenase 1) jsme použili PCR (polymerase chain reaction) s primery specifickými pro daný gen (Scholz et al., 2003; Wickstrom et al., 2003; Haukialmi et al., 2010). Sekvence jednotlivých genů byly zařazeny do fylogenetické analýzy s dalšími sekvencemi anoplocephalidních tasemnic z GenBank<sup>TM</sup> databáze. Datasetsy z jaderných a mitochondriálních sekvencí byly analyzovány metodou maximální parsimonie (MP) v programu PAUP\* 4.0b10 a Bayesovskou metodou v programu MrBayes 3.1.2 (Ronquist a Huelsenbeck, 2003). Jako outgroup byly zvoleny sekvence tasemnice *Echinococcus multilocularis*.

Morfometrické analýzy proběhly na úrovni měření velikosti zralých vajíček z jednotlivých izolátů vyjma vzorek z Peru a Španělska, kde vajíčka chyběla, nebo nebyla zralá. Měřili jsme délku a šířku vajíčka, délku piriformního aparátu a šířku onkosféry. Morfometrické analýzy vajíček byly doplněny měřením izolátů *Anoplocephala perfoliata* a *A. magna* z koní. Údaje byly statisticky zpracovány pomocí analýzy hlavních komponent (PCA-Principal Component Analysis) a K-means clustering a Kruskal Wallis ANOVA. Proglotidy z Ugandy, Středoafriické republiky a Indonésie byly transversálně nařezány a obarveny acetokarminem železitým a změřeny pro vytvoření perokreseb.



Obrázek 1: Fylogram z NADH a COI

*Anoplocephala*. Nicméně, podle morfologie vajíček a onkosféry se tento izolát zařazuje do skupiny s *Anoplocephala perfoliata* a *Anoplocephala magna* z koní. V morfologické analýze proglotid z Ugandy a Středoafriické republiky byly zřetelné jen děloha a vajíčka, které jsou pro přesnou determinaci do druhu nedostatečné. Druhově byla determinována *Bertiella satyri* (Indonésie).

## Výsledky

Výsledný alignment sekvencí zahrnující geny 5.8S-ITS2 byl délky 896 bp a COI a NADH byl délky 1356 bp. Všechny izoláty z primátů a lidí vytvořily v rámci skupiny anoplocephalidních tasemnic monofyletickou skupinu jak v jaderním tak i mitochondriálním fylogramu (obr. 1). Vysoká variabilita v rámci rodu *Bertiella* poukazuje na možnost existence více druhů, dokonce infekci odlišnými druhy u lidí a primátů. Fylogenetická analýza zároveň ukázala, že rod *Anoplocephala* je parafyletický, protože izolát z gorily horské morfologicky určený jako *Anoplocephala gorillae* je geneticky více příbuzný s rodem *Bertiella* než s rodem

**Diskuse**

Jednotlivé izoláty tasemnic rodu *Bertiella* z primátů a lidí vytvořily monofyletickou skupinu v rámci čeledi Anoplocephalidae. Vnitřní struktura této skupiny naznačuje, že naše izoláty představují několik druhů, i když pocházejí z blízkých lokalit. Na základě zjištěné evoluční příbuznosti izolátů z primátů a z lidí zatím nelze potvrdit sdílení druhů rodu *Bertiella* mezi oběma hostitelskými skupinami. Z důvodu nedostatečných morfometrických dat je možno hodnotit jen jejich fylogenetické postavení v rámci čeledi Anoplocephalidae. Zajímavostí je parafylie v rámci rodu *Anoplocephala*, ačkoli podobná charakteristika byla zjištěna u rodu *Mosgovoyia* (Haukisalmi et al., 2010). Z toho hlediska by bylo vhodné získat typový materiál dospělých jedinců a zhodnotit tak taxonomické postavení *Anoplocephala gorillae*.

**Závěr**

Ačkoli tasemnice z primátů a lidí jsou rodově blízce příbuzné, naše výsledky nepotvrdily přítomnost identických druhů u těchto hostitelů.

**Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem GA524/06/0264. Poděkování patří dr. Marii Galan-Puchades a dr. Luisovi Gomez-Puerta za poskytnutí materiálu.

**Literatura**

- GALAN-PUCHADES, M.T.; FUENTES, M.V.; MAS-COMA, S. Morphology of *Bertiella studeri* (Blanchard, 1891) sensu Stunkard (1940) (Cestoda: Anoplocephalidae) of human origin and a proposal of criteria for the specific diagnosis of bertiellosis. *Folia Parasitologica*. 2000, vol. 47, s. 23-28.
- HAUKISALMI, V.; HARDMAN, L.M.; FORONDA, P.; FELIU, C.; HENTTONEN, H. Systematic relationships of *Mosgovoyia Spasskii*, 1951 (Cestoda: Anoplocephalidae) and related genera inferred from mitochondrial and nuclear sequence data. *Systematic Parasitology*. 2010, vol. 77, s. 71–79.
- JACOBS, L. Tapeworm diseases. *The American Journal of Nursing*. 1941, vol. 41, no. 7, s. 754-758.
- RONQUIST, J.; HUELSENBECK, J.J. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003, vol. 19, s. 1572–1574.
- SCHOLZ, T.; SKERIKOVA, A.; HANZELOVA, V.; KOUBKOVÁ, B.; BARUŠ, V. Resurrection of *Proteocephalus sagittus* (Grimm, 1872) (Cestoda: Proteocephalidae) based on morphological and molecular data. *Systematic Parasitology*. 2003, vol. 56, no. 3, s. 173-181.
- WICKSTROM, L.M.; HAUKISALMI, V.; VARIS, S.; HANTULA, J.; FEDOROV, V.B.; HENTTONEN, H. Phylogeography of the circumpolar *Paranoplocephala arctica* species complex (Cestoda: Anoplocephalidae) parasitizing collared lemmings (*Dicrostonyx* spp.). *Molecular Ecology*. 2003, vol. 12, s. 3359–3371.

**Kontaktní adresa:** Jana Petrášová, MVDr., Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, petrasovaj@vfu.cz

## Komplexní diagnostika NGD, význam virové etiologie

### Complex diagnosis of PDD, sense of viral etiology

Vondráčková Martina, Tukač Viktor

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

*PDD is a fatal inflammatory disease that affects mainly psittacine birds. The disease was first recognized in 1970, but the causative agent of PDD, a novel bornavirus (ABV) was discovered in 2008. The intravital diagnosis of PDD is based on blood profile analyses (haematology, plasma chemistry) and radiography. RT-PCR and ELISA for ABV detection are already commercially available, but the knowledge regarding their optimal application in PDD is still a topic of research.*

**Keywords:** *proventricular dilatation disease; avian bornavirus; intravital diagnosis*

Neuropatická gastrická dilatace (NGD) je celosvětově rozšířené onemocnění charakteristické lymfocytoplazmocyární infiltrací ganglií centrálního a periferního nervového systému. Onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1970 u papoušků ara dovezených z Bolívie do USA. Jednalo se většinou o mladé ptáky z odchytu, postupně se onemocnění rozšířilo a nyní je jeho výskyt zaznamenáván u papoušků na všech kontinentech. Onemocnění bylo popsáno u více než 70 druhů papoušků, nejčastěji je výskyt zaznamenáván u papoušků ara (*Ara spp.*), žako (*Psittacus erithacus*), amazoňanů (*Amazona spp.*), amazónků (*Pionus spp.*), kakaduů (*Cacatua spp.*), eklektů (*Eclectus roratus*). Tento jev je ovšem vysvětlován častějším zastoupením těchto druhů v chovech než jejich větší predispozicí k NGD. Andulka vlnkovaná (*Melopsittacus undulatus*) je doposud považovaná za rezistentní k NGD. Neuropatická gastrická dilatace nebyla doposud zaznamenána v populacích volně žijících jedinců. Výskyt onemocnění byl většinou spojen se změnami v podmínkách chovu, ve výživě, změnách teploty nebo s nástupem chovné sezóny. Na základě šíření onemocnění v chovech a výskytu typických patologických lézí byla již od počátku předpokládána virová etiologie. Identifikací možného etiologického agens, pomocí standardních diagnostických virologických technik, se zabývala řada studií. Poměrně často byl v trusu postižených jedinců pomocí EM zachycen neidentifikovaný obalený virus o průměru asi 80 nm a podobný virus byl získán i z tkání z těchto ptáků za použití tkáňové kultury embryonálních buněk arů. Tkáňový homogenát z nemocných jedinců s obsahem tohoto neznámého viru byl schopen vyvolat obraz NGD. Přesto se téměř přes 30 let nepodařilo původce identifikovat a objevili se i názory o vlivu autoimunitních procesů na průběh onemocnění. Zásadní průlom v identifikaci etiologického agens byl zaznamenán až v souvislosti s pokroky v diagnostických metodách molekulární biologie, které byly využity k testování tkání z nemocných ptáků. Tak byl objeven v roce 2008 aviární bornavirus (ABV). Bylo izolováno 6 různých genotypů, u papoušků se nejčastěji setkáváme s ABV2 a ABV4. Patoanatomicky je často zjišťována celková vyhublost, atrofie prsních svalů, dilatace volete, proventrikulu, ventrikulu. Proventrikulus a ventrikulus jsou naplněny nestrávenými semeny a jejich stěna zeslabená. Dilatace s náplní potravy může být zjištěna i v duodenu. Histologický nálezn zahrnuje nehnisavou encefalitidu a myelitidu prodloužené míchy, nehnisavý zánět spinálních ganglií, mononukleární infiltrát v nervech a gangliích plexus myentericus proventrikulu a

ventrikulu, ložiskový mononukleární infiltrát v dřeni nadledvin, nehnisavou myokarditidu a nehnisavou neuritidu u periferních nervů. Popisován je i výskyt ložiskových zánětlivých změn, postihujících Purkyňova vlákna v myokardu. Inkubační doba onemocnění je velmi individuální, může se jednat o několik měsíců, ale i o několik let. Mezi nejčastější klinické příznaky patří progresivní hubnutí, regurgitace, přítomnost nestrávených semen v trusu. Neurologické příznaky se projevují změnami v chování, křečovitými stavy či paralýzou končetin, abnormální pohyby hlavou, u papoušků žako je popisována i slepota. Klinické příznaky onemocnění se vyskytují v různých kombinacích a žádný z nich není patognomický. V současnosti je susp. diagnostika stanovována nejčastěji na základě výsledků hematologického, biochemického a rtg vyšetření. Hematologickým vyšetřením je zjišťována heterofilie s leukocytózou a anémie. Leukocytóza s heterofilii je způsobena přidruženou sekundární bakteriální nebo mykotickou infekcí. Vyšetřením krevní plazmy je zjišťována elevace hodnot amylázy, kreatinkinázy, AST, fosforu a ALP. Zvýšené hodnoty amylázy, kreatinkinázy a AST odpovídají poškození svaloviny stěny předžaludku, žaludku, případně srdeční svaloviny. Zvýšené hodnoty fosforu a ALP se vyskytují v důsledku poškození ledvin, které onemocnění často doprovází. Rentgenologickým vyšetřením prováděným ve ventrodorzální (VD) a laterolaterální (LL) projekci je díky přítomnosti vzdušných vaků možno pozorovat dilataci částí GIT. Použitím kontrastních látek je dilatace GIT zvláště zřetelná a lze zaznamenat i zpomalení pasáže potravy. Prokazovaná dilatace proventrikulu je objektivně měřena dle Dennison a kol. (2008), kdy je měřen poměr mezi průměrem proventrikulu kolmo na jeho podélnou osu v místě spojení posledních hrudních obratlů a synsakra a maximální dorzoventrální výškou kýlu prsní kosti v místě spojení s os coracoideum. Výsledek větší než 0,522 je považován za objektivní průkaz dilatace proventrikulu. V některých případech je možno pozorovat dilataci volete a u arů často dilataci srdce. Rentgenologicky nelze odhalit časnou fázi onemocnění. Další možností diagnostiky NGD je endoskopie, tato metoda je ovšem poměrně invazivní a u těžce postižených ptáků může být životohrožující, stejně jako biopsie volete. Definitivní diagnózu NGD lze vyslovit až na základě histologického vyšetření prokazujícího lymfocytoplazmocytární infiltrace v autonomní nervové tkáni GIT, případně pozitivního nálezu PCR v této tkáni. Možností získání vzorku pro histologické vyšetření intravitálně je biopsie volete prováděná v celkové anestezii odebráním vzorku tkáně o velikosti 8 x 12 mm z kraniální části levého laterálního vaku. Odebraný vzorek by měl obsahovat minimálně jednu větší cévu v jejímž okolí jsou nervová ganglia. Záchytnost této metody se ovšem pohybuje v rozmezí 22 – 76%. S rozvojem metod molekulární biologie a objevením aviárního bornaviru byla rozvinuta i diagnostika NGD metodami PCR a serologickými metodami. Tkáněmi vhodnými k vyšetření z uhynulých jedinců metodou PCR jsou mozek, mícha, vole, proventrikulus, ventrikulus a nadledvinky. Intravitálně lze použít choanální nebo kloakální výtěry, případně vzorky trusu nebo brků. Sérologicky lze vyšetřit krevní sérum na přítomnost protilátek i pro detekci viru. Terapie onemocnění je založena na podpůrné a paliativní léčbě. Pacientovi je nasazena fluidní terapie a dokrmován kašovitou potravou podávanou do volete. Indikováno je použití prokinetik (metoklopramid HCl), probiotik, multivitaminových preparátů a dle charakteru přidružených infekcí použití antibiotické, případně antimykotické terapie. Použitím NSAID celecoxibu (Celebrex), selektivního inhibitoru COX-2, v kombinaci s mesalazinem (Pentasa) a výše popsanou podpůrnou terapií je možné dosáhnout stabilizaci pacienta. KCHPPDS se diagnostikou a terapií NGD zabývá již dlouhou dobu. Sledování výskytu onemocnění u pacientů kliniky dokumentuje jeho výrazné rozšíření

v chovech. Od září 2010 do března 2011 byl na klinice zaznamenán výskyt susp.NGD u 35 ptáků z 309 celkem ošetřených za dané období. Celkem 18 jedinců bylo na klinice hospitalizováno, 8 jedinců propuštěno po provedení hematologického, biochemického a rentgenologického vyšetření do domácí péče, 7 jedinců doručeno jako kadávery k postmortálnímu vyšetření a u 2 pacientů po konzultaci s majitelem provedena eutanázie. Jednalo o amazoňany (14), papoušky ara (9), žako (6), kakadu (3), eklektus (1) a papouška amboinského (1). V poměru pohlaví převažovali mírně samci nad samicemi 2,4:2, u 4 jedinců nebylo pohlaví známo. Věkové rozmezí pacientů od 7 měsíců do 25 let, nejčastěji postiženou věkovou kategorií byli jedinci ve věku 5 až 6 let. U daných pacientů převažovaly mírně příznaky postižení GIT nad nervovými. Nejčastěji se jednalo o progresivní hubnutí, přítomnost nestrávených semen v trusu, regurgitaci, snížený příjem krmiva. Z nervových příznaků byla zaznamenána změna chování, neschopnost udržet se na bidle, nekoordinované pohyby, zvýšená spavost, křečové stavy. Z hospitalizovaných pacientů se jich 8 podařilo stabilizovat, 3 jedinci na terapii nezareagovali a 7 jedinců uhynulo, nejdéle však do 10 dnů hospitalizace. Hematologické vyšetření bylo provedeno u 25 pacientů, přičemž leukocytóza byla zaznamenána u 17, heterofilie u 13 pacientů, u 8 pacientů byla zaznamenána monocytóza. Dva pacienti vykazovali leukopenii, vždy současně s erytropenií. Biochemické vyšetření bylo provedeno u 22 jedinců. Elevace kreatinkinázy byla jistěna u 15 jedinců, amylázy u 13 jedinců, AST u 8 jedinců. Dále bylo u 7 pacientů zjištěno zvýšení fosforu a u 3 zvýšení ALP. U všech pacientů byla prokázána objektivní dilatace proventrikulu, kdy se průměry naměřených hodnot pohybovaly v rozmezí od 0,55 do 1,32. U jednoho pacienta ary zelenokřídle (*Ara chloroptera*) nebyla rentgenologicky prokázána dilatace proventrikulu, ale byla zjištěna dilatace srdce a histologicky diagnóza NGD potvrzena. Postmortální vyšetření a odběr vzorků pro histologické a PCR vyšetření bylo provedeno u všech uhynulých jedinců. Intravitálně jsou odebrána brka. Vzorky odebrané pro PCR diagnostiku budou vyšetřeny na specializovaných zahraničních pracovištích. Vyšetření provedená na naší klinice u pacientů se susp. NGD potvrzují, že změny pozorované na rtg a v krevním obraze u všech sledovaných pacientů odpovídají změnám typickým při výskytu NGD. V současnosti je tedy běžná intravitální diagnostika u podezřelých pacientů založena na anamnéze, hematologickém, biochemickém a rentgenologickém vyšetření. V budoucnu bude intravitální diagnostika doplněna o PCR vyšetření kloakálních výtěrů, krevního séra a brků.

### Literatura

1. Ady Y, Susan Clubb, Shivaprasad H.L. Advanced diagnostic approaches and management of proventricular dilatation disease. *Vet Clin Exot Anim* 13 2010;13:471-494.
2. Honkavuori KS, Shivaprasad HL, Williams BL, et al. Novel bornavirus in psittacine birds with proventricular dilatation disease. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1883-6
3. Straub J, Michael P, Krautwald-Junghanns M.-E. Measurement of the cardiac silhouette in psittacines. *JAVMA*, Vol 221, No.1, July 1,2002
4. Dennison S.E., Paul-Murphy J.R., Adams W.M. Radiographic determination of proventricular diameter in psittacine birds. *JAVMA*, Vol 232, No.5, March 1, 2008

**Kontaktní adresa:** Martina Vondráčková, MVDr., Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, V10237@vfu.cz



# **SEKCE 8**

*Morfologie a fyziologie*





## Infiltrace podkožní tukové tkáně makrofágy ve vztahu k lipomobilizaci u dojnic v okoloprodním období

### Macrophage infiltration of subcutaneous fat tissue in relation to lipomobilisation in periparturient dairy cows

Pěnkava Oldřich, Šlosárková Soňa

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

#### Summary

*The aim of the study was to evaluate the changes in macrophage infiltration of subcutaneous fat tissue in periparturient dairy cows in relation to markers of lipomobilisation. From each of 30 included animals was collected a pair of samples of blood and fat (prior/after the delivery-a.p./p.p.). The macrophages in fat tissue were stained using immunohistochemistry (antigen CD68). The amount of macrophages was counted in the light microscope as a number of labeled cells in five fields of vision at a magnification of 10x40. Blood sera were examined for the levels of non-esterified fatty acids (NEFA) and  $\beta$ -hydroxybutyrate (BHB).*

*The count of infiltrated macrophages amounted to 1.57 a.p. and 3.87 p.p. with significant difference ( $p < 0.01$ ). While the level of NEFA was higher p.p. ( $p < 0.001$ ) (0.10 and 0.94 mmol/l, respectively), no difference was observed in the level of BHB (0.59 and 0.62 mmol/l, respectively). There weren't any significant relations between counts of macrophages and biochemical parameters. The results confirmed the premise of increased macrophage infiltration of fat tissue after periparturient load in dairy cows but not demonstrably because of the higher lipomobilisation.*

**Keywords:** *non-esterified fatty acids;  $\beta$ -hydroxybutyrate; negative energy balance; metabolic load; proinflammatory status*

#### Úvod

Pro dojnice po porodu je k vyrovnání negativní energetické balance zásadní zejména aktivita tukové tkáně. Lipomobilizace se zvyšuje již před porodem (Bernabucci a kol., 2005), přičemž její patologicky zvýšená úroveň je zaznamenávána zejména v souvislosti s obezitou zvířat v tomto období (Drackley a kol., 2005). U lidí je obezita v současnosti chápána také jako chronický zánětlivý stav organismu. Tuková tkáň se při obezitě odlišuje mimo jiné morfologicky, zvětšuje se velikost adipocytů i míra infiltrace makrofágy (Curat a kol., 2006; Strissel a kol., 2007).

Cílem práce bylo popsat změny v infiltraci podkožní tukové tkáně makrofágy, imunohistochemicky (IHC) značenými, během peripartálního období dojnic ve vztahu k biochemickým markerům lipomobilizace.

#### Materiál a metody

Do pokusu bylo zahrnuto 30 plemenic holštýnského plemene s průměrným pořadím laktace při otelení 2,3. U každého zvířete byla provedena dvě vyšetření zahrnující odběr vzorků krve z podocasní žíly (v. *coccygea*) a podkožního tuku z oblasti kořene ocasu (*regio clunis*) pomocí bioptických kleští. První sledování bylo prováděno 20-2 dny (průměrně 8,5 dne) do očekávaného termínu porodu, druhé 1-12 dnů (průměrně 7,4 dne) po porodu, průměrný interval mezi vyšetřeními byl 16 dnů.

Tuková tkáň po odběru byla fixována v 10% neutrálním formalínu, vzorky byly zpracovány běžnou parafinovou metodou. Po demaskování antigenů teplem (v mikrovlnné troubě při pH 6 a teplotě 98°C po dobu 20 minut) byly preparáty tukové tkáně obarveny v rámci nepřímé imunohistochemické metody s využitím primární protilátky anti-CD68 (klon EBM 11, DAKO, Denmark) a barvicího systému CSA, HRP (DAKO, Denmark). Množství makrofágů v tukové tkáni bylo počítáno ve světelném mikroskopu (Motic BA310) jako počet značených buněk v pěti zorných polích při zvětšení 10x40.

Z krevního séra byly vyšetřovány koncentrace neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) a  $\beta$ -hydroxybutyrátu (BHB) pomocí automatického analyzátoru Cobas Mira (ROCHE, Switzerland).

Statistická analýza byla provedena v programu KyPlot (v. 2.0 beta 15). Rozdíly v počtu makrofágů infiltrovaných v podkožním tuku a porovnání koncentrací NEMK i BHB před a po porodu byly posouzeny neparametrickým párovým Wilcoxonovým testem. Vazba mezi jednotlivými parametry byla testována Spearmannovým korelačním testem.

### Výsledky

Pro oba odběry jsou v tabulce 1 prezentovány počty makrofágů infiltrovaných v podkožní tukové tkáni pokusných zvířat a v tabulce 2 uvedeny parametry krve vyšetřované u těchto zvířat.

Tabulka 1: Počet makrofágů infiltrovaných v podkožní tukové tkáni sledovaných krav před a po porodu

	Počet makrofágů (v 5 zorných polích při zvětšení 10x40)		Změna v počtu makrofágů
	před porodem	po porodu	
x $\pm$ s	1,57 $\pm$ 2,11	3,87 $\pm$ 3,46**	2,3 $\pm$ 4,30
Min	0	0	-9
Max	9	14	12

\*\* $p < 0,01$

Tabulka 2: Koncentrace vybraných parametrů krve sledovaných krav před a po porodu

	NEMK (mmol/l)		BHB (mmol/l)	
	před porodem	po porodu	před porodem	po porodu
x $\pm$ s	0,10 $\pm$ 0,13	0,94 $\pm$ 0,46***	0,59 $\pm$ 0,15	0,62 $\pm$ 0,33

\*\*\* $p < 0,001$ ; NEMK-neesterifikované mastné kyseliny, BHB- $\beta$ -hydroxybutyrát

### Diskuze

Počet makrofágů infiltrovaných v podkožní tukové tkáni se mezi odběry průkazně zvýšil (tabulka 1). Signifikance bylo dosaženo i přes velké rozptyly hodnot v obou skupinách, což lze vysvětlit vyhodnocováním párových vzorků od jednotlivých zvířat. Mezi množstvím infiltrovaných makrofágů a koncentrací NEMK i BHB nebyly prokázány korelace před ani po porodu. Sérová koncentrace NEMK vzhledem ke zvýšené lipomobilizaci u dojnic začíná stoupat těsně před porodem a pokračuje ještě několik dnů po něm (Bernabucci a kol., 2005). V našem sledování se vzestup projevil

signifikantně vyšší koncentrací NEMK po porodu (tabulka 2). Bernabucci a kol. (2005) také potvrdil průkazně vyšší koncentrace NEMK u zvířat s nadváhou. Jak bylo u lidí prokázáno (Curat a kol., 2006; Strissel a kol., 2007), obezita vede ke kumulaci makrofágů v tukové tkáni. V našich výsledcích pozitivní korelace mezi počtem makrofágů a koncentrací NEMK (a tak nepřímo i tělesnou kondicí) ale potvrzena před ani po porodu nebyla. Zvýšená infiltrace tukové tkáně makrofágy po porodu pak byla zřejmě způsobena environmentálními, infekčními, sociálními a nutričními stresory, které se u dojnic uplatňují právě v okolopородním období (Drackley a kol., 2005). Doložené zvýšené množství NEMK u skupiny dojnic po porodu mohlo být jednou z příčin aktivace makrofágů (Lee a kol., 2003; Nguyen a kol., 2007). Koncentrace BHB, která slouží jako ukazatel schopnosti jater využít mastné kyseliny, nebyla před a po porodu signifikantně rozdílná a nedosahovala ani hodnot typických pro rozvoj alespoň subklinické ketózy (Enjalbert a kol., 2001).

### Závěr

Práce prokázala u dojnic v peripartálním období zvyšující se infiltraci podkožní tukové tkáně makrofágy. Souvislost zvýšené infiltrace tukové tkáně makrofágy po porodu s rozvojem lipomobilizace u jednotlivých dojnic nebyla prokázána. Výsledky je nutné zejména vzhledem k velkým rozptylům v počtech makrofágů upřesnit na větší respektive homogennější skupině zvířat.

### Poděkování

Práce byla vypracována za podpory grantových projektů IGA VFU č. 51/2010/FVL a NAZV č. QI91A238.

### Literatura

- BERNABUCCI, U.; RONCHI, B.; LACETERA, N.; NARDONE, A. Influence of body condition score on relationships between metabolic status and oxidative stress in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*. 2005, vol. 88, s. 2017-2026.
- CURAT, C.A.; WEGNER, V.; SENEGES, C.; MIRANVILLE, A.; TONUS, C.; BUSSE, R.; BOULOUMIE, A. Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*. 2006, vol. 49, s. 744-747.
- 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, s. 323-344.
- ENJALBERT, F.; NICOT, M.C.; BAYOURTHE, C.; MONCOULON, R. Ketone bodies in milk and blood of dairy cows: Relationship between concentrations and utilization for detection of subclinical ketosis. *Journal of Dairy Science*. vol. 84, s. 583-589.
- LEE, C.H.; OLSON, P.; EVANS, R.M. Lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. 2003, vol. 144, no. 6, s. 2201-2207.
- NGUYEN, M.T.A.; FAVELYUKIS, S.; NGUYEN, A.K.; REICHART, D.; SCOTT, P.A.; JENN, A.; LIU-BRYAN, R.; GLASS, C.K.; NEELS, J.G.; OLEFSKY, J.M. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007, vol. 282, no. 48, s. 35279-35292.
- STRISSEL, K.J.; STANCHEVA, Z.; MIYOSHI, H.; PETRFIELD, J.W.; DEFURIA, J. Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes*. 2007, vol. 56, s. 2910-2918.

**Kontaktní adresa:** Oldřich Pěnkava, MVDr., Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, penkava@vfub.cz

## Fyziologické funkce c-Myb v proliferaci, diferenciaci a apoptóze během odontogeneze

### Physiological Function of c-myb in proliferation, differentiation and apoptosis during odontogenesis

<sup>1,2</sup>Lungová Vlasta, <sup>1,3</sup>Buchtová Marcela, <sup>1</sup>Doubek Jaroslav, <sup>4</sup>Šmarda Jan,  
<sup>1,3</sup>Matalová Eva

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého, Olomouc

<sup>3</sup>Ústav živočišné fyziologie a genetiky, Akademie věd ČR, Brno.

<sup>4</sup>Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

#### Summary

*c-Myb belongs to the family of transcription factors that regulate expression of genes involved in signalling pathways responsible for cell proliferation, differentiation and apoptosis. These processes significantly influence morphogenetic events that proceed during embryonic development. The main aim of this work was to monitor c-Myb expression in the mouse M1 tooth germs and correlate it with morphogenetic processes such as proliferation, differentiation and apoptosis in order to investigate its physiological role during odontogenesis. Distribution and assesment of c-Myb, PCNA (cell proliferation marker) and apoptotic cells were carried out immunohistochemically on serial histological sections obtained during prenatal and postnatal stages of development untill the tooth eruption. Occurence of c-Myb positive cells during odontogenesis positively correlated with proliferation and negatively with apoptosis. Furthermore, c-Myb was detected in fully differentiated tissues, such as ameloblasts and odontoblasts. This indicates that physiological function of c-Myb during odontogenesis includes not only regulation of proliferation and initiation of terminal differentiation but it may also control production of dental hard tissues, probably on the level of calcium metabolism.*

**Keywords:** *c-Myb; proliferation; differentiation; apoptosis*

#### Úvod

c-Myb patří do rodiny transkripčních faktorů tzv. myb-proteinů (stejně tak jako A-Myb, B-Myb a onkogenní v-Myb). Produkty *myb* genů regulují expresi signálních molekul v drahách zodpovědných za proliferaci, diferenciaci a programovanou smrt buněk. Tyto významné morfogenetické procesy se uplatňují při vývoji tkání, ale i v dospělosti při udržení homeostáze. Označení *myb* rodiny vychází z myeloblastózy a účast jejích členů je nejvíce prozkoumána v procesech hematopoetických nádorových transformací. V současnosti je nejlépe probádaným členem *myb* rodiny c-Myb. Přirozeně se vyskytuje ve velkém množství především v nezralých proliferujících buňkách např. v prekurzorech hematopoietických buněk, kde ovlivňuje jejich diferenciaci do jednotlivých buněčných linií (Ess *et al.*, 1999; Ness, 2003). Expresce *c-myb* genu je dokumentována rovněž v některých embryonálních tkáních (Sitzmann *et al.*, 1995), kde reguluje vývojové procesy spojené s morfogenezí jednotlivých struktur. Výskyt c-Mybu v diferencovaných tkáních byl zatím prokázán jen v několika málo případech např. u dospělých buněk mozku myši (Hwang *et al.*, 2007) Absence c-Mybu v buňkách je letální, u myši kolem 14,5 dne embryonálního vývoje (E14,5), a to z důvodu těžké anemie. Biologická funkce c-Mybu mimo hematopoézu a související nádorové patogeneze je zatím prozkoumána jen velmi málo. Cílem této práce bylo tedy

zmapování produkce c-Myb v zubních základech prvního moláru myších embryí a sledování její korelace s morfogenetickými procesy v souvislosti s fyziologickým uplatněním c-Myb během odontogeneze. Distribuce c-Myb a PCNA jako proliferačního markeru bylo prováděno imunohistochemicky v sériových histologických řezech společně se značením zlomů DNA v apoptotických buňkách, a to v období prenatalního (E) i postnatalního vývoje (P) až do erupce zubu (P16).

### Výsledky a diskuze

Přítomnost c-Mybu byla detekována již ve stadiu iniciace odontogeneze E 12,5, kdy dochází ke ztluštění epitelu a následně k tvorbě zubního pupene. c-Myb pozitivní buňky byly roztroušeny v zubním epitelu a rovněž v okolním kondenzujícím mezenchymu kolem. Ve stadiu zubního pupene E13,5 se pozitivní c-Myb buňky nacházely zejména v oblasti zubního epitelu. Ve stadiu zubního zvonku ED15,5 byly soustředěny zvláště do prostoru stopky spojující zubní základ se zubní lištou a na apikálním konci orgánu skloviny, v místě rostoucí cervikální smyčky. Některé c-Myb pozitivní buňky byly detekovány také v epiteliální vrstvě vnitřního sklovinného epitelu tj. vrstvě budoucích ameloblastů. Ve stadiu zubního zvonku se pozitivní c-myb buňky nacházely také v mezenchymu v blízkosti vnitřní vrstvy sklovinného orgánu, kde dochází k diferenciaci odontoblastů. Velmi výrazná exprese *c-myb* byla prokázána na úrovni mRNA v mezenchymu v okolí sekundárních sklovinných uzlů, které hrají roli při vytváření vrcholů zubní korunky.

Rozmístění c-Myb pozitivních buněk během prenatalního vývoje obecně pozitivně korelovalo s proliferací a negativně s apoptózou, i když c-Myb pozitivní buňky byly v nadbytku k PCNA pozitivním buňkám. Důležitým zjištěním byl nález c-Mybu v diferencovaných buňkách nejenom zubního základu (ameloblasty, odontoblasty), ale také okolní kosti tvořící alveolární lůžko (osteoblasty, osteoklasty). Proto byl další výzkum zaměřen na období mineralizace zubního základu. Mineralizaci zahajují odontoblasty produkcí predentinu/dentinu a to již na konci prenatalního období. Sekrece skloviny začíná postnatálně ve stadiu P0 na vrcholech zubní korunky. V tomto časovém úseku téměř všechny buňky sklovinného orgánu ještě proliferují, stejně tak mezenchymální buňky zubní pulpy a dentální vaku včetně alveolární kosti. Přítomnost c-Myb v zubním zárodku byla proto v tomto období velmi hojná a c-Myb pozitivní buňky se vyskytovaly ve všech zmíněných oblastech. Od stadia P2 až po stadium P12 se proliferace buněk sklovinného orgánu postupně zastavuje a soustřeďuje se do oblasti cervikální smyčky (P2) a Hertwigovy epiteliální pochvy HERS (P4 – P12). Ty představují hlavní proliferační zóny zubu, které úzce souvisí s vývojem zubního kořene. Intenzivním dělením buněk HERS se zubní kořen prodlužuje a postupně proniká hlouběji do alveolární kosti. Ze současných výzkumů vyplývá, že v pokročilých stádiích postnatalního období se proliferace buněk udržuje a naopak postupně zintenzivňuje u mezenchymálních buněk dentálního vaku v oblasti budoucího periodontu, což je nejlépe patrné ve stadiu P12. Apoptóza buněk je v těchto obdobích soustředěna do alveolární kosti především v místech alveolárních hřebenů lokalizovaných v erupční zóně zubu, dále podél vnitřního okraje alveolu a v prostotu měkkých tkání nad zubními hrboly (zejména ve stadiu P6).

I v během postnatalního období korespondoval výskyt c-Myb pozitivních buněk s proliferačními zónami vyvíjejícího se zubního zárodku. Nacházely se v oblasti cervikální smyčky (P0 a P2) i HERS (P4 – P12), dále u mezenchymálních buněk zubní

pulpy a dentálního vaku (P0 – P12). c-Myb byl rovněž prokázán i ve zcela diferencovaných funkčních buňkách (ameloblasty, odontoblasty) a to zejména ve stádiích P0 – P8. Od P10 začalo c-Myb pozitivních buněk ubývat, a to zvláště na vrcholech zubních hrbolů, kde dochází k postupné maturaci tvrdých tkání zubu. Ve stádiích P10 a P12 byly c-Myb pozitivní ameloblasty soustředěny výhradně na cervikálním konci zubní korunky v blízkosti cementosklovinné hranice a c-Myb pozitivní odontoblasty pouze v oblasti zubního kořene. c-Myb negativní buňky byly pozorovány v místech apoptózy buněk. V pozdějších stádiích postnatálního vývoje zubu těsně před jeho erupcí dochází k ukončení aktivního růstu zubního kořene a k diferenciaci buněk dentální pulpy i periodontia. Dělení buněk se zastavuje, výrazně se omezuje i produkce c-Myb a to i u diferencovaných ameloblastů, které na vrcholech zubních hrbolů ukončují produkci skloviny a jsou apoptoticky eliminovány. Zajímavé je, že se produkce c-Myb se nadále udržuje v diferencovaných fibroblastech periodontu. Také tyto výsledky podporují možnost uplatnění c-Myb při regulaci metabolismu vápníku během tvorby tvrdých tkání zubu. Role c-Myb v regulaci vápníku byla popsána právě u embryonálních fibroblastů (Bein *et al.*, 1997).

### Závěr

Uvedené výsledky potvrdily, že existuje pozitivní vztah mezi zvýšeným množstvím c-mybu v buňkách a jejich proliferací, zatímco u apoptotických buněk se c-myb nevyskytoval. Navíc c-Myb pozitivní buňky byly v zubním zárodku četnější než PCNA pozitivní buňky, což naznačuje další úlohy c-Myb mimo proliferaci. Přítomnost c-Mybu ve zcela diferencovaných funkčních buňkách zubů (ameloblasty, odontoblasty) a kostí (osteoblasty, osteoklasty) a u fibroblastů během diferenciaci periodontu je zřejmě spojena s dalšími funkcemi c-Myb. Fyziologická role c-Myb během odontogeneze tedy zřejmě zahrnuje nejenom regulaci proliferace a nástup diferenciaci buněk, ale podílí se zřejmě i na tvorbě a homeostáze tvrdých tkání zubu pravděpodobně na úrovni regulace metabolismu vápníku.

### Poděkování

Aktuální základní výzkum odontogeneze je podporován grantem GAAV IAA600450904, buněčná diagnostika GAČR 203/08/1680, aplikovaný výzkum IGA MZ NT11420-6/2010.

### Literatura

- BEIN, K., HUSAIN, M., WARE, A., MUCENSKI, M.L., ROSENBERG, R.D., SIMONS, M. (1997) *c-Myb Function in fibroblasts*, Journal of Cellular Physiology 173, p.319 – 326.
- ESS, K.C, WITTE, D.P., BASCOMB, C.P, ARONOW, B.J. (1999) *Diverse developing mouse lineages exhibit high-level c-Myb expression in immature cells and loss of expression upon differentiation*, Oncogene 18, 1103-1111.
- HWANG, I.K., MOON, S.M., YOO K.Y., LI, H., KWON, H.D., HWANG H.S., CHOI S.K., LEE, B.H., KIM D.J., WON H.M. (2007) *c-Myb immunoreactivity, protein, and mRNA levels significantly increase in the aged hippocampus proper in gebrils*. Neurochem Res 32, 1091-7.
- NESS, S.A. (2003) *Myb protein specificity: evidence of a context-specific transcription factor code*, Blood cells, Molecules and Diseases 31, 192-200.
- SITZMANN, J., NOBEN-TRAUT, K., KLEMPNAUER, K.H. (1995) *Expression of mouse c-myb during embryonic development*. Oncogene 11, 2273-9.

**Kontaktní adresa:** Vlasta Lungová, RNDr., PřF UP Olomouc, Katedra zoologie a antropologie, tř. Svobody 26, 779 00 Olomouc; e-mail: vlasta.lungova@upol.cz.

## Myší třetí molár jako vývojový model fyziologických interakcí mineralizovaných tkání

### The mouse third molar as a developmental model for physiological interactions of mineralised tissues

<sup>1,2</sup>Chlastáková Ivana, <sup>3</sup>Tucker S. Abigail, <sup>4</sup>Radlanski J. Ralf, <sup>1</sup>Doubek Jaroslav, <sup>2</sup>Míšek Ivan, <sup>1,2</sup>Matalová Eva

<sup>1</sup>Department of Physiology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno

<sup>2</sup>Laboratory of Animal Embryology, Academy of Sciences, Brno

<sup>3</sup>Department of Craniofacial Development, King's College, London

<sup>4</sup>Department of Craniofacial Developmental Biology, Freie Universität, Berlin

#### Summary

The mouse first molar (M1) is the most common developmental model in odontogenetic studies. The third molar (M3) is one of the most commonly missing tooth type in humans as well as in mice. Moreover, M1 starts its development prenatally, whereas M3 develops postnatally, therefore under different mineralization stage of the surrounding bone tissue. From this point of view, the mouse M3 may resemble the secondary human dentition. The aim of this study was to evaluate the M3 development with special focus on initial stages, particularly its origin. Methods of molar explants cultures, histochemistry and 3D reconstructions were performed to achieve the goals. The M3 tooth germ was shown to extend out from the epithelium of the second molar (M2). Moreover, the M3 encapsulation into the mineralized bone proceeds at earlier stages than M1, thus making the M3 tooth growth more difficult. Therefore, related processes of bone remodelling on the tooth bone interface are under study.

**Keywords:** third molar; explant cultures; 3D reconstructions

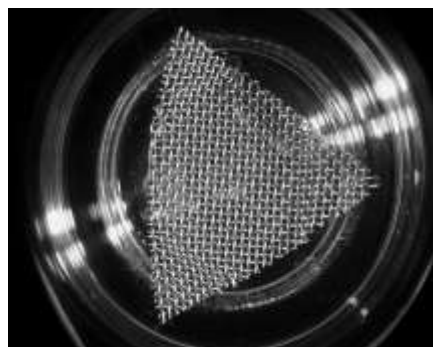
#### Úvod

Myší dentici tvoří jeden řezák a tři moláry v každém čelistním kvadrantu, které jsou od sebe odděleny bezzubou oblastí označovanou jako diastema. Třetí molár je ze všech zubů nejméně prostudovaný a zároveň je zajímavý hned z několika hledisek. Jedná se o zub, který nejčastěji chybí v dentici nejenom u myší, ale také i u lidí. Literární prameny uvádí, že 10-25 % lidské populace se vyznačuje agenezí jednoho nebo více třetích molárů (1). Další zajímavostí myšího M3 je jeho postnatální vývoj, a proto se do určité míry podobá trvalému chrupu člověka. Z hlediska postnatálního vývoje se musí nově vznikající zub integrovat do plně mineralizované kosti. Z tohoto důvodu je vhodným modelem pro studování interakcí v komplexu zub-kost, zejména při srovnání s prvním molárem, jehož vývoj začíná prenatálně.

V této práci jsme se zaměřili na objasnění původu myšího M3, protože informace v této oblasti doposud chyběly. Vhodným přístupem pro sledování fyziologických interakcí jsou explantátové kultury, které navíc splňují zásadu 3R práce s laboratorními zvířaty. Jejich další výhodou je zachování mezibuněčných interakcí, sledování molekulárních komunikací nebo možnost cílené modulace mimo organismus. K zachování podmínek stejných jako v živých organismech jsou explantáty kultivovány v 5% CO<sub>2</sub> atmosféře při teplotě 37 °C za přítomnosti živného média.

### Materiál a metody

**Explantátové kultury:** Mandibulární explantáty byly získány po usmrcení myších mláďat v den narození (P0). Nejprve byla identifikována oblast molárů pod stereoskopem a následně oddělena stopka zubní lišty M2 od zbytku zubního základu M2. Takto oddělená tkáň byla umístěna na podpůrnou mřížku s kulturačním terčíkem do kulturační misky (obr. 1) s živným médiem (DMEM, L-glu, P/S, 10% FBS) a kultivována ve standardní 5% CO<sub>2</sub> atmosféře při teplotě 37 °C po dobu 7 dnů. Ve 24- hodinových intervalech bylo měněno kulturační médium a pořizovány fotografie vyvíjejícího se zubního základu M3.



Obr. 1: Kulturační miska s mřížkou, na kterou se umísťuje explantát

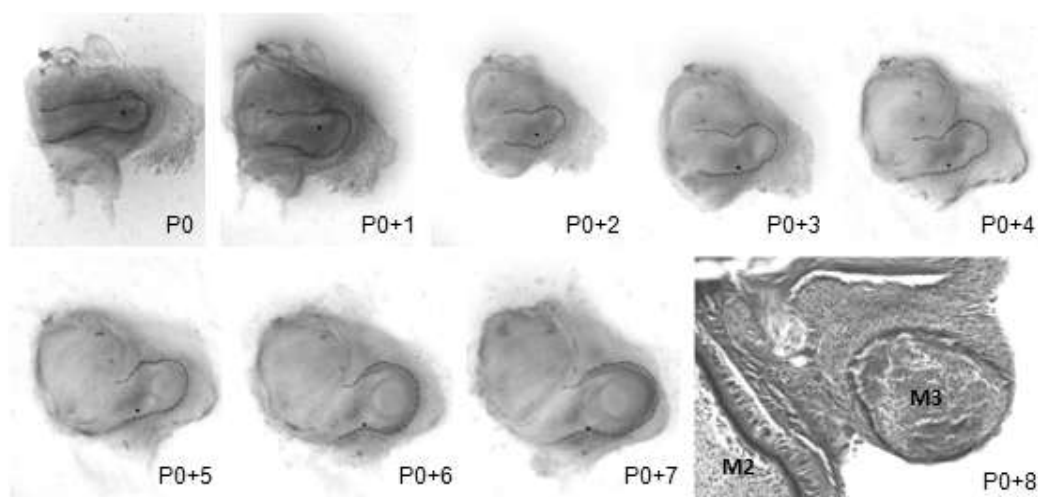
**3D rekonstrukce:** V parafínu fixovaná myší hlava ve stádiu P0 byla použita pro zhotovení sagitálních sériových řezů o tloušťce 7 μm. Tyto řezy byly obarveny hematoxylin-eosinem a použity pro zhotovení 3D rekonstrukcí všech tří myších molárů (obr. 2) počítačovým programem 3D-module software Analysis (SIS-Olympus, Münster, Germany).



Obr. 2: 3D-rekonstrukce všech tří

### Výsledky

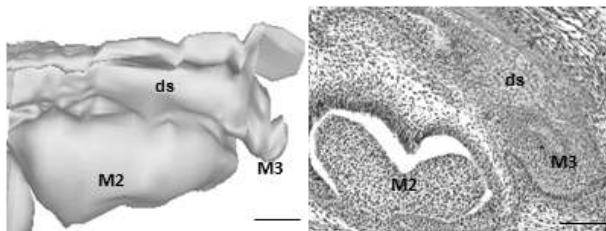
Vývoj myšího M3 je zahájen perinatálně, kdy dochází k vychlipování epitelu dentální stopky druhého moláru linguálním směrem a formování stádia zubního pupene M3. Původ M3 z dentální stopky M2 byl prokázán explantátovými kulturami epitelu zubní lišty M2 s počátkem kultivace v P0. Během kulturační periody (P0+1 – P0+7) docházelo k výraznému růstu dentálního epitelu a bylo možné pozorovat stádia zubního pohárku a zubního zvonku vyvíjejícího se zubu. Po ukončení kultivace byl M3 jasně zřetelný i na histologickém řezu (obr. 3).



Obr. 3: Kultivace M3 po 7 dnů s histologickým preparátem po ukončení kultivace



3D rekonstrukce myších molárů potvrdily původ M3 ze stopky zubní lišty M2, což bylo dobře patrné i na histologických řezech barvených hematoxylinem (obr. 4).



Obr. 4: 3D rekonstrukce (vlevo) a histologický řez (vpravo) M2 a M3

### Diskuse a závěr

Podle výsledků získaných v této práci má myš M3 odlišný počátek vývoje oproti prvnímu moláru (M1), který je nejvíce prozkoumaným modelem v odontogenezi (2). Přes rozdílný počáteční vývoj procházejí zuby stejnými vývojovými stádii a jsou tvořeny stejnými typy tkání (3). Vzhledem k tomu, že se M3 vyvíjí postnatálně, musí dojít k integraci měkkých tkání vyvíjejícího se zubu s kostní tkání plně mineralizované čelisti. Aktuální výzkum navazující na tuto práci se zabývá rozdíly mezi integrací zubního pohárku M1 (růst měkkého zubního základu do dosud nemineralizované kosti) a stejného vývojového stádia M3, který roste do mineralizované kostní tkáně. Pozornost je zaměřena na aktivitu osteoklastů a buněčnou smrt osteoblastů a regulační molekulární mechanismy.

V posledních letech nabývá stále více na významu obor molekulární stomatologie, který se snaží o náhradu zubů z vlastních kmenových buněk pacienta, kdy je třeba měkkou tkáň zubního základu ukotvit do tvrdé tkáně čelisti (4). Z tohoto pohledu je myš M3 velmi vhodným modelem pro studování fyziologických interakcí mineralizovaných tkání a jeho detailnější studie by mohla přispět k hlubšímu porozumění principů integrace zubů a kostí.

### Poděkování

Výzkum interakcí zubů a kostí s klinickými aplikacemi je podporován projektem Ministerstva zdravotnictví MZ OK10/II, NT 11420-6/2010, základní výzkum projektem IAA600450904.

### Literatura

- 1) VASTARDIS, H. The genetics of human tooth agenesis: new discoveries for understanding dental anomalies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000, vol. 117, s. 650-656.
- 2) PETERKOVA, R.; LESOT, H.; VONESCH, J.L.; PETERKA, M.; RUCH, J.V. Mouse molar morphogenesis revisited by three-dimensional reconstruction. I. Analysis of initial stages of the first upper molar development revealed two transient buds. *Int J Dev Biol.* 1996, vol. 40, s. 1009-1016.
- 3) STOCK, D.W.; WEISS, K.M.; ZHAO, Z. Patterning of the mammalian dentition in development and evolution. *Bioessays.* 1997, vol. 19, s. 481-490.
- 4) YEN, A.H.H.; SHARPE, P.T. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res.* 2008, vol. 331, s. 359-372.

**Kontaktní adresa:** Ivana Chlastáková, MVDr., Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ivanachlastakova@seznam.cz



# **SEKCE 9**

*Patobiologie*



## Studie "patogenního" nálevníka *Balantidium coli* u lidoopů s důrazem na jeho hostitelskou specifitu

### A survey of „pathogenic“ ciliate *Balantidium coli* in great apes with emphasis on the host specificity

<sup>1</sup>Pomajbíková Kateřina, <sup>2</sup>Petrželková Klára J., <sup>1</sup>Petrášová Jana,  
<sup>1</sup>Růžicová Magdalena, <sup>1,2</sup>Profousová Ilona, <sup>3</sup>Oborník Miroslav, <sup>1,3</sup>Modrý David

<sup>1</sup>Ústav patol. morfologie a parazitologie, FVL, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Ústav biologie obratlovců, AV ČR, Brno

<sup>3</sup>Parazitologický ústav, AV ČR, České Budějovice

#### Summary

*Balantidium coli* is a ciliate reported in many mammalian species including great apes. In the present study, we carried out a large study of *B. coli* in captive and wild African apes. In total, 1,161 fecal samples were examined from 28 captive facilities in Europe, plus 2 sanctuaries and 11 wild sites in Africa. There was recorded the discrepancies between captivity and wild nature. Whereas *B. coli* was not detected in any wild-ape population, 53 % prevalence was recorded in captive individuals. Samples were analyzed with the use of Sheather's flotation and merthiolate-iodine-formaldehyde (MIFC) sedimentation. MIFC was the more sensitive technique for diagnostics of *B. coli* trophozoites in apes. We calibrated the new technique FLOTAC® for diagnostics of *B. coli* in chimpanzees which includes the qualitative and quantitative approaches. Almost 300 samples were analyzed for the calibration and based on statistical analysis optimal flotation solution was established. Finally, the large set of fecal samples of apes and other mammals has afforded us to study the host specificity of *B. coli* with using of molecular analyses based on two gene makers: 18S rDNA and ITS region. The present results show that the host specificity of *B. coli* is relatively wide.

**Keywords:** *Balantidium coli*; great apes; MIFC sedimentation; FLOTAC; host specificity

#### Úvod

*Balantidium coli* je kosmopolitně rozšířený střevní nálevník mnoha druhů savců, včetně primátů a člověka (Schuster & Ramirez-Avila, 2008). V rodě *Balantidium* bylo u primátů popsáno 7 druhů, přesto jsou všechny nálezy balantidia u primátů uváděny jako *B. coli*. Nicméně hostitelská specifita *B. coli* není doposud objasněná.

*B. coli* se u lidoopů v zajetí vyskytuje často a jako asymptomatické infekce (např. Myers & Kuntz, 1972). Přesto byly popsány případy klinické balantidiózy u šimpanzů i goril (např. Lankester a kol., 2008). U jedinců ve volné přírodě bylo *B. coli* zachyceno pouze ve Středoafričské republice a Tanzánii (Freeman a kol., 2004; Bakuza & Nkwengulila, 2009).

Pro objasnění diskrepance výskytu *B. coli* mezi lidoopy v zajetí a ve volné přírodě, jsme provedli rozsáhlou studii. Byla zoptimalizovaná rutinní diagnostika *B. coli* a pro stanovování intenzit infekcí byla zkalibrována metoda FLOTAC. Pro ujasnění hostitelské specifity *B. coli* byly použity pozitivní vzorky lidoopů a prasat.

#### Materiál a metodika

**Studie výskytu *B. coli*:** Vzorky byly získány od lidoopů z 28 Evropských zoo, 2 rehabilitačních center a z 11 lokalit v Africe (přehled uveden v publikaci Pomajbíková a

kol., 2010). Bylo vyšetřeno 326 vzorků trusu od jedinců v zajetí a 834 vzorků z volné přírody. Vzorky byly fixovány 10% formalínem, vyšetřeny Sheatherovaou flotací a mertiolát-jód-formaldehydovou (MIFC) sedimentací a prohlédnuty ve světelném mikroskopu (zvětšení 200-1000×). Citlivost obou metod pro záchyt trofozoitů byla statisticky hodnocena McNemarovým testem v programu STATISTICA ver. 8.0.

*Kalibrace metody FLOTAC:* Bylo použito 7 vzorků šimpanzů pozitivních pro *B. coli*. Kalibrace byla provedena dle protokolu v manuálu Prof. Cringoliho. Každý vzorek vážil 40g, byl fixován ve 120 ml 10% formalínu a 6× kvantifikován. Vhodný flotační roztok byl vybrán na základě statistických analýz (GLM repeated measures ANOVA, Tukey post-hoc test).

*Studium hostitelské specifity:* Byly použity vzorky trusu fixované 96% etanolem od lidoopů, ostatních primátů a prasat. Pro zhodnocení specifity byly vybrány dva genové markery: 18S rDNA a region ITS1-5.8SrRNA-ITS2. Celková DNA byla izolována komerčním kitem a pro amplifikaci byl použit MasterMix. Amplikony byly zaslány pro sekvenaci do firmy Macrogen. Sekvence byly porovnány se sekvencemi v GenBanku, zalínovány (Clustal X) a fylogeneticky zpracovány (maximum parsimony, maximum likelihood, etc. v programu PAUP\*, Phylip, TreePuzzle, etc.).

## Výsledky

*Studie výskytu B. coli:* Trofozoiti byli identifikováni na základě morfologie (50-150 μm, ovoidní tvar, etc.). Přítomnost byla zaznamenána s 53% prevalencí v zajetí, naopak ve volné přírodě nebylo zaznamenáno vůbec. *B. coli* bylo registrováno ve 30 skupinách, přičemž v 8 z nich byla zaznamenána 100% prevalence a 9-95 % prevalence ve zbývajících 22 ( $Q_{0,5}=67$ ;  $Q_{0,25}=40$ ;  $Q_{0,75}=95$ ). MIFC je citlivější pro záchyt trofozoitů (z 326 vzorků trusu MIFC zachytila 164 pozitivních a flotace 98 ;  $\chi^2=52.81$ ,  $P \ll 0.01$ ).

*Kalibrace metody FLOTAC:* Vyhodnocením počtů trofozoitů u jednotlivých vzorků byl vybrán nejvhodnější flotační roztok a to síranu zinečnatého ( $\rho=1.2$ ).

*Studium hostitelské specifity:* Topologie fylogenetických stromů jak 18S rDNA tak ITS regionů je velmi podobná. 18S rDNA vytvořila dvě dobře podpořené skupiny *B. coli* (distance 99, 100): (i) sekvence z lidoopů a prasata, (ii) sekvence z ostatních primátů. ITS regiony vytvořily tři dobře podpořené skupiny *B. coli* (distance 94, 100, 97): (i) sekvence z lidoopů a volně žijících prasat, (ii) sekvence z prasat domácích a (iii) sekvence z ostatních primátů.

## Diskuse

Ačkoliv *B. coli* bylo opakovaně zaznamenáno u primátů v zajetí (např. Levecke a kol., 2007), u volně žijících lidoopů bylo registrováno pouze 3 studii (Lilly a kol., 2002; Freeman a kol., 2004; Bakuza & Nkwengulila, 2009). My jsme *B. coli* ve volné přírodě nezaznamenali vůbec, přestože bylo vyšetřeno více než 800 vzorků trusu. Na základě našich výsledků a nedostatku záznamů z předchozích studií, se domníváme, že Afričtí lidoopi nejsou přirozeným hostitelem *B. coli*. Pro tento fakt máme dvě vysvětlení: (i) infekce lidoopů v zajetí jsou dány zvýšeným kontaktem s rezervoáry (prase, člověk) a (ii) složení diety pro lidoopy v zajetí je příznivější pro přežívání balantidia. Vztah mezi výživou hostitele a *B. coli* byl již diskutován v několika málo studiích, z nichž vyplývá, že by počty trofozoitů mohly pozitivně korelovat s množstvím škrobu v potravě hostitele (např. Schumaker, 1930). Tato skutečnost byla prokázána u šimpanzů v zajetí

(Schovancová, in prep). Prasata jsou všeobecně považována za rezervoár v epidemiologii *B. coli*, který vylučuje jeho cysty do prostředí, zatímco u lidoopů jsou v trusu detekovány trofozoiti. Tento fakt spolu s předběžnými výstupy z fylogenetických analýz, taktéž podporuje hypotézu o lidoopech jako náhodných hostitelích *B. coli*. Avšak další studium hostitelské specifity je nezbytné. Diagnostika *B. coli* je založena na demonstraci cyst nebo trofozoitů v trusu hostitele. V naší studii jsme prokázali, že sedimentace MIFC je citlivější pro záchyt trofozoitů u lidoopů. Nicméně flotace je rutinně používanou metodou pro diagnostiku dalších parazitů a tudíž doporučujeme u lidoopů kombinaci obou metod pro detekci co nejširšího spektra parazitů. Metoda FLOTAC je prozatím využívána pro potřeby kvantifikace trofozoitů v experimentech.

### Závěr

Naše studium nálevníka *B. coli* je prozatím na začátku, přesto odkrývá zapomenuté i neznámé aspekty nezbytné pro pochopení jeho epidemiologie a patogenního působení u lidoopů v zajetí. Tyto poznatky bude zřejmě možné aplikovat i na člověka.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena grantovými projekty od GAČR (524/06/0264 a 206/09/0927), Leakyho nadace, GAAV ČR (KJB600930615) a Hlávkovy nadace. Tato práce by nemohla vzniknout bez spolupráce všech zoologických zahrad, záchranných center a mnoha projektů v Africe.

### Literatura

- BAKUZA, J. S.; NKWENGULILA, G. Variation over time in parasite prevalence among free-ranging chimpanzees at Gombe National Park, Tanzania. *International Journal of Primatology*. 2009, vol. 30, s 43-53.
- FREEMAN, A. S.; KINSELA, J. M.; CIPOLLETA, C.; Deem, S. H.; Karesh, W. B. Endoparasites of Western Lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*) at Bai Hokou, Central African Republic. *Journal of Wildlife Diseases*. 2004, vol. 40, s 775-781.
- LANKESTER, F.; MÄTZ-RENSING, K.; KIYANG, J.; JENSEN, S. A.; WEISS, S.; LEENDERTZ, F. H. Fatal ulcerative colitis in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). *Journal of Medical Primatology*. 2008, vol. 37, s 297-302.
- LEVECKE, B.; DORNY, P.; GEURDEN, T.; VERCAMMEN, F.; VERCRUYSSSE, J. Gastrointestinal protozoa in non-human primates of four zoological gardens in Belgium. *Veterinary Parasitology*. 2007, vol. 148, s 236-246.
- LILLY, A. A.; MEHLMAN, P. T.; DORAN, D. Intestinal parasites in gorillas, chimpanzees, and humans at Mondika Research Site, Dzanga-Ndoki National Park, Central African Republic. *International Journal of Primatology*. 2002, vol. 23, s 555-573.
- MYERS, B. J.; KUNTZ, R. E. A checklist of parasites and commensals reported for the chimpanzee (*Pan*). *Primates*. 1972, vol. 13, s 433-471.
- POMAJBÍKOVÁ, K.; PETRŽELKOVÁ, K. J.; PROFOUSOVÁ, I.; PETRÁŠOVÁ J.; MODRÝ, D. Discrepancies in the occurrence of *Balantidium coli* between wild and captive African great apes. *Journal of Parasitology*. 2010, vol. 96, s 1139-44.
- SCHUMAKER, E. *Balantidium coli*. Host specificity and relation to the diet of an experimental host? *American Journal of Epidemiology*. 1930, vol. 25, s 384.
- SCHUSTER, F. L.; RAMIREZ-AVILA, L. Current world status of *Balantidium coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2008, vol. 26, s 626-638.

**Kontaktní adresa:** Kateřina Pomajbíková, MVDr., Ústav patol. morfologie a patologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno; kpomajbik@gmail.com.

## Vliv perorální dotace různých forem zinku na sliznici bachoru kůzlat - morfometrická studie

### The effects of the per oral supplementation of different forms of zinc on ruminal mucosa of kids- morphometric study

<sup>1</sup>Černík Julius, <sup>1</sup>Pechová Alena, <sup>1</sup>Pavlatá Leoš, <sup>1</sup>Halouzka Roman,  
<sup>1</sup>Jokverová Olga, <sup>1</sup>Mišurová Lubica, <sup>2</sup>Luňáček Jiří

<sup>1</sup>Fakulta veterinární medicíny, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Fakulta obchodu a managementu, VUT, Brno

#### Summary

*The submitted article is a part of the experiment, which aim was finding and comparing of effects of the addition of zinc in different forms (the anorganic and the organic form) in the feeding ration for the intensity of the grow, the quality of the meat and its distribution in the organism of kids. The filling of this article is the finding of the activity of different forms of additioned zinc for the ruminal mucosa and dimensions of ruminal papillae, especially for the intensity of the keratinization of the epitel of ruminal papillae.*

*The changes of the ruminal papillae epitel were observed in kids fed by the diet enriched by zinc for four months. All kids were fed by the same feed ration consisting of the hay (ad libitum) and the granulated feed mixture in the dose of 300g/animal/day. The natural content of zinc in the granulated feed mixture was 40 mg/kg, and for the experimental groups, the mixture was supplemented with 60 mg/kg of zinc in the corresponding form. The experimental group B received zinc in the form of ZnO, the experimental group C received zinc in the form of chelate and the experimental group D received zinc in the form of lactate. The group A was a control group without additional supplementation of zinc.*

*The histopathologic and the morphometric findings showed (after the comparing between the experimental and the control groups) the shorting of ruminal papillae with the low grade of hyperkeratosis in the groups supplemented by anorganic zinc and the higher grade of hyperkeratosis in groups supplemented by organic zinc. The lenght of ruminal papillae corresponded and exceeded this dimension in the control group.*

**Keywords:** forestomach; goat; inorganic zinc; morphometry; organic zinc; ruminal epithelium

#### Úvod

Bachor vystylá sliznice krytá vrstevnatým dlaždicovým, značně zrohovatěným epitelem. Na povrchu má sliznice papily jazýčkovitého tvaru, vysoké 3-13 mm a široké 1-3 mm, které výrazně zvyšují plochu bachorového epitelu (Hofmann and Schnorr, 1982; Jelínek, 1995; Frappier, 2006). Morfologický status bachorové sliznice souvisí s koncentrací těkavých mastných kyselin (TMK), zejména kyseliny máselné a propionové. Je charakterizován procesem kontinuálních změn, probíhajících od regrese až po proliferaci. Mimo již výše uvedených faktorů ovlivňujících morfologický a fyziologický vývoj předžaludku jsou studovány také další faktory - včetně vlivu mikroprvků. Patří k nim kobalt, selen, měď a také zinek.

Zinek se přidává s ostatními stopovými prvky do krmných směsí pro přežvýkavce a prasata za účelem stimulace růstu a zabezpečení dobrého zdravotního stavu a užitkovosti. Dotuje se v různých anorganických i organicky vázaných formách a je ve veterinární i humánní medicíně využíván také v souvislosti s jeho účinky



antibakteriálními (Puchala et al. 1999; Pechova et al., 2009). Naším hypotetickým předpokladem byl intenzivnější vývoj papil bachorové sliznice u skupin dotovaných zinkem. Cílem práce je srovnání účinků perorální dotace různých forem zinku na sliznici bachoru a rozměry bachorových papil s přihlédnutím k intenzitě keratinizace bachorových papil.

### **Materiál a metody**

Do pokusu, který byl realizován v akreditovaných stájích Kliniky chorob přežvýkavců VFU Brno, bylo zařazeno 20 kůzlat plemene koza bílá krátkosrstá, která byla rozdělena do 4 skupin po 5 zvířatech. Všechna kůzlatka byla krmena stejnou krmnou dávkou zahrnující seno (*ad libitum*) a granulovanou krmnou směs v dávce 300g/zvíře/den, která se lišila obsahem a formou přidaného zinku. Přirozený obsah zinku v sušině krmné dávky kůzlat skupiny kontrolní (A – zinkem nedotované) byl 40 mg/kg. Granulovaná krmná směs skupin experimentálních byla obohacena různými formami zinku tak, aby celkový obsah zinku v sušině krmné dávky byl 60 mg zinku/kg sušiny. Skupina B dostávala krmnou směs obohacenou zinkem ve formě ZnO, skupina C ve formě chelátu zinku a skupina D ve formě laktátu zinku. Pokus trval 4 měsíce - od odstavu kůzlat ve věku cca 2 měsíců do jejich odporažení v šesti měsících věku. Kůzlatka byla odporažena standardním způsobem na jatkách.

Odběr a zpracování vzorků pro histopatologické a morfometrické vyšetření:

Vzorky pro histopatologické a morfometrické vyšetření byly odebírány po odporažení pokusných zvířat z bachoru ze dna *saccus ruminis ventralis* v úrovni odstupu *omentum majus*. Velikost vzorků byla cca 1 x 1 x 0,5 cm. Po odběru byla tkáň fixována po dobu 72 hodin v 10% formalínu. Pak byly vzorky zpracovány běžnou parafínovou metodou, obarveny hematoxylin-eozinem (Clark, 1981) a vyhodnoceny pod světelným mikroskopem.

Histopatologické preparáty z bachoru byly dále proměřovány morfometrickou metodou obrazové počítačové analýzy *Soft Imaging System Cell F - Imaging Software for Life Science Microscopy*, *OLYMPUS Soft Imaging Solutions*. V každém řezu byly proměřovány tři papily v pěti parametrech: délka papily, šířka papily, síla epitelu, síla *stratum corneum* od externího konce *stratum lucidum* po papilární povrch a úroveň keratinizace na povrchu papil.

### **Výsledky**

Dotace organického zinku měla za následek výraznější růst papil, zesílení epitelu a *stratum corneum* a též výraznější úroveň keratinizace. Dotace zinku ve formě ZnO měla za následek mírné rozšíření papil a nízkou keratinizací. Statisticky významné rozdíly, získané pomocí Studentova t- testu byly zjištěny při srovnání délky papil bachorové sliznice mezi skupinami B a C ( $p = 0,03$ ) a B a D ( $p = 0,04$ ), při srovnání šířky papil bachorové sliznice mezi skupinami A a D ( $p = 0,02$ ) a při srovnání intenzity keratinizace epitelu sliznice bachorových papil mezi skupinami A a B ( $p = 0,03$ ), A a C ( $p = 0,04$ ) a A a D ( $p = 0,001$ ).

### **Diskuse a závěr**

Z uvedeného vyplývá, že z morfologického hlediska byla vhodnější dotace anorganického zinku. Délka a šířka papil jsou v normě, (Hofmann a Schnorr, 1982; Jelínek, 1995), i když třeba délkou nepřevyšují kontrolní ani další pokusné skupiny.

Srovnáním pokusné skupiny B s kontrolní skupinou A byla zjištěna slabší úroveň keratinizace, což vytváří možný předpoklad lepšího využití dotovaného zinku ve formě ZnO. U obou skupin dotovaných zinkem organicky vázaným byl zjištěn výrazný růst papil do délky, ale zároveň vysoký stupeň keratinizace. Toto by svědčilo o horší využitelnosti dotovaného zinku v organické formě.

#### **Poděkování**

Studie byla finančně podpořena projektem MSM6215712403.

#### **Literatura**

CLARK, G. General Methods, 23- 25, 36- 37. In: Clark, G.(ed.): Staining procedures. Williams + Wilkins, Baltimore, USA. 1981, 512 pp

FRAPPIER, B.L. Digestive system, 189- 194. In: EURELL, J., FRAPPIER, B.L. (ed.): Dellmanns Textbook of Veterinary Histology. Blackwell Publishing. 2006, 405 pp

HOFMANN, R.R., SCHNORR, B. Die funktionelle Morphologie des Wiederkäuer- Magens, 6-110. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. 1982, 170 pp

JELINEK, K. Development dynamics of the caprine forestomach in the postnatal period. Acta veterinaria Brno. 1995, no. 64, s. 49-61

PECHOVA, A., MISUROVA, L., PAVLATA, L., DVORAK, R. The influence of supplementation of different forms of zinc in goats on the zinc concentration in blood plasma and milk. Biological trace element research. 2009, no. 132, s. 112-121

PUCHALA, R., SAHLU, T., DAVIS, J.J. Effects of zinc-metionine on performance of Angora goats. Small ruminant research. 1999, no. 33, s. 1-8

**Kontaktní adresa:** Julius Černík, MVDr., Ústav patologické morfologie a parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, cernikj@vfu.cz

## Výskyt původců virových gastroenteritid (rody *Norovirus*, *Sapovirus*, *Kobuvirus*) v chovech prasat v České republice

### The occurrence of viral agents of gastroenteritis (the genera *Norovirus*, *Sapovirus*, *Kobuvirus*) in pig farms in the Czech Republic

Dufková Lucie, Kulich Pavel, Prodělalová Jana

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

#### Summary

The objective of the study was to determine the presence of porcine noroviruses and sapoviruses in faecal samples collected on Czech pig farms. A total of 251 faecal samples from piglets showing symptoms of diarrhoea (group 1), collected between 2005 and 2010, were examined by electron microscopy. The faecal samples from 139 pigs of various ages with and without diarrhoea (group 2), collected between 2009 and 2010, were tested by reverse transcription-PCR (RT-PCR) assay using primers designed to detect both norovirus and sapovirus. Only one sample from group 1 showed characteristic sapovirus morphology. Presence of sapovirus in the positive sample was confirmed by RT-PCR. In group 2 noroviruses and sapoviruses were not detected, but we found porcine kobuvirus. We tested 80 faecal samples from collection 2 by RT-PCR using generic kobuvirus primers and 70 (87,5%) samples were found positive to kobuvirus RNA. To the best of our knowledge, this is the first report indicating the occurrence of porcine sapovirus and kobuvirus in pigs in the Czech Republic.

**Keywords:** norovirus; sapovirus; kobuvirus; gastroenteritis; pig

#### Úvod

Do skupiny malých nebalených virů s jednořetězcovou RNA pozitivní polarity patří řada původců gastroenteritid lidí a zvířat. Zástupci rodů *Norovirus*, *Sapovirus* (čeleď *Caliciviridae*) a *Kobuvirus* (čeleď *Picornaviridae*) jsou potenciální původci gastroenteritid prasat (1,2).

Prasečí noroviry jsou detekovány převážně u prasat starších třech měsíců bez klinických příznaků (1). V Evropě se prevalence pohybuje v rozmezí 1,2 - 5,8%, v Severní Americe však dosahuje až 20%, naopak v rámci studií provedených v Itálii a Venezuele nebyla norovirová RNA detekována vůbec (3).

Sapoviry se vyskytují jak u prasat s příznaky gastroenteritidy, tak u prasat bez klinických příznaků různých věkových kategorií (1). V Evropě se výskyt sapovirů pohybuje v rozmezí 1,6% - 49,1%, nejvyšší prevalence byla zjištěna v Dánsku. V Severní Americe byly sapoviry diagnostikovány až v 85% vyšetřovaných chovů (4).

Prasečí kobuviry se vyskytují zejména u prasat bez klinických příznaků. Nedávná studie však popisuje, že kobuviry lze považovat za původce gastroenteritid u prasat. Kobuviry byly detekovány v Číně, Maďarsku, Japonsku, Jižní Koreji a v Thajsku, prevalence se pohybovala v rozmezí 30% - 99% (2).

V České republice nebyl doposud výskyt těchto virů sledován. Cílem příspěvku je informovat o výsledcích studie monitorující výskyt norovirů a sapovirů v chovech prasat v České republice, včetně prvního průkazu prasečího sapoviru a kobuviru.

## Materiál a metody

V rámci studie byly analyzovány dva soubory vzorků. V prvním souboru bylo zahrnuto 251 vzorků výkalů selat (stáří 3-90 dnů) s příznaky průjmu, které byly v průběhu let 2005 až 2010 zasílány do Laboratoře elektronové mikroskopie VÚVeL Brno. Vzorky byly vyšetřovány transmisivním elektronovým mikroskopem (Philips EM 208), metodou negativního barvení 2% molybdenanem amonným. Vzorky obsahující virové částice s charakteristickou kalicivirovou morfologií byly dále testovány na přítomnost norovirové a sapovirové RNA metodou RT-PCR. Druhá skupina obsahovala celkem 139 vzorků výkalů prasat různých věkových kategorií odebraných na třech farmách v letech 2009 až 2010. Tyto vzorky byly vyšetřeny metodou RT-PCR se specifickými primery.

K detekci norovirů a sapovirů byl použit pár primerů p290/289 odvozený od nejvíce konzervativní oblasti genomu kódující RNA polymerázu, který umožňuje současně detekovat oba rody (1). Pro potvrzení příslušnosti k rodu *Sapovirus* byl dále použit pár primerů CapsidF/R odvozený od části genu pro kapsidový protein (5). Kobuviry byly detekovány pomocí specifických primerů pro rod *Kobuvirus* (UNIV-kobu-F/R), které zaměřují oblast 3D proteinu (2). RT-PCR byla provedena ve dvou krocích. Amplifikační produkty byly analyzovány v 1% agarózovém gelu a vizualizovány po obarvení ethidium bromidem pod UV světlem. Amplifikované fragmenty byly purifikovány a zaslány k sekvenování (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Německo). Získané sekvence byly upraveny v programu BioEdit verze 5.0.9. a srovnány se známými sekvencemi dostupnými v GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Fylogenetická analýza sekvencí byla provedena pomocí shlukové analýzy (nevážená párová metoda aritmetických průměrů) v 1000 replikacích programu MEGA verze 4.0.

## Výsledky

V rámci prvního souboru 251 vzorků byly v květnu 2010 zjištěny u jednoho vzorku virové částice s typickou morfologickou strukturou charakterizovanou kalíškovitými prohlubněmi, odpovídající virionům sapovirů. Na základě výsledků RT-PCR s párem primerů CapsidF/R a analýzy nukleotidové sekvence amplifikovaného fragmentu byl český izolát P1884/2 zařazen do rodu *Sapovirus*. Fylogenetická analýza částečné sekvence genu kódující virový kapsidový protein zařadila izolát P1884/2 do genoskupiny GIII. Nejvyšší sekvenční homologie (93%) byla zjištěna s izolátem JB-GC155/Korea, který byl detekován v roce 2005 ve výkalech průjmujícího selete v Jižní Koreji. Fylogenetická analýza částečné sekvence genu pro RNA polymerázu však umístila český izolát do genoskupiny GVII, kde byla zjištěna nejvyšší sekvenční homologie (88%) s izolátem LL26/US, který byl detekován v roce 2002 ve výkalech zdravého selete. Ve druhé skupině 139 vzorků nebyl metodou RT-PCR detekován žádný zástupce rodů *Norovirus* a *Sapovirus*. Při sekvenační analýze amplifikovaných produktů o přibližné velikosti 330 bp jsme detekovali u jednoho vzorku rod *Kobuvirus*. Pár primerů p290/289 zaměřující oblast kódující RNA polymerázu kalicivirů detekuje také 3C/3D oblast kobuvirů. Z druhé skupiny vzorků jsme vyšetřili 80 vzorků RT-PCR se specifickými primery pro rod *Kobuvirus* (UNIV-kobu-F/R) a 70 (87,5%) z 80 vzorků bylo pozitivních. Nukleotidové sekvence amplifikovaných fragmentů dvou vzorků jsme podrobili fylogenetické analýze, potvrzující, že oba izoláty P102/10/CZ a P119/10/CZ patří do rodu *Kobuvirus* a jedná se o prasečí kobuviry. České izoláty vytvořily samostatnou skupinu, podobně jako izoláty maďarské, korejské a thajské.

## Diskuse

Z výsledku analýzy 251 vzorků vyšetřených elektronovou mikroskopií můžeme usuzovat, že noroviry ani sapoviry nejsou v českých chovech prasat významně rozšířeny. Přestože negativní nález z elektronového mikroskopu nelze považovat za absolutní diagnózu vzhledem k nízkému detekčnímu limitu, nízká pozitivita byla potvrzena negativními výsledky v souboru 139 vzorků pomocí RT-PCR. Rozdílné výsledky fylogenetické analýzy částečné sekvence genu pro RNA polymerázu a kapsidový protein izolátu P1884/2 naznačuje, že byl detekován rekombinantní kmen. Rekombinace je u RNA virů běžnou záležitostí. U norovirů a sapovirů vznikají rekombinantní kmene jak v rámci jedné genoskupiny tak mezi různými genoskupinami (1). Nemůžeme ale zcela vyloučit možnost koinfekce dvěma odlišnými sapovirovými kmene. Tato možnost je však vzhledem ke zjištěné velmi nízké prevalenci sapovirů v českých chovech prasat nepravděpodobná.

Vysoká míra detekce prasečích kobuvirů v českých chovech prasat je v souladu s výsledky studií provedených v Thajsku a Maďarsku, kde prevalence byla 99% a 65% (2). Fylogenetická analýza odlišila české izoláty P102/10/CZ a P119/10/CZ od ostatních izolátů z různých geografických oblastí.

## Závěr

Na základě dostupných informací se jedná o první práci popisující záchyt sapoviru a kobuviru v chovech prasat v České republice. Vzhledem k tomu, že v současné době jsou tyto enterální viry detekovány v chovech prasat v mnoha zemích světa, dá se předpokládat jejich celosvětový výskyt.

## Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV QH81061 a AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.006, ED006/01/01.

## Literatura

1. L'HOMME, Y. et al. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-2007. *Archives of Virology*. 2009, vol. 154, no. 4, s. 581-593.
2. REUTER, G. et al. Kobuviruses – a comprehensive review. *Reviews in Medical Virology*. 2010, vol. 21, no. 1, s. 32-41.
3. MIJOVSKI, J.Z. et al. Detection and molecular characterisation of noroviruses and sapoviruses in asymptomatic swine and cattle in Slovenian farms. *Infection, Genetics and Evolution*. 2009, vol. 10, no. 3, s. 413-420.
4. REUTER, G. et al. Incidence, diversity, and molecular epidemiology of sapoviruses in swine across Europe. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, vol. 48, no. 2, s. 363-368.
5. KIM, H.J. et al. Detection and molecular characterization of porcine enteric calicivirus in Korea, genetically related to sapoviruses. *Journal of Veterinary Medicine*. 2006, vol. 53, no. 4, s. 155-159.

**Kontaktní adresa:** Lucie Dufková, MVDr., Oddělení Virologie a diagnostiky, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Hudcova 70, 621 00 Brno, dufkovaL@vri.cz

## **Stanovení specifických protilátek proti viru bluetongue u volně žijících přežvýkavců v České republice (2010-2011)**

### **Detection of bluetongue virus specific antibodies in wild ruminants in the Czech Republic (2010-2011)**

Šperlová Adéla, Zendulková Dagmar

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno*

#### **Summary**

*Bluetongue (BT) is an infectious non-contagious viral disease of domestic and wild ruminants transmitted by *Culicoides* biting midges. The disease is caused by an orbivirus of the family *Reoviridae*, with 24 serotypes of the bluetongue virus (BTV-1 to BTV-24) being recognized at present. Clinical signs are usually detected in fine-wool breeds of sheep and white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). 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 specific antibodies against BTV in wild ruminants living in the territory of the Czech Republic. Since 2010 to 2011, a total of 195 samples of blood sera or full blood (with EDTA) of eight different wild ruminant species were examined for the presence of group-specific antibodies against BT virus by the ID Screen Bluetongue Competition ELISA kit (ID.Vet, France). Until now all samples collected in 2010-2011 were negative. Our results indicate that at present role of played by wild ruminants in the epidemiology of BT in the Czech Republic is minimal.*

**Key words:** *bluetongue; wild ruminants; ELISA; antibodies*

#### **Úvod**

Bluetongue (BT), neboli katarální horečka ovcí, je infekční, avšak nekontagiózní onemocnění domácích i volně žijících přežvýkavců přenášené tiplíky rodu *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*). Původcem onemocnění je Orbivirus z čeledi *Reoviridae*, do dnešního dne bylo popsáno 24 sérotypů viru BT (BTV-1 až BTV-24). Klinické příznaky onemocnění se rozvíjejí nejčastěji u ovcí a jelence běloocasého. Bluetongue není přenosný na člověka, avšak toto onemocnění vede k přímým a především nepřímým ekonomickým ztrátám. V roce 2006 se BTV-8 zcela nečekaně objevil 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. Díky povinné plošné vakcinaci domácích přežvýkavců, která začala v r. 2008, se nákazová situace na našem území konsolidovala a vakcinace ovcí a koz je v současnosti již na dobrovolné bázi. U volně žijících přežvýkavců, možného rezervoáru BTV, však pochopitelně vakcinace prováděna není a nebyla. Jejich role v epizootologii BT v ČR není známá, a proto od r. 2008 sledujeme, zda v populaci našich volně žijících přežvýkavců původce této nákazy cirkuluje. V tomto příspěvku prezentujeme incidenci BT u volně žijících přežvýkavců v období 2010-2011.

#### **Materiál a metodika**

**Odběr vzorků:** V období 2010-2011 jsme získali 195 vzorků krevních sér či plné krve (s EDTA) od volně žijících přežvýkavců (druhově a početní zastoupení je uvedeno v tab.). Vzorky nám poskytl prof. Jiří Lamka z Farmaceutické fakulty Univerzity

Karlovy v Hradci Králové, Střední lesnická škola ve Žluticích a myslivecká sdružení z různých oblastí ČR.

**Zpracování vzorků:** Krevní séra byla až do doby vyšetření uchovávána při  $-18^{\circ}\text{C}$ . Plná krev s EDTA byla odstředěna při 1 500 otáčkách/min po dobu 10 min, plazma byla poté odpipetována a uložena do mrazničky s teplotou  $-18^{\circ}\text{C}$ .

**Sérologické vyšetření:** Vzorky krevního séra nebo plazmy byly vyšetřeny komerčně dodávaným kompetitivním ELISA kitem (Bluetongue Competition, ID.Vet, Francie) pro průkaz skupinově-specifických protilátek proti proteinu VP7 viru BT.

Tabulka 1: Druh a počet vyšetřovaných zvířat

Druh	Počet
Muflon ( <i>Ovis aries musimon</i> )	60
Daněk evropský ( <i>Dama dama</i> )	46
Srnec obecný ( <i>Capreolus capreolus</i> )	34
Jelen lesní ( <i>Cervus elaphus</i> )	24
Sika ( <i>Cervus nippon nippon</i> )	24
Koza bezoárová ( <i>Capra aegagrus</i> )	5
Paovce hřivnatá ( <i>Ammotragus lervia</i> )	1
Jelen milu ( <i>Elaphurus davidianus</i> )	1

### Výsledky

Všechny vzorky sér i krevní plazmy byly sérologicky negativní.

### Diskuse a závěr

Volně žijící přežvýkavci jsou vnímaví k infekci BTV a mohou sloužit jako jsou potenciální rezervoár této nákazy. V Evropě byl dosud BT podle dostupných literárních údajů prokázán 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; Lorca-Oró et al., 2010), u jelenů lesních a jaků domácích v Belgii (Mauroy et al., 2008; Linden et al., 2010) a u jelenů lesních, srnců obecných a kamzíků středozemních ve Francii (Rossi et al., 2010). Této problematice je na Ústavu infekčních chorob a mikrobiologie FVL VFU Brno věnována od roku 2008 intenzivní pozornost. Od té doby zde bylo sérologicky vyšetřeno 555 vzorků pocházejících z volně žijících přežvýkavců. Seropozitivita byla zatím prokázána u jediného vzorku, odebraného na konci r. 2009 (Šperlová & Zendulková, 2010). Tento vzorek byl však virologicky negativní. Na základě námi dosažených výsledků se nálezová situace z pohledu BT 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.

**Použitá 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.

HENRICH, M.; REINACHER, M.; HAMANN, H.P. Lethal bluetongue virus infection in an alpaca. *Vet Rec.* 2007, 161(22):764.

LINDEN, A.; GRÉGOIRE, F.; NAHAYO, A.; HANREZ, D.; MOUSSET, B.; MASSART, L.; DE LEEUW, I.; VANDEMEULEBROUCKE, E.; VANDENBUSSCHE, F.; DE CLERCK, K. Bluetongue virus in wild deer, Belgium, 2005-2008. *Emerg Inf Dis.* 2010, 16 (5): 833-836.

LORCA-ORÓ, C.; PUJOLS, J.; ZORILLA, I.; GÓMEZ-GUILLAMÓN, F.; ARENAS, A. Epidemiological surveillance of bluetongue virus serotype 1, 4 and 8 in Spanish ibex (*Capra pyrenaica hispanica*) from southern Spain. Proc. of EWDA Conference Healthy wildlife, healthy people, Vlieland, The Netherlands, 13-16<sup>th</sup> September 2010, p. 83.

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.

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.

ŠPERLOVÁ, A.; ZENDULKOVÁ, D.; LAMKA, J. Stanovení časných protilátek proti viru katarální horečky ovcí u volně žijících přežvýkavců. Proc. XII. Konference mladých vědeckých pracovníků, Brno, Česká republika, 2. 6. 2010, s. 158-160.

**Kontaktní adresa:** Adéla Šperlová, MVDr., Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, V09239@vfu.cz



## Klíšťová encefalitida: využití nested qRT-PCR založené na detekci sekvence genu pro NS5 při diagnostice onemocnění u psů a při vyšetřování vzorků klíšťat

### Tick-borne encephalitis: examination of canine and tick samples by nested qRT-PCR based on the detection of NS5 gene sequence

<sup>1</sup>Hekrlová Alena, <sup>1</sup>Rosenbergová Kateřina, <sup>1</sup>Lány Petr, <sup>2</sup>Kubiček Oldřich

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
<sup>2</sup>Státní ústav jaderné, chemické a biologické ochrany

#### Summary

*Tick-borne encephalitis (family Flaviviridae) is a seasonal, by ticks transmitted zoonotic disease with endemic occurrence and vast spectrum of hosts. The course of TBE is subclinical in most species with the exception of humans, primates, dogs and horses, in which serious involvement of nervous system can be observed. Since 1990 the number of human cases has risen and new endemic areas have appeared.*

*Clinical course in dogs occurs sporadically but number of cases also rises. Presently diagnostics is based on serological methods. In our study we used nested qRT-PCR focused on detection of high conservative genomic sequence encoding nonstructural protein 5 (NS5). Samples of five dogs with the indication of encephalitis were tested. We also focused on the possibility of using our method for detection TBEV in ticks (stored in ethanol).*

*During examination of canine samples one blood sample was tested with positive result. In tick samples 8 pool (from 14 in total) were positive. We demonstrated applicability of the method in both types of samples.*

**Keywords:** tick-borne encephalitis, dog, NS5, nested qRT-PCR

#### Úvod

Klíšťová encefalitida (KE) je klíšťaty přenášené zoonotické onemocnění s endemickým výskytem a širokým spektrem hostitelů. Původce onemocnění spadá do skupiny RNA virů s pozitivní polaritou, náleží do čeledi Flaviviridae. Hostitelské spektrum viru KE je velmi pestré - zahrnuje jak plazy, tak ptáky a savce. U většiny druhů má však infekce subklinický průběh. Výjimkou jsou zejména člověk, primáti, psi, velmi vzácně koně, u nichž se onemocnění může projevovat těžkým postižením nervového systému. (7) V České republice se virus klíšťové encefalitidy vyskytuje standardně – také jižní Morava je řazena k endemickým lokalitám. Od 90. let narůstá jak v rámci Evropy, tak v rámci ČR incidence u humánní populace a rozšiřují se areály výskytu KE. (1)

Areál evropského subtypu odpovídá výskytu klíštěte druhu *Ixodes ricinus*. Životní cyklus klíštěte sestává ze 3 vývojových stádií: larva, nymfa a dospělec, všechna stadia mohou sloužit jako vektory pro přenos KE. Virus KE je schopen se v klíšťatech přenášet transovariálně, transstadiálně, sexuální cestou a taktéž nevíremickým přenosem - tzv. cofeedingem. V rámci výzkumu klíšťat v ohniscích ve střední Evropě bylo zjištěno, že 0,1 až 5 % jedinců přenáší virus KE. (6)

U psů je klinický průběh onemocnění popisován sporadicky, nicméně počet případů narůstá. Délka inkubační doby se pohybuje v rozmezí 5 - 9 dnů. Při perakutním průběhu dochází k úhynu za 3 - 7 dní post infectionem, při akutním průběhu dochází ke zlepšení

klinického stavu pacienta po 1 - 3 týdnech a infekce nezanechává žádné dlouhodobé následky. Jsou však popisovány i případy chronické infekce trvající až 6 měsíců p.i. (4) Seroprevalence u psů pocházejících ze zemí s výskytem KE se pohybuje v rozmezí jednotek až desítek procent. V České republice bylo v letech 1997-1998 sérologicky vyšetřeno 150 psů pocházejících z endemických oblastí pro TBE s pozitivním výsledkem u 5 zvířat (tj. 3,3 %) (2).

### **Materiál a metodika**

V naší práci jsme pro vyšetřování vzorků používali metodu nested qRT-PCR založenou na detekci úseku genomu kódujícího nestrukturální protein 5 (NS5). Úsek NS5 je totiž vysoce konzervativní a tudíž vhodný jako cíl pro molekulárně biologické metody. Tato metoda je díky tzv. degenerovaným bazím primerů schopna zachytit celou škálu flavivirů, konkrétní druh je pak stanoven na základě shody s pozitivní kontrolou. Primery jsou konstruovány dle: Scaramozzino et al. (2001) (5), Kuno (1998) (3) a prom. biol. Oldřicha Kubíček, SÚJCHBO (nepublikováno). Nested PCR jsme zvolili kvůli vyšší citlivosti než u běžné PCR. Kromě pozitivní kontroly KE jsme využívali i další flavivirus – vakcinační kmen žluté zimnice 17-D-204. Pro izolaci RNA jsme používali NucleoSpin RNA II protocol 5.1 a ZR-whole-blood Total RNA kit. Pro PCR reakci byla použita sada qPCR 2x SYBR Master Mix (Top-Bio, s.r.o.) a termocycler ROTOR-GENE RG-3000, Corbett Research.

Vyšetřovány byly vzorky pocházející od psů s indikací k vyšetření na KE, které byly získávány ve spolupráci s Klinikou chorob psů a koček, VFU Brno (MVDr. Pavel Schánilec). Jednalo se o 13 vzorků (od 5 psů) - plná krev (EDTA), sérum a mozkomíšní mok, vše uchovávalo při -80 °C. Dále jsme zjišťovali, zda je možné metodu využít pro detekci viru u klíšťat. K dispozici jsme měli adultní stádia klíšťat *I. ricinus* uchovávaná v ethanolu (Ústav biologie a chorob volně žijící zvěře, Doc. MVDr. Pavel Široký, Ph.D.). Klíšťata byla získána roku 2009 při sběru ve čtyřech oblastech: Rusovce, Michalovce, Gabčíkovo a Záhoří a následně rozdělena do 14 poolů dle lokality a pohlaví.

### **Výsledky**

Při vyšetřování vzorků u psů byl zachycen jeden pozitivní případ – jednalo se o vzorek krve českého fouska hospitalizovaného s dysfagií související s neschopností pohybovat jazykem, nacházel se v dezorientovaném stavu. Následující den byly u pacienta pozorovány záchvaty a generalizovaná spasticita, zvíře uhynulo. Testované vzorky byly odebrané perimortálně. Na rozdíl od vzorku krve, vzorky séra a cerebrospinálního moku byly testovány s negativním výsledkem. Bylo provedeno sérologické vyšetření na přítomnost protilátek proti viru KE v séru a cerebrospinálním moku pomocí kompetitivní ELISA metody – opět s negativním výsledkem.

Co se týče vyšetřování klíšťat, 8 poolů bylo vyšetřeno s pozitivním výsledkem (Rusovce – 2 pooly, 1 pozitivní; Michalovce – 1 pool, pozitivní; Gabčíkovo – 2 pooly, 1 pozitivní; Záhoří – 9 poolů, 5 pozitivních).

### **Diskuze a závěr**

V naší studii se podařilo prokázat, že i v rámci České republiky se u psů můžeme setkat s klinickým průběhem klíšťové encefalitidy. Případ byl diagnostikován počátkem září, Toto období v rámci roku spadá do intervalu s nejvyšší aktivitou klíšťat a tudíž

nejčastějším přenosem KE. Je tedy nezbytné provádět preventivní opatření v podobě aplikace antiparazitárních prostředků účinných proti klíšťatům. I pro psy se totiž v současnosti zvyšuje riziko nakažení - a to i díky tomu, že cestování a turistika s domácími pet zvířaty se stalo běžnou praxí. Takto se i zvířata žijící mimo ohnisko mohou setkat při pobytu v rizikové oblasti s infikovaným vektorem. Je tedy důležité mít k dispozici spolehlivou metodu pro rychlou diagnostiku. V současnosti není pro psy vyvinutá vakcína proti KE. Při laboratorní diagnostice lze v současnosti ze spektra serologických metod využít hemaglutinačně-inhibiční test, ELISA metodu nebo komplement-fixační test. Diagnóza KE je však potvrzena po vyšetření párových vzorků a neposkytne nám informace o průběhu infekce v době rozvoje klinických příznaků postižení. Přímý důkaz infekce však můžeme získat pomocí molekulárně-biologických metod rozboru plné krve. Je možné využít zpětně vzorky pocházející z fáze nespecifických příznaků (pokud byly odebrány) nebo vzorky odebrané co nejdříve po rozvoji nervových příznaků. Postižení nervové soustavy se totiž zřejmě rozvíjí již ve fázi, kdy titer viru v krvi klesá díky rozvoji protilátkové imunity.

Podařilo se nám také prokázat možnost využití metody pro vyšetřování klíšťat – a to i vzorků uchovávaných v ethanolu. Pozitivita vyšetřovaných klíšťat odpovídala tomu, že vzorky byly získány z oblastí považovaných za ohniska KE.

#### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem výzkumného záměru SUJ 200401 Státního ústavu jaderné, chemické a biologické ochrany.

#### Literatura

1. DANIEL, M. KRÍŽ, B. DANIELOVÁ, B. BENEŠ, Č. Sudden increase in tick-borne encephalitis cases in the Czech Republic, 2006. *International Journal of Medical Mikrobiology*. 2008, vol. 298, s. 81-87
2. KLIMEŠ, J. JUŘICOVÁ, Z. LITERÁK, I. SCHÁNILEC, P. TRACHTA, E. SILVA, E. Prevalence of antibodies to tickborne encephalitis and West Nile flaviviruses and clinical signs of tickborne encephalitis in dogs in the Czech Republic. *Veterinary record*. 2001, vol. 148, s. 17-20
3. KUNO, G. Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses. *Journal of Virological Methods*. 1998, vol. 72, s. 27-41
4. LESCHNIK, M.W. KIRTZ, G. C. THALHAMMER, J. G. Tick-borne encephalitis in dogs. *International Journal of Medical Microbiology*. 2002, vol. 291, s. 66-69
5. SCARAMOZZINO, N. CRANCE, J. – M. JOUAN, A. DeBRIEL, D. A. STOLL, F. GARIN, D. Comparison of *Flavivirus* universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, vol. 39, s. 1922-1927
6. SÜSS, J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia – an overview. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2011, vol. 2, s. 2-15
7. SÜSS, J, DOBLER, G. ZÖLLER, G. ESSBAUER S. PFEFFER, M. KLAUS Ch. LIEBLER-TENORUO, E. M. GELPI, E. STARK, B. HOTZEL H. Genetic characterisation of of a Tick-borne encephalitis virus isolated from the brain of naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*). *International Journal of Medical Microbiology*. 2008, vol. 298, s. 295-300

**Kontaktní adresa:** Alena Hekrlová, MVDr., Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, a.hekrlova@seznam.cz

## Parazité gastrointestinálního traktu u psů v severní Keni Parasites of gastrointestinal tract of dogs in northern Kenya

<sup>1</sup>Hlaváč Jan, <sup>2</sup>Albrechtová Kateřina, <sup>1</sup>Sloboda Michal, <sup>3</sup>Mihalca Andrei,  
<sup>1,4</sup>Modrý David

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>3</sup>Facultății de Medicină Veterinară, Universitatea de Științe Agricole și Medicină Veterinară, Cluj-Napoca, Romania

<sup>4</sup>Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice

### Summary

*In frame of broad research of infectious diseases of dogs in northern Kenya, 255 of faecal samples were examined. Population of dogs in our study represents unique model for study of infectious diseases due to lack of any preventive or curative intervention in the past. This parasitological survey provide data about spectrum and prevalence of parasitoses in the region. We noted differences in both parasites prevalences and species richness among localities with diverse ecological conditions. Our study reveal scarce presence of geohelminths probably as a result of adverse enviromental conditions for their cyclus. Total absence of generally ubiquitous Toxocara canis will need further investigation based on serological methods.*

**Keywords:** dogs; *Echinococcus sp.*; Kenya; *Sarcocystis sp.*; *Spirocerca sp.*; survey

### Úvod

V rámci širšího studia infekčních onemocnění psů v severní Keni je dlouhodobě sledována populace psů z okolí jezera Turkana. Tato populace představuje unikátní model pro výzkum infekcí, neboť v ní nejsou prováděny žádné preventivní ani léčebná opatření, což umožňuje zachytit jejich přirozenou dynamiku. Tento příspěvek shrnuje první výsledky koprologického průzkumu z jednotlivých oblastí v okolí jezera Turkana.

### Materiál a metody

Během vakcinační kampaně Mount Kulal Dogs Vaccination Project (MKVDP), byli majitelé očkovaných psů vybaveni označeným sáčkem a požádáni o vzorek trusu. Celkem byly v letech 2006 až 2009 získány vzorky trusu od 255 psů.

Vzorky byly konzervovány zvlášť v 4% formaldehydu, 1% dichromanu didraselném který umožňuje sporulaci oocyst a v etanolu. Vzorky fixované ve formaldehydu, resp. v dichromanu byly koprologicky vyšetřeny flotační metodou. K flotaci byly použity 15ml zkumavky, modifikovaný Sheatherův flotační roztok (specifická hmotnost 1,3 g.cm<sup>-3</sup>); centrifugace 2500 ot.min<sup>-1</sup> po dobu 5 minut. Povrchová blanka byla po přenesení na podložní sklíčko prohlédnuta pod mikroskopem při 200násobném zvětšení. Pokud to množství materiálu umožňovalo, byly z každého vzorku provedeny dvě flotační vyšetření. Pokud se ve vzorku konzervovaném ve formaldehydu vyskytly oocysty kokcií, byl vyšetřen vzorek konzervovaný v dichromanu a za relevantní nález byli považováni pouze zástupci rodu *Isoospora*.

Jednotlivá místa sběru dat se značně liší svými ekologickými podmínkami. Pro potřeby práce byly určeny čtyři typové oblasti (Lake, Gatab, Olturot, Mt. Ngyiro). Toto rozdělení nelze brát fundamentálně, neboť zejména mezi prvními třemi lokalitami

existuje v průběhu celého roku migrace lidí i zvířat. Jednotlivé oblasti, lze stručně charakterizovat takto:

**Lake:** Oblast okolo jihovýchodním břehu jezera Turkana. Jde o poušť až polopoušť s velmi vysokými teplotami a téměř chybějícími srážkami v průběhu celého roku. Významnou součástí diety psů zde tvoří ryby.

**Gatab:** Se nachází na úpatí kulalského masivu cca 1600 m.n.m. na hranici mlžného lesa. Jedná se o chladnější a vlhčí lokalitu. Díky relativně dostupným vodním zdrojům je zde poměrně husté osídlení lidmi i zvířaty. Stáda hospodářských zvířat zde většinou kvůli omezeným možnostem pastvy nejsou držena trvale, ale čas od času jsou přiháněna k napajedlu.

**Olturot:** Pod tento typ patří vesnice v suché savaně pod úpatím pohoří Kulal. Celá oblast je velmi suchá s řídkou vegetací, která umožňuje jen chudou pastvu, hustota osídlení je zde velmi nízká, naopak koncentrace hospodářských zvířat relativně vysoká.

**Mt. Ngyiro:** Pod touto lokalitou jsou zahrnuty vzorky odebrané ve vesnicích pod masivem Mt. Ngyiro, celá oblast je relativně vlhká, je zde mnohem nižší migrace zvířat i obyvatelstva, takže lidské osídlení tu má spíše městský charakter.

### Výsledky

Z vyšetřených 255 vzorků byla na základě koprologického vyšetření zjištěna přítomnost parazitů u 133 vzorků (52,16 %). Rozdíly ve výskytu jednotlivých parazitů mezi různými lokalitami shrnuje tabulka 1.

Tabulka 1: Parazitární prevalence ve vzorcích trusu psů podle jednotlivých lokalit

Druh parazita/sledovaná oblast	Lake n = 87	Gatab n = 84	Olturot n = 46	Mt Ngyiro n = 20
<i>Spirocerca lupi</i>	1 (1,1 %)	11 (13,1 %)	3 (6,5 %)	0
<i>Sarcocystis</i> sp.	12 (13,8 %)	21 (25 %)	15 (32,6 %)	6 (30 %)
<i>Demodex canis</i>	0	7 (8,3 %)	0	0
<i>Taenia/Echinococcus</i>	16 (18,4 %)	20 (23,8 %)	17 (37 %)	7 (35 %)
<i>Dipylidium caninum</i>	1 (1,1 %)	4 (4,8 %)	1 (2,2 %)	0
<i>Trichuris</i> sp.	0	3 (3,6 %)	5 (10,9 %)	0
strongylida	2 (2,3 %)	5 (6 %)	4 (8,7 %)	3 (15 %)
<i>Isospora</i> sp.	2 (2,3%)	0	2 (4,3 %)	1 (5 %)
negativní	55 (63,2 %)	31 (36,9 %)	13 (28,3 %)	6 (30 %)

### Diskuze

Celý soubor 255 vzorků představuje zhruba čtvrtinu všech psů zahrnutých do našeho sledování, jde tedy o reprezentativní vzorek srovnatelný s obdobnými studii prováděnými v zahraničí (Oliveira-Sequeira a kol., 2002). Relativně zajímavým zjištěním je fakt, že u 47,8 % psů nebyli žádní parazité GIT prokázáni, a to i při absenci jakýchkoliv antiparazitárních opatření. Nicméně ani toto zjištění není v rozporu s dříve publikovanými výsledky (Sowemimo a Asaolu, 2008; Oliveira-Sequeira a kol., 2002).

Je třeba poukázat na limity koprologické diagnostiky na základě morfologického posouzení vajíček, resp. oocyst kokcií, zejména se to týká těch případů, kdy nelze

odlišit skutečné parazity hostitele od pseudoparazitů. Týká se to především komplexu *Taenia/Echinococcus* a vajíček strongylid. Oblast kolem jezera Turkana je známa jednou z nejvyšších incidencí humánní echinokokózy (Craig a kol., 2007) a časté nálezy vysokého počtu vajíček v jednotlivých vzorcích nasvědčují spíše jejich autochtonímu původu než pseudoparazitaci, konečný výsledek nám mohou dát jen molekulární metody. Překvapujícím výsledkem byla absence rodu *Toxocara*, resp. *Toxascaris*. Nepřítomnost tohoto ubikvitárního parazita ve vyšetřených vzorcích patrně nelze vysvětlit vyšším věkem psů zapojených do studia (Gompper a kol., 2005), V našem případě bylo více jak 40 % vyšetřovaných psů mladších jednoho roku, což odpovídá i věkové struktuře místní populace. Suché prostředí a vysoká teplota patrně působí nepříznivě pro šíření geohelmintů, na což ukazuje jejich obecně malé zastoupení ve vyšetřených vzorcích. K získání detailnějších informací o přítomnosti *T. canis* pomůže až serologické vyšetření sledovaného souboru psů. Podobně jsme získali nepřímý důkaz o výskytu kokcidie *Neospora caninum*, jejíž seroprevalence ve sledované populaci dosahuje 17,9 %. Při koprologickém jsme však v žádném vzorku její oocysty neidentifikovali.

### Závěr

Předložená práce přináší výsledky parazitologického průzkumu založenému na flotačním vyšetření trusu. Jde o první podobně rozsáhlou studii z dané oblasti a představuje tak cenný zdroj informací o podobě místní parazitární fauny. Náš výzkum rovněž potvrdil domněnku, že rozdíly v ekologických podmínkách na jednotlivých lokalitách se do jisté míry odráží i ve struktuře parazitární populace. Zároveň se ukázaly určité limity klasických koprologických metod, zejména v podmínkách, kdy je třeba odlišit pseudoparazity od skutečné infekce.

### Poděkování

Část práce byla finančně zajištěna díky prostředkům z projektu IGA VFU Brno č. 247/2009/FVL.

### Literatura

CRAIG, P.S.; McMANUS D.P.; LIGHTOWLERS, M.W.; CHABALGOITY, J.A.; GARCIA, H.H.; GAVIDIA, C.M. et al. Prevention and control of cystic echinococcosis. *The Lancet Infectious Diseases*. 2007, Vol.7, no. 6, s. 385-394.

GOMPPER, M.E.; GOODMAN, R.M.; KAYS, R.W.; RAY, J.C.; FIORELLO, C.V.; WADE, S.E. A Survey of the Parasite of Coyotes (*Canis latrans*) in New York based on Fecal Analysis. *Journal of Wildlife diseases*. 2003, Vol. 39, no. 3, s. 712-717.

OLIVEIRA-SEQUIRA, T.C.G.; AMARANTE, A.F.T.; FERRARI, T. B.; NUNES, L. C. Prevalence of intestinal parasites in dogs from São Paulo State, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2002, Vol. 123, no. 1-2, s. 19-27.

SOWEMIMO, O.A.; ASAOLU, S.O. Epidemiology of intestinal helminth parasites of dogs in Ibadan, Nigeria. *Journal of Helminthology*. 2008, Vol. 82, no. 1, s. 89-93.

**Kontaktní adresa:** Jan Hlaváč, MVDr., Ústav parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42, Brno, janhlavac@seznam.cz

## Prevalence of equine piroplasmids in a population of Jordanian Equids: a molecular study

### Prevalence koňských piroplasem v populaci Jordánských equidů založené na molekulárních analýzách

<sup>1</sup> Qablan Moneeb, <sup>1</sup> Sloboda Michal, <sup>1,2</sup> Modrý David

<sup>1</sup> Ústav morfologické patologie a parazitologie, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup> Parazitologický ústav, Biologické centrum AV ČR v.v.i., České Budějovice

#### Summary

During an epidemiological survey extending from 2007 to 2009, blood samples were collected from horses and donkeys from several localities in Jordan. Occurrence of *Babesia caballi* and *Theileria equi*, the causative agents of equine piroplasmosis, have been confirmed by PCR approach applying universal primers targeting the 18s rRNA gene and followed by sequencing of the PCR products. Sequencing results indicate that infection with *Theileria equi* was more prevalent. The analysis of variability of sequences showed three *T. equi* genotypes while only one *B. caballi* genotype was determined.

**Keywords:** Jordan; *Babesia caballi*; *Theileria equi*; horses; donkeys.

#### Introduction

Equine piroplasmosis is a tick-borne disease of economic importance due to the international trade and the increased movement of horses all over the world; however knowledge of the epidemiology of equine piroplasmosis in many areas of the world is limited. Two piroplasmid species namely *Babesia caballi* and *Theileria equi* cause the disease which is characterized by fever, anemia and icterus and occurs mainly in the tropical and subtropical areas of the world, including southern Europe (Battsetseg et al. 2001). Compared to *B. caballi*, *T. equi* shows rather high genetic polymorphism that can be attributed to current sympatric speciation as suggested by Kouam et al. (2010).

Molecular-based diagnostic test show a notably higher degree of sensitivity and specificity over serological tests and morphological examination methods (Nagore et al. 2004). The usage of molecular procedures, as well as gene sequencing, improve the diagnostics of piroplasmids and has prompted the discovery of striking level of genetic diversity in these parasites (Criado-Fornelio et al. 2004). The aims of our study was (i) to investigate the prevalence of equine piroplasmosis in the studied area (ii) to determine which species of equine piroplasmids occur in Jordan by application of PCR diagnostic methods targeting part of the 18s rRNA gene and followed by sequencing (iii) to evaluate the genetic diversity among sequenced isolates and to infer phylogenetic relationships between them.

#### Material and methods

In total, 216 (81 males; 135 females) horses and 67 (56 males; 11 females) donkeys were sampled from several localities in Jordan during the 2007-2009 period. Blood samples were obtained via puncturing the jugular vein and stored in EDTA tube for later DNA isolation. DNA was isolated from 100 µl of whole blood with DNeasy Blood and Tissuekit (Qiagen). A universal primer pair targeting a ~500bp fragment of 18s

rRNA gene of *Babesia* and *Theileria* species was used for the PCR diagnostics, PCR conditions were followed as described (Sloboda et al. 2011). Products of all PCR reactions were subjected to Goldview stained 1.5% agarose gel electrophoresis, and documented using Vilber Lourmat system. Selected PCR products were extracted using QIAquick gel extraction kit (Qiagen) and sequenced in their entirety. The obtained sequences were edited, and aligned using Chromas pro (TechnelySium Pty Ltd) and Bioedit (Hall et al. 1999). The final sequence alignment were used to construct a maximum likelihood phylogenetic tree using PhyML (Guindon and Gascuel, 2003) program.

### Result

No symptoms of piroplasmosis were recorded from any of the animals included in our study. The average prevalence of piroplasmids infection by PCR was (26.4% and 19.4%) among horses and donkeys respectively. Males in both animal species show significantly increased susceptibility to the infection (p-value=0.001 and 0.003 at 5% test level for horses and donkeys respectively).

So far, 57 sequences were successfully retrieved from both horses (n=49) and donkeys (n=8). Sequencing confirmed the occurrence of both equine piroplasms, namely *B. caballi* and *T. equi*. Among sequenced samples piroplasmosis caused by *T. equi* was more prevalent in horses (n=41, 83.7%) compared to donkeys (n=3, 37.5%) whereas infection with *B. caballi* was more prevalent in donkeys (n=62.5%) than in horses (n=8, 16.3%). Additionally sequence similarity and phylogenetic analysis indicates the occurrence of three genotype of *T. equi* and a single genotype of *B. caballi*.

### Discussion

All examined animals in our study show the unapparent piroplasmid infection during sampling period and no clinical symptoms were reported which could be attributed to the host immune system adaptation to infection in endemic areas (Chauvin et al. 2009). The disease has been reported from Jordan (Hailat et al. 1997). However, the authors detected only *T. equi* infection and no cases of *B. caballi*. Moreover, mentioned study used only microscopic detection and as such apparently failed to detect the carrier animals with low parasitaemia. Molecular diagnostics used in our study indicates wide distribution of both detected piroplasmids and reports the infection with *B. caballi* in Jordan for the first time.

Statistical analysis proved males of both host species being more susceptible to piroplasmosis, which could be referred to the differences in the immune system response on gender base (Zuk and Mckean, 1996). Sequences results show that the infection with *T. equi* was more prevalent among horses than the infection with *B. caballi*. This could be possibly referred to the life persistent infection with *Theileria* species and the possibility of the host to eliminate the infection with *B. caballi* within 1-4 years (Salim et al. 2009). The higher prevalence (62.5 %) of *B. caballi* among donkeys may result from local outbreak as all the infected animals were from the same locality and same sampling period. Three genetically distinct *Theileria* genotypes were identified in the present study, same isolates were recently recorded in South Africa (Bhoora et al. 2009).



## Conclusion

Further research including more genes is needed to clarify the status of the different genotypes among detected equine piroplasmids species in Jordan.

## Acknowledgment

This work was supported by the Czech Science Foundation project GA CR 523/09/1972.

## References

- BATTSETSEG, B.; XUAN, X.; IKADAI, H.; BAUTISTA, J. L.; BYAMBAA, B.; BOLDBAATAR, D.; BATTUR, B.; BATTSETSEG, G.; BATSUKH, Z.; IGARASHI, I.; NAGASAWA, H.; MIKAMI, T.; FUJISAKI, K. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttali* adults ticks. *International Journal of Parasitology*, 2001, vol. 31, p. 384-386.
- 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*, 2009, vol. 159, p. 112–120.
- CRIADO-FORNELIO, A.; GÓNZALEZ-DEL-RÍO, M. A.; BULING-SARAÑA, A.; BARBARCARETERO, J. C. The “expanding universe” of piroplasmids. *Veterinary Parasitology*, 2004, vol. 119, p. 337–345.
- GUINDON, S.; GASACUEL, O. A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 2003, vol. 52, p. 696-704.
- HAILAT, N. Q.; LAFI, S. Q.; AL-DARRAJI, A. M.; AL-ANI, F. K. Equine babesiosis associated with strenuous exercise: clinical and pathological studies in Jordan. *Veterinary Parasitology*, 1997, vol. 69, p. 1–8.
- HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucleic Acid Symposium Series*, 1999, vol. 41, p. 95-98.
- KOUAM, M. K.; KANTZOURA, V.; MASOUKA, P. M.; GAJADHAR, A. A.; THEODOROPOULOS, G. Genetic diversity of equine piroplasmids in Greece with a note on speciation within *Theileria* genotypes (*T. equi* and *T. equi* like). *Infection, Genetics and Evolution*, 2010, vol. 10, p. 963-968.
- NAGORE, D.; GARCIA-SANMARTIN, J.; GARCIA-PEREZ, A. L.; JUSTE, R. A.; Hurtado, A. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. *Veterinary Parasitology*, 2004, vol.123, p. 41-54.
- SALIM, B. O. M.; HASSAN, S. M.; BAKHEIT, M. A.; ALHASSAN, A.; IGARASHI, I.; KARANIS, P.; ABDELRAHMAN, M. M. Diagnosis of *Babesia caballi* and *Theileria equi* infections in horses in Sudan using ELISA and PCR. *Parasitology Research*, 2008, vol. 103, p. 1145-1150.
- SLOBODA, M.; JIRKŮ, M.; LUKEŠOVA, D.; QABLAN, M.; BATSUKH, Z.; FIALA, I.; HOŘÍN, P.; MODRÝ, D.; LUKEŠ, J. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in Northern-Eastern Mongolia. *Veterinary Parasitology*, 2011, (In Press)
- UILENBERG, G. *Babesia*—A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 2006, vol. 138, p. 3–10.
- ZUK, M.; MCKEAN, K. A. Sex differences in parasites infections: patterns and processes. *International Journal for Parasitology*, 1996, vol. 26, no. 10 p. 1009-1024

**Contact address:** Moneeb Qablan, MSc., Ústav morfologické patologie a parazitologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, moneeb\_78@hotmail.com

## Úroveň viremie u perzistentní anellovirové infekce prasat Level of viremia in persistent swine TT virus infection

Jarošová Veronika, Celer Vladimír

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

### Summary

*Torque teno sus viruses (TTSV) were detected in the pig population in the Czech Republic. At present the nested PCR with specific primers situated in the highly conserved region of the virus genome is used for TTSV diagnostic. The present study describes novel assay for detection and quantitation of TT virus using Taq-man probe for qPCR situated in ORF1 part of virus genome. Ten-fold dilutions of plasmids containing ORF1 gene were used to construct calibration curve allowing virus quantitation. The total of 120 serum samples was used for virus detection. All samples were first checked by standard nested-PCR assay and then by qPCR test. TTSV1 and TTSV2 was found in 25% a 21,4 % of examined animals, virus titres ranged from 0 to 10<sup>6</sup> copies of virus genome per ml of blood serum.*

**Keywords:** *Torque teno virus; porcine; real-time PCR.*

### Úvod

*Torque teno sus viry (TTSV) jsou malé neobalené viry s ikozáhedralní 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*, čeledi *Anelloviridae* (ICTV 2009). První TTV izolát byl získán od 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 prasečích TT virů jsou detekovány jak u prasat domácích tak i divokých a jejich výskyt je celosvětový (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 orofekální cestou, případně transplacentárním přenosem.*

V současné době se pro diagnostiku TT virů používá nested-PCR. Při této dvoukrokové reakci ale hrozí riziko kontaminace vzorku a může tak docházet k nespecificky pozitivním výsledkům. Alternativou k tomuto postupu je kvantitativní q-PCR, která je pokládána za citlivější a specifitější metodu a navíc umožňuje kvantifikaci viru ve vzorku (Gallei 2009).

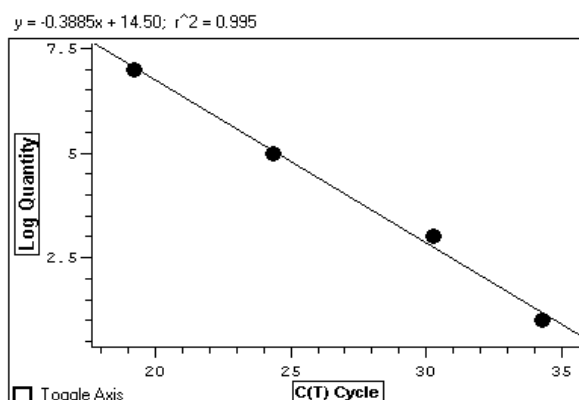
Cílem práce bylo navrhnout a zavést qPCR pro diagnostiku TT virů a kvantifikovat množství virových částic v klinických vzorcích.

### Materiál a metody

Specifické primery stejně jako Taq-man sonda byly umístěny v ORF1 oblasti virového genomu. Standard pro kvantifikaci q-PCR reakce byl získán klonováním odpovídajícího

úseku genomu viru do plazmidového vektoru pEntr (Invitrogen). Vzniklý rekombinantní plazmid byl transformován do chemicky kompetentních buněk *E. Coli* TOP10 One Shot pro jeho namnožení, následně byl purifikován a kvantifikován. Pro vytvoření kalibrační křivky byla použita desítková ředění plazmidu obsahující ORF1 gen. Primery a sondy byly navrženy programem Universal probe library (Roche). qPCR byla provedena na přístroji Chromo 4 (MJ Research) a analyzována programem Opticon Monitor v.3.

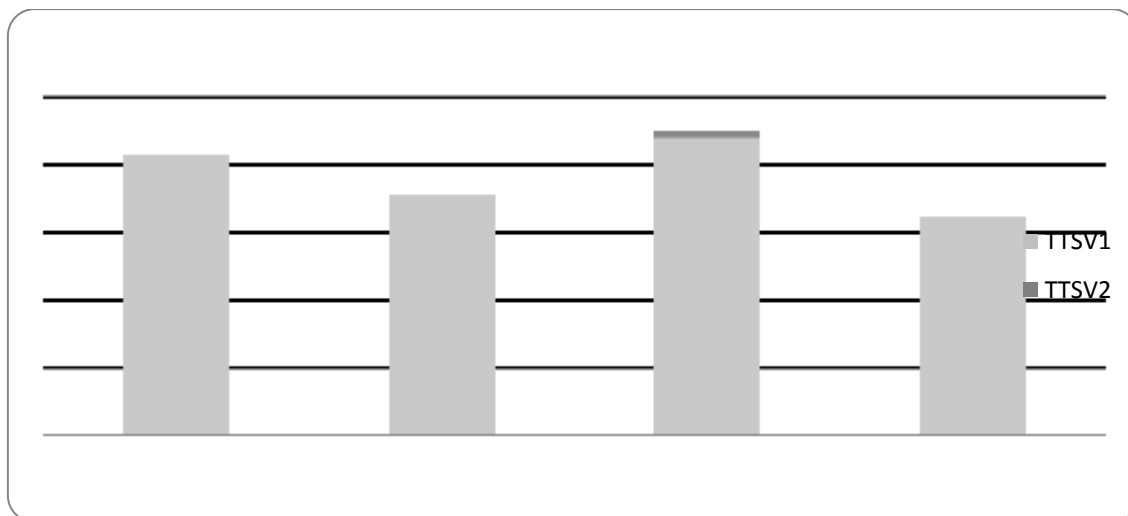
Celkem bylo metodou real-time PCR vyšetřeno 120 vzorků krevních sér prasat z různých farem prasat. Všechny vzorky byly nejdříve vyšetřeny standardní nested-PCR a poté qPCR. Pro nested PCR byly použity diagnostické primery, lokalizované ve vysoce konzervované oblasti nekódujícího regionu genomu. DNA byla extrahována ze vzorků pomocí NucleoSpin Blood kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) dle postupu výrobce a poté skladována v zamraženém stavu při  $-20^{\circ}\text{C}$ .



Obrázek 1: Standardní křivka pro TTSV2

### Výsledky

Pomocí sériových ředění plazmidového standardu byla sestrojena kalibrační křivka pro kvantitativní qRT-PCR. TTSV1 byl metodou qPCR prokázán ve 30 vzorcích a TTSV2 ve 26 vzorcích séra. Oba druhy prasečích TT virů byly současně detekovány v 5 vzorcích. Záchyt TT virů je podrobně popsán v tabulce 1. Zjištěné titry virů se pohybovaly od 0 do  $10^6$  kopií viru na ml krevního sera.



Graf 1: Průměrné titry viru na 1 ml krevního séra v různých věkových kategoriích

Tabulka 1: Počet a procento pozitivních vzorků na TTSV1 a TTSV2

	Prasata	TTV1- TTV2-	TTV1+ TTV2-	TTV1- TTV2+	TTV1+ TTV2+
Celkový počet	120	69	25	21	5
%	100	57,5	20,8	17,5	4,1

### Diskuze

Kultivace TT virů na buněčných kulturách zatím nebyla úspěšná, proto se v diagnostice využívá průkaz metodou PCR a vzhledem k malé koncentraci viru ve vzorcích variantou nested-PCR. Riziko kontaminací vzorku můžeme omezit zavedením kvantitativní q-PCR, která je pokládána za citlivější a specifitější metodu a navíc umožňuje kvantifikaci viru ve vzorku. Zjištěné titry virů se pohybovaly od 0 do  $10^6$  kopií viru na ml krevního sera, to odpovídá výsledkům z jiných prací (Gallei 2009); (Huang 2010). Náš protokol pro qPCR, založený na Universal probe library je vhodný pro specifickou detekci TT virů v klinických vzorcích. Metodou qPCR byly zjištěny nižší procenta zachytu TT virů než jsou u metody nested-PCR, určitou roli zde může hrát i značná variabilita TTSV a tedy neschopnost qPCR testu detekovat všechny kmeny viru. Analýza dalších sekvencí viru nám umožní další optimalizaci sekvencí primerů a tím zpřesnění qPCR metody.

### Poděkování

Tento projekt je finančně podpořen Grantovou agenturou Ministerstva školství č. ME08108.

### Literatura

Gallei, A., Pesch, S., Esking, W., S., Keller, Ch., Ohlinger, V., F. (2009) Porcine Torque teno virus: Determination of viral genomic loads by genogroup-specific multiplex rt-PCR, detection of frequent multiple infections with genogroups 1 or 2, and establishment of viral full-length sequences. *Veterinary Microbiology*, 143, 202-212.

Huang, Y., W., a kol. Development of SYBR green-based real-time PCR and duplex nested PCR assay for quantitation and differential detection of species- or type-specific porcine Torque teno viruses. *Journal of Virological Methods*. 2010, vol. 170, s. 140-146.

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.

**Kontaktní adresa:** Veronika Jarošová, Mgr., VFU Brno – FVL, Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, jaronika@seznam.cz

## Expres rekombinantního glykoproteinu D herpesviru psů 1 v bakteriálních buňkách

### Expression of recombinant glycoprotein D of Canine herpesvirus 1 in bacterial cells

Vaňková Markéta, Celer Vladimír, Molinková Dobromila

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*Gene fragment coding for glycoprotein D of canine herpesvirus 1 was cloned into plasmid vector and expressed in E.coli cells. Recombinant protein was then purified by metalochelating affinity chromatography and used as an antigen in immunoblot for the detection of CHV-1 specific antibodies. Antibody testing was performed on the panel of 100 canine sera and CHV-1 specific antibodies were detected in 46% of samples. Our test proved to be a suitable tool for epidemiological studies as well as for vaccination control in the case of herpesvirus disease in dogs.*

**Keywords:** *canine herpesvirus; glycoprotein D; recombinant protein; serology; immunoblot*

#### Úvod

Herpesvirové onemocnění psů je považováno za aktuální téma současné veterinární medicíny „malých zvířat“. Ač je původce onemocnění značně rozšířen v populaci psů, přesto přesná patogeneze, prevalence i biologické vlastnosti viru zůstávají i v současné době poměrně málo objasněné. Vzhledem k nedostupnosti dostatečně specifických a citlivých sérologických testů není prevalence herpesvirového onemocnění v České republice známa, i když na základě vyšetření omezeného souboru diagnostických vzorků lze usuzovat na značné rozšíření tohoto onemocnění (Sedlák, 2007). Výsledky sérologických depistáží v jiných zemích poskytují široké rozpětí hodnot prevalence.

Cílem naší práce bylo vyvinout rekombinantní glykoprotein D a použít jej jako antigen pro imunoenzymatický test a jeho prostřednictvím získat přesnější údaje o prevalenci onemocnění v ČR a získat nástroj pro studium patogeneze herpesvirové infekce u psů.

#### Materiál a metodika

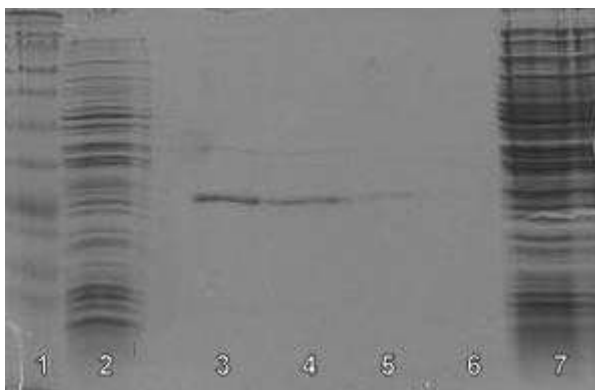
Extrakce virové DNA byla provedena komerčně dostupným kitem NucleoSpin Tissue, Genomic DNA from Tissue (Macherey-Nagel GmbH, Německo). Extrakce byla provedena ze 100 µl supernatantu buněčné kultury.

Gen kódující glykoprotein D byl amplifikován metodou PCR, primery byly navrženy na základě již publikované sekvence genu pro gD. Amplifikovaný fragment genu byl klonován do expresního vektoru pTrcHis (Invitrogen), vzniklou rekombinantní konstrukcí byly transformovány buňky *E.coli*, kmen TOP10. Expres rekombinantního proteinu byla indukována 1 mM IPTG při 37°C po dobu 4 hodin.

Purifikace rekombinantního proteinu byla uskutečněna v denaturujícím prostředí 8M močoviny metalochelatační afinitní chromatografií s využitím polyhistidinové domény na N' terminálním konci proteinu. Kinetika exprese, účinnost purifikace a solubilita proteinu byly monitorovány SDS-PAGE. Sérologické vyšetření bylo provedeno na souboru 100 vzorků psích sér metodou imunoblot.

### Výsledky

Amplifikací získané virové DNA pomocí CHV-1 specifických primerů jsme získali fragment molekuly DNA kódující gD. Po purifikaci z gelu byl tento genový fragment metodou TA klonování integrován do plazmidového vektoru pTrecHis. Vzniklou konstrukcí byly transformovány TOP10 *E.coli* buňky. Indukce a analýza na SDS-PAGE gelu prokázala u jednoho z klonů expresi proteinu o velikosti 35 kDa (Obrázek 1).



Obrázek 1: Expres a purifikace rekombinantního proteinu.

Dráha: 1- marker molekulové hmotnosti; 2- bakteriální lyzát před indukcí; 3-6 jednotlivé frakce vytěsněného proteinu (35 kDa); 7 – bakteriální lyzát po indukcí.

Prítomnost polyhistidinové domény v molekule proteinu byla prokázána imunoblotem, reakcí s anti-polyhistidinovou protilátkou. Po purifikaci byl rekombinantní protein dále blotován na nitrocelulósovou membránu a následně charakterizován reakcí s kontrolním CHV-1 pozitivním psím sérem (Obrázek 2).



Obrázek 2: Imunoblot s psími séry

1 – kontrolní pozitivní sérum, 2- jedno z testovaných psích sér

Testování bylo provedeno na souboru 100 psích sér imunoblotem. Vyšetření prokázalo 46% pozitivitu v rámci testovaného souboru.

### Diskuse

Rekombinantní glykoprotein D byl opakovaně úspěšně použit ve studiích detekujících nejen obecnou sérologickou reaktivitu tohoto glykoproteinu, ale především její korelaci s titrem neutralizačních protilátek (Flowers a O'Callaghan, 1992).

Přesto, že jsou povrchové glykoproteiny CHV-1 glykosylované, celá řada autorů exprimovala tyto virové struktury nejen v eukaryotických buňkách (bakulovirus), ale i v prokaryotickém systému založeném na *E. coli* buňkách. Takto exprimované rekombinantní proteiny CHV-1 pak byly úspěšně použity jako antigeny v sérologických testech (Maeda a kol., 1997).

V našich experimentech jsme použili vektor pTrcHis umožňující expresi proteinů pod kontrolou Lac promotoru. Po indukci IPTG byla po analýze v SDS-PAGE gelu detekována produkce proteinu o molekulové hmotnosti 35 kDa v nesolubilní frakci bakteriálního lyzátu. Nesolubilní povaha vzniklého proteinu je běžná v případě exprese heterologních proteinů v bakteriálních buňkách (deGroot, 2008) a je obranou bakterie před toxicitou virových proteinů. Z tohoto důvodu bylo proto nutné přistoupit k purifikaci proteinu metalochelatační afinitní chromatografií v denaturujícím prostředí.

Získaný protein byl následovně použit k testování souboru psích sér. Zjištěná prevalence 46% je v souladu se zjištěnými údaji z jiných zemí Evropy, které se pohybují v rozmezí prevalencí 22 - 88% (Nöthling a kol., 2008; Reading a Field, 1998). Případné odchylky lze vysvětlit jednak rozdílnou citlivostí použitých testů, imunoenzymatické testy jsou citlivější než tradiční testy nepřímé imunofluorescence nebo virus neutralizační test.

### Závěr

Rekombinantní glykoprotein D připravený v naší práci se osvědčil jako vhodný antigen pro test imunoblot. Výhodou tohoto testu je především relativně snadná příprava, vysoká citlivost i specifita. Naše výsledky nám umožní detailněji studovat imunitní odpověď psů na virovou infekci nebo vakcinaci.

Praktické využití tohoto rekombinantního antigenu při testování souboru 100 psích sér prokázalo značnou prevalenci (46%) CHV-1 specifických protilátek v populaci psů v ČR.

### Literatura

- DE GROOT, N. S., ESPARGARO, A., MORELL, M., VENTURA, S. Studies on bacterial inclusion bodies. *Future Microbiology*, 2008, vol. 3, no. 4, p. 423-435.
- FLOWERS, C. C., O'CALLAGHAN, D. J. Equine herpesvirus 1 glycoprotein D: mapping of the transcript and a neutralization epitope. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, no. 11, p. 6451-6460.
- MAEDA, K., XUAN, X., KAWAGUCHI, Y., ONO, M., YOKOYAMA, N., FUJITA, K., TOHYA, Y., MIKAMI, T. Characterization of canine herpesvirus glycoprotein D (hemagglutinin). *Journal of Veterinary Medical Science*, 1997, vol. 59, no. 11, p. 1003-1009.
- NÖTHLING, J.O., HÜSSY, D., STECKLER, D., ACKERMANN, M. Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa. *Theriogenology*, 2008, vol. 69, no. 3, p. 276-282.
- READING, M. J., FIELD, H.J. A serological study of canine herpesvirus-1 infection in the English dog population. *Archives of Virology*, 1998, vol. 143, no. 8, p. 1477-1488.
- SEDLÁK, K. Výskyt protilátek proti herpesviru (CHV-1) u psů v České republice. *Veterinářství*, 2007, roč. 57, s. 416-417.

**Kontaktní adresa:** Markéta Vaňková, MVDr., Ústav infekčních chorob a mikrobiologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, vankova.marketa@email.cz

## Postradiačné zmeny v kostnej dreni kurčiat Postirradiation changes in bone marrow in chickens

<sup>1</sup>Štofániková Jana, <sup>2</sup>Špalek Milan

<sup>1</sup> *Klinika vtákov a exotických zvierat, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice*

<sup>2</sup> *Katedra biológie a genetiky, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice*

### Summary

*Quantitative and qualitative changes in haemopoetic cells in chickens in bone marrow were investigated after acute single irradiation with doses 3 Gy. Samples of bone marrow were obtained from proximal femur epiphysalis. Marrows smears were prepared and stained according to Diff – Quick.*

*Qualitative examination of myelograms showed proliferation of adipose tissue, hypocellularity, caryolysis, caryorexis, disintegration of cells and proliferation of cells which could not be differentiated. Quantitative examination revealed high radiosensitivity of blast cells and lymphocytes shortly after irradiation.*

**Keywords:** *chickens; bone marrow; irradiation*

### Úvod

Vplyv rôznych polutantov nachádzajúcich sa v životnom prostredí je neustále stredobodom výskumu na rôznych úrovniach živočíšneho organizmu vrátane človeka (Sesztáková a kol., 2010, Lovásová a kol., 2010, Beňová a kol., 2007, Falis a kol., 2004, Škardová a kol., 1994 a iní) účinky žiarenia nevynímajúc.

Podľa základného rádiobiologického zákona tkanivá s málo diferencovanými a aktívne deliacimi sa bunkami sú rádiosenzitívnejšie oproti bunkám diferencovaným, málo deliacimi sa alebo vôbec nedeliacimi sa (výnimku tvoria lymfocyty) (Kuna, 1985). Patria k nim zárodočné bunky semenníkov, črevný a kožný epitel a tiež hemopoetické bunky kostnej drene (Škardová a kol., 1994, Sesztáková a kol., 1999).

Cieľom práce bolo kvalitatívne a kvantitatívne vyhodnotenie kostnej drene a myelogramu u kurčiat po ožiarení nízkymi dávkami gama žiarenia.

### Materiál a metodika

Kurčatá brojlerového typu chované v štandardných podmienkach vo veku 28 dní boli ožiarené jednorázovo celotelovou dávkou gama žiarenia 3 Gy pri príkone 0,0123 Gy/min (60 Co, Chisostat, Chirana). Odber kostnej drene sa vykonával po utratení kurčiat krčnou dislokáciou v intervaloch 1., 10. a 21. deň po ožiarení z proximálnej epifýzy femuru.

Po makroskopickej obhliadke kostnej drene kedy bola posudzovaná jej farba a konzistencia sa z nej urobil náter, ktorý bol ofarbený Diff – Quickom a mikroskopicky vyhodnotený.

Experimentálne skupiny boli porovnávané s kontrolnou skupinou. V každej skupine bolo 6 kurčiat.



## Výsledky

Obdukciami kostnej drene sme zaznamenali oproti neožiareným miernu anémiu a tukovosť kostnej drene.

Kvalitatívnym mikroskopickým vyšetrením myelogramu bolo zaznamenané zmnoženie tukového tkaniva na úkor aktívneho, ktoré nie je schopné produkcie plnohodnotných buniek. Ďalej bola pozorovaná hypocelularita. Z morfológických zmien bunky vykazovali rôzne štruktúralne zmeny ako karyorexa, karyolýza a tiež zmnoženie nediferencovateľných buniek.

Kvantitatívne sme sledovali rádiosenzitivitu jednotlivých hemopoetických buniek. Najvyššiu rádiosenzitivitu vykazovali blasty (proerytroblasty, erytroblasty, myeloblasty, tromboclasty), lymfocyty, bazofilné a eozinofilné myelocyty. Ich počet výrazne poklesol už krátko po ožiarení. Menšia rádiosenzitivita bola zaznamenaná u promyelocytov a trombocytov, ktorých počet klesol až neskôr (10. deň po ožiarení). Naopak heterofilné myelocyty a granulocyty na žiarenie reagovali vzostupom vo všetkých experimentálnych intervaloch.

## Diskusia

Nami zistené zmeny v kostnej dreni a myelograme poukazujú na vysokú rádiosenzitivitu kmeňových buniek (výnimku tvoria lymfocyty) (Kuna, 1985, Sesztáková a kol., 1999, 2000).

Uvedené zmeny v kostnej dreni vedú k vzniku aplastickej anémie, ktorá sa však vyvíja v neskoršom období, vzhľadom na to, že organizmus hydiny má veľké zásoby erytrocytov v slezine a zrelé erytrocyty sú rádiorezistentnejšie oproti ostatným krvným elementom. Stupeň anémie je závislý od druhu a veľkosti dávky žiarenia, dĺžky pôsobenia, zdravotného stavu jedinca a pod. (Sesztáková a kol., 2000). Postradiačná anémia je charakterizovaná mikrocytózou a hypochrómiou (Malhotra a kol., 1990).

Žiarenie zároveň v dôsledku poškodenia kmeňových buniek bielej krvnej rady vedie k vzniku imunopresie, čo má za následok zvýšenú vnímavosť organizmu voči rôznym iným chorobám – infekčným, parazitologickým, mykózam a pod.

Nález, ktorý bol zaznamenaný v kostnej dreni a myelograme zodpovedá miernej vyčerpanosti kostnej drene, kedy táto nie je schopná produkcie plnohodnotných krvných buniek, ale sa objavujú bunky morfológicky zmenené a menej hodnotné. Je však možné predpokladať, že nami použitá dávka žiarenia nespôsobuje trvalé poškodenie hemopoézy a adaptačné a reparačné mechanizmy sú schopné účinky uvedenej dávky žiarenia kompenzovať.

## Záver

V súčasnej práci sme sledovali postradiačné zmeny v kostnej dreni a myelograme u kurčiat po celotelovej jednorázovej dávke gama žiarenia 3 Gy. Najvyššiu rádiosenzitivitu vykazovali kmeňové bunky (blasty) a lymfocyty. Postradiačné poškodenie bolo charakterizované kvalitatívnymi (karyorexa, karyolýza a pod.) aj kvantitatívnymi zmenami (hypocelularita). Zmeny mali mierny charakter. Je možné predpokladať, že nami použitá dávka nespôsobuje ireverzibilné zmeny v kostnej dreni.

### PodĎakovanie

Práca vznikla v rámci riešenia grantového projektu VEGA 1/0590/09.

### Literatúra

BEŇOVÁ, K., DVOŘÁK, P., FALIS, M., SKLENÁŘ, Z.: Interaction of low Doses of Ionising Radiation, Pottassium Dichromate and Cadmium Chloride in *Artemia franciscana* Biotest. *Acta veterinaria Brno*, 76: 34 – 40, 2007

FALIS, M., BEŇOVÁ, K., TOROPILA, M., SESZTÁKOVÁ, E., LEGÁTH, J.: Changes in the activity of selected adaptive enzymes in chicken liver after single gamma irradiation. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 48, 503 – 506, 2004

KUNA, P.: Chemická rádioprotekcia, AVICENUM, Praha, 1985, s. 147

LOVÁSOVÁ, E., SESZTÁKOVÁ, E., ŠKARDOVÁ, I.: Vplyv gama žiarenia na celkovú antioxidačnú kapacitu plazmy, V zborníku: *Animal protection and welfare*, 21. – 22.09. 2010, UVF, Brno, s. 132 – 135, ISBN 978-80-7305-114-3

MALHOTRA, N., RANI, N., RANA, K., MALHOTRA, R. K.: Radiation induced blood pathology in chick-erythrocytes and related parameters. *Exp. Pathol.*, 38, 241 – 248, 1990

SESZTÁKOVÁ, E., BEŇOVÁ, K., ŠKARDOVÁ, I., TOROPILA, M., LEISTEIN, R.: Postirradiation changes in myelogram of chickens. *Folia veterinaria*, 43, 4: 196 – 199, 1999

SESZTÁKOVÁ, E., BEŇOVÁ, K., TOROPILA, M., FALIS, M., BAJOVÁ, V.: Postirradiation changes of haemopoetic cells in Bone Marrow of chickens. V zborníku: *Current trends in morphology*, Košice, 2. júna 2000, s. 182 – 185

SESZTÁKOVÁ, E., BEŇOVÁ, K., LOVÁSOVÁ, E., DAŇOVÁ, D.: Zdravie hydiny a jeho ovplyvnenie faktormi vonkajšieho prostredia, V zborníku: *Animal protection and welfare*, 21. – 22.09. 2010, UVF Brno, s. 214 – 216, ISBN 978-80-7305-114-3

ŠKARDOVÁ, I., OJEDA, F., PROSBOVÁ, M, ROSIVAL, I.: Radiation induced disorders of haematopoesis in chickens (Apoptosis), *Folia veterinaria*, 38, 3 – 4, s. 81 – 84, 1994

**Kontaktná adresa:** Jana Štofániková, MVDr., Klinika vtákov a exotických zvierat, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81 Košice, jana.stofanikova@centrum.sk

# **SEKCE 10**

*Choroby malých zvířat*



## Matematické modelování zatížení titanové LCP ploténky po selhání implantátu u miniaturního prasete

### Mathematical modelling of crack fractography of titanium LCP after implant failure in a miniature pig

<sup>1</sup>Urbanová Lucie, <sup>1</sup>Crha Michal, <sup>2</sup>Stehlík Ladislav, <sup>1</sup>Nečas Alois, <sup>2</sup>Proks Pavel,  
<sup>1</sup>Srnc Robert, <sup>3</sup>Snášil Robert, <sup>3</sup>Fedorová Petra, <sup>4</sup>Tuček Pavel

<sup>1</sup>Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>3</sup>Student, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>4</sup>Katedra geoinformatiky, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci

#### Summary

*Evaluation of biomechanical properties of implants used for fracture fixation is recently based on mechanical loading in testing laboratories. An alternative to the biomechanical testing is computerized mathematical modeling. This study deals with creation of 3D model of locking compression plate (LCP) implant and its deformation testing using mathematic modeling with COMSOL Multiphysics software. The goal was to characterize forces causing the LCP implant failure and describe a crack fractography.*

**Keywords:** plate; bone defect; fracture; deformation; material failure

#### Úvod

V dnešní době existuje několik studií zabývajících se testováním mechanických vlastností, v žádné z nich však dosud není jednoznačně definováno, která složka působících sil je zásadní příčinou případného selhání fixace fraktury. Zmíněné práce se zabývají ex vivo testováním pevnosti různých konstrukcí kost/implantát studie (Hulse et al. 1997, Filipowicz et al. 2009, Zahn K et al. 2008, Urbanová et al. 2010). Všechny tyto studie vyžadovaly vyrobení testovaných vzorků a použití zkušebního stroje pro simulaci předem určeného zatížení dané konstrukce kost/implantát (Tyler et al. 2008, Urbanová et al. 2010). Tento způsob testování je velmi náročný časově i materiállově, zejména proto, že na každý typ zatížení modelu kost/implantát je zapotřebí nového měření a nových vzorků zlomené kosti s implantátem. Proto jsme jako alternativu uvedeného mechanického testování zvolili počítačovou modelaci, která umožňuje vytvořit přesný 3D model kost/implantát, a ten následně podrobit deformačním testům v prostředí matematických softwarů. V této studii bylo využito matematicko-stochastické modelování softwaru COMSOL Multiphysics ke stanovení sil, které způsobily selhání (zlomení) pětiděrové titanové 4,5 mm Locking Compression Plate (LCP), která byla použita k flexibilní pilířové osteosyntéze segmentálního defektu diafýzy femuru miniaturního prasete v experimentální studii hojení této kostní léze pomocí transplantace mezenchymových kmenových buněk v kombinaci s biokompatibilními skafoldy (Necas et al. 2010, Urbanová et al. 2010). Snahou je tímto modelováním v budoucnu nahradit drahé a časově náročné mechanické ex vivo testy konstrukce kost/implantát v biomechanické laboratoři.

### **Materiál a metodika**

Pro matematické modelování charakteristiky lomu implantátu byla zvolena pětiděrová titanová 4,5 mm LCP (Synthes ®) používaná k flexibilní pilířové osteosyntéze segmentálního diafyzálního defektu femuru stehenní kosti miniaturního prasete použitého v rámci výzkumného projektu NPV II 2B06130. Po lege artis utracení zvířat byly vypreparovány nedotčené femury prasat a ex vivo na nich byl vytvořen kostní defekt, fixovaný pětiděrovou 4,5mm LCP (Synthes ®). Tento vzorek byl předán k matematickému modelování na Regionální centrum pokročilých technologií a materiálů a Katedru matematické analýzy a aplikací matematiky pomocí softwaru COMSOL Multiphysics.

V první fázi byl vytvořen zjednodušený 3D model výše uvedené titanové kostní ploténky fixované dvěma šrouby v nejproximálnějším a nejdistančnějším otvoru ploténky. Tento model byl dále podroben modelaci zatížení vnějšími silami se známým rozložením (Nečas et al. 2010). Model byl následně zatížen dvěma způsoby (Nečas et al. 2010). V prvním případě tak, že působící síly směřovaly proti sobě a paralelně s dlouhou osou ploténky. Byla stanovena výsledná deformace ploténky a byly znázorněny hodnoty von Misesova napětí (von Mises 1913). Ve druhém případě byl 3D model zatížen tak, že působící síly směřovaly proti sobě, avšak šikmo k dlouhé ose ploténky. I v tomto případě byla stanovena výsledná deformace ploténky a byly znázorněny hodnoty von Misesova napětí (von Mises 1913).

Výsledky působení sil u takto vytvořených a zatížených 3D modelů uvedené LCP byly makroskopicky porovnány s etalonovým vzorkem, kterým byla v reálné situaci (in vivo) zlomená pětiděrová titanová 4,5 mm LCP, vyjmutá z femuru miniaturního prasete po selhání fixace segmentálního defektu stehenní kosti.

### **Výsledky**

Síly působící na model ploténky paralelně s jeho dlouhou osou vedly k symetrickému rozložení napětí, došlo k ohybu modelu ploténky a maximálního von Misesova napětí bylo dosaženo na vnějších okrajích otvorů modelu ploténky. Síly působící na model ploténky šikmo k jeho dlouhé ose vedly k asymetrickému rozložení napětí s tendencí von Misesova napětí kumulovat se šikmo okolo prostředního otvoru modelu implantátu.

### **Diskuse**

První testovaný způsob zátěže modelu implantátu vede k symetrickému rozložení napětí, dojde k ohybu ploténky a maximálního von Misesova napětí je dosahováno na vnějších okrajích otvorů. Toto působení zátěže se zdá být dobře simulovatelné v laboratorních podmínkách (při zátěžovém testu) a výstup může tedy sloužit ke kalibraci modelu. Z výsledků druhého testovaného způsobu zátěže modelu LCP implantátu si lze všimnout, že von Misesovo napětí má tendenci se kumulovat šikmo kolem středního otvoru, což odpovídá daleko lépe lomům, které v reálných klinických podmínkách vedou často šikmo přes prostřední otvor ploténky. Ovšem ani tento asymetrický typ zátěže modelu ploténky, použitý v tomto numerickém experimentu, patrně zcela neodpovídá reálným podmínkám. Výsledky naší studie na příkladu zlomené pětiděrové titanové 4,5 mm LCP však napovídají, že je možné hledat nastavení okrajových podmínek tak, aby kritické napětí bylo překročeno v předem určených místech. Určení rozložení a velikostí sil, působících na implantát a vedoucích k jeho zlomení in vivo, bude vyžadovat další matematické modelování s využitím kombinací různých způsobů

zatížení implantátu. Matematicko-stochastické modelování toto umožňuje, a v porovnání s mechanickým testováním reálných vzorků (konstrukcí kost/implantát) se jeví jako metoda relativně levná, dostupná a časově méně náročná.

### **Závěr**

Na zjednodušeném modelu jsme dokázali existenci smykových sil působících nesymetricky uprostřed pětiděrové titanové 4,5 mm LCP, čímž dochází k deformaci ploténky analogicky jako v případě skutečného objektu, tedy zlomené LCP vyreparované po selhání tohoto implantátu použitého k flexibilní pilířové osteosyntéze. Podle našeho názoru by metoda matematického modelování mohla v budoucnu najít široké uplatnění při testování sil působících na implantát použitý pro různé typy fixace fraktur.

### **Poděkování**

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (Výzkumný projekt NPV II 2B06130), grantové agentury IGA VFU Brno (Projekt 45/2010/FVL). Výsledky studie byly publikovány v Acta vet Brno 2010, 79: 621-626 a Sborníku příspěvků z výsledků řešení projektů IGA VFU Brno 2010.

### **Literatura**

NEČAS, A.; URBANOVÁ, L.; FÜRST, T.; ŽENČÁK, P.; TUČEK, P. Mathematical Modelling of Crack Fractography after Implant Failure of Titanium 4.5 LCP Used for Flexible Bridging Osteosynthesis in a Miniature Pig. Acta Vet Brno. 2010, vol. 79, no. 4, s. 621-626.

VON MISES, R. Mechanik der Festen Korper im plastech deformablen Zustand. Göttin Nachr Math Phys. 1913, vol. 1, s. 582-592.

FILIPOWICZ, D.; LANZ, O.; MC LAUGHLIN, R.; ELDER, S.; WERRE, S. A biomechanical comparison of 3,5 locking compression plate fixation to 3,5 limited contact dynamic compression plate fixation in a canine cadaveric distal humeral metaphyseal gap model. Vet Comp Orthop Traumatol. 2009, vol. 22, s. 270-277.

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.

TYLER, JM.; LARINDE, W.; ELDER, SH. A device for performing whole bone torsional testing in a single-axis linear motion testing machine. Vet Comp Orthop Traumatol. 2008, vol. 21, s. 478-480.

URBANOVÁ, L.; SRNEC, R.; PROKS, P.; STEHLÍK, L.; FLORIAN, Z.; NÁVRAT, T.; NEČAS, A. Comparison of the resistance to bending forces of the 4.5 LCP plate-rod construct and of 4.5 LCP alone applied to segmental femoral defects in miniature pigs. Acta Vet Brno. 2010, vol. 79, no. 4, s. 613-620.

ZAHN, K.; FREI, R.; WUNDERLE, D.; LINKE, B.; SCHWIEGER, K.; GUERGUIEV, B.; POHLER, O.; MATIS, U. Mechanical properties of 18 different AO bone plates and the clamp-rod internal fixation system tested on a gap model construct. Vet Comp Orthop Traumatol. 2008, vol. 21, s. 185-194.

**Kontaktní adresa:** Lucie Urbanová, MVDr., Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, lucieurbanova@email.cz

## Vztah mezi rupturou předního zkříženého vazů a boreliózou u psů The relationship between ligament cruciate cranial rupture and borreliosis in dogs

Blažek-Fialová Iva, Dvořák Milan

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

### Summary

*The article explains a possible relation between cruciate ligament rupture (ligamentum cruciatum craniale, hereinafter as LCC) and clinical borreliosis disease on an ongoing study on four patients with positive IgG antibodies titre. In two dogs the LCC rupture was diagnosed bilaterally. Early diagnosis and initiation of borreliosis therapy may prevent LCC damage and subsequent rupture.*

**Keywords:** *ligament cruciate cranial;, borreliosis; antiborreliosis titre*

### Úvod

Borelióza byla popsána poprvé v USA v roce 1980, v Evropě o rok později<sup>1</sup> a v dnešní době se považuje za běžně diagnostikované onemocnění u lidí, psů a koček, přenášené členovci. Za původce tohoto onemocnění jsou považovány různé sérotypy *Borrelia burgdorferi*. Spirochety se v infikovaném hostiteli mohou šířit měkkou tkání a často napadají nejbližší klouby v oblasti přisátí klíštěte. V kloubech, které jsou od místa přisátí infikovaného klíštěte vzdálenější se může zánět rozvíjet později v závislosti na rychlosti replikace bakterií a aktivitě obranných mechanismů napadeného hostitele.<sup>2</sup> Ne u všech infikovaných zvířat dochází k rozvoji klinických příznaků. Důvod tohoto fenoménu není zatím znám. U koček je zatím známo pouze omezené množství údajů a klinických studií, které by potvrdzovaly vznik a rozvoj tohoto onemocnění u tohoto živočišného druhu<sup>3</sup>.

Ruptura LCC se řadí u psů k nejčastějším příčinám kulhání na pánevní končetinu. Primární funkcí LCC je omezení kраниокаудálního posunu tibie vůči femuru, dále pak zabránění hyperextenze kolenního kloubu a jeho nadměrné vnitřní rotace. V této souvislosti je literaturou zmiňována možnost degenerace LCC působením infekce původce *Borellia burgdorferi*.<sup>4</sup>

### Diagnostika boreliózy

A: Klinická diagnostika boreliózy je v praxi založena na základě čtyř kritérií: 1 - Anamnesticky nebo klinicky zjištěné přisátí klíštěte v oblasti výskytu infikovaných klíšťat (ohnisko výskytu). 2 - Typické klinické příznaky boreliózy. 3 - Pozitivní titr specifických sérových protilátek (nepřímý průkaz boreliózy). 4 - Rychlá klinická odezva na zahájenou cílenou antibiotickou terapii.

B: Laboratorní diagnostika je založena na nepřímém průkazu patogena pomocí sérologického vyšetření metodou ELISA, nepřímé imunofluorescence a Western blot nebo na přímém průkazu patogena v tělních tekutinách (nejčastěji synoviální tekutině) metodou PCR. Nevýhodou nepřímého sérologického průkazu onemocnění je nemožnost odlišení případného titru postvakcinačních a postiinfekčních protilátek.



## Metodika

Do studie jsou zařazováni pacienti u nichž jsou klinickým, rentgenologickým a posléze chirurgickým způsobem zjišťovány parciální nebo totální ruptury LCC a u nichž jsou zároveň sérologickou metodou ELISA (komerční diagnostický set Dog EIA Borrelia IgG/IgM (TEST-LINE, Brno, Czech Republic) z periferní krve zjišťovány pozitivní antiboreliové IgG. Pacienti s pozitivním titrem IgG protilátek jsou současně sérologicky testováni na antiboreliové IgM. Dle návodu výrobce byly vzorky s indexem pozitivity vyšším než 1,15 vyhodnoceny jako pozitivní, vzorky s indexem pozitivity v rozmezí 0,85 – 1,15 jako dubiozní, vzorky s indexem pozitivity nižším než 0,85 jako negativní.

Klinické vyšetření je prováděno v sedaci medetomidin 0,01mg/kg IV (Domitor, ORION, Finland) v kombinaci s butorphanolem 0,2 mg/kg IV (Butomidol, Richter, Austria), přičemž je prováděn zásuvkový a tibiální kompresní test.

## Výsledky

Ve studii máme doposud 4 pacienty (viz Tabulka 1) U žádného psa nepředcházela odběrům krve na serologické vyšetření medikace jakýmkoliv antibiotiky, žádný pes nebyl nikdy vakcinovaný proti borelióze. Všichni psi se podrobili artrotomii kolenního kloubu s revizí tvaru a uložení obou menisků a s různou formou periartikulární stabilizace kolenního kloubu. Byla použita pěti bodová stupnice hodnocení kulhání (1 - kulhání zaznamenané při zátěži, 2 - kulhání v kroku, 3 – střední kulhání v kroku, v zastavení končetinu neodlehčuje, 4-výrazné kulhání viditelné v kroku, pes končetinu odlehčuje, 5 – pes končetinu vůbec nezatěžuje).

Tabulka 1: Soubor pacientů

	Pohlaví	Věk (roky)	Stupeň kulhání	Délka trvání klin.příznaků (týdny)
1	pes	6	4/5	8
2	pes	6	2/5	2
3	pes	3,5	4/5	4
4	fena	7	4/5	1
průměr		5,6	3,5	3,8

Tabulka 2: Serologické a klinické výsledky

	IgG před terapií	IgG po 5ti týdenní atb terapii	Bilaterální poškození LCC
1	2,35	1,39	ne
2	2,72	1,17	ano
3	2,6	-	ano
4	1,37	-	ne
průměr	2,26	1,28	

## Diskuze

V synoviální tekutině artroticky postižených kloubů u lidí bylo pomocí PCR detekováno mnoho bakteriálních DNA.<sup>5</sup> Koleno člověka i psa je za normálních okolností sterilní. Přítomnost bakteriálních DNA uvnitř synovie byla signifikantně spojena s výskytem ruptury LCC.<sup>4</sup> Populace bakterií uvnitř kloubu patří k velmi významným faktorům rozvoje artritidy.<sup>5</sup> Pozitivní titry protilátek IgG v naší studii potvrzují kontakt patogena s

pacientem a v dále pokračující studii by mohly potvrdit i naši hypotézu vlivu chronicky probíhajícího onemocnění boreliózou na rupturu LCC u psů. Dva ze čtyřech pacientů měli rupturu LCC bilaterálně.

Pacienti s klinickými projevy boreliózy se mohou projevovat velmi různorodě nespecifickými symptomy mezi něž řadíme horečku (pouze v akutní formě onemocnění), apatii, anorexii, kulhání, otoky kloubů, slabost končetin, lymfadenopatii. U chronických forem onemocnění dochází k rozvoji glomerulonefritidy, neurologickým příznakům a perzistentních infekcích.<sup>6</sup> Na našem pracovišti jsme u séropozitivních jedinců nacházely převážně projevy postižení muskuloskeletálního systému

U pacientů účastnících se naší studie jsme přistoupili v terapeutické fázi k aplikaci doxycyclinu a stabilizaci kolenního kloubu operativním ošetřením. Doxycyclin byl podáván v dávce 10 mg/kg BID a doba užívání byla minimálně 5 týdnů. Po této době jsme opakovali sérologické vyšetření (viz Tabulka 2). Léčba způsobuje redukci titru protilátek i samotných spirochét v měkkých tkáních a slouží jako prevence proti nově vzniklým onemocněním kloubů nebo jako protekce, kdy brání dalšímu poškození již postižených kloubů.

Naše práce obsahuje zatím pouze velmi malé množství pacientů, což je dáno krátkou dobou existence této klinické studie a proto není zatím možné porovnávat naše výsledky s některými již publikovanými údaji. Taktéž interpretaci výsledků serologického vyšetření je nutné hodnotit komplexně. Například podle velikosti titru IgG a IgM protilátek je nutné vyhodnotit v jaké fázi onemocnění se pacient právě nachází. Neméně důležitá je informace o vakcinaci proti borelióze, která má za následek postvakcinační zvýšení titru protilátek až k pozitivním hodnotám.

### **Závěr**

Při ruptuře LCC u seropozitivních psů na boreliózu je vhodné zahájit co nejdříve kauzální antibiotickou terapii a chirurgické ošetření kolenního kloubu s rupturou LCC. Tímto postupem můžeme předejít ruptuře LCC v kontralaterálním kolenním kloubu.

### **Literatura**

1. Kornblatt, A.N, Urband, PH, Steere, A.C. Arthritis caused by *Borrelia burgdorferi* in dogs. J Am Med Assoc 1985, **186**, 960-964
2. Straubinger, R.K Lyme Borreliosis in Dogs Carmichael L.E; Recent Advances in Canine Infections Disease Alleman, AR The diagnosis and treatment of tick borne diseases in dogs. NAVC 2005; www.ivis.org
3. Schulz, K. Disease of the Joints. In:Fossum, T.W. Small Animal Surgery 2007 St.Louis. 1162, 1143-1315 Steere, A Lyme disease. N Engl J Med 1989, **321**, 586-596
4. Muir, P. et al. Detekce DNA z řady bakteriálních druhů v kloubních kloubech psů s inflamatorní kloubní artritidou a související degenerativní anteriorní křížovou vazou. Microbial Pathogenesis 42, 2007;47-55
5. Gérard, H.,C. et al. Chromosomální DNA z řady bakteriálních druhů je přítomna v synoviální tkáni pacientů s různými formami artritidy. Arthritis Rheum 2001;44:1689-1697
6. Alleman AR: The diagnosis and treatment of tick borne diseases in dogs. NAVC 2005, www.ivis.org

**Kontaktní adresa:** Iva Blažek-Fialová, MVDr., Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, ivafialova@email.cz

**Porovnání účinku hydroxyethylškrobu 200/0.5 (HAES<sup>®</sup>) v 6% nebo 10% koncentraci, 130/0.4 (Voluven<sup>®</sup>) a fyziologického roztoku na stabilizaci krevního tlaku u králíků v celkové anestézii při artrotomii kolenních kloubů**

**Cardiovascular changes after administration of hydroxyethyl starch 200/0.5 (HAES<sup>®</sup>) in 6% or 10% concentration, 130/0.4 (Voluven<sup>®</sup>) and saline for joint surgery in rabbits**

**Fialová Lucie, Lexmaulová Leona, Raušer Petr, Srnec Robert, Dvořák Milan, Nečas Alois**

*Oddělení chirurgie a ortopedie, klinika malých zvířat, fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká republika*

**Summary**

*Synthetic colloids may be used to restore blood volume and, indirectly, to increase blood pressure during anaesthesia. In this study we compared the impact of hydroxyethyl starch (HES) of various concentrations and molecular weight (HES 200/0.5 as a 6% solution - HAES 6 and as a 10% solution - HAES 10, and HES 130/0.4 as a 6% solution - Voluven) with of 0.9% saline solution (Saline) on the cardiovascular system.*

*No significant changes in HR, SpO<sub>2</sub>, and RR were observed in any of the groups. No significant difference was found in comparison between baseline and postapplication values of SAP, DAP, and MAP ( $p > 0.05$ ).*

**Keywords:** *hydroxyethyl starch; colloids; plasma-expander; fluid therapy*

**Úvod**

Hypotenze a hypovolémie jsou rizikovými faktory při anestézii zvířat (Thurmen a kol., 2007). Rychlá stabilizace krevního oběhu snižuje riziko poškození orgánů (zejména ledvin) a může být životně důležitá.

Infúzní roztoky se používají pro rychlou náhradu při ztrátě cirkulujícího objemu nebo vazodilataci. Typ a objem infuzního roztoku závisí na závažnosti hypovolémie a druhu zvířete. Na rozdíl od jiných druhů zvířat (např. psa) nevede hypovolémie u králíků ke kompenzační tachykardii. Fakt, že se během hypovolémie u králíků setkáváme s normální nebo sníženou tepovou frekvencí predisponuje tato zvířata ke vzniku edému plic (Lichtenberg, 2004). Makromolekulární koloidní roztoky (např. hydroxyethylškrob – HES) zvětšují objem cirkulujících tekutin přestupem vody z intersitia a jejím zadržením v cévním řečišti po dobu několika hodin (Hughes a Boag, 2006). Silný a dlouhodobý efekt koloidů je vysokým rizikem pro předávkování. V této studii byli použiti králíci, kteří jsou relativně senzitivní na objemové předávkování (Flecknell, 1998). Během základní anestézie králíků je doporučena dávka izotonických krystaloidů 5-10 ml/kg/h krystaloidů (Heard 2006). V případě hypovolémie je doporučeno podání 10-15 ml/kg/h krystaloidů nebo 5 ml koloidů během 5-10 minut (Lichtenberg, 2004, Heard, 2006).

### **Cíl studie**

Cílem studie bylo srovnání účinku fyziologického roztoku a hydroxyethylškrobu o různé molekulární velikosti a koncentraci (HES 200/0,5 6%, 10%, a HES 130/0,4 6%) na kardiovaskulární systém (na zvýšení krevního tlaku) u králíků během celkové anestézie.

### **Metodika**

U novozélandských bílých králíků jsme během celkové anestézie z důvodu experimentální artrotomie s transplantací kmenových buněk (NPV II výzkumný projekt 2B06130) sledovali změny arteriálního tlaku po aplikaci hydroxyetylškrobu nebo fyziologického roztoku.

Do studie bylo zahrnuto dvacet čtyři novozélandských bílých králíků (14 samců, 10 samic) starých  $1,1 \pm 0,22$  roků, váhy  $2,8 \pm 0,59$  kg. Všichni králíci byli klinicky zdraví. Dvacet čtyři králíků bylo rozděleno do 4 skupin po 6 zvířatech – skupina HES 6, (aplikace HES 200/0,5 6%), skupina HES 10 (aplikace, HES 200/0,5 10%), skupina VOL (aplikace HES 130/0,4 6%) a skupina CON (aplikace fyziologického roztoku).

Všechna zvířata byla sedována směsí xylazinu (3mg/kg; Rometar, Spofa, Česká republika) a ketaminu (30 mg/kg; Narkamon, Spofa, Česká republika) intramuskulárně do dorzální lumbální svaloviny. Celková anestézie byla indukována propofolem (1-2 mg/kg; Propofol, Fresenius, Rakousko) aplikovaného intravenózně do pravé ušní vény přes intravenózní katétr a vedena v propofolu (0,1 mg/kg/min) aplikovaného kontinuálně pomocí injektomatu (Braun Perfusor S, B. Braun, Německo).

Do levé mediální ušní artérie byl zaveden 22G katétr (Vasofix, B.Braun, Německo) pro kontinuální invazivní měření arteriálního tlaku (Mindray, Čína). Dvacet minut po úvodu do celkové anestézie byly zaznamenány dechová frekvence (RR), tepová frekvence (HR), saturace hemoglobinu kyslíkem ( $SpO_2$ ), hodnoty systolického (SAP), středního (MAP) a diastolického (DAP) arteriálního tlaku (čas  $T_0$ ). Následně byl králíkům na základě zařazení do jednotlivých skupin (HES 6, HES 10, VOL, CON) aplikován přes intravenózní katétr zavedený do pravé ušní žíly daný typ infúzního roztoku (HES 200/0,5 6%, HES 200/0,5 10%, HES 130/0,4 6%, fyziologický roztok) v dávce 3 ml/kg během 3 minut. V následujících 30-ti minutách jsme v pěti minutových intervalech zaznamenávali RR, HR, SAP, MAP, DAP,  $SpO_2$  a RR ( $T_5-T_{30}$ ).

### **Výsledky**

Během studie nebyly u žádné ze skupin zvířat zjištěny signifikantní rozdíly hodnot sledovaných parametrů ve srovnání s jejich výchozími hodnotami.

### **Diskuze**

Izotonické krystaloidy zvyšují krevní objem rychleji ve srovnání s koloidy. Jejich efekt je úměrný podávanému objemu, ale je krátkodobý (DiBartola a Bateman, 2006). Naproti tomu aplikace HAESu (6% nebo 10%) nebo Voluvenu navíc vede k přesunu tekutin z intersticia do cév a tím zvětšuje cirkulující objem až o 170 % podaného objemu (Hughes a Boag, 2006). Efekt koloidních roztoků je částečně podmíněn přestupem tekutiny z intersticia do cév, které vyžaduje určitý čas, proto je nástup účinku koloidů pomalejší (Hughes a Boag, 2006). Zvýšení onkotického tlaku, vyvolané koloidy, zadržuje tekutinu v cévách a díky tomu je působení koloidů podstatně delší ve srovnání s roztoky krystaloidů (Baron, 1992, Hughes a Boag, 2006, Silversstein a kol.,

2005). Zvětšení objemu cirkulujících tekutin nepřímo vede ke zvýšení krevního tlaku (Lichtenberg, 2004). Na základě těchto publikovaných faktů lze předpokládat rychlý vzestup cirkulujícího objemu a tím i arteriálního tlaku po aplikaci fyziologického roztoku (skupina CON), jakožto zástupce izotonických krystaloidů, což potvrzuje např. studie provedená Silverstain a kol. (2005). Pozdější, ale výraznější vzestup cirkulujícího objemu by měl nastat po aplikaci HAES 10% (skupina HES 10), který je ve srovnání s krevní plazmou mírně hyperonkotický (Baron, 1992, Hughes a Boag, 2006). O účinku koloidního roztoku však nerozhoduje jeho koncentrace, ale především molekulová hmotnost (James a kol., 2004, Madjdpour a kol., 2004). Bylo zjištěno, že plazmaexpanzní účinek koloidů je podmíněn přítomností menších molekul (Hughes a Boag, 2006). Z tohoto pohledu HES 130/0,4 obsahuje hydroxyetylškrob s menší molekulovou hmotností a měl by tedy mít větší efekt na zvýšení cirkulujícího objemu než HES 200/0,5. V naší studii ale k signifikantnímu zvýšení arteriálního tlaku nedošlo po aplikaci ani u jedné skupiny králíků. Tento fakt mohl být podmíněn relativně malým objemem podávaných koloidních roztoků. U koloidů je riziko předávkování objemem vyšší než u izotonických krystaloidů, protože zvětšují cirkulující objem výrazněji (přestupem tekutiny z intersticia do cév) než izotonické krystaloidy (např. fyziologický roztok) (Mathews, 2006). Na druhou stranu 30-ti minutový časový interval mohl být relativně krátký k dosažení maximálního efektu aplikace koloidů (Silverstein a kol., 2005).

### **Závěr**

Koloidní roztoky hydroxyetylškrobu i fyziologický roztok mají obdobné účinky na cirkulující objem u králíků a lze je použít k udržení normovolémie (nepřímo i normotenze) během celkové anestézie.

### **Poděkování**

Tato práce vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky (NPV II Výzkumný projekt 2B06130) a grantové agentury AGEL – MH.

### **Literatura**

Baron JF (1992) Pharmacology of low molecular weight hydroxyethyl starch. *Annales Francaises d anesthésie et de reanimation* 11, 509–515.

DiBartola SP, Bateman S (2006): Introduction to fluid therapy. In DiBartola SP: Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. 3<sup>th</sup> ed., Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 325-344

Flecknell PA (1987) Laboratory animal anaesthesia. An introduction for research workers and technicians, Academic Press, London, 155 p.

Heard DJ: Anesthesia, Analgesia, and Sedation of Small Mammals. In: Quesenberry K.E., Carpenter J.W.: Ferrets, Rabbits, and Rodents Clinical Medicine and Surgery. 2<sup>nd</sup> edition, Saunders, St. Louis, Missouri, 2006, pp:356-369

Hughes D, Boag AK (2006) Fluid therapy with macromolecular plasma volume expanders. In DiBartola SP: Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. 3<sup>th</sup> ed., Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 625–630.

James MFM, Latoo MY, Mythen MG, Mutch M, Michaelis Ch, Roche AM, Burdett E (2004) Plasma volume changes associated with two hydroxyethyl starch colloids following acute hypovolaemia in volunteers. *Anaesthesia* 59, 738–742.

Lichtenberg M, 2004: Principles of Shock and Fluid Therapy in Special Species. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 13 (3): 142-153

Madjdpour C, Dettori N., Frascarolo P, Burki M, Boll M, Fisch A, Bombeli T, Spahn DR (2005) Molecular weight of hydroxyethyl starch: is there an effect on blood coagulation and pharmacokinetics? *British Journal of Anaesthesia* 94, 569–576.

Mathews KA (2006): Monitoring fluid therapy and complications of fluid therapy. In DiBartola SP: *Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice*. 3<sup>th</sup> ed., Saunders Elsevier, St. Louis, pp. 377-391

Silverstein DC, Aldrich J, Haskins SC, Drobatz KJ, Cowgill LD (2005) Assessment of changes in blood volume in response to resuscitative fluid administration in dogs. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 15, 185–192.

Thurmon JC, Tranquilli WJ, Grimm KA (2007) *Lumb & Jones Veterinary Anesthesia*. 4<sup>th</sup> ed., Blackwell Publishing, Oxford, 1096 p.

**Kontaktní adresa:** Fialová Lucie, MVDr., Oddělení chirurgie a ortopedie, klinika malých zvířat, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, [fialu@seznam.cz](mailto:fialu@seznam.cz)

## Oxidační stres u fen s tumory mléčné žlázy

### Oxidative stress in females with mammary gland tumors

**Stavinohová Renata, Lorenzová Jana, Crha Michal, Mrázová Markéta,  
Pfeifr Jakub**

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*Oxidative stress in humans is associated with surgery, tissue ischemia, inflammation, tumor proliferation, reperfusion damage. In dogs, there are studies investigating the oxidation and antioxidant status in patients with lymphoma, with heart disease, kidney disease. There is only one foreign study, which follows the parameters of oxidative stress in dogs with mammary gland tumors. The article summarizes findings obtained by IGA VFU BRNO 62/2010/FVL in which we examined oxidative stress in dogs with mammary gland tumors.*

**Keywords:** *mammary gland tumors; oxidative stress; antioxidants*

#### Úvod

Na Oddělení chirurgie a ortopedie, Kliniky chorob psů a koček, Fakulty veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutické univerzity v Brně, probíhá výzkum v oblasti tumorů mléčné žlázy u fen dlouhodobě. Naše sledování bylo nejprve zaměřeno na plemennou predispozici a stáří fen s tumory mléčné žlázy. Dále jsme sledovali vliv některých vybraných ukazatelů na prognózu onemocnění fen po operaci tumorů mléčné žlázy (Lorenzová a kol.: Patient survival periods and death cause following surgical treatment of mammary gland tumours depending on histological type of tumour: retrospective study of 221 cases. *acta vet. brno* 2010). Zkoumali jsme možné asociace mezi mutacemi a polymorfismy (SNP) vybraných kandidátních genů a vnímavosti ke vzniku tumorů mléčné žlázy u psů.

V roce 2010 jsme získali grant IGA VFU BRNO 62/2010/FVL s názvem „Význam parametrů oxidačního stresu u fen s tumory mléčné žlázy a efekt vybraných antioxidantů suplementovaných těmto fenám“. V rámci tohoto grantu jsme se zabývali oxidačním stresem u fen s tumory mléčné žlázy.

Tento projekt byl pilotní studií pro další analýzu markerů oxidačního stresu a antioxidační kapacity u fen s tumory mléčné žlázy a využití antioxidantů v medicíně malých zvířat.

#### Materiál a metodika

Do studie bylo zařazeno 40 fen, rozdělených do 5ti skupin. V I. a II. skupině byly feny s tumorem mléčné žlázy, u nichž jsme provedli mastektomii (Obrázek 1) a kastraci v anestézii a tumor mléčné žlázy jsme histologicky vyšetřili. Ve III.-V. skupině byly feny zdravé. Zdravé feny IV. skupině byly podrobeny anestézii. Vitamínový doplněk pouze s  $\alpha$  tokoferolem /vitamínem E byl podáván fenám v I. a V. skupině v dávce 100 mg pro toto per orálně 1x denně. Vitamín E jsme měřili v I., II., III. a V. skupině v krevním séru kapalinovou chromatografií. Celkovou antioxidační kapacitu TRAP (Total Radical – trapping Antioxidative Potential – chemiluminiscenčně) a markery oxidačního stresu TBARS/MDA  $\eta$ mol/ml (Thiobarbituric acid reactives substance/

malondialdehyd – kolorimetricky a proteinové SH (thiolové) skupiny ( $\mu\text{mol/l}$  – spektrofotometricky) jsme stanovovali v krevním séru ve skupině I-V.



Obrázek 1: Totální bilaterální mastektomie, sutura rány, foto R. Stavinohová

### Výsledky

U fen s tumory mléčné žlázy jsme zjistili vyšší množství TBARS (biomarkerů oxidačního stresu), nižší množství proteinových SH skupin (biomarker oxidačního poškození) a nižší celkovou antioxidační kapacitu (TRAPu).

### Diskuze

Organismus reaguje na zvýšení kyslíkových radikálů aktivací antioxidačních mechanismů.<sup>1,2,3</sup> Poměr oxidačních a antioxidačních mechanismů by měl být rovnovážný.<sup>1,2,3</sup> Pokud se rovnováha posune ve prospěch kyslíkových radikálů, vzniká v organismu oxidační stres.<sup>1,2,3</sup> Množství kyslíkových radikálů se zvyšuje při zátěži organismu fyziologickými stavy, patologickými stavy a stresem.<sup>1,2,3</sup> Oxidační stres u lidí je spojován s chirurgickým zákrokem, ischemií tkáně, zánětem, nádorovým bujením, reperfučním poškozením.<sup>2,3</sup>

U psů existují studie, zkoumající oxidační a antioxidační statut u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním<sup>4</sup>, onemocněním ledvin<sup>4</sup> a lymfomem<sup>5</sup> a s *diabetes mellitus*<sup>6</sup>. Existuje jediná studie, která sleduje parametry oxidačního stresu u fen s tumory mléčné žlázy.<sup>1</sup> Autoři v této studii poukazují na rozšíření studie o větší skupinu vyšetřovaných zvířat, častější odběr vzorků a využití dalších markerů oxidační a antioxidační kapacity.<sup>1</sup>

Cílem naší studie bylo stanovit u zdravých a tumorem mléčné žlázy postižených fen markery oxidační a antioxidační aktivity. Zajímalo nás, čím bychom mohli tlumit oxidační stres u pacientů s tumory mléčné žlázy. Naším cílem bylo zjistit, jak bychom mohli pozitivně ovlivnit pooperační období pacientek a zkvalitnit jejich život.

Výsledky hodnot markerů oxidační a antioxidační aktivity u fen s tumory mléčné žlázy naší studie jsou srovnatelné s údaji, uváděnými v literatuře.<sup>1</sup> Naše studie navíc



poukazuje na nižší hodnoty celkové antioxidační kapacity a nižší množství proteinových SH skupin u fen s tumory mléčné žlázy. Prokázali jsme, že oxidačním stresem jsou zatíženy pacientky s tumorem mléčné žlázy. Neprokázali jsme nepříznivý vliv oxidačního stresu na hojení rány u pacientů po excizi tumoru mléčné žlázy. Nicméně jsme zjistili, že podávání antioxidantů fenám zlepšuje hojení operační rány po excizi tumoru mléčné žlázy.

### Závěr

Další výsledky projektu IGA VFU BRNO 62/2010/FVL „Význam parametrů oxidačního stresu u fen s tumory mléčné žlázy a efekt vybraných antioxidantů suplementovaných těmto fenám“ budou publikovány ve vědeckém časopise s Impact faktorem (Acta Vet Brno), název článku je „Markery oxidačního stresu a markery antioxidační kapacity u fen s tumory mléčné žlázy a efekt vybraných antioxidantů suplementovaných fenám s nádorem mléčné žlázy“.

### Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU BRNO 62/2010/FVL.

### Literatura

1. Szczubial, M., Kankofer, M., Lopuszynski, W., Dabrowski, R., Lipko, J. Oxidative stress parameters in bitches with mammary gland tumors. *J.Vet. Med.A. Blackwell Verlag, Berlin, ISSN 0931-184X. 2004, vol.51, s. 336-340.*
2. Sies, H., Stahl, W. Vitamins E and C,  $\beta$  carotene, and other carotenoids as antioxidants. In: *Am J Clin Nutr. 1995, vol.62, s.1315-1321*
3. Badid, N., Ahmed, F. Z. B., Merzouk, H., Belbraouet, S., Mokhtari, N., Merzouk, S.A., Benhabib, R., Hamzaoui, D., Narce, M. Oxidant/Antioxidant status, lipids and hormonal profile in overweight women with breast cancer.
4. Buranakarl, C., Trisiriroj, M., Pondeenana, S., Tungjitpeanpong, T., Jarutakanon, P., Penchome, R. Relationships between oxidative stress markers and red blood cell characteristics in renal azotemic dogs. In: *Res Vet Sci. 2009, vol. 86, no.2, s.309-13. Epub 2008 Jul 29.*
5. Winter, J. L., Barber, L. G., Freeman, L., Griessmayr, P. C., Milbury, P. E., Blumberg, J. B. Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. In: *J Vet Intern Med. 2009, vol. 23, no. 2, s.311-6. Epub 2009 Feb 4.*
6. Chansaisakorn, W., Sripavatsarakorn, P., Sopakdittapong, P., Trisiriroj, M., Pondeenana, S., Buranakarl, C. Oxidative stress and intraerythrocytic concentrations of sodium and potassium in diabetic dogs. In: *Vet Res Commun. 2009; vol. 33, no.1, s.67-75. Epub 2008 Jul 5.*

**Kontaktní adresa:** Renata Stavínohová, MVDr., Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, renatastavínohova@seznam.cz

## Acidobazický profil psů se syndromem dilatace a volvulu žaludku Acid-base profile in dogs with gastric dilatation and volvulus

Uhríková Ivana, Lexmaulová Leona, Řeháková Kristína

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

### Summary

Acid-base examination is an unreplacable examination for evaluation of changes in internal enviroment. Twelve dogs with gastric dilatation and volvulus (GDV) were included in this study. Blood was collected pre-operatively (from a. dorsalis pedis or v. jugularis) for acid-base and routine biochemistry examination. By evaluation of results we diagnosed: uncompensated respiratory acidosis (RAC, n=3), uncompensated metabolic acidosis (MAC, n=3), uncompensated RAC with MAC (n=1), compensated MAC (n=1) and individuals without acid-base disturbance (n=4). Corrected chloride and strong ion gap (SIG) were calculated. Decreased SIG were observed in 4 dogs, two of them had increased lactate. Corrected chlorides shows hypochloridemia in one patient with decreased SIG. Most common acid-base disturbance in dogs with GDV was RAC and MAC associated with lactate accumulation.

**Keywords:** acid-base; strong ion gap; dogs; gastric dilatation and volvulus; GDV

### Úvod

Acidobazické (AB) vyšetření patří mezi nezastupitelná vyšetření poskytující aktuální informace o stavu vnitřního prostředí. Pro hodnocení diagnostického významu AB vyšetření je vhodný syndrom dilatace a volvulu žaludku (GDV), u kterého se můžeme setkat s mnoha AB poruchami. Cílem sledování proto bylo vyhodnocení nejčastějších změn AB parametrů u pacientů s GDV. Získané poznatky mohou v budoucnosti pomoci zlepšit podpůrnou terapii pacientů s GDV.

### Materiál a metody

Do studie bylo zahrnuto 12 psů (8 samců, 4 samice) přijatých na Klinikou chorob psů a koček se syndromem GDV. Od všech pacientů byla předoperačně odebrána krev pro acidobazickou (*arteria dorsalis pedis*; n=7 a *vena jugularis externa*; n=5, stanovení pH, pCO<sub>2</sub>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, výchylky bazí) a biochemickou (*vena jugularis externa*; n=12) analýzu. AB vyšetření bylo provedeno do 10 min po odběru krve, heparinová plazma a sérum byly separovány ihned po centrifugaci (5, resp. 15 min, 3000 otáček/min). Z heparinové plazmy byla stanovena hladina laktátu, další parametry byly stanoveny ze séra (koncentrace albuminu, fosforu, vápníku, sodíku, draslíku, chloridů) na automatickém analyzátoru DPC Konelab 20i (Thermo Fisher Scientific, Finland).

Na základě výsledků vyšetření byl zhodnocen AB profil pacientů s použitím referenčních hodnot podle Willarda a Tvedtena (2004). Dále byly vypočítané korigované chloridy podle vzorce  $Cl^- = [Cl^-]_{m\acute{e}řen\acute{e}} * 146 / [Na^+]_{m\acute{e}řen\acute{y}}$  a rozdíl zdánlivé a efektivní difference silných iontů (strong ion gap, SIG) podle vzorce  $SIG = [albumin] * 4,9 - AG$ , přičemž AG (anion gap) =  $[Na^+ + K^+] - [HCO_3^- - Cl^-]$ . Pokud byl rozdíl mezi referenční hladinou chloridů a korigovanými chloridy menší než -4 mmol/l, hodnotily jsme vliv chloridů jako acidózní, v případě rozdílu vyššího než 4 mmol/l šlo o alkalózní vliv. Hodnota SIG nižší než -5 mmol/l poukazuje na přítomnost neměřených aniontů, tj. acidózní stav (Constable a Stämpfli, 2005; DiBartola, 2006).

## Výsledky

Výsledky jsou sumarizovány v tabulce 1. Vyšetřením acidobazického profilu byla zjištěna nekompensovaná respirační acidóza (RAC, n=3), nekompensovaná metabolická acidóza (MAC, n=3), nekompensovaná kombinovaná RAC s MAC (n=1) a kompenzovaná MAC (n=1). Čtyři jedinci vykazovali acidobazickou rovnováhu.

Tabulka 1: Acidobazický profil krve pacientů

Č.	pH	pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	BE (mmol/l)	laktát (mmol/l)	Cl* (mmol/l)	SIG (mmol/l)
vzorky arteriální krve (n=7)						
1	7,392	35,939	-2,6	3,27	-2,58	4,98
2	<b>7,339</b>	<b>45,037</b>	-1,8	4,52	-1,02	-4,42
3	<b>7,264</b>	<b>45,037</b>	<b>-6,8</b>	2,08	-1,79	-4,46
4	<b>7,338</b>	<b>44,586</b>	-1,9	2,61	1,04	<b>-7,71</b>
5	7,362	35,714	<b>-5,6</b>	<b>6,43</b>	1,09	<b>-9,81</b>
6	7,402	42,105	1,2	3,52	2,53	-2,87
7	<b>7,335</b>	36,541	<b>-6,5</b>	<b>5,13</b>	-0,38	-3,36
vzorky venózní krve (n=5)						
8	<b>7,308</b>	45,263	-3,9	<b>5,66</b>	-0,89	-4,96
9	7,426	36,917	0,3	2,27	<b>4,47</b>	<b>-6,27</b>
10	<b>7,286</b>	<b>53,383</b>	-1,5	3,41	-2,02	-0,33
11	7,350	43,233	-2,0	1,69	-3,88	0,97
12	<b>7,242</b>	45,489	<b>-8,0</b>	<b>8,4</b>	0,35	<b>-7,98</b>

Vysvětlivky: pCO<sub>2</sub> – parciální tlak oxidu uhličitého, BE – base excess (výchylka bází), Cl\* - rozdíl mezi referenční hladinou chloridů a korigovanými chloridy, SIG – strong ion gap. **Tučným** písmem jsou označeny hodnoty mimo referenční rozmezí.

Na základě zjištěného rozdílu střední hodnoty chloridů a korigovaných chloridů jsme identifikovali hypochloridemii jako acidózní ukazatel u pacienta číslo 9. Stanovení SIG odhalilo u čtyř pacientů (č. 4, 5, 9 a 12) zvýšenou koncentraci neměřených aniontů, z toho u dvou pacientů byl jako neměřený anion identifikován laktát (č. 5 a 12). Pomocí výpočtů jsme tedy dodatečně odhalily acidózní participaci sníženého SIG u pacienta s primárně identifikovanou RAC (č. 4) a dále kombinaci acidózní (snížené SIG) a alkalózní situace (hypochloridemie) u pacienta (č. 9) primárně bez AB poruchy. Nejčastější elektrolytovou dysbalancí byla hypokalemie, přítomná u třech pacientů.

## Diskuse

Výsledky sledování poukazují na přítomnost různých acidobazických poruch u pacientů se syndromem GDV. Jako nejčastější poruchy byly identifikovány respirační nebo metabolická acidóza. Lze konstatovat, že zdravotní stav pacientů bez AB poruchy byl shledán ošetřujícími lékaři jako uspokojivý, kdežto u pacientů s AB poruchou byly přítomny klinické nálezy distenze dutiny břicha, často ve spojitosti s nepohyblivostí, dále polypnoe a hypoperfuze. I když jsou změny AB statusu u GDV považovány z patofyziologického hlediska za logické a samozřejmé, klinické studie zaměřené na ověření těchto hypotéz se vyskytují jen omezeně. Například Muir (1982) zaznamenal jako nejčastější AB poruchu MAC, přítomnou u 23 z 57 vyšetřených psů s GDV. Respirační acidózu zjistil pouze u třech jedinců. Navzdory velkému počtu pacientů má tato studie limity. Pouze u 13 psů byla odebrána arteriální krev, u ostatních byla hodnocena venózní krev. Výsledky byly porovnávány s hodnotami získanými od 100

zdravých psů, přičemž chybí informace o místě odběru krve (hodnoty AB parametrů z venózní a arteriální krve jsou odlišné). Ze studie není zřejmé, zda u pacientů s odchylkami jak v respirační složce, tak ve složce metabolické, byla důvodem kompenzace nebo šlo o smíšenou poruchu. Naproti tomu Wingfield a kol. (1982) stanovili acidobazický profil včetně výpočtu AG u 20 psů se syndromem GDV na základě analýzy arteriální krve, stejně tak jako u 37 kontrolních psů. Bohužel, tyto autoři nehodnotili výskyt acidobazických odchylek, nýbrž statisticky porovnali rozdíly v jednotlivých parametrech mezi kontrolními psy a psy s GDV a mezi přeživšími a nepřeživšími pacienty s GDV. Vzhledem k možnému výskytu kombinovaných poruch není neočekávané, že porovnání nepřineslo žádnou statisticky významnou odchylku.

Hodnocení acidobazického statusu by mělo být komplexní, včetně posouzení dílčích vlivů a korektní identifikace AB poruchy. I když humánní medicína poskytuje široké množství pro rozbor AB profilu, nelze je kvůli odlišné velikosti negativního náboje na psím a lidském albuminu ve veterinární medicíně plně aplikovat (Constable a Stämpfli, 2005). Zvoleny proto byly výpočty ověřené pro veterinární medicínu (DiBartola, 2006). Hodnocení nadbytku aniontů pomocí anion gap zde bylo kvůli širokému referenčnímu rozmezí (12-24 mmol/l) málo citlivé. Tento problém by bylo možné odstranit vytvořením vlastních referenčních hodnot. Absenci vlastních referenčních hodnot považujeme za největší limit této studie. Pro hodnocení acidózních a alkalózních vlivů byly tedy zvolené korigované chloridy a strong ion gap, které vypovídaly o acidózní situaci u čtyř psů, přičemž ve dvou případech byla za příčinu považována kumulace laktátu. Ve zbylých dvou případech zůstala otázka acidózy ze zvýšení neměřených aniontů otevřená, nicméně některé studie šokových pacientů poukazují na vzestup citrátu nebo acetátu (Bruegger a kol., 2007).

### **Závěr**

Z výsledků naší studie vyplývá, že nejčastější acidobazickou poruchou u psů s dilatací a volvulem žaludku byla respirační acidóza a metabolická acidóza spojená s kumulací laktátu.

### **Poděkování**

Studie byla uskutečněna díky podpoře Klinické laboratoře pro malá zvířata.

### **Literatura**

- BRUEGGER, D.; KEMMING, G.I.; JACOB, M. et al. Causes of metabolic acidosis in canine hemorrhagic shock: role of unmeasured ions. *Crit Care*. 2007, vol. 11, no. 6, s. R130.
- CONSTABLE, P.D.; STÄMPFLI, H.R. Experimental determination of net protein charge and A(tot) and K(a) of nonvolatile buffers in canine plasma. *J Vet Intern Med*. 2005, vol. 19, no. 4, s. 507-514.
- DIBARTOLA, S.P. *Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice*. 3 Ed. St. Louis:Sauders, 2006. 702 s.
- MUIR, W.W. Acid-base and electrolyte disturbances in dogs with gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc*. 1982, vol. 181, no. 3, s. 229-231.
- WILLARD, M.D.; TVEDTEN, H. *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 4 Ed. St. Louis:Sauders, 2004. 420 s.
- WINGFIELD, W.E.; TWEDT, D.C.; MOORE, R.W. et al. Acid-base and electrolyte values in dogs with acute gastric dilatation-volvulus. *J Am Vet Med Assoc*. 1982, vol. 180, no. 9, s. 1070-1072.

**Kontaktní adresa:** Uhríková Ivana, MVDr., Ústav fyziologie, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, V10248@vfu.cz

## Měření tloušťky kloubní chrupavky v kolenním kloubu miniaturních prasat pomocí CT arthrografie a MR zobrazení

### Measuring articular cartilage thickness in miniature pigs knee joint by CT arthrography and MR imaging

<sup>1</sup>Stehlík Ladislav, <sup>1</sup>Proks Pavel, <sup>2</sup>Urbanová Lucie, <sup>2</sup>Srnc Robert, <sup>3</sup>Krupa Petr, <sup>2</sup>Nečas Alois

<sup>1</sup>Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>3</sup>Klinika zobrazovacích metod, FN U Sv. Anny v Brně

#### Summary

*This study was made on 20 miniature pigs, which were used to study healing of iatrogenic defects in articular cartilage. The knee joints were examined using magnetic resonance imaging and computed tomography arthrography. Histological specimens of femoral condylar articular cartilage were used as a gold standard in measuring cartilage thickness. Cartilage thickness measured on each modality was compared with results from measuring on histological specimens. To compare this data a student paired t-test was used. There was statistically significant difference between results from diagnostic imaging modalities and histological measurements.*

*This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project NPV II 2B06130).*

**Keywords:** *articular cartilage; cartilage thickness; computed tomography; magnetic resonance imaging; miniature pigs*

#### Úvod

Chrupavku nelze zobrazit pomocí klasických zobrazovacích metod využívajících ionizující záření, tj. radiografie a počítačová tomografie (CT). V současné době, s lepší dostupností magnetické rezonance (MR), stoupá její využití v zobrazení chrupavky, hlavně pro její neinvazivní charakter a výborný kontrast. Magnetická rezonance se zdá být nejužitečnější zobrazovací technikou pro hodnocení kloubní chrupavky (Mlynarik et al. 1996).

#### Materiál a metodika

Pro tuto studii byla použita miniaturní prasata, na kterých se zkoumalo hojení iatrogeně vytvořených defektů kloubní chrupavky. Výzkum byl dílčím cílem v rámci projektu NPV II 2B06130.

Vyšetření na zobrazovacích metodách probíhalo v celkové injekční anestezii, v sternální poloze s končetinami v extenzi. Před CT vyšetřením byla do kloubu aplikována jodová kontrastní látka, iomeprol, v koncentraci 250 mg/ml (Iomeron 250, Bracco Imaging Deutschland GmbH).

Měření se provádělo na intaktní chrupavce distální epifýzy femuru levého kolenního kloubu v zátěžové části kloubní plochy femuru na snímcích v koronární rovině.

Preparáty kloubů pro histologické zpracování byly fixovány v 4% roztoku pufovaného formaldehydu. Tkáňové bloky byly dekalcifikovány, dehydratovány a zality do

parafinu. Z parafinových bloků byly následně zhotoveny preparáty silné 4  $\mu\text{m}$ , a nabarveny rutinně hematoxylin-eozinem (Hematoxylin Mayer, Eozin G, Bamed s.r.o., České Budějovice, ČR). Histologické preparáty byly prohlíženy pomocí přímého mikroskopu Olympus BX-61 vybaveného kamerou Olympus DP50 (Olympus Czech Group, s.r.o, Praha, ČR). Měření bylo realizováno pomocí systému analýzy obrazu analySIS (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Německo). Měřena byla vzdálenost od linie osifikace po povrch chrupavky.

Získaná data byla vyhodnocena párovým t-testem. Nulová hypotéza předpokládala, že neexistuje statisticky významný rozdíl mezi tloušťkou chrupavky změřenou na snímcích z CT a MR v porovnání s tloušťkou chrupavky změřenou na histologických preparátech.

### **Výsledky**

Zlatým standardem pro ověření námi získaných hodnot bylo měření tloušťky chrupavky na histologických preparátech. Průměrná hodnota tloušťky chrupavky byla 1,12 mm pro mediální a 1,18 mm pro laterální kondylus femuru. Průměrná tloušťka chrupavky mediálního kondylu odečtena z CT snímku byla 0,93 mm a 1,36 mm z MRI. Pro laterální kondylus byly změřeny obdobné hodnoty, a to 0,91 mm na CT a 1,33 mm na MRI. Námi změřené hodnoty neodpovídají hodnotám získaným z histologických měření ( $p < 0,05$ ).

### **Diskuse**

Chrupavka z hlediska zobrazovacích metod patří mezi těžko zobrazitelné struktury. Oblíbenost vyšetření magnetickou rezonancí stoupá nejen díky neinvazivnímu charakteru, ale i pro možnost nastavení sekvencí specifických pro zobrazení chrupavky. Taková sekvence musí zabezpečit dobrý poměr signál-šum, vysoký kontrast mezi chrupavkou a okolitými strukturami a stejně vysoký kontrast mezi normální a abnormální zónou chrupavky (Hodler a Resnick 1996). Kromě MRI se používá počítačová tomografie (CT). Pro nedostatečný tkáňový kontrast na CT se aplikuje do kolenního kloubu kontrastní látka (CT artrografie, CTA), která zvýrazní intraartikulární vazivové struktury jako plnicí defekty. Současně sa ohraničí povrch chrupavky. CTA patří mezi invazivní procedury v porovnání s MRI. Pro korektní zobrazení chrupavky a případné odečítání lézí je nutné, podobně jako u MRI, skenovat ve vysokém rozlišení a ideální je, aby byly data izotropické. Tím sa získají i rekonstrukce dalších rovin (MPR) ve vysokém rozlišení (El-Khoury et al. 2004). Na histologickém řezu je možné popsat typické vrstevnaté uspořádání chrupavky (Modl et al. 1991). Chrupavka na MRI vykazuje taky určitou vrstevnatost (Dardzinski 1997, Modl et al. 1991, Rubenstein et al. 1996, Waldschmidt et al. 1997). Ta je však zachována jen při skenování ve vysokém rozlišení. Používá se T2 sekvence, která je citlivá na anizotropní strukturu kolagenové matrix (Peto a Gillis 1990). Echo time (TE) může být nastaveno na středně dlouhé až dlouhé časy ( $> 10$  ms) (Mlynarik et al. 1996, Recht a Resnick 1994, Rubenstein et al. 1996). Bylo popsáno vícero typů zobrazení chrupavky (Lehner et al. 1989, Modl et al. 1991, Recht et al. 1993, Rubenstein et al. 1993).

My jsme na MRI použili T1 SE sekvenci. Chrupavka se zobrazovala jako homogenní struktura středního signálu (izosignální se svaly) a bez vrstevnatého uspořádání. Podobný vzhled popsal Hayes et al. (1990). Absence vrstvení by mohla být výsledkem skenování v nízkem rozlišení. Další důvod by mohl být nedodržení hypotetického

předpokladu, že velikost pixelu by měla být alespoň 3-krát menší než předpokládaná tloušťka chrupavky (Olive 2010). Při tomto nastavení tedy dochází ke splývání hyposignální vrstvy kalcifikované chrupavky a hyposignální vrstvy kortexu kosti. Vzhledem k této skutečnosti, je těžké určit přesnou šířku chrupavky z MR snímků při použitém nastavení.

### Závěr

Nepřesné měření jak na CT, tak i na MR snímcích můžeme odvodnit absencí vysokého prostorového rozlišení u obou modalit. To je ovlivněno nastavením FOV a s tím souvisí i velikost pixelu. Navíc u MRI byla identifikace chrupavky komplikována splnutím hyposignální distální vrstvy chrupavky s asignální kortikální kostí.

### Poděkování

Studie vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, projekt NPV II 2B06130.

### Literatura

- Dardzinski, B.; et al.: Spatial variation of T2 in human articular cartilage. *Radiology*, ročník 205, 1997: s. 546–550.
- El-Khoury, G.; et al.: Cartilage thickness in cadaveric ankles: measurement with double-contrast multi-detector row CT arthrography versus MR imaging. *Radiology*, ročník 233, č. 3, 2004: s. 768–773, ISSN 0033-8419.
- Hayes, C.; Sawyer, R.; Conway, W.: Patellar cartilage lesions: in vitro detection and staging with MR imaging and pathologic correlation. *Radiology*, ročník 176, 1990: s. 479–483.
- Hodler, J.; Resnick, D.: Current status of imaging of articular cartilage. *Skeletal Radiology*, ročník 25, č. 8, 1996: s. 703–709, ISSN 0364-2348.
- Lehner, K.; et al.: Structure, function and degeneration of bovine hyaline cartilage: assessment with MR imaging in vitro. *Radiology*, ročník 170, 1989: s. 495–499.
- Mlynarik, V.; et al.: Investigation of laminar appearance of articular cartilage by means of magnetic resonance microscopy. *Magn Reson Imaging*, ročník 14, 1996: s. 435–442.
- Modl, J.; et al.: Articular cartilage: correlation of histologic zones with signal intensity at MR imaging. *Radiology*, ročník 181, 1991: s. 853–855.
- Olive, J.: Distal interphalangeal articular cartilage assessment using low-field magnetic resonance imaging. *Vet Radiol Ultrasound*, ročník 51, 2010: s. 259–266.
- Peto, S.; Gillis, P.: Fiber-to-field angle dependence of proton nuclear magnetic relaxation in collagen. *Magn Reson Imaging*, ročník 8, 1990: s. 705–712.
- Recht, M.; et al.: Abnormalities of articular cartilage in the knee: analysis of available MR techniques. *Radiology*, ročník 187, 1993: s. 473–478.
- Recht, M.; Resnick, D.: MR imaging of articular cartilage: current status and future directions. *American Journal of Roentgenology*, ročník 163, č. 2, 1994: s. 283–290, ISSN 0361-803X.
- Rubenstein, J.; Kim, J.; Henkelman, R.: Effects of compression and recovery on bovine articular cartilage: appearance on MR images. *Radiology*, ročník 201, 1996: s. 843–850.
- Rubenstein, J.; et al.: Effects of collagen orientation on MR imaging characteristics of bovine articular cartilage. *Radiology*, ročník 188, 1993: s. 219–226.
- Waldschmidt, J.; et al.: In vitro and in vivo MR imaging of hyaline cartilage: zonal anatomy, imaging pitfalls and pathologic conditions. *RadioGraphics*, ročník 17, 1997: s. 1387–1402.

**Kontaktní adresa:** Ladislav Stehlík, MVDr., Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, stehlikl@vfu.cz

## Orální neoplasie psů: Vybraní pacienti Veterinární a farmaceutické univerzity Brno

### Oral Neoplasia in the Dogs: Selected Patients of The University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno

Janalík Petr, Fichtel Tomáš

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*This report describes oral neoplasia in the dogs based on clinical records of the dentistry ambulance (Dog and Cat Clinic, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno). Available records were collected and analyzed. The incidence was 14 cases among 94 new patients of the dentistry ambulance (14,89 %) in the three-months observation period. Two patients (14,29 %) were euthanized immediately due to bad prognosis. According to histological examination of ten samples, there were five cases of squamous cell carcinoma (50 %), three malignant melanomas (30 %) and single cases of haemangiosarcoma and granular cell tumour (10 % each). Three patients (21,42 %) underwent conservative therapy. Six of nine surgically treated patients (64,29 %) encountered only minor clinical problems after the surgery, other three were euthanized due to concurrent tumours. However, there are not enough data to assess the differences between conservative and surgical approach outcome in this group of patients.*

**Keywords:** oral neoplasia; dog; squamous cell carcinoma; malignant melanoma

#### Úvod

Neoplasie dutiny ústní se dělí na odontogenní a neodontogenní. Odontogenní mají původ v zubních tkáních (např. ameloblastom či odontoblastom). Maligní odontogenní nádory se vyskytují zřídka. Neodontogenní neoplasie vznikají transformací ostatních tkání dutiny ústní. Většinou jsou maligní (maligní melanom, karcinom dlaždicového epitelu – SCC, fibrosarkom, osteosarkom aj.), z benigních je nejčastější virová papillomatoso psů. Platí, že neodontogenní tumory se vyskytují častěji než tumory odontogenní, mívají horší prognosu a vyšší tendenci k recidivám. Prognosa orálních neoplasií závisí na typu i dalších faktorech – věk (vyšší je častější, ale prognosticky nepříznivý), lokalisace (příznivější je rostrální a mandibulární), skutečnost, zda jde o recidivu, metastasy (nebývají časté), další onemocnění (Withrow 2001).

Nádory bývají zaměněny za jiné masy (hyperplasie dásní, stomatitis aj.). Nehojí-li se léčený zánět do dvou týdnů, musí být provedena další vyšetření. V ideálním případě se provede cytologické, histologické a radiologické vyšetření. Operabilní nádory by měly být excidovány s lemlem zdravé tkáně. Doplňkovou léčbou jsou cytostatická léčiva anebo radioterapie. Konservativní léčba je možná cytostatiky či jinými inhibujícími látkami (např. piroxicam u SCC) (Withrow 2001).

#### Materiál a metody

Do studie byli zařazeni pacienti druhu pes domácí (*Canis lupus familiaris*), kteří byli mezi 1. 11. 2010 – 31. 1. 2011 předvedeni na Kliniku chorob psů a koček Veterinární a farmaceutické univerzity Brno k první návštěvě s daným zdravotním problémem a byli zařazeni jakožto pacienti stomatologické ambulance výše uvedené kliniky. Z tohoto



souboru byla vybrána skupina pacientů, u kterých byla konstatována diagnosa orální neoplasie; jejich klinické záznamy byly shromážděny a analysovány.

### Výsledky

Ve sledovaném období byli vyšetřeni 94 noví pacienti stomatologické ambulance. 14 z nich (14,89 %) trpělo orální neoplasí. Průměrný věk těchto činil 11,54 roku (směrodatná odchylka 2,85 r., medián 12,5 r.). Nejčastějším plemenem byl anglický kokršpaněl. Klinické vyšetření odhalilo u všech masu v dutině ústní a ptyalismus. Cytologické vyšetření devíti vzorků zahrnovalo v osmi případech diferenciální diagnosu maligního neoplastického procesu. Rentgenologické vyšetření sedmi psů odhalilo ve čtyřech případech lysu čelistní kosti, ve dvou případech byl nález dubiosní; snímky posledního případu vyloučily metastasy v hrudníku. Desíti psům byl odebrán vzorek pro histologické vyšetření (výsledky v tabulce č. 1). Dva psi (14,29 %) museli být kvůli beznadějně prognose utraceni po klinickém vyšetření. Další tři (21,42 %) byli na přání chovatelů léčeni konzervativně. Devět psů (64,29 %) podstoupilo chirurgický zákrok. Druhý den po operaci byli psi schopni přijímat měkkou stravu. Ve třech případech se později vyskytnuly další nádory či metastasy, kvůli nimž museli být tito pacienti utraceni, avšak ostatní psi se ze zákroku v krátkodobém měřítku zotavili bez klinických problémů či jen s mírnými obtížemi (např. serom). Sledované období nebylo dostatečně dlouhé pro získání informací o dlouhodobém vývoji stavu pacientů.

Tabulka 1: Nacionále pacientů

Plemeno	Pohlaví	Věk (roky)	Histologie	Ošetření
sheltie	pes	12,5	SCC	hemimandibulektomie
angl. kokršpaněl	pes	15	maligní melanom	excise tumoru v podjazyčí
zlatý retriever	pes	8,5	tumor granulárních buněk jazyka	excise tumoru na jazyku
angl. kokršpaněl	fena	14	SCC	konzervativní léčba
rottweiler	fena	9	haemangiosarkom	tonsillektomie
knírač střední	fena	13	neprovedeno	excise
špic	pes	14	neprovedeno	euthanasie
bullmastif	pes	10	maligní melanom	excise
angl. kokršpaněl	pes	12,5	SCC	konzervativní léčba
československý vlčák	fena	12	SCC	tonsillektomie
Yorkshire terrier	pes	14	neprovedeno	euthanasie
německý ovčák	fena	5	SCC	hemimandibulektomie
knírač střední	pes	14	neprovedeno	segmentální mandibulektomie
pitbull	fena	8	maligní melanom	konzervativní léčba

## Diskuse

Dutina ústní je čtvrtou nejčastější lokalizací neoplasií u psů a koček; běžná incidence je 5-6 % všech neoplasií u psů (Wiggs a Lobprise 1997, Dinescu *a kol.* 2010). Počet pacientů chirurgického oddělení byl v roce 2010 cca 3400 a počet pacientů ve studii odpovídá zhruba jednomu novému případu týdně. Incidence nádorů trávicího ústrojí byla v jiné publikaci 210 případů na 100 000 psů ročně (Dobson *a kol.* 2002). Četnost na našem pracovišti připisujeme skutečnosti, že jde o jediné referenční pracoviště specialisované na chirurgii hlavy a horních cest dýchacích psů a koček u nás.

Dostupné výsledky histologického vyšetření ukázaly, že nejčastějšími nádory byly karcinom dlaždicového epitelu a maligní melanom, což je ve shodě s literaturou (Withrow 2001, Dinescu *a kol.* 2010). Naopak haemangiosarkom či tumor granulárních buněk jazyka jsou vzácnější (Patnaik 1993, Smith 2003).

Chirurgickou léčbu řada chovatelů odmítá. Představa, že zvíře ztratí část obličeje, je často frustrující. Veterinární lékař musí při jednání s chovatelem onkologického pacienta postupovat s maximálními ohledy, přesto důrazem na fakt, že operace je neúčinnějším kurativním postupem. Klienty zajímá kvalita života zvířete a kosmetický efekt zákroku; v tomto je dosahováno velmi dobrých výsledků, což platilo i v našem souboru. Dalším problémem je délka přežití pacienta. Nejčastější nádory bývají hodně agresivní a recidivy nejsou neobvyklé. Perspektiva reálného prodloužení života o několik měsíců (výjimečně let) v kombinaci s cenou zákroku mnoho klientů odradí. V případech, kdy se klienti rozhodli dát souhlas k chirurgické intervenci, se u nich ale zpravidla dostavuje spokojenost, jak ostatně uvádějí i Fox *a kol.* (1997).

## Závěr

Orální neoplasie u psů tvořily na našem pracovišti ve sledovaném období významné procento pacientů. Jelikož jde o onemocnění zásadně ohrožující život, včasná diagnostika a terapie jsou faktory s velkým vlivem na jeho maximální prodloužení. Zaznamenali jsme velmi dobrý krátkodobý efekt chirurgické léčby, pro důkladnější porovnání konservativního a chirurgického přístupu však bude zapotřebí získat větší soubor pacientů v delším časovém období.

## Literatura

- DINESCU, G., *et al.* The Importance of Cytological Examination in Canine Oral Neoplasia. *Journal of Comparative Pathology*. 2010, vol. 143, i. 4, p. 315.
- DOBSON, J. M., *et al.* Canine neoplasia in the UK: estimates of incidence rates from a population of insured dogs. *Journal of Small Animal Practice*. 2002, vol. 43, i. 6, pp. 240–246.
- FOX, L. E., *et al.* Owner satisfaction with partial mandibulectomy or maxillectomy for treatment of oral tumors in 27 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 1997, vol. 33, i. 1, pp. 25-31.
- PATNAIK, A. K. Histologic and Immunohistochemical Studies of Granular Cell Tumors in Seven Dogs, Three Cats, One Horse, and One Bird. *Veterinary Pathology*. 1993, vol. 30, pp. 176-185.
- SMITH, A. N. Hemangiosarcoma in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 2003, vol. 33, i. 3, pp. 533-552.
- WIGGS, R.B. – LOBPRISE, H.B. Clinical oral pathology. In *Veterinary Dentistry: Principals and Practice*. Philadelphia: Wiley-Blackwell, 1997. Pp. 104–139.
- WITHROW, S. J. Cancer of the Oral Cavity. In *Small animal clinical oncology*. 3<sup>rd</sup> ed. Philadelphia: Saunders, 2001. Pp. 305-318.

**Kontaktní adresa:** Petr Janalík, MVDr., Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 61242 Brno, v10240@vfu.cz

## Rentgenologické hodnocení selhání implantátů 4,5 LCP vs. 4,5 LCP v kombinaci plate/rod použitých k flexibilní pilířové osteosyntéze u miniaturních prasat

### Radiographic assessment of implant failures of titanium 4.5 LCP vs. 4.5 LCP plate/rod construct used for flexible bridging osteosynthesis in miniature pigs

<sup>1</sup>Stehlík Ladislav, <sup>1</sup>Proks Pavel, <sup>2</sup>Crha Michal, <sup>2</sup>Urbanová Lucie, <sup>2</sup>Srnc Robert, <sup>2</sup>Raušer Petr, <sup>2</sup>Nečas Alois

<sup>1</sup>Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

<sup>2</sup>Oddělení chirurgie a ortopedie, Klinika chorob psů a koček, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

#### Summary

*This prospective study evaluates failure rate of implants used for fixation of segmental bone defect in femur by the flexible bridging osteosynthesis with 4.5 LCP and 4.5 LCP with rod („plate and rod“ system). The study evaluated 106 femurs of miniature pigs where healing of the large segmental bone defect was studied using transplantation of mesenchymal stem cells in combination with biocompatible scaffolds. Implants failure was assessed on basis of radiographic examination of animals femurs after 2, 4, 8, 12 and 16 weeks postoperatively. This work was supported by Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic (project NPV II 2B06130).*

**Keywords:** *implant failure; radiography; segmental bone defect; bridging osteosynthesis; locking compression plate; miniature pigs;*

#### Úvod

Pilířová osteosyntéza se většinou používá k přemostění kostních defektů a její úlohou je držet fragmenty kosti v normální pozici, odolávat silám působícím na kost a udržovat stabilní délku kosti (Piermattei and Flo 1997, Koch 2005, Nečas et al. 2007). Pro optimální hojení kostního defektu nebo fraktur je důležité, aby nebylo porušeno krevní zásobení kortexu kosti. Právě zámkové kompresní ploténky (LCP, Synthes®), použité v této studii, zachovávají krevní zásobení kortexu. Pevnost fixačního aparátu může být zvýšená použitím intramedulárního hřebu, t.j. technika „plate and rod“ (Hulse et al. 1997).

#### Materiál a metodika

Studie se prováděla na miniaturních prasátech (n=106) z certifikovaného chovu AV ČR Liběchov. Uprostřed diafýzy levého femuru byl oscilační pilou vytvořen segmentální defekt kosti v celé šířce kosti o délce 15 mm. Fixace a stabilizace hlavních fragmentů femuru byla provedena dvěma různými způsoby, přičemž byly dodrženy pravidla flexibilní pilířové osteosyntézy (Stoffel et al. 2000, Stoffel et al. 2003, Wagner 2003). V jedné skupině (n = 49) byla použita pětiděrová titanová zámková kompresní ploténka (LCP) velikosti 4,5 mm. Hmotnost zvířat v době zařazení do studie byla 19, 83 kg (SD ±6,41), věk 22,96 (SD ±4,51) týdnů. U druhé skupiny (n = 57) zvířat byla použita stejná ploténka, ale v kombinaci s intramedulárním hřebem tloušťky 3 mm, t.j. metoda „plate and rod“. Hmotnost zvířat v době zařazení do studie byla 22,38 (SD ±5,24), věk 26,68 (SD ±5,44) týdnů. V obou případech byla ploténka upevněna do kosti pomocí 4

zámkových šroubů.

Rentgenologické vyšetření bylo prováděno ihned po operačním zákroku a pak v stanovených časových intervalech, t.j. 2., 4., 8., 12. a 16. týden po operaci. Vždy byly vyhotoveny dvě na sebe kolmé projekce, mediolaterální (ML) a kaudokraniální (CdCr). Po 16. týdnu po operaci byla zvířata utracena. Následně byly zhotoveny rentgenové snímky stehenních kostí s implantáty ve dvou na sebe kolmých rovinách (ML a CdCr).

Pro statistické zhodnocení byl použit nepárový Wilcoxonův test. Nulová hypotéza předpokládala, že neexistuje statisticky významný rozdíl v četnosti selhání implantátů mezi skupinou prasat ošetřenou osteosyntézou samotnou ploténkou a skupinou prasat ošetřenou systémem „plate and rod“.

### **Výsledky**

Zaznamenali jsme statisticky významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) v selhání ploténky u osteosyntézy samotnou ploténkou a osteosyntézou v systému „plate and rod“. V skupině prasat ošetřených samotnou ploténkou bylo zaznamenáno zlomení ploténky v 5 případech ze 49 (10,2 %). V skupině prasat s osteosyntézou „plate and rod“ nebyl zaznamenán žádný případ zlomení ploténky.

Statisticky významný rozdíl ( $p < 0,01$ ) byl zaznamenán u selhání šroubu v osteosyntéze samotnou ploténkou v porovnání s osteosyntézou systémem „plate and rod“. V skupině prasat s osteosyntézou pomocí samotné ploténky bylo zaznamenáno zlomení šroubu v 6 případech ze 49 (12,24 %). Žádný případ zlomení šroubu nebyl doprovázen zlomením ploténky, uvolněním jiného hřebu nebo kolapsem ostektomické štěrbině. V systému osteosyntézy „plate and rod“ nebyl zaznamenán žádný případ zlomení šroubu.

V systému „plate and rod“ jsme v 4 případech z 57 (7,02 %) zaznamenaly migraci hřebu.

### **Diskuse**

Stabilita a odolnost fixačního aparátu vůči silám působícím na kost v oblasti lomu nebo defektu je nesmírně důležitá pro správné zhojení fraktury, a to obzvláště ve výzkumu hojení fraktur, protože je nemožné zamezit nebo značně omezit pohyb experimentálních zvířat. Pomocí kostních implantátů můžeme omezit nežádoucí působení různých sil na místo kostního defektu (*Perren 1991*).

V naší studii bylo zaznamenáno 10,2 % případů zlomení 4,5 mm LCP ploténky použité samostatně pro osteosyntézu. V případě segmentálních kostních defektů dochází k působení ohybových sil na kost a ploténku, a tak může dojít k ohnutí nebo až zlomení ploténky (*Hulse et al. 1997*). Predispozičním místem pro zlomení ploténky je prázdná díra pro šroub v místě ostektomie (*Stoffel et al. 2000, Stoffel et al. 2003*). Lepší alternativou se zdají být delší ploténky, které vykazují nižší pnutí v místě ostektomického defektu (*Rozbruch et al. 1998, Stoffel et al. 2003*). Velikost použitého implantátu je odvislá od velikosti experimentálního zvířete (*Bernarde et al. 2001*). V naší studii nebyl zaznamenán žádný případ zlomení 4,5 mm LCP ploténky při osteosyntéze technikou „plate and rod“. Pravděpodobnost selhání tohoto systému je desetkrát nižší než pravděpodobnost selhání ploténky samotné (*Hulse et al. 1997*). Intramedulární hřeb působí mechanicky jako náhrada za kostní defekt. Kostní implantát je pak mnohem víc odolný vůči ohybu (*Hulse et al. 1997*). Urbanová et al. (2010) potvrdili v *in vitro* studii, že systém „plate and rod“ je odolnější na působení vybraných sil než samotná ploténka. Velikost napětí působícího na ploténku je nepřímo úměrná průměru intramedulárního hřebu (*Hulse et al. 2000*).

V naší studii bylo zaznamenáno 12,24 % případů zlomení šroubu při osteosyntéze samotnou ploténkou. Vždy se jednalo o šroub v proximálním fragmentu femuru v blízkosti zóny ostektomie (distální šroub). Tento šroub je vystaven největším strižným silám (Stoffel *et al.* 2003). Vzhledem k technice zamykání nejsou zámkové šrouby schopny uvolnění při zatížení nadměrnou axiální silou, a proto dochází častěji k jejich zlomení, a to v krčku šroubu těsně pod ploténkou (Tan and Balogh 2009).

V 7,02 % případů naší studie byly zaznamenány migrace intramedulárního hřebu. Hřeb má tendenci se pohybovat v kosti vlivem ohybových sil (Hulse *et al.* 1997). Hřeb není v dřevové dutině fixován napevno a schopnost zůstat v nezměněné pozici, do které byl aplikován, závisí od třecích sil mezi hřebem a spongiózní kostí.

### Závěr

Podle výsledků naší studie doporučujeme systém 4,5 mm LCP v kombinaci s hřebem technikou přemosťující osteosyntézy jako vhodný pro fixování segmentálních kostních defektů femurů u miniaturních prasat.

### Poděkování

Studie vznikla za finanční podpory MŠMT ČR, projekt NPV II 2B06130.

### Literatura

- Bernarde, A.; Diop, A.; Maurel, N.; et al.: An in vitro biomechanical study of bone plate and interlocking nail in a canine diaphyseal femoral fracture model. *Vet Surg*, ročník 30, č. 5, 2001: s. 397 – 408.
- Hulse, D.; Ferry, K.; Fawcett, A.; et al.: Effect of intramedullary pin size on reducing bone plate strain. *Vet Comp Orthop Traumatol*, ročník 13, č. 4, 2000: s. 185 – 190.
- Hulse, D.; Hyman, W.; Nori, M.; et al.: Reduction in Plate Strain by Addition of an Intramedullary Pin. *Vet Surg*, ročník 26, č. 6, 1997: s. 451 – 459.
- Koch, D.: *AO Principles of Fracture Management in the Dog and Cat*, kapitola Screws and plates. Switzerland: AO Publishing, 2005, s. 26 – 50.
- Necas, A.; Urbanová, L.; Srnc, R.: Osteotomie a nové trendy v léčbě nemocí kostí a kloubů, kapitola Principy použití LCP plotenek. Brno: VFU Brno, 2007, s. 19 – 22.
- Perren, S.: The concept of biological plating using the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP). Scientific background, design and application. *Injury Int J Care Injured*, ročník 22, č. Supplement 1, 1991: s. S1 – S41.
- Piermattei, D. L.; Flo, G. L.: Brinker, Piermattei, and Flo's Handbook of Small Animal Orthopedics and Fracture Repair, kapitola Fractures: Classification, Diagnosis, and Treatment. Philadelphia: Saunders, 3. vydání, 1997, ISBN 0-7216-5689-7, s. 24 – 146.
- Rozbruch, S.; Muller, U.; Gautier, E.; et al.: The evolution of femoral shaft plating technique. *Clin Orthop*, ročník 354, September 1998: s. 195 – 208.
- Stoffel, K.; Dieter, U.; Stachowiak, G.; et al.: Biomechanical testing of the LCP – how can stability in locked internal fixators be controlled? *Injury Int J Care Injured*, ročník 34, č. Supplement 2, 2003: s. S-B11 – S-B19.
- Stoffel, K.; Klaue, K.; Perren, S.: Functional load of plates in fracture fixation in vivo and its correlate in bone healing. *Injury Int J Care Injured*, ročník 31, č. Supplement 2, 2000: s. S-B37 – S-B50.
- Tan, S. E.; Balogh, Z. J.: Indications and limitations of locked plating. *Injury Int J Care Injured*, ročník 40, č. 7, 2009: s. 683 – 691.
- Urbanová, L.; Srnc, R.; Proks, P.; et al.: Comparison of the resistance to bending forces of the 4.5 LCP plate-rod construct and of 4.5 LCP alone applied to segmental femoral defects in miniature pigs. *Acta Vet Brno*, ročník 79, č. 4, 2010: s. 613 – 620.

**Kontaktní adresa:** Ladislav Stehlík, MVDr., Oddělení zobrazovacích metod, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého třída 1-3, 612 42 Brno, stehlikl@vfu.cz

## Indukce říje u fen pomocí GnRH agonisty deslorelinu Estrus induction in bitches with GnRH agonist deslorelin

<sup>1</sup>Jenčová Michaela, <sup>2</sup>Poláčková Hana

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

### Summary

*In our study GnRH agonist deslorelin (Suprelorin implant, Virbac) was used for estrus induction in 9 bitches. All bitches in the study were mature and each of them already went through at least one estrus. At the time of implantation Suprelorin all animals were in anestrus. In order to determine stage of estrous cycle of each animal, blood sampling to evaluate progesterone concentration was performed. First blood samples were taken before Suprelorin administration to confirm anestrus. Second and third measurements were used for monitoring estrous cycle and particularly onset of proestrus and estrus. Estrus induction was successful in all 9 bitches and the onset of proestrus occurred between first and tenth day after suprelorin implantation (average 7.1 days). Seven bitches were mated naturally and two were inseminated with native ejaculate. Five of nine bitches conceived. The estrus induction rate in our experiment was 100%. For more complete assessment of fertility of induced estrus is necessary to evaluate a larger amount of animals.*

**Keywords:** GnRH; deslorelin; Suprelorin; estrus induction; bitch

### Úvod

K indukci říje u fen bylo vyzkoušeno a publikováno několik metod. Mezi tyto metody patří využití dopaminových agonistů, exogenních gonadotropinů, diethylstilbestrolu a GnRH agonistů.

Úspěšnost těchto metod v indukci říje a zejména v její fertilitě je velmi rozdílná. Rovněž způsob využití jednotlivých účinných látek a tím i dostupnost pro majitele fen a pro podmínky velkých chovů psů jsou velmi variabilní.

Plodnost říjí vyvolaných exogenními gonadotropiny a diethylstilbestrolem je relativně nízká (50% u gonadotropinů a 30 % u diethylstilbestrolu).

Dopaminoví agonisté jako jsou Bromocriptin a Cabergolin se používají v některých velkých chovech psů jako úspěšná metoda k indukci říje s vysokou fertilitou, avšak počet mláďat ve vrhu po takto indukované říji bývá nižší. Způsob aplikace těchto látek – perorální podávání v kapkách po několik dní (3 – 45 dní, průměrně 27) a vysoká variabilita v nástupu říje jsou překážkou k širšímu využití těchto látek k indukci říje u fen.

Cílem naší studie je sledování účinku GnRH agonisty Deslorelinu ve formě podkožního implantátu Suprelorin k indukci fertillní říje u fen. Implantát byl fenám aplikován do podkoží v oblasti pravé lopatky, kde mohl být snadno kontrolován palpací a rovněž je toto místo snadno přístupné při následné extrakci implantátu.

### Materiál a metody

Ve studii bylo zahrnuto 9 fen ve věkovém rozmezí 1 až 9 let. Všechny feny byly pohlavně dospělé a každá již minimálně jednou hárala. Pouze jedna samice v období před zařazením do pokusu byla nullipara. Osm fen porodilo již dříve, počet štěňat na

jeden porod se pohyboval od 1 do 11. Pozorované feny se na počátku průzkumu nacházely v anestru, což bylo potvrzeno stanovením koncentrace progesteronu v séru před aplikací Suprelorinu.

U fen bylo prováděno sledování nástupu říje. Po pozorování prvních klinických příznaků říje byla fenám opět odebrána krev na vyšetření hladin progesteronu.

Krev byla odebírána z *vena cephalica antebrachii* v množství 2 až 5 ml a vyšetřena v Centrální klinické laboratoři na Oddělení biochemie VFU Brno.

Po zjištění říjových hodnot progesteronu, které umožňovaly stanovení optimálního dne pro krytí (nad 2,4 ng/ml) byl podkožní implantát Suprelorin vyjmut z podkoží v lokálním znecitlivění (lidokain). Poté byly ve vypočítaném optimálním termínu (2 - 6 dní od LH peaku) feny nakryty (ve dvou případech inravaginálně inseminovány nativním ejakulátem). Diagnostika gravidity byla provedena ultrasonograficky po 25. dni od krytí, případně inseminaci.

### Výsledky

První vyšetření progesteronu prokázalo, že všechny feny v pokusu se nacházejí v anestru. První příznaky říje se u fen objevily 1 až 10 dnů od aplikace Suprelorinu (průměr 7,1 dne). (Tabulka 1)

Tabulka 1

Č. feny	progesteron 1 anestrus	Aplikace Suprelorinu	Začátek proestru od aplikace impl. [dny]	progesteron 2 a 3		Březí
	[ng/ml]			Dny od aplikace	[ng/ml]	
1	0,21	1. 6. 2009	6	7	2,4	Ano
2	0,77	8. 6. 2009	1	4	6,8	Ano
3	0,63	13. 8. 2009	4	6 13	0,7 3,2	Ano
4	0,3	16. 11. 2009	10	14	4,9	Ne
5	0,2	16. 11. 2009	8	14	9,1	Ne
6	0,22	16. 11. 2009	10	14 23	1,5 16,9	Ano
7	0,45	12. 2. 2010	7	10	4,5	Ano
8	0,4	14. 4. 2010	9	14 17	1,4 4,4	Ne
9	0,1	14. 4. 2010	9	14 17	2,8 19,0	Ne

Poté byla fenám odebrána krev podruhé, případně potřetí k sledování průběhu říje. Odběr krve byl proveden v rozmezí 7 až 14 dnů od aplikace implantátu, průměr 12,3dnů (až 24 dnů při třetím stanovení, průměr 17,2 dny), 1 až 6 dnů od začátku proestru, průměr 3,8 dnů (až 13 dnů při třetím stanovení, průměr 7,8dnů). (Tabulka 1)

Feny byly úspěšně nakryty (ve dvou případech fena 8 a 9 inseminovány nativním ejakulátem). Diagnostika gravidity byla provedena ultrasonograficky po 25. dni od krytí, případně inseminaci. Pět z devíti fen bylo březích. (Tabulka 1)

### **Závěr**

Na základě výsledků se použití GnRH agonisty Suprelorinu jeví jako účinná a přístupná metoda k indukci říje fen. Po indukci říje preparátem Suprelorin zabřezlo 5 fen z 9. Úspěšnost indukce estru deslorelinem byla v našem pokusu stoprocentní. Pro objektivnější a důkladnější zhodnocení fertility takto indukované říje je nutné zahrnout do sledování větší počet zvířat.

### **Literatura**

KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology* (66:3), 2006, vol. 66, s. 514-525.

KUTZLER, M. A. Estrus induction and synchronization in canids and felids. *Theriogenology*, 2007, vol. 68, s. 354-374.

HERBERT, C. A.; TRIGG, T. E. Applications of GnRH in the control and management of fertility in female animals. *Anim Reprod Sci*, 2005, vol. 88, s. 141-153.

MUNSON, L.; BAUMAN, J. E.; ASA, C. S.; JÖCHLE, W.; TRIGG, T. E. Efficacy of the GnRH analogue deslorelin for suppression of oestrous cycles in cats. *J Reprod Fertil Suppl*, 2001, vol. 57, s. 269-273.

ROMAGNOLI, S.; STELLETTA, C.; MILANI, C.; GELLI, D.; FALOMO, M. E.; MOLLO, A. Clinical use of deslorelin for the control of reproduction in the bitch. *Reprod Domest Anim*, 2009, vol. 44, s. 36-39.

WALTER, B.; OTZDORFF, C.; BRUGGER, N.; BRAUN, J. Estrus induction in beagle bitches with the GnRH-agonist implant containing 4.7 mg Deslorelin. *Theriogenology*, 2011, vol. 75, s. 1125-1129

**Kontaktní adresa:** Michaela Jenčová, MVDr., Klinika chorob psů a koček, oddělení reprodukce, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, jencovam@vfu.cz



## Reverzibilní suprese pohlavní aktivity kocourů Reversible suppression of sexual activity in toms

Novotný Robert, Vitásek Roman

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

### Summary

*The aim of the study is to assess efficacy and safety of GnRH agonist deslorelin implant in toms and to verify the presumption of reversibility of suppression of sexual activity. Healthy, sexually mature toms with already observed male sexual behaviour were implicated to the survey. After Suprelorin implantation, all animals were regularly clinically examined, the testicle size measurement was performed, testosterone concentration after HCG stimulation was measured and ejaculate was collected and evaluated. Four month after implantation Suprelorin was explanted and using the same methods the recrudescence of sexual activity was observed. In the end of observation all toms were castrated and the testicles were histologically examined. At present we have preliminary results from 11 toms from the total number of 30. After Suprelorin implantation the reduced testicular size, decrease of testosterone concentration and gradual azoospermia were found. After explantation all observed parameters returned to initial levels.*

**Keywords:** GnRH agonist; Suprelorin; tom; sexual activity; suppression

### Úvod

V současnosti představuje převažující metodu ovlivnění pohlavního chování kocourů chirurgická kastrace, tedy trvalé odstranění samčích pohlavních žláz – varlat. Nevýhodou je ovšem definitivní charakter zákroku, který omezuje jeho použití pouze na zvířata, u kterých se dále nepočítá s působením v reprodukci. V reprodukci psů a některých ostatních druhů zvířat se v poslední době zvyšuje uplatnění hormonální suprese pohlavní aktivity prostřednictvím GnRH agonistů. Cílem práce je ověřit účinnost a bezpečnost GnRH agonisty deslorelinu při použití u kocourů a současně potvrdit předpoklad o reverzibilitě potlačení pohlavní aktivity.

### Materiál a metodika

V projektu se předpokládá zařazení celkově 30 zdravých, pohlavně dospělých kocourů, u kterých již bylo pozorováno samčí pohlavní chování. Jedná se o zvířata soukromých majitelů, kteří žádají o řešení kontroly reprodukce. Majitelé jsou podrobně seznámeni s protokolem projektu a se zařazením zvířete vyjadřují svůj informovaný souhlas.

Před zařazením do sledování jsou zvířata klinicky vyšetřena a je jim odebrána krev ke stanovení hladiny testosteronu. Po jednorázové stimulaci HCG (50 m.j./kg) pro eliminaci možných chyb způsobených cirkadiálními výkyvy je opětovně odebrána krev ve 4 hodinovém intervalu. V celkové anestezii je získán ejakulát elektroejakulací pro vyšetření a zaveden Suprelorin implantát.

Ve sledováních prováděných u psů docházelo po krátkodobé úvodní stimulaci k potlačení pohlavní činnosti nejpozději do 6 týdne. Abychom mohli posoudit úroveň suprese a znovuobnovení spermiogeneze, jsou námi sledovaní kocouři rozděleni do 15 skupin po dvou zvířatech.

U zvířat ve skupinách 1 až 7 sledujeme rychlost nástupu a stupeň potlačení pohlavní aktivity. U všech sledovaných jedinců provedeme klinické vyšetření, odběr krve pro

stanovení sérové koncentrace testosteronu, odběr ejakulátu a jeho zhodnocení, orchiektomie a histologické posouzení tkáně pro zjištění stupně potlačení spermiogeneze v tomto schématu:

Číslo skupiny	1	2	3	4	5	6	7
Týdnů po implantaci	4	6	8	10	12	14	16

Pro dosažení plné suprese spermatogeneze ponecháváme implantát zavedený 16 týdnů. Poté je vyjmut v celkové anestezii nebo hluboké sedaci.

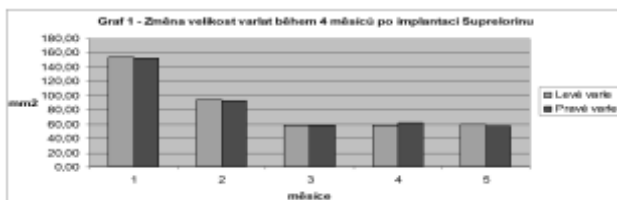
U zvířat ve skupinách 8 až 15 sledujeme rychlost znovuobnovení pohlavní aktivity po explantaci Suprelorinu a její úroveň. U všech kocourů je provedeno klinické vyšetření, odběr krve pro stanovení sérové koncentrace testosteronu, odběr ejakulátu a jeho zhodnocení, orchiektomie a histologické posouzení varlat v tomto harmonogramu:

Číslo skupiny	8	9	10	11	12	13	14	15
Týdnů po implantaci	18	20	22	24	26	28	30	32

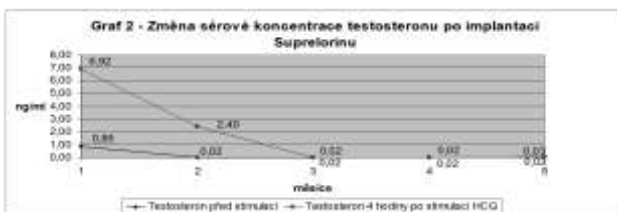
U všech zvířat zařazených do projektu je kromě výše zmíněných kontrol pravidelně v měsíčních intervalech odebírána krev ke stanovení sérové koncentrace testosteronu a ve dvouměsíčním intervalu odebírán ejakulát k posouzení.

### Výsledky

V současnosti jsou k dispozici dílčí výsledky od 11 sledovaných zvířat z celkového počtu 30. Po implantaci Suprelorinu dochází u kocourů ke zmenšení velikosti varlat (Graf 1), poklesu sérové koncentrace testosteronu (Graf 2) a postupné azoospermii (Graf 3).



Graf 1: Změna velikosti varlat během 4 měsíců po implantaci Suprelorinu

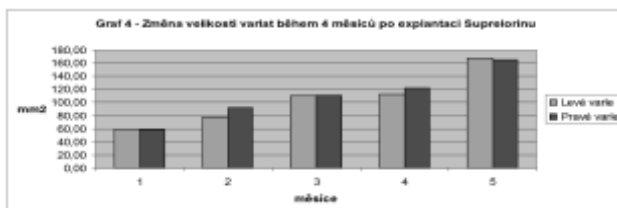


Graf 2: Změna sérové koncentrace testosteronu po implantaci Suprelorinu

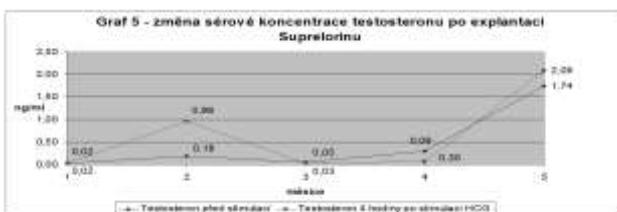


Graf 3: Počet spermií v ejakulátu po implantaci Suprelorinu

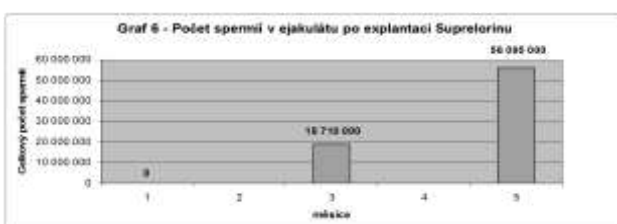
Po explantaci Suprelorinu dochází k návratu sledovaných parametrů na výchozí úroveň (Graf 4,5,6).



Graf 4: Změna velikosti varlat během 4 měsíců po explantaci Suprelorinu



Graf 5: Změna sérové koncentrace testosteronu po explantaci Suprelorinu



Graf 6: Počet spermií v ejakulátu po explantaci Suprelorinu

## Závěr

Na základě předběžných výsledků se GnRH agonista deslorelin jeví jako účinná, bezpečná a vratná alternativa k chirurgické kastraci kocourů. Reverzibilita metody umožňuje dočasné potlačení pohlavní aktivity včetně jejích nežádoucích doprovodných projevů (značkování zápachající močí) a tím využití plemenných kocourů pouze v krycí sezóně.

## Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 49/2010/FVL.

## Literatura

- MUNSON, L. Contraception in felids. *Theriogenology*. 2006, vol. 66, no. 1, s. 126-134.
- KUTZLER, M.; WOOD, A. Non-surgical methods of contraception and sterilization. *Theriogenology*, 2006, vol.66, no. 3, s. 514-525.
- JUNAIDI, A.; WILLIAMSON, P. E.; CUMMINS, J. M.; MARTIN, G. B.; BLACKBERRY, M. A.; TRIGG, T. E. Use of a new drug delivery formulation of the gonadotrophin-releasing hormone analogue Deslorelin for reversible long-term contraception in male dogs. *Reproduction, Fertility and Development*. 2003, vol. 15, no. 6, s. 317-322.
- LUDWIG, C.; DESMOULINS, P. O.; DRIANCOURT, M. A.; GOERICKE-PESCH, S.; HOFFMANN, B. Reversible downregulation of endocrine and germinative testicular function (hormonal castration) in the dog with the GnRH-agonist azagly-nafarelin as a removable implant "Gonazon"; a preclinical trial. *Theriogenology*. 2009, vol. 71, no. 7, s. 1037-1045.
- GOERICKE-PESCH, S.; SPANG, A.; SCHULZ, M.; OZALP, G.; BERGMANN, M.; LUDWIG, C.; HOFFMANN, B. Recrudescence of spermatogenesis in the dog following downregulation using a slow release GnRH agonist implant. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009, vol. 44, suppl. 2, s. 302-308.

**Kontaktní adresa:** Robert Novotný, MVDr., Oddělení reprodukce, Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, novotnyr@vfu.cz

## Diagnostika anaplazmózy pomocí PCR a stanovení specifických protilátek

### Diagnosis of anaplasmosis in dogs using polymerase chain reaction and specific antibodies

Konvalinová Jarmila, Svobodová Vlasta

Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

#### Summary

*Granulocytic anaplasmosis is an infectious disease caused by an obligatory intracellular bacteria *Anaplasma phagocytophilum*. This bacteria infects cells from the bone marrow including neutrophils, which show typical inclusions (morulae) in their cytoplasm. The disease has a world-wide distribution. In Europe the reservoir animals are rodents and wild and domestic ruminants. In the 1980's was reported in dogs. The main vector responsible for the transmission of the disease is the tick *Ixodes ricinus*. According to the last research, the infection can often have a subclinical presentation. The clinical signs are nonspecific and patients may show fever, depression, and anorexia. Muscular pain, bleeding, neurological and gastrointestinal signs and rarely multiorgan failure also were described. One hundred and fifty dogs were examined in the Clinic of Dog and Cat Diseases at the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno during the period from March to June 2009. One hundred and fifteen dogs had different clinical signs and 35 were healthy. Age, sex, and breed were recorded. Hematology and biochemistry were performed in the most of patients. The sera were used to examine the presence of specific antibodies using IFAT and complete blood to detect presence of DNA by PCR. Specific antibodies were detected in 64 dogs (42.6%) and the highest found titer was 10240. DNA was detected in 10 dogs (6.6%).*

**Keywords:** *Anaplasma phagocytophilum*; dog

#### Úvod

Anaplazmóza je infekční onemocnění jehož původcem je obligátní intracelulární bakterie *Anaplasma phagocytophilum* z řádu *Rickettsiales*. Tato pleomorfní gramnegativní bakterie infikuje buňky pocházející z kostní dřeně. Infikuje především neutrofile, ale je možné ji výjimečně detekovat v eozinofilech nebo monocytech. V cytoplasmě těchto buněk vytváří bazofilní intracytoplazmatická tělíska - tzv. moruly. Onemocnění je rozšířeno celosvětově a bylo zjištěno u celé řady živočišných druhů. V Evropě byla infekce psů poprvé popsána v 80. letech 20. století ve Švýcarsku a Švédsku. V 90. letech minulého století bylo zjištěno, že tato bakterie může vyvolávat onemocnění i u lidí. Vektorem tohoto onemocnění jsou klíšťata z čeledi *Ixodidae*. V Evropě se nejvíce uplatňuje hojně rozšířený druh *Ixodes ricinus*. Jako rezervoárová zvířata se uplatňují především domácí a volně žijící přežvýkavci - ovce, kozy a vysoká zvěř. U zvířat i lidí může tato infekce probíhat asymptomaticky, s různě výraznou symptomatologií nebo může vyústit až v multiorganové selhání s fatálním průběhem. Obecně lze říci, že se toto onemocnění nejčastěji prezentuje jako akutní febrilní syndrom – zvířata vykazují horečku, apatii a nechutenství. Další klinické příznaky většinou souvisí s postižením pohybového, nervového, trávicího a dýchacího aparátu. V rámci hematologického vyšetření je nečastějším a typickým nálezem trombocytopenie. Mohou být přítomny i inkluze (moruly) v neutrofilech a změny v počtu leukocytů. Při hodnocení biochemického vyšetření krve se setkáváme nejčastěji s elevací jaterních

enzymů. Ostatní parametry nevykazují signifikantní odchylky od fyziologického rozmezí. Bakteriémie trvá obvykle 1-2 týdny. Protilátky se tvoří do 2 týdnů po infekci, IgM dominují první 3 týdny, IgG se vytváří později a v krvi přetrvávají několik týdnů i let.

### Materiál a metody

V období od března do června 2009 bylo vyšetřeno 150 psů, celkem 65 plemen. Jednalo se o 83 samců (z toho 4 kastrování) a 67 samic (z toho 21 kastrování). Věk vyšetřovaných psů se pohyboval od 4 měsíců do 16 let. Do souboru byli zařazeni jak psi s různými klinickými příznaky onemocnění tak i zvířata zdravá. Jednalo se o pacienty Kliniky chorob psů a koček FVL VFU Brno. U většiny psů bylo provedeno hematologické a biochemické vyšetření krve. Krev byla odebírána z v. cephalica antebračii nebo v. jugularis. Od každého psa byly získány vzorky plné krve (odběr na EDTA) a krevního séra. Vzorky plné krve byly vyšetřeny metodou PCR. DNA byla ze vzorků extrahována komerčním kitem QIAGEN NucleoSpin Blood (Machery-Nagel, Germany) podle pokynů výrobce. Použité primery a postupy vyšetření byly provedeny v souladu s metodikou Walls et al., 2000. Jako pozitivní kontrola byla použita DNA pozitivního psa. K sérologickému vyšetření byl použit komerční kit Anaplasma phagocytophila IFA Canine IgG Antibody Kit (Fuller Laboratories, Fullerton, California, USA) dle návodu výrobce a za pozitivní byly považovány titry vyšší než 80.

### Výsledky

Z celkového počtu 150 vyšetřených psů byla DNA *A. phagocytophilum* prokázána v krvi u 10 jedinců (tj. 6,7 %). Sérologické vyšetření na přítomnost specifických protilátek bylo pozitivní u 70 psů (tj. 46,7 %), nejvyšší dosažený titer byl 10240. V souboru bylo 36 zvířat bez klinických příznaků onemocnění. Mezi nimi byli 2 PCR pozitivní jedinci (5,6 %) a 18 sérologicky pozitivních (50 %). Celkem 114 psů mělo různé klinické příznaky onemocnění. Z těchto bylo 8 PCR pozitivních (7 %) a 52 sérologicky pozitivních (45,6 %). Polovina PCR pozitivních psů bylo sérologicky negativních. Z 10 PCR pozitivních zvířat mělo 5 klinické příznaky související s anaplazmózou, u 2 bylo diagnostikováno nádorové onemocnění, které může mít za následek imunodeficienci, 2 byli klinicky zdraví a 1 pes měl příznaky nesouvisející s anaplazmózou. Samci převažovali jak ve skupině PCR pozitivních (8 samců a 2 samice), tak ve skupině sérologicky pozitivních psů (41 samců a 29 samic), viz tabulka 1.

Tabulka 1: Charakteristika a vyšetření DNA pozitivních psů

Měsíc odběru	Plemeno, pohlaví, věk	Klinické příznaky	Vyšetření krve	Titr protilátek
5	Kříženec F- k 12	Horečka, apatie	↓tr, leu, ↑ALP	640
5	Pudl M 16	Klinicky zdrav	fyziologické	neg
5	Bernský salašnický M 7	Tumor	↓tr,ery,leu↑ALP,ALT	neg
5	Jezevčík M 10	Neurologické potíže	↑leu, ALP, ALT	2560
5	Rotvajler M 3	Apatie, nechutenství	↑ ALT, AST	640

5	Velký švýcarský s. M 1	Zvracení, průjem	fyziologické	320
5	Kokršpaněl F- k 1	Tumor	-	1280
5	Pražský krysařík M-k 1	Urolitiáza	↑ ALT	neg
6	Dobrman M 5	Klinicky zdravý	↑ ALP, ALT	neg
6	Boloňský psík M 5	Neurologické potíže	fyziologické	neg

### Diskuse

Většina pozitivních záchytů spadá na měsíc květen – 80 %, což souvisí s aktivitou klíšťat. PCR pozitivní psi jsou často séronegativní (50 %), protože protilátky se začínají tvořit 2-3 týdny po infekci. Mezi pozitivními zvířaty je převaha samců, což souvisí s vyšší aktivitou v prostředí, než je tomu u samic. Nejvíce sérologicky pozitivních psů bylo ve věku 8 – 13 let. Nebyly zjištěny výrazné rozdíly mezi výsledky PCR a sérologických vyšetření u psů s a bez klinických příznaků onemocnění. To souvisí se zjištěním jiných autorů, že v Evropě tato infekce probíhá často asymptomaticky. Tento fakt je důležitý pro případy transfúzní terapie.

### Závěr

Provedená vyšetření prokázala, že s výskytem anaplazmózy u psů je třeba počítat i v podmínkách ČR. Téměř polovina vyšetřených zvířat (46,7 %) přišla do kontaktu s touto infekcí. Přestože často probíhá asymptomaticky nebo subklinicky, může vyvolávat i řadu klinických problémů.

### Literatura

- Dumler J.S.; Madigan J.E.; Pusterla N.; Bakken J.S. Ehrlichioses in humans: Epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. *Clin Infect Dis.* 2007, vol. 45, s. 45-51.
- Egenvall A.E.; Hedhammar Å.A.; Bjöersdorff A.I. Clinical features and serology of 14 dogs affected by granulocytic ehrlichiosis in Sweden. *Vet Rec.* 1997, vol. 140, s. 222-226.
- Melter O.; Stehlík I.; Kinská H.; Volfová I.; Tichá V.; Hulínská D. Infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a young dog: case report. *Veterinarni Medicina.* 2007, vol. 52, s. 207-212.
- Woldehiwet Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet Parasitol.* 2010, vol. 167, s. 108-122.

**Kontaktní adresa:** Jarmila Konvalinová, MVDr., Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, konvalinova@vfu.cz

## Meranie množstva kortizolu v srsti a slinách psov a možnosť využitia pri diagnostike a kontrole terapie u hyperadrenokorticismu

### Measuring cortisol in hair and saliva from dogs to diagnose and control treatment of hyperadrenocorticism

Stegmann Mário, Svoboda Miroslav

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*The objective of this study was to evaluate if the amount of cortisol in hair and saliva of dogs is measurable. The other objective was to find out if the dogs with hyperadrenocorticism will have significantly higher levels of cortisol. Study is not complete yet.*

**Keywords:** *Cushing's syndrome; hyperadrenocorticism; dog; hair; saliva*

#### Úvod

Hyperadrenokorticismus patrí medzi časté ochorenia endokrinného systému u psov. Vyznačuje sa nadmernou tvorbou kortizolu, ktorý poznáme aj ako stresový hormón. Je nezbytný k normálnemu fungovaniu organizmu ale jeho nadprodukcia počas dlhšej doby má množstvo nežiadúcich účinkov. Medzi najčastejšie patrí zvýšená chuť do jedla, zvýšený príjem tekutín, atrofia kože, atrofia svalstva, znížená imunita, vypadávanie srsti, centripetálna obezita.

K potvrdeniu diagnózy sa skúšalo merať množstvo kortizolu v krvi, moči, slinách a truse. Každá metóda má svoje výhody ale aj nevýhody. Meranie v krvi je po technickej stránke jednoduché, ale vyžaduje manipuláciu s pacientom a je spojené s individuálnou stresovou odpoveďou. Z tohoto dôvodu nemá jednotlivé meranie veľký význam z dôvodu nemožnosti rozlíšenia fyziologickej stresovej reakcie od patologického dlhodobého zvýšenia jeho hladiny. Stanovenie hormónu v slinách má výhodu v neinvazite a minimalizácie stresu. Na druhej strane nám sliny určia aktuálnu hladinu kortizolu tak sa nedokážeme vyhnúť náhlym výkyvom. Z tohoto dôvodu sa hľadá biologický materiál, v ktorom dochádza k hromadeniu kortizolu počas dlhšieho časového obdobia. Túto podmienku splňuje moč aj trus. Maximálnu hladinu dosiahne kortizol v moči asi za 3 hodiny a v truse je táto doba ešte dlhšia. U moči môže byť nevýhodou náročnejší zber vzorkov a v truse sa hladiny kortizolu môžu významne líšiť podľa produkovaného množstva a frekvencie defekácie.

Ako relatívne nová metóda sa nabáda meranie kortizolu v chlpm psa. Z chlpuvého folikulu sa hormón uvoľňuje do chlpu kde ostáva uložený. Rôzne druhy zvierat majú aj rôzne rytmy v uvoľňovaní hormónu a preto je potreba výsledky validovať podľa druhu zvierat'a. U ľudí sa postupom času kortizol vo vlasoch odbúráva a jeho množstvo v distálnej šasti je menšie ako v proximálnej. Tento proces ale nebol potvrdený u opíc. Predpokladom mojej práce je že u psov, u ktorých bude potvrdený hyperadrenokorticismus (pomer kortizol/ kreatinin v moči, test s nízkou dávkou dexamethasonu) bude potvrdené aj vyššie množstvo kortizolu v chlpm. Po zahájení terapie by sa novorastúce chlpy dali využiť na kontrolu terapie. Druhú časť výskumu by som chcel zacieliť možnosti stanovenia kortizolu v slinách a využitie tohoto

vyšetrenia ako orientačného testu. Rovnaké miesto bude použité aj na kontrolu terapie minimálne mesiac od nasadenia terapie.

### **Materiál a metódy**

V sledovanej skupine je zatiaľ 21 psov s potvrdeným hyperadrenokorticismom. U všetkých bolo k potvrdeniu diagnózy prevedené stanovenie pomeru kortizolu a kreatinínu v moči a u väčšiny potom nasledoval supresný test s nízkou dávkou dexamethasonu na potvrdenie diagnózy.

Metodika vyšetrenia moči spočíva v odchyte ranej moči po dobu dvoch dní. Z týchto vzorkov vytvoríme jeden zmiešaním v pomere 1:1. Vzorky zasielame na biochemické vyšetrenie do FN Brno kde je množstvo kortizolu merané imunochemiluminiscenčnou metódou a kreatín meraného spektrofotometricky. Pomer kortizolu a kreatínu nižší ako  $12 \times 10^{-6}$  berieme ako normálny nález.

U väčšiny pacientov s vyšším pomerom sa pokračovalo v diagnostike dexamethason supresným testom s nízkou dávkou. Pacientovi je odobraná krv a následne je aplikovaný dexamethason v dávke 0,01mg/kg i.v. Nasledujú dva odbery za 4 a za 8 hodín od podania dexamethasonu. Hodnotu po 8 hodinách vyššiu ako 40 nmol/l berieme ako pozitívnu. Pokles o viac ako 50% po 4 hodinách poukazuje skôr na centrálnu formu ochorenia. Kortizol stanovujeme v krvi imunochemiluminiscenčne.

Krv sa odoberá z v. jugularis. Miesto odberu oholíme v rozsahu asi 50 cm<sup>2</sup> a získané chlpy použijeme na analýzu množstva kortizolu. Rovnaké miesto bude použité aj na kontrolu terapie minimálne 6 týždňov od jej zahájenia. Je potrebné aby opakovaný odber obsahoval iba novorastúce chlpy.

Metóda odberu slín prebiehala pomocou vatového tampónu. Produkcia slín bola stimulovaná pochúťkou ukrytou v zavretej dlani. U väčšiny psov sme získali týmto spôsobom dostatočné množstvo slín (cca 1 až 2 ml). Vzorky boli označené a uchované dlhodobo pri teplote -70°C. Ďalšie vzorky od jednotlivých pacientov boli odebrané po dvoch až troch týždňoch od nasadenia terapie. Stanovenie hodnôt prebehne enzymoimunitnou analýzou v biochemickom laboratóriu Univerzity sv Cyrila a Metoda v Trnave.

K stanoveniu kortizolu v chlloch je potrebné tieto vzorky spracovať. Použili sme rovnakú metódu ako v práci Dr. Davenporta et al. (2006). Chlpy boli omyté isopropanolom a potom vysušené pri izbovej teplote po dobu 2 dní. Nasleduje rozmixovanie na jemný prášok a následný rozklad v metanole. Použili sme 1 ml metanolu na 50 mg prášku. Po odstredení odoberieme 0,6 ml supernatantu a necháme ho vyschnúť. Opätovne tento vzorok skvapalníme pridaním 0,4 ml fosfátového pufru z kitu na stanovenie kortizolu. Samotné meranie kortizolu je založené na enzymoimunitnej analýze. Vzorky boli spracované a vyšetrené v biochemickom laboratóriu Univerzity sv Cyrila a Metoda v Trnave.

### **Výsledky**

U 21 psov bol diagnostikovaný hyperadrenokorticismus na základe stanovenia pomeru kortizolu a kreatinínu v moči a u väčšiny bol na definitívne potvrdenie prevedený dexamethason supresný test. 17 psov bolo mužského pohlavia (3 boli kastrovány), 4 feny (3 kastrované). Priemerný vek pacientov bol 11,6 roku s mediánom 13 let. Najmladší pacient má 6 rokov a najstarší 16. Plemenné zastúpenie pozostávalo z



krížencov (5), škótsky teriér (3), jazvečík (3x), rhodésky ridgeback (2) a zbytok boli plemeni menšieho vraztu. Priemerná kodnota pomeru kortizolu a kreatininu v moči je 41,1. Priemerná hodnota kortizolu pred aplikáciou dexamethasonu bola 126 (+/- 68) a 8 hodín po aplikácii 88 (+/- 52). Kortizol v slinách a chlpoch je stanovený zatiaľ iba u 6 psov (3 zdravé zvieratá a 3 s hyperadrenokorticizmom). Psi s cushingovým ochorením mali hodnoty 29,9 pg/mg 34 pg/mg a 36 pg mg. U zdravých psov sme namerali 8 pg/mg, 22 pg/mg a 28pg/mg.

### **Diskusia**

Zo získaných hodnôt nie je zatiaľ možné vyvodit' žiadne závery. U týchto pacientov sa skôr jednalo o overenie možnosti stanovenia kortizolu v týchto biologických materiáloch. Bude potreba vyšetriť väčšie množstvo vzorkov a podľa štúdie „measuring cortisol in hair and saliva from dogs“ (A. Bennett, V. Hayssen) bude nutné zohľadniť ďalšie faktory ako farbu srsti a taktiež možnosť výrazných individuálnych rozdielov.

### **Záver**

Kortizol v chlpoch by mohol byť dôležitým cenným ukazateľom dlhodobých hladín kortizolu v organizme. Nevýhodou je absencia referenčných hodnôt a zložitost' stanovenia.

### **PodĎakovanie**

Na tomto mieste by som chcel poďakovať pracovníkom katedry biotechnológie na Univerzite sv. Cyrila a Metoda za ich ochotu,

### **Literatúra**

BENNETT, A.; HAYSEN, V. Measuring cortisol in hair and saliva from dogs: coat color and pigment differences. *Domestic Animal Endocrinology* 39 (2010) 171–180

DAVENPORT, MD.; TIEFENBACHER, S.; LUTZ, CK.; NOVAK, MA.; MEYER, JS. Analysis of endogenous cortisol concentrations in the hair of rhesus macaques. *Gen Comp Endocrinol* 2006;147:255–261.

ROONEY, NJ.; GAINES, SA.; BRADSHAW, JWS. Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kenneling: Investigating mitigation of stress by prior habituation. *Physiol. Behav.* 2007;92:847–854.

BUCHANAN, KL.; GOLDSMITH, AR. Noninvasive endocrine data for behavioral studies: The importance of validation. *Anim Behav* 2004;67:183–185.

**Kontaktní adresa:** Mário Stegmann, MVDr., Klinika chorob psů a koček FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, V08211@vfu.cz

## **Stanovení hladiny EGF (*epithelial growth factor*) v moči koček s FIC (*feline idiopathic cystitis*)**

### **Evaluation of epithelial growth factor urine levels in cats with feline idiopathic cystitis**

**Honzák Daniel, Kovaříková Simona, Hronová Nikola**

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

#### **Summary**

*Lower urinary tract disorders (LUTD) represent the important part of urinary tract problems of feline clinical medicine. Today, more than 50 % of LUTD cases is diagnosed as feline idiopathic cystitis (FIC). The resemblance between feline idiopathic cystitis and human interstitial cystitis was described. The diagnostics and treatment of this disorder is difficult. Measurement of urine level of epithelial growth factor is one of the diagnostic possibilities of interstitial cystitis in human. The goal of this study is evaluation of EGF in feline urine as a marker for FIC.*

**Keywords:** *feline idiopathic cystitis; urine markers; nonsteroidal anti-inflammatory drugs*

#### **Úvod**

Onemocnění dolních cest močových představuje významnou část urologických problémů řešených v klinické praxi koček. Jedná se o onemocnění močového měchýře a močové trubice, které může probíhat v obstruktivní či neobstruktivní formě.

V současné době je více než 50% případů FeLUTD (Feline Lower Urinary Tract Disorders) diagnostikováno jako idiopatická forma onemocnění dolních cest močových (FIC, Feline Idiopathic Cystitis). Tato diagnóza je stanovena na základě vyloučení všech známých příčin (anatomické abnormality, neurogenní poruchy, urolity, uretrální zátky, zánětlivá onemocnění, traumata, neoplazie, iatrogenní vlivy), které mohou tento urologický problém vyvolat. Existuje také určitá podobnost mezi FIC a intersticiální cystitidou (IC) u lidí. Rovněž klinické projevy FIC jsou shodné se symptomatologií IC u lidí. Mezi nejčastěji pozorované příznaky patří strangurie, dysurie, hematurie, polakisurie a u koček též periurie.

Snaha o nalezení neinvazivní diagnostické metody IC u lidí, vedla k provedení několika studií, zabývajících se močovými markery. V jedné takové studii zjistili, že hladiny epiteliálního růstového faktoru EGF jsou významně zvýšené v moči pacientů s IC oproti kontrolním skupinám. Vzhledem k dosaženým výsledkům navrhuje autoři tento parametr jako vhodný diagnostický marker IC. Velmi podobných výsledků bylo dosaženo i v následujících studiích zabývajících se tímto markerem.

Vzhledem k podobnosti FIC u koček a IC u lidí, je možné očekávat velmi podobné výsledky ve stanovení hladin tohoto markeru v moči kočičích pacientů trpících idiopatickou cystitidou. Stanovení hladin epiteliálního růstového faktoru v moči těchto pacientů by tak mohlo přispět k diagnostice a pochopení patofyziologie tohoto onemocnění. Cílem této studie je tedy zhodnocení hladiny EGF v moči a možnost použití v rámci diagnostiky Felinní idiopatické cystitidy.

## Metodika

Pacienti jsou do této studie zařazováni tak jak majitelé přicházejí na naše pracoviště. Jsou rozdělováni do několika skupin: 1. pacienti s idiopatickou cystitidou, 2. pacienti s přítomností anorganického sedimentu, konkrementů v močovém měchýři, pacienti s přítomností močové zátky a obstrukcí močových cest, 3. pacienti s infekcí močových cest, 4. kontrolní skupina pacientů nemající v anamnéze žádné urologické onemocnění. Kritéria pro zařazení do první skupiny pacientů FIC sestávají: z přítomnosti klinických projevů tohoto onemocnění, z nepřítomnosti bakteriální infekce, anorganického sedimentu, konkrementů a uretrální obstrukce.

Vzorky moči od všech skupin pacientů jsou získávány cystocentézou, ihned zpracovány (vyšetření moči, močového sedimentu, kultivace moči) a supernatant je uskladněn při -80 stupních Celsia. V těchto vzorcích získané moči je pak stanovována hladina EGF, humánním Elisa testem.

## Dosavadní výsledky

Tabulka 1: Hladina EGF v moči koček

1. skupina FIC	2. skupina Močový písek, urolity, obstrukce	3. skupina Infekce močových cest	4. skupina kontrolní skupina pacientů
Hladina EGF v moči (ng/ml)			
11,66	9,19	22,43	1,2
	6,57	0	0,7
	4,69		2,29
	1,17		4,64
	6,02		
	3,79		
	1,07		
	3,93		
	4,2		
	4		
	3,49		
	4,85		
	0		

## Závěr

Vzhledem k prozatím nedostatečnému množství získaných vzorků moči, nelze tyto výsledky zcela validně reprodukovat a statisticky zhodnotit. Zejména pak nedostatek vzorků moči od pacientů s idiopatickou formou onemocnění dolních cest močových je v této studii limitující. Sběr dalších vzorků moči ke stanovení hladiny EGF stále probíhá tak jak majitelé přicházejí se svými pacienty na naše pracoviště.

### **Poděkování**

Studie je finančně podpořena projektem IGA VFU Brno.

### **Literatura**

BUFFINGTON, D.A.; CHEW, D.J.; DBAROTLA, S.P. Interstitial cystitis in cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1996 Mar;26(2):317-26.

KRUGER, J.M.; OSBORNE, C.A.; LULICH, J.P. Changing paradigms of idiopathic cystitis. *Vet Clin Small Anim* 39 (2008) 15-40.

GUNN-MOORE, D.A.; SHENOY, C.M. Oral glucosamine and the management of feline idiopathic cystitis. *J Feline Med Surg.* 2004 Aug;6(4): 219-225.

WILKINSON, D.R.; ERICKSON, D.R. Urinary and Serologic Markers for Interstitial Cystitis: An Update. *Curr Urol Rep.* 2006 Sep;7(5):414-22.

KEAY, S.K.; et al. Sensitivity and specificity of antiproliferative factor, heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor, and epidermal growth factor as urine markers for interstitial cystitis. *Urology* 57 (Suppl 6A) 9-14, 2001.

**Kontaktní adresa:** Daniel Honzák, MVDr., Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, dhonzak@vfu.cz

## Borelióza psů v České republice Borreliosis in dogs in the Czech Republic

<sup>1</sup>Schánilec Pavel, <sup>2</sup>Kybicová Kateřina, <sup>1</sup>Agudelo F. Carlos, <sup>3</sup>Žáková Alena,  
<sup>1</sup>Treml František

<sup>1</sup>Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup>Státní zdravotní ústav, Praha

<sup>3</sup>Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

### Summary

*The aim of this thesis was to assess the occurrence of seroprevalence of antiborrelial antibodies against *B. burgdorferi* s.l. in selected groups of dogs and detect endemic areas comparing findings with available data. In addition we try to observe of persistence of borrelial antibodies, describe findings in naturally infected dogs, detect prevalence of borrelial genospecies in ticks, and describe findings in dogs with clinical signs of disease.*

*To accomplish these aims two seroprevalence studies were performed made. In the first there were obtained 399 serum samples from healthy asymptomatic military dogs from 12 different areas in the Czech Republic. In the second seroprevalence study were evaluated molecular, serologic, and clinical findings in naturally infected dogs with *Borrelia burgdorferi* s.l. and the molecular findings in ticks collected from the same dogs. In total, blood samples from 296 dogs and 118 engorged ticks were examined.*

*Furthermore, four clinical cases were documented with *Borrelia burgdorferi* s.l. infection. The aim of this study was to present clinical and neurological signs, laboratory abnormalities, serologic and/or molecular findings.*

**Keywords:** *Borrelia burgdorferi* s.l.; *B. garinii*; *Borrelia afzelii*; borreliosis; dog; tick

### Úvod

V Evropě patří mezi klíšťaty přenášené nemoci babesióza, borelióza, bartonelóza, anaplasmóza, erlichióza a klíšťová meningoencefalitída. Nejčastěji diagnostikovaným onemocněním je borelióza.

### Materiál a metodika

Byly provedeny 2 séroprevalenční studie.

V 1. séroprevalenční studii byly sledovány: a) Výskyt celkových IgG za celé sledované období 10/2001 – 11/2002 a séroprevalence jednotlivých genospecíí *B. burgdorferi* s.l. (*B.afzelii* a *B.garinii*), sledování séroprevalence IgG v závislosti na lokalitě, termínu odběru a stáří zvířete. b) Sledování séroprevalence IgM/IgG v období 10/2001 – 11/2002 se současným sledováním sérokonverze a přetrvávání protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. (Bbsl).

V období 10/2001 – 11/2002 bylo odebráno celkem 399 vzorků sér od zdravých, asymptomatických, vojenských psů. Séra byla získána z ÚVVDÚ Hlučín, ČR, včetně informací o věku, pohlaví, plemeni, dat odběrů a lokalitě, kde byli psi umístěni. Pro stanovení celkového IgG byl použit modifikovaný ELISA test. Paralelně byla použita k detekci protilátek Dog EIA *Borrelia* IgG/IgM (TEST-LINE, s.r.o., Brno, CZ). Data byla statisticky vyhodnocena pomocí  $\chi^2$  testu. Rozdíly s hodnotami  $p < 0,05$  byly hodnoceny jako statisticky významné.

Ve 2. séroprevalenční studii byly sledovány klinické, molekulární, sérologické, hematologické a biochemické nálezy s ohledem na plemeno, věkovou skupinu, způsob využití (pracovní / společenští psi), pohlaví a skupiny A/B (symptomatictí / asymptomatictí psi). Všichni psi byli vyšetřeni na KCHPK, VFU Brno a na Veterinární klinice v Jablonci nad Nisou v období od listopadu 2005 do října 2007. Psi, celkem 296, pocházeli z různých oblastí České republiky, převážně z jižní Moravy (202), severní Moravy (32) a ze severních Čech (62). Psi byli rozděleni do 2 skupin. Do skupiny A byli zařazeni psi s klinickými příznaky, které by mohly vyvolat infekce Bbsl. Do skupiny B byli zařazeni psi zdraví nebo psi s diagnózou nebo symptomy neodpovídajícími infekci Bbsl, jako jsou trauma, epilepsie apod. Byla prováděna DNA izolace a sérologické vyšetření. Séra byla testována pomocí Dog EIA *Borrelia* IgG/IgM, TEST-LINE, s.r.o., Brno, CZ. Ke statistickému vyhodnocení byly využity Fisherův exaktní test,  $\chi^2$  test. Kalkulace byly provedeny v programu Stata.

Klinické případy: všichni psi byli řádně vakcinováni proti infekčním onemocněním (žádný nebyl vakcinován proti borelióze).

### Výsledky a závěr

V předložené práci jsme sledovali:

1) Séroprevalenci antiboreliových protilátek ve vybrané skupině vojenských služebních psů a u pacientů odebraných v rámci klinických vyšetření.

V období 10/2001 – 11/2002 byla sledována séroprevalence protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. třídy IgG. Bylo vyšetřeno 399 vzorků a séroprevalence dosáhla 6,5%. V jednotlivých oblastech se séroprevalence pohybovala od 0% do 28,6%. Prokázali jsme signifikantní rozdíly mezi jednotlivými lokalitami ( $p < 0,05$ ). Prokázali jsme pozitivní protilátky proti *Borrelia afzelii* u 5,5% a proti *Borrelia garinii* u 4,8% vyšetřovaných psů. V séroprevalenci nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly ( $p > 0,05$ ). Signifikantní rozdíly nebyly zjištěny ani v závislosti na měsíci odběru ( $p > 0,05$ ). Při hodnocení séroprevalence podle věku byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi staršími zvířaty (stáří nad 4 roky) při porovnání se zvířaty do 3 let stáří ( $p < 0,05$ ).

V průběhu 11/2005 – 10/2006 bylo vyšetřeno celkem 296 vzorků krve psů, rozdělených do 2 skupin: skupina A (141 vzorků), skupina B (155 vzorků). Prokázali jsme séroprevalenci u protilátek třídy IgM (7 psů, 2,4%), u protilátek třídy IgG (30 psů, 10,3%). Nebyly prokázány signifikantní rozdíly v séroprevalenci mezi skupinami A a B, ani v ostatních studovaných parametrech.

2) Detekovali jsme ohniska pozitivních nálezů a porovnali je s nálezy z humánní medicíny.

Z 11 vyšetřovaných lokalit jsme prokázali výskyt protilátek v 9 lokalitách, 2 lokality byly negativní. V porovnání údajů z humánní sféry i s šetřením u psů byly nálezy nejednotné.

3) Posuzovali jsme dobu přetrvávání protilátek proti *Borrelia burgdorferi* s.l. u séropozitivních psů při opakovaných odběrech.

V séroprevalenčních studiích se nepodařilo zachytit takovou protilátkovou odpověď, aby byla vyhodnocena doba přetrvávání protilátek po infekci. Prokazatelná sérokonverze byla zaznamenána pouze u 3 pacientů uvedených jako klinické nálezy u

psů s infekcí *B.burgdorferi* s.l. U pacienta (případ 1) se podařilo prokázat více než 10 násobný vzestup IgM v průběhu 38 dní. U druhého pacienta (případ 2) jsme prokázali v průběhu 44 dnů vzestup IgG do pozitivních hodnot za současného poklesu IgM. Pouze u případu 4 jsme byli schopni vysledovat kompletní sérokonverzi. Vzestup IgM z negativních hodnot (1. den) k maximu (63. den) až k opětovným negativním hodnotám (114. den), za současného nárůstu IgG z negativních hodnot (1. den) přes maximum (71. den). Pozitivní hodnoty IgG byly minimálně ještě 122. den. 473. den byly IgM i IgG negativní.

4) Zjistili jsme a popsali molekulární, sérologické a klinické nálezy u psů přirozeně infikovaných *Borrelia burgdorferi* s. l. v České republice.

Byly provedeny 2 séroprevalenční studie. V první z nich byly všichni psi asymptomatictí. Ve 2. séroprevalenční studii byla pomocí PCR prokázána přítomnost DNA *B. garinii* pouze u jediného z 296 vzorků krve. Pes je prezentován jako případ 3. Séroprevalence protilátek proti *B. burgdorferi* s.l. byla 2,4% (IgM) a 10,3 (IgG) z 296 vzorků. Ve skupině symptomatických psů (skupina A) byly nejčastěji zjišťovanými příznaky apatie, inapetence, kulhání, horečka a gastrointestinálního neurologické příznaky. Nejčastější hematologické nálezy byly anémie, trombocytopenie a leukocytóza. Ve skupině asymptomatických psů (skupina B) nebyly zjištěny hematologické nebo biochemické abnormality. Klinické případy 1 – 4 viz bod 6.

5) Na 4 případech jsme popsali klinické příznaky, abnormality laboratorních nálezů, sérologické a/nebo molekulární nálezy u pacientů s klinickými projevy infekce *Borrelia burgdorferi* s.l.

Tři psi vykazovali neurologické příznaky. U dvou z nich jsme prokázali meningoencefalomyelitidu (MEM), jeden měl záchvaty spojené s progresivním renálním onemocněním. U 1 pacienta jsme zaznamenali případ suspektní kardiitidy a následné dilatační kardiomyopatie. Kardiologické změny korespondovaly s klinickými, elektrokardiografickými a echokardiografickými nálezy a s odpovídající sérokonverzí.

#### Poděkování

Tato práce vznikla za částečné grantové podpory MSM 143 100008 a MŠMT 1661700002.

#### Literatura

PEJCHALOVÁ K., ŽÁKOVSKÁ A., FUČÍK K., SCHÁNILEC P. Serological confirmation of *Borrelia burgdorferi* infection in dogs in the Czech republic. *Veterinary Research Communications*. 2006, vol. 30, s. 231 - 238.

KYBICOVÁ K., SCHÁNILEC P., HULÍNSKÁ D., UHERKOVÁ L., KURZOVÁ Z., SPEJCHALOVÁ S. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in dogs in the Czech Republic. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2009, vol. 9, s. 655-661.

SCHÁNILEC P., KYBICOVÁ K., AGUDELO C. F., TREML F. Clinical and Diagnostic Features in Three Dogs Naturally Infected with *Borrelia* spp. *Acta Veterinaria Brno*. 2010, vol. 79, s. 319-327.

AGUDELO C.F., SCHÁNILEC P., KYBICOVA K., KOHOUT P. Cardiac manifestations of borreliosis in a dog: a case report. *Veterinari Medicina*. 2011, vol. 56, s. 85–92.

**Kontaktní adresa:** Pavel Schánilec, MVDr., Klinika chorob psů a koček, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, schanilecp@vfu.cz





# **SEKCE 11**

*Choroby velkých zvířat*



## Monitoring zhubnej katarálnej horúčky na farme oviec počas roku 2010

### Monitoring of *febris catarrhalis ovium* in the sheep farm during year 2010

<sup>1</sup>Lacková Zuzana, <sup>1</sup>Bíreš Jozef, <sup>2</sup>Kočišová Alica, <sup>1</sup>Lešková Lenka

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Klinika prežúvavcov, Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach, Ústav parazitológie, Košice, Slovenská republika

#### Summary

The aim of this study during year 2010 was to gain primary information about the incidence and epidemiological situation of economically important orbivirus transmissible disease of bluetongue in the sheep farm. Monitoring of BT including entomological survey, clinically-biochemical examinations and serological diagnostics was carried out since January to December 2010. During year 2010 in the sheep farm totally 13 788 midges were captured. Of this number *Obsoletus* complex was 83,58 % (11 524), *Pulicaris* complex was 2,32% (320) and *Nubeculosus* complex were 0,1 % (13). Of other non-transmitting *Culicoides* species were 14 % (1931). The peak in seasonal dynamics was reached in weeks 24., 30. and 34. We diagnosed no clinical symptoms that are characteristic for BT. During laboratory diagnostics we have noticed increase of TL, urea and total Ig, decrease of creatinine, TG 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.

**Keywords:** monitoring; *febris catarrhalis ovium*; bluetongue; sheep

#### Úvod

Katarálna horúčka je orbivírusová choroba oviec a ostatných domácich a voľne žijúcich prežúvavcov prenášaná pakomárikmi *Culicoides*. Pôvodne bola považovaná za ochorenie afrického kontinentu. Prvý výskyt nákazy mimo územia Afriky bol zaznamenaný na ostrove Cyprus. Hlavné nálezové prepuknutia nákazy bluetongue nastali v krajinách strednej a západnej Európy v roku 2006. Choroba modrého jazyka (bluetongue, BT) vyvoláva v chove prežúvavcov zdravotné a ekonomické dôsledky a obmedzuje národné a medzinárodné obchodovanie so živými zvieratami a ich produktmi (embryá, semeno). Pri výskyte BT sa postupuje v súlade s národnou, európskou a OIE legislatívou. Povinnosťou každej členskej krajiny je realizovať na svojom území aktívny surveillance BT (entomologický prieskum, klinicko - biochemické, sérologické, virologické vyšetrenia zvierat). Na Slovensku pri monitoringu BT sa doposiaľ nepotvrdila prítomnosť pôvodcu nákazy. Opatrenia, ktoré sa na Slovensku realizovali, súviseli s ohniskom nákazy BT v susedných krajinách (napr. Česká republika, Maďarsko) (Bíreš a i., 2009).

#### Materiál a metódy

Monitoring zhubnej katarálnej horúčky oviec bol realizovaný v období od januára 2010 do decembra 2010 na farme oviec (356 m n. m.). Entomologický prieskum pozostával z odchytku vektora ochorenia – pakomárikov (apríl až november, lapač hmyzu - JW 1212) a ich zatriedenia na základe charakteristických znakov na krídlach (Goffredo

a Meiswinkel, 2004; Rawlings, 1996). Zároveň bolo hodnotené pigmentové zafarbenie bruška samičiek (Braverman a Mumcuoglu, 2009, Bartsch a i., 2009).

Klinické vyšetrenie oviec v mesačných intervaloch pozostávalo z klinickej obhliadky stáda, klinického vyšetrenia chorých zvierat a z údajov poskytnutých od privátneho veterinárneho lekára a chovateľa.

Laboratórne vyšetrenie sa realizovalo v mesačných intervaloch od tých istých 10 bahníc a 5 plemenných baranov kusov oviec plemena merino z celkového počtu 850 ks zvierat na farme. Jednotlivé hematologické parametre (Hb, Er, Htk, Lc) boli robené na hematologickom analyzátore ABC Vzt 16, diferenciálny krvný obraz klasickou metódou, aktivita enzýmov (AST, ALP, GGT, CPK), CB, ALB, kreatinín, Clg, U, BHB, P na spektrofotometrickom analyzátore ALIZÉ, Ca, Fe, Cu, Zn metódou atómovej absorpčnej spektrofotometrie (AAS-AAAnalyst 100 Perkin Elmer), CBi na spektrofotometri SPECOL 211. Sérologické vyšetrenia boli vykonané v Referenčnom laboratóriu pre bluetongue v Štátnom veterinárnom ústave vo 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

Počas transmisívnej sezóny vektora sme odchytili 13 788 ks pakomárikov s prevahou zástupcov komplexu *Culicoides obsoletus* (11 524 ks; 83,58 %). Z ďalších komplexov pakomárikov potencionálnych vektorov prenášajúcich vírus boli odchytení zástupcovia Komplexu *Culicoides Pulicaris* (320 ks; 2,32 %) a *C. Nubeculosus* (13 ks; 0,1 %). Z iných druhov pakomárikov sa odchytilo 1931 ks (14 %). Z hľadiska sezónnej dynamiky sme zaznamenali prvý vrchol v 24. týždni odchyty (7.6.-13.6.), ďalšie vrcholy v 30. týždni (19.7.-25.7.) a 34. týždni (16.8.-21.8.). Najviac bolo odchytených pakomárikov v kategórii „*nulliparous*“ (6 235 ks; 52,58 %). Druhý najvyšší výskyt v rámci odchytených pakomárikov bol zaznamenaný v kategórii „*parous*“ s celkovým počtom 3 428 ks (28,91 %). Samičiek s označením „*gravid*“ bolo 10,36 % (1 228ks). Najmenej bolo odchytených samičiek pakomárikov v kategórii „*bloodfed*“, kde bolo odchytených celkovo 966 ks pakomárikov (8,15%).

Pri klinickom sledovaní oviec sme nepozorovali klinické symptómy charakteristické pre zhubnú katarálnu horúčku. Z iných chorôb sme u oviec diagnostikovali chronické endo a ektoparazitózy, nákazlivú krívačku, mušec, mastitídy a nedostatky vo výžive. V rámci vybraných biochemických parametrov sme zistili pokles TG, kreatinínu, Zn a nárast TL, Clg, U. Pri sérologickom vyšetrení krvného séra oviec na protilátky proti vírusu BT sme nezistili pozitívne prípady. Na základe negatívnych sérologických výsledkov sme nepokračovali vo virologickom vyšetovaní.

### Diskusia

Pri entomologických štúdiách bola potvrdená prítomnosť zástupcov pakomárikov rodu *Culicoides* z komplexov *C. Obsoletus*, *C. Pulicaris* a *C. Nubeculosus*, ktoré sú považované za vektorov zhubnej katarálnej horúčky (Goffredo, M., Meiswinkel, R., 2004) s dominanciou komplexu *C. Obsoletus* (83,58%). Dôležitou súčasťou entomologického prieskumu je diagnostika vekovej štruktúry vektora a schopnosť prenosu vírusu BT. Z hľadiska najvyššieho počtu odchytených pakomárikov na sledovanej farme bola najrizikovejšie obdobie prelomu mája a júna, júl a august, čomu zodpovedali aj priaznivé klimatické podmienky.

Klinické vyšetrenie, biochemické a sérologické analýzy vnímavých zvierat sa odporúča vykonávať v období maximálnej aktivity vektora, t.j. na jar a v lete. Ak obdobie maximálnej aktivity nie je známe, zvieratá sa testujú v mesačných intervaloch v priebehu celého roka (Bíreš a i., 2009). Zvláštnu pozornosť pri monitoringu BT je potrebné venovať rizikovým skupinám, t.j. nakúpeným alebo novo zaradeným zvieratám do chovu, hlavne z infikovaných oblastí a zvieratám na pastve. Klinický monitoring je založený na stálej kontrole zdravotného stavu vnímavých druhov zvierat a na klinickom vyšetrení podozrivých zvierat. Pri sérologickom vyšetrení nebola u oviec diagnostikovaná počas sledovania prítomnosť protilátok voči žiadnemu sérotypu vírusu BT. Virologické vyšetrenia zvierat a vektora je potrebné robiť len v prípade podozrenia na nákazu.

### Záver

Pri sledovaní sa potvrdila prítomnosť potencionalneho vektora choroby modrého jazyka z komplexu *C. Obsoletus* s maximálnou aktivitou v mesiacoch máj a jún. U oviec nebola diagnostikovaná prítomnosť protilátok proti katarálnej horúčke. Vzhľadom na výskyt vektorov vírusu BT na farme sa potvrdila potreba klinického a laboratórneho sledovania prežúvavcov v chovateľských podmienkach ako neodmysliteľná 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).

### Pod'akovanie

Práca bola realizovaná v rámci projektov AV4/2041/08 a VEGA 1/0940/11

### Literatúra

BARTSCH S., BAUER B., WIEMANN A., CLAUSEN P. H., STEUBER S. Feeding patterns of biting midges of the *Culicoides obsoletus* and *Culicoides pulicaris* groups on selected farms in Brandenburg, Germany. *Parasitology Research*, 2009, 105, s. 373-380.

BRAVERMAN Y., MUMCUOGLU K. Newly emerged nulliparous *Culicoides imicola* Kieffer (Diptera: Ceratopogonidae) with pigmented abdomen, *Veterinary Parasitology*, 2009, 160, s. 356-358.

BÍREŠ J., LACKOVÁ Z., KOČIŠOVÁ A., MANDELÍK R., MOJŽIŠ M. Surveillance of febrile catarrhalis ovium on sheep farm. 10th Jubilee Middle European Buiatrics Congress Košice. *Folia Veterinaria*, Supplementum II. 3-6 June 2009, s. 221-225.

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), Chapter 2.1.9., Fifth Edition, 2004, 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 spoločenských L327, 22. 12. 2000, s. 74-83).

**Kontaktná adresa:** Zuzana Lacková, MVDr., Klinika prežúvavcov, UVLF Košice, Komenského 73, 041 81, lackova\_z@azet.sk

## Vývoj účinného protokolu vitrifikace oocytů skotu

### A development of the effective bovine oocytes vitrification technique protocol

Lálová Helena

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*The aim of this study is to develop a successful method of bovine oocyte cryopreservation. Unlike cryopreservation of embryos, there are still no reliable protocols determined for this method. Methods of cryopreservation can be divided into two main groups; slow freezing and vitrification.*

*Vitrification technique was chosen by our group as a modern method for being less time demanding, simple and equal or even better results can be achieved, when compared with slow freezing. So far not enough data is at our disposal to evaluate and publish our results.*

*Currently we are testing different compositions (ethylene glycole, glycerol, dimethyl sulfoxide) and temperatures (RT, 38°C) of thawing and vitrification solutions. The research is focused on spindle, a key organelle within oocytes. Overall condition of oocytes after thawing is assessed by fertilization and consequent cultivation.*

**Keywords:** *bovine oocyte; vitrification; spindle*

#### Úvod

Kryokonzervace embryí je již v podstatě rutinní technikou. Kryokonzervace oocytů oproti tomu po několik desítek let nedosahovala žádaných výsledků. Oocyt se totiž liší od embrya poměrem velikosti povrchu ku objemu, skladbou membrán a některými organelami. V neposlední řadě obsahuje veliký aparát dělicího vřetenka, které je velmi náchylné k chladovému i mrazovému poškození. Oocyt má ve srovnání s embryem větší objem, menší poměr velikosti povrchu ku objemu, liší se také skladbou a vlastnostmi buněčné membrány a obsahuje některé specifické organely, z nichž nejproblematictější z hlediska kryokonzervace jsou kortikální granula. Proto není možné úspěšně použít protokoly pro mražení embryí a musí být vyvíjeny nové (Chen et al., 2003).

Existují dvě základní metody kryokonzervace - pomalé mražení („slow freezing“) a vitrifikace. Obě mají za cíl především zabránit tvorbě velkých ledových krystalů. Za tím účelem se do mraženého materiálu přidávají speciální látky – kryoprotektiva. Tyto látky jsou pro buňky toxické, a proto jim musí být vystaveny co nejkratší dobu. Pomalé mražení je konvenční metodou. Využívá malých koncentrací kryoprotektiv a pomalého snižování teploty v několika krocích, s fází tzv. „seedingu“ - řízené tvorby malých ledových krystalků vně buněk. Novější metodou je vitrifikace, při které se žádné ledové krystaly netvoří, voda přímo přechází do amorfni tuhé fáze bez zvětšení objemu. Dosahuje se toho vysokou koncentrací kryoprotektiv a obrovskou rychlostí mražení - vzorek se v podstatě jen vloží do tekutého dusíku (Jain, Paulson, 2006).

V naší laboratoři se snažíme o vývoj optimální metodiky vitrifikace oocytů skotu, která bude šetrná zejména k meiotickému vřetenku, a tak bude zajišťovat nejen vysokou úroveň přežití, ale i zachování oplozenischnosti oocytu a korektní vývoj embrya. Tato

metodika by dále měla splňovat požadavek minimální finální náročnosti, aby byla dostupná pro chovatele skotu (nosič vyrobený z běžné pejety na mražení spermatu atd.).

### **Materiál a metody**

Experiment probíhá na jatečných vaječnicích krav a jalovic. Z folikulů po velikosti 3 – 6 mm jsou aspirací získávány oocyty. Oocyty jsou *in vitro* zrání do stádia MII. Zrání probíhá v modifikovaném médiu TCM 199 (tissue culture medium). Vždy 20 – 50 oocytů je umístěno do 400  $\mu$ l média ve čtyřjamkových miskách (Nunc). Zrání probíhá v inkubátoru (Planer) při 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 90-95% Rv. Část oocytů je vitrifikována, část oplozena a dále kultivována (kontrola úspěšnosti zrání a celkového stavu ooplazmy) a část nabarvena fluorescenčními barvivy (na chromozomy a tubuly vřeténka).

Pro fluorescenci je nutné z oocytů odstranit kumulus (hyaluronidáza, Sigma, a následné vortexování) a zonu pellucidu (pronáza, Sigma). Pak se buňky fixují v paraformaldehydu (3,7 %, Aldrich). Následně se provede permeabilizace buněk Tritonem X-100 (Sigma) a přes noc probíhá inkubace s primární protilátkou (mouse monoclonal antibody against porcine brain alpha-tubulins, Exbio). Druhý den se oocyty inkubují se sekundární protilátkou s navázaným barvivem (Anti-Mouse IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in sheep, Sigma) a fixují na mikroskopická skla v montovacím médiu s DAPI.

Oplození a další kultivace embryí probíhá v inkubátoru (Binder) při 39 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 7% O<sub>2</sub>, 90-95% Rv, sperma zpracováváme metodou swim-up. Aby byly srovnatelné výsledky oplození před a po vitrifikaci, máme k dispozici homogenní sérii inseminačních dávek (sperma bylo před i po zamražení vyšetřeno a vyhodnoceno andrologickou laboratoří našeho oddělení), z odběrů pokusného býka ze stáje univerzity.

Vitrifikaci provádíme v námi připraveném roztoku. U oocytů odstraníme několik vnějších vrstev kumulárních buněk, kvůli lepší manipulaci a pronikání kryokonzervačních látek. Pak se oocyty umístí do ekvilibračního roztoku s 7,5 % ethylenglykolu (Fluka), 7,5 % glycerolu (Sigma) a sérem. Poté jsou přeneseny do vitrifikačního roztoku obsahujícího 15 % ethylenglykolu, 15 % glycerolu a 0,5 M sacharózy (Sigma). Poté jsou v co nejmenší kapce (cca 5  $\mu$ l) přeneseny na nosič a ten ponořen přímo do kapalného dusíku. Ten byl vyroben seřiznutím 0,25 ml pejety na kryokonzervaci sperma. Od chvíle, kdy byly oocyty vloženy do vitrifikačního roztoku po vložení nosiče do dusíku čas nesmí překročit 60 sekund.

Tání po vitrifikaci se provádí v roztocích s klesajícím obsahem sacharózy (1M a 0,5 M) a konstantní koncentrací séra. Jak vitrifikaci tak tání provádíme v roztocích buď o pokojové teplotě nebo o teplotě 38°C (dvě skupiny).

Vitrifikované oocyty jsou skladovány v tekutém dusíku po dobu minimálně jednoho měsíce. Po tání je část fixována a nabarvena (a to v několika různých časech po tání - kontrola stavu vřeténka, případně času jeho opětovného složení) nebo oplozena a dále kultivována (kontrola přežívání).

Výhledově bychom chtěli část oocytů nasnímat na řezech v elektronového mikroskopu, aby bylo možné rámcově ohodnotit celkové změny v ootoplazmě, které se netýkají meiotického vřeténka.

### **Výsledky a závěr**

V tuto chvíli ještě nemáme dostatečné množství dat pro statistické vyhodnocení. Předběžně je možno říci, že lepších výsledků se dosahuje při předeřtí vitrificačních a táčích roztoků na 38°C.

### **Diskuze**

Z důvodů uvedených výše zatím není možné diskutovat konkrétní výsledky. Nicméně dosažené přežívání oocytů je zatím nedostatečné. Ve shodě s publikací Aman, Parks (1994) zjišťujeme, že už pokojová teplota způsobuje rozpad dělicího vřeténka a ne vždy následuje jeho korektní znovusložení.

Poškození vřeténka kryokonzervací by se zdánlivě dalo předejít kryokonzervací oocytů už ve stádiu zárodečného váčku, kdy vřeténko ještě není utvořeno. Kromě obtížného vyhledávání takových oocytů, v různorodé kolekci aspirovaných oocytů s kumuly, ukazuje nejen článek Mandelbauma et al., 2004, že výsledky kryokonzervace oocytů ve stádium MII a zárodečného váčku (GV) se neliší.

Potýkáme se i s problémy při oplozování oocytů po tání. To může být způsobeno částečným odstraňováním kumulárních buněk před vitrifikací. U skotu je totiž funkční kumululus nezbytný pro správný průběh oplození (Tanghe et al., 2002). Může to být ale způsobeno i u kryokonzervace poměrně běžným jevem - někdy nastává tzv. zona hardening. Při něm dochází k poškození proteinů zony pellucidy, která už poté neumožní průnik spermii (Ambrosini, 2006).

V neposlední řadě mají na úspěšnost mražení vliv kromě stádia vývoje oocytu a postupu také použitá kryoprotektiva, jak je velmi přehledně ukázáno ve starší práci Schellandera et al. (1994). Zatím používáme často používanou kombinaci ethylenglykolu a glycerolu jako pronikajících kryoprotektiv a sacharózy jako nepronikajícího kryoprotektiva. Plánujeme výhledově použít i dimethylsulfoxid a propylenglykol (oboje se často používají v lidské asistované reprodukci).

### **Literatura**

- AMAN R. R., PARKS J. E. (1994): Effects of Cooling and Rewarming on the Meiotic Spindle and Chromosomes of In Vitro-Matured Bovine Oocytes. *Biology of Reproduction* 50, 103-110.
- AMBROSINI G., ANDRISANI A., PORCU E., REBELLATO E., REVELLI A., CASERTA D., COSMIA E., MARCI R., MOSCARINI M. (2006): Oocytes cryopreservation: State of art. *Reproductive Toxicology* 22, 250–262.
- CHEN S. U., LIEN Y. R. , CHAO K. H. , HO H. N. , YANG Y. S., LEE T. Y. (2003): Effects of cryopreservation on meiotic spindles of oocytes and its dynamics after thawing: clinical implications in oocyte freezing. *Molecular and Cellular Endocrinology* 202, 101-107.
- JAIN J. K., PAULSON R. J. (2006): Oocyte cryopreservation. *Fertility and Sterility* 86 (4), S1037-S1046.
- MANDELBAUM J., ANASTASIOU O., LÉVY R., GUÉRIN J.F., DE LAROUZIÈRE V., ANTOINE J.M. (2004): Effects of cryopreservation on the meiotic spindle of human oocytes. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 113, S17-S23.
- SHELLANDER K., PELI J., SCHMOLL F., BREM G. (1994): Effects of different cryoprotectants and carbohydrates on freezing of matured and unmaturred bovine oocytes. *Theriogenology* 42, 909-915.
- TANGHE S., VAN SOOM A., NAUWYNCK H., CORYN M., DE KRUIF A. (2002): Minireview: Functions of the cumulus oophorus during oocyte maturation, ovulation, and fertilization. *Molecular Reproduction and Development* 61(3), 414–424.

**Kontaktní adresa:** Helena Lálová, Ing., Oddělení reprodukce Kliniky chorob přežvýkavců a prasat, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, lalovah@vfu.cz



## The prevention of digestive disorders in domestic rabbit with probiotic cultures of *Lactobacillus* and *Enterococcus*

### Prevenca tráviacich porúch králikov pomocou probiotických kultúr *Lactobacillus* a *Enterococcus*

<sup>1</sup>Supuka Peter, <sup>2</sup>Supuková Anna

<sup>1</sup>UVLF Košice, Ústav chovu zvierat, Košice, Slovenská republika

<sup>2</sup>UPJŠ Košice, Lekárska fakulta, Ústav experimentálnej medicíny, Košice, Slovenská republika

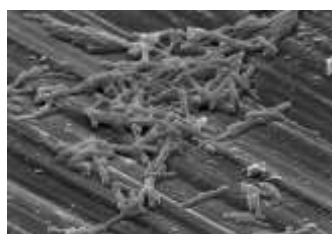
#### Summary

This study is aimed at the effect of probiotic cultures *Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* on rabbit digestive system Supuková et al. (2010), Simonová et al. (2008). The rabbit digestive system is very subtle system that answers rapidly not only to any imbalance in feed ration, breeding system, climatic changes, but also to administration of therapy or transport stress Supuková et al. (2010). Thus it is very important to ensure the most effective protection of digestive system, especially in some critical periods, as weaning Nemcová et al. (1997), Supuková et al. (2010). First two weeks after the weaning, during breeding or tattooing and transportation.

**Keyverbs:** rabbits; probiotic; lactobacillus; enterococcus; therapy

#### Introduction

Members of the classes *Coccidia* and *Clostridia* belong to the most pathogenic agents in rabbits that cause severe clinical problems, often fatal. So far, there has been general opinion among vets and breeders that the therapy using chemical anticoccidics is the most effective to heal coccidiosis and clostridiosis Ebringer et al. (2004).



Picture 1: Clostridium

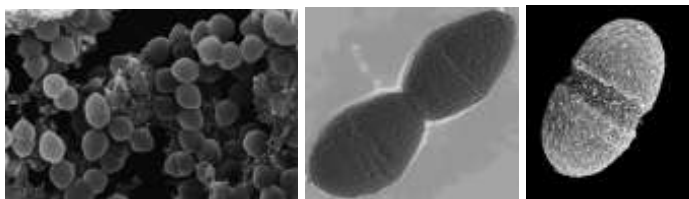
Picture 2: Clinically diseased rabbit

Picture 3: Eimeria

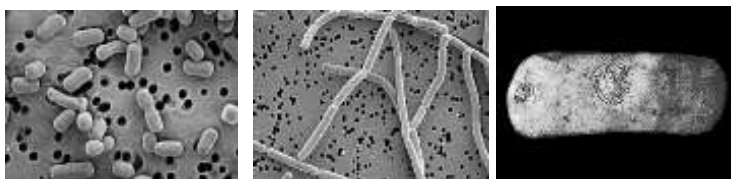
Protected period for slaughter rabbit meat, immune system depression, or degradation of favourable digestive microflora are the main disadvantages of the preparations mentioned above Bomba et al. (2005). Because of the prosperous microflora elimination, digestive disorders appeared after 1-2 weeks after the therapy. The disorders are characterized by tympany, diarrhoea, innapetence, body weight decrease and death. The study and work experience disconfirmed these long used chemical treatment methods. The aim of our study was to observe the effect of probiotic cultures *Lactobacillus* and *Enterococcus* on the digestive system of the domestic rabbit *Oryctolagus cuniculus*.

The probiotic cultures have local and systematic biomedical effect Simonová et al. (2008), Bomba et al. (2005). They are effectively and successfully usable in nutrition,

prevention and therapy of rabbits in small breeds as well as in farm breeding systems Kuchta et al. (2006).



Picture 4,5,6: *Enterococcus faecium*



Picture 7,8,9: *Lactobacillus fermentum*

### Methods

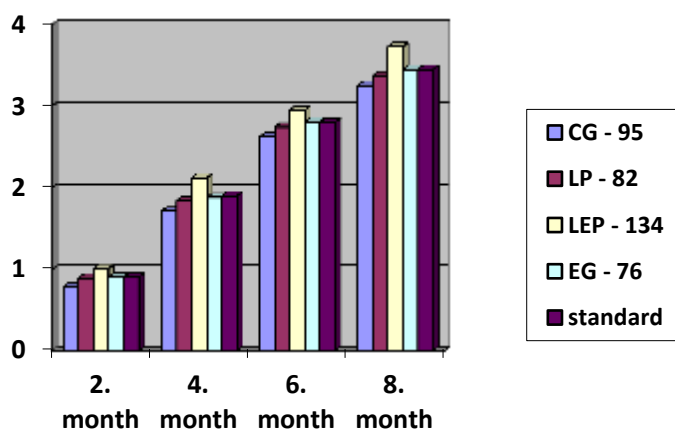
In this study, the combination of *Lactobacillus* and *Enterococcus* with maltodextrin and prebiotic (fructooligosaccharide) was used. The animals were divided into the four groups. The first group 95 animals – control group (CG) was administered only with chemical anticoccidics (sulfonamide base). The second group (LP) 82 rabbits was administered with combination of *Lactobacillus* and maltodextrin and prebiotic (fructooligosaccharide). 134 rabbits were included in the third group (LEP). In the LEP group received with both probiotic cultures (*Lactobacillus* and *Enterococcus*) with maltodextrin and prebiotic (fructooligosaccharide). In fourth group (EG) 76 rabbits was administered only with *Enterococcus*. In each phase of breeding, the body weight, health status and the number of coccidia was determined.

### Results

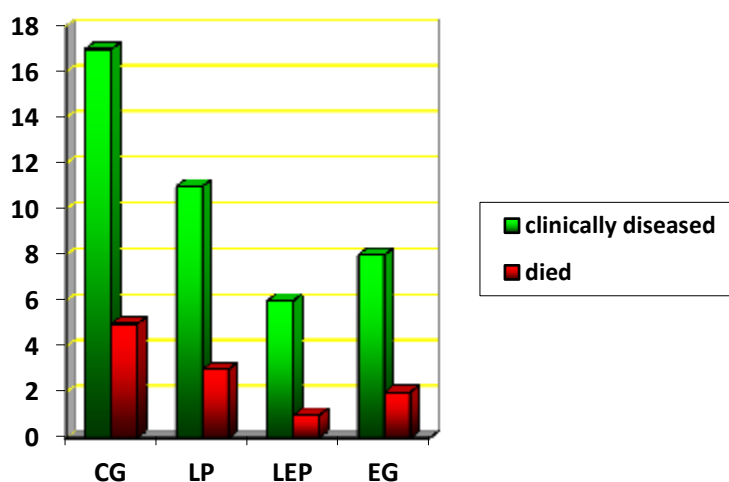
Table 1: Weight gains

<b>Month Groups</b>	<b>1. (0,5 kg)</b>	<b>2. (0,9 kg)</b>	<b>3. (1,4 kg)</b>	<b>4. (1,9 kg)</b>	<b>5. (2,4 kg)</b>	<b>6. (2,8 kg)</b>	<b>7. (3,3 kg)</b>	<b>8. (3,5 kg)</b>
<b>CG n=95</b>	0,39	0,78	1,29	1,71	2,29	2,62	3,19	3,25
<b>LP n=82</b>	0,46	0,89	1,38	1,84	2,35	2,74	3,26	3,37
<b>LEP n=134</b>	0,55	1,01	1,51	2,12	2,53	2,95	3,41	3,73
<b>EG N=76</b>	0,51	0,91	1,46	1,88	2,44	2,81	3,32	3,45

Daily weight gains in a finish in group LEP was 15,4% higher than in the CG group, and 11,7% higher than in the LP. The number of animals with digestive disorders in the group CG, LE, LEP were 17(CG), 11(LE), 6(LEP) and 8(EG).



Graph 1 - Weigh gains in CG, LP and LEP comparing to standard



Graph 2: Clinically diseased rabbits and died in particular groups

### Discussion

During the experiment the most positive results were reported in the LEP group of rabbits that were fed with the both probiotic cultures combined with maltodextrin and prebiotic (fructooligosaccharide). So, the best prevented effect was obsort in the application with LEP.

### Acknowledgements

This work was supported by the Slovak Research and Development agency under the contract No VMSP-P-0024-09.

### References

In authors.

**Contact address:** Peter Supuka, MVDr., Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie Košice, Ústav chovu zvierat, Komenského 73, 04181 Košice, supuka.peter@gmail.com

## Vliv indukované akutní metabolické acidózy na parametry acidobazické rovnováhy v krvi a folikulární tekutině u skotu

### The influence of acute metabolic acidosis on the acid-base balance parameters in blood and follicular fluid in dairy cattle

Indrová Eva, Čech Svatopluk, Pechová Alena, Doležel Radovan,  
Lopatářová Miloslava, Malá Jana

*Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

#### Summary

*The aim of the study was to evaluate changes in composition of follicular fluid during acute metabolic acidosis in dairy heifers. Five dairy heifers were superstimulated by FSH and LH to reach a sufficient number of follicles for repeated collection of follicular fluid. Heifers were treated by sacharose (9g/100 kg intraruminally) to create acute acidosis. Samples of ruminal fluid, peripheral blood and urine were taken for documentation of the development of acute metabolic acidosis. Follicular fluid was aspirated by ultrasound guided transvaginal aspiration at eight hours intervals. Follicular fluid and venous blood were examined for acid-base balance parameters. We observed significant changes in all collected body fluids followed by similar changes in follicular fluid.*

**Key words:** acute metabolic acidosis; follicular fluid; heifers; TVFA

#### Úvod

Folikulární tekutina je předmětem zkoumání již dlouhou dobu. Jednou ze sledovaných oblastí je vliv výživy a metabolismu skotu na složení folikulární tekutiny (Jorritsma et al., 2003; Moallem et al., 1999) a následného vlivu na oocyty a embrya (Leroy et al., 2005; Rizos et al., 2007). Studie o vlivu akutní metabolické acidózy na složení folikulární tekutiny u skotu nebyla dosud nikde prezentována a prací zaměřených na acidobazickou rovnováhu ve folikulární tekutině odebírané in vivo je velmi málo. Několik článků v humánní medicíně se zabývá koncentrací CO<sub>2</sub> a hodnotami pH ve folikulární tekutině (Daya, 1988; Imoedemhe et al., 1993). Koncentraci kyslíku ve folikulární tekutině skotu u preovulačních folikulů je popisuje de Castro et al. (2008). Cílem této práce bylo zjistit vliv akutní metabolické acidózy na změny acidobazické rovnováhy ve folikulární tekutině.

#### Materiál a metodika

Pokus byl prováděn na 5 holštýnských jalovicích. Jalovice byly synchronizovány pomocí cloprostenolu (500 µg i.m. pro toto, Oestrophan<sup>®</sup>, Bioveta a.s., Czech Rep.). Sedm dní po říji byl transvaginální aspirací odsát dominantní folikul. Dva dny poté byla zahájena stimulace růstu folikulů pomocí FSH (450 UI, Pluset<sup>®</sup>, Calier S.A., Spain) v devíti sestupných dávkách (100, 75, 75, 50, 50, 25 and 25 UI) v intervalu 12 hodin. Před zahájením zátěže byly jalovice důkladně klinicky vyšetřeny, byly zakanylovány (*vena jugularis*) pro snadnější opakovaný odběr krve a byly jim odebrány kontrolní vzorky (0 hodin) krve, folikulární a bachorové tekutiny a moči. Po odebrání kontrolních vzorků byl jalovicím perorálně podán nálev sacharózy (9g/kg) v 10 l vlažné vody. Další vzorky byly odebírány 8, 12, 16, 24, 32, 40, 48 a 72 hodin po zátěži. Vzorky krve na vyšetření ABR (pH, pO<sub>2</sub>, pCO<sub>2</sub>, BE, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) byly uloženy do ledové tříštiny a byly stanoveny po odběru všech pěti jalovic cca do jedné hodiny. Ke stanovení ABR

byl použit přístroj Rapidlab® 855 (Bayer, USA). Folikulární tekutina byla odebírána transvaginální tenkojehelnou aspirací nově patentovaným zařízením (Čech) také pro stanovení ABR. Bachorová tekutina se získávala bachorovou sondou a moč katetrizací, tyto tekutiny byly odebírány z důvodů sledování vývoje akutní acidózy v organismu. Po celou dobu pokusu byla jalovicím podávána pouze voda ad libidum. Po skončení pokusu bylo jalovicím podán bachorový nálev s propionáty (Uni-ruminal) a bachorová tekutina od zdravé krávy a umožněn příjem sena ad libidum.

### Výsledky

Výsledky byly vyhodnoceny párovým t-testem. U všech vzorků vyjma pO<sub>2</sub> byla vzhledem ke kontrolním vzorkům výrazná statistická signifikance jak v krvi (tabulka 1), tak ve folikulární tekutině (tabulka 2). Nejvíce patrné rozdíly mezi kontrolními vzorky a ostatními odběry byly nalezeny u pH, HCO<sup>3-</sup> a BE. Byly také zjištěny vysoce signifikantní korelační vztahy mezi parametry acidobazické rovnováhy v krvi a folikulární tekutině. Prokázaly se vysoké korelační koeficienty pro HCO<sup>3-</sup>, BE a pH (korel.koef. 0,927, 0,926 a 0,909), nižší pak byly u pCO<sub>2</sub> (korel.koef. 0,487) a zanedbatelný u pO<sub>2</sub>(-0,03).

Tabulka 1: Výsledky acidobazické rovnováhy v krvi v určitých hodinách po zátěži

	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	HCO <sup>3-</sup>	BE (B)
<b>0h</b>	7,46±0,03	5,67±0,23	4,75±0,43	28,64±2,39	5,24±2,69
<b>8h</b>	7,44±0,02*	6,48±0,56	4,93±0,52	29,88±2,87**	6,68±3,01**
<b>12h</b>	7,33±0,06**	5,91±0,94	4,45±0,4	21,04±1,18**	-3,1±1,42**
<b>16h</b>	7,28±0,04***	5,32±0,61	4,7±0,57	17,5±1,9**	-7,82±2,51**
<b>24h</b>	7,30±0,02**	4,54±0,47**	5,36±0,66	17,08±1,68**	-8,62±2,24**
<b>32h</b>	7,34±0,02**	4,75±0,45*	5,03±0,45	19,02±1,57**	-6,02±2,18**
<b>40h</b>	7,36±0,02**	5,04±0,3*	4,06±0,55	20,44±1,31**	-3,86±1,51**
<b>48h</b>	7,39±0,01**	5,13±0,62**	4,68±0,71	22,74±1,99*	-1,42±2,51*
<b>72h</b>	7,41±0,03*	6,04±0,35	4,48±0,25	26,56±2,44	3,14±2,7

(\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ , \*  $p \leq 0.05$ )

Tabulka 2: Výsledky acidobazické rovnováhy ve folikulární tekutině v určitých hodinách po zátěži

	pH	pCO <sub>2</sub>	pO <sub>2</sub>	HCO <sup>3-</sup>	BE (B)
<b>0h</b>	7,47±0,01	5,55±0,29	14,37±4,4	29,28±1,61	5,34±1,69
<b>12h</b>	7,39±0,03**	5,25±0,58	14,57±2,33	23,36±3,22**	-1,42±3,7**
<b>16h</b>	7,30±0,02**	4,36±0,39*	15,87±4,33	17±0,56***	-9,55±0,81***
<b>24h</b>	7,30±0,03***	4,18±0,4**	16,06±2,42	16,9±1,83***	-9,72±2,55***
<b>32h</b>	7,37±0,01**	4,37±0,25**	14,72±1,33	20,08±0,15**	-5,43±0,15**
<b>40h</b>	7,40±0,01***	4,19±0,44**	14,92±2,14	20,88±1,45**	-4,44±1,89**
<b>48h</b>	7,43±0,02	4,74±0,32	16,31±1,74	24,23±1,57*	-0,4±1,87*

(\*\*\* $p \leq 0.0001$ ; \*\* $p \leq 0.01$ , \*  $p \leq 0.05$ )

## Diskuse

Prokázal se výrazný vliv indukované akutní metabolické acidózy na složení folikulární tekutiny. Vliv akutní metabolické acidózy na biochemické složení folikulární tekutiny dosud nebyl popsán, stejně tak jako vliv na parametry acidobazické rovnováhy. Acidobazická rovnováha ve folikulární tekutině u skotu je zkoumána in vivo jen zřídka (De Castro et al., 2008). Jedním z důvodů může být technická náročnost odběru vzorků, což i v našem pokusu vyústilo v nestejný počet vzorků folikulární tekutiny a krve. Několik výzkumů bylo prováděno v humánní medicíně při odběru oocytů laparoskopickou metodou, kdy byl prokázán negativní vliv sníženého pH ve folikulární tekutině na oocyty (Daya 1988, Imoedemhe a kol., 1993). V našem pokusu byl zaznamenán výrazný pokles pH,  $\text{HCO}_3^-$  a BE v krvi, který se projevil s obdobným průběhem i ve folikulární tekutině. Přes tendenci k normalizaci parametrů během kompenzace metabolické acidózy zůstaly tyto dlouho významně změněné. Tyto změny by pravděpodobně negativně ovlivňovaly vývoj oocytů a následně i reprodukční ukazatele u jedince s metabolickou acidózou. To se však potvrdí až dalšími pokusy.

## Poděkování

Práce byla realizována za podpory projektu MSM č.6215712403.

## Literatura

- DAYA, S. Follicular fluid pH changes following intraperitoneal exposure of Graafian follicles to carbon dioxide: a comparative study with follicles exposed to ultrasound. *Hum. Reprod.* 1988, vol.3, no. 6, pp. 727 – 730.
- DE CASTRO E PAULA, L.A.; ANDRZEJEWSKI J.; JULIAN D.; SPICER L.J.; HANSEN P.J. Oxygen and steroid concentrations in preovulatory follicles of lactating dairy cows exposed to acute heat stress. *Theriogenology* 2008, vol. 69, no. 7, pp.805 – 813.
- IMOEDEMHE, D.A.G.; CHAN, R.C.W.; RAMADAN, I.A.G.; SIGUE, A.B. Changes in follicular fluid gas and pH during carbon dioxide pneumoperitoneum for laparoscopic aspiration and their effect on human oocyte fertilizability. *Fert. Steril.* 1993, vol. 59, no. 1, pp. 177 – 182.
- JORRITSMA, R.; DE GROOT, M.W.; VOS, P.L.A.M.; KRUIP, T.A.M.; WENSING, T.; NOORDHUIZEN J.P.T.M. Acute fasting in heifers as a model for assessing the relationship between plasma and follicular fluid NEFA concentrations. *Theriogenology* 2003, vol. 60, no. 1, pp. 151 – 161.
- LEROY, J.L.M.R.; VANHOLDER, T.; MATEUSEN, B.; CHRISTOPHE, A.; OPSOMER, G.; VAN SOOM, A.; DE KRUIF, A.; GENICOT, G. Non-esterified fatty acids in follicular fluid of dairy cows and their effect on developmental capacity of bovine oocytes in vitro. *Reproduction* 2005, vol. 130, no. 4, pp. 485 - 495
- MOALLEM, U.; FOLMAN, Y.; BOR, A.; ARAV, A.; SKLAN, D. Effect of calcium soaps of fatty acids and administration of somatotropin on milk production, preovulatory follicular development, and plasma and follicular fluid lipid composition in high yielding dairy cows. *J. Dairy. Sci.* 1999, vol. 82, no. 11, pp. 2358 – 2368.
- RIZOS, D.; KENNY, D.A.; GRIFFIN, W.; QUINN, K.M.; DUFFY, P.; MULLIGAN, F.J.; ROCHE, J.F.; BOLAND, M.P.; LONERGAN, P. The effect of feeding propylene glycol to dairy cows during the early postpartum period on follicular dynamics and on metabolic parameters related to fertility. *Theriogenology* 2008, vol. 69, no. 6, pp. 688 – 699

**Kontaktní adresa:** Eva Indrová, MVDr., Klinika chorob přežvýkavců, FVL VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, indrovae@vfu.cz

## Polymorfizmus génu DGAT-1 v chove dojníc a jeho vplyv na vybrané metabolické parametre v krvnom sére po otelení

### DGAT-1 gene polymorphism in the cattle farm and its effect on selected metabolic indices in blood serum after calving

<sup>1</sup>Lešková Lenka, <sup>2,3</sup>Bauer Miroslav, <sup>2</sup>Chrenek Peter, <sup>1</sup>Lacková Zuzana, <sup>1</sup>Kováč Gabriel

<sup>1</sup>Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice, SR, <sup>2</sup>Ústav genetiky a reprodukcie hospodárskych zvierat, CVŽV Nitra, SR, <sup>3</sup>Univerzita Konštantína Filozofa, Nitra, SR

#### Summary

*K232A polymorphism in DGAT-1 gene was identified in the collection of 42 dairy cows. Based on this polymorphism we have detected 38 animals belonging to AA genotype and 4 animals of AK genotype. We have compared average values of selected metabolic indices (glucose, total lipids, triglycerides, NEFA, BHB, total bilirubin) between the group of heterozygotes and group of homozygotes. In both groups of animals (AA and AK genotype) increased level of NEFA and total bilirubin were detected. In the group of animals with AA genotype we have detected also decreased level of triglycerides.*

**Keywords:** dairy cows; DGAT-1; metabolism; polymorphism

#### Úvod

Zviera je chápané ako biologický objekt s jasným genetickým profilom a vyhranenými nárokmi na výživu a prostredie, v ktorom je chované. Z tohto hľadiska je to otázka dynamickej rovnováhy medzi základnými prvkami tvorenými reťazcom organizmus – výživa – prostredie – veterinárna a ošetrovateľská starostlivosť (Novák *et al.*, 2002). V posledných desaťročiach bolo šľachtenie hospodárskych zvierat zamerané najmä na produkčné znaky, na druhej strane selekcia z hľadiska zdravia a dlhovekosti zvierat bola v úzadí. Problémom u dojníc je najmä negatívna energetická bilancia v období po otelení, od ktorej sa pri nesprávnom manažmente odvíja viacero metabolických porúch, ako sú ketóza, pečeňová steatóza a pod. Tieto poruchy sa však neprejavia u všetkých zvierat, preto by bolo potrebné zamerať sa na objasnenie tohto javu. Vo svetle najnovších poznatkov a s dostupnosťou nových molekulárno-biologických technológií dochádza k rozvoju na tomto poli výskumu, čo nám umožňuje lepšie pochopenie súvislostí medzi produkciou, reprodukciou, zdravím zvierat a kvalitou produktov živočíšneho pôvodu. Gén *acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase-1* (DGAT-1) sa javí ako potenciálny kandidátsky gén, kde substitúcia *lyzínu* na *alanín* (K232A) má významný vplyv na zloženie a produkciu mlieka (Kaupe *et al.*, 2004). Tento gén je lokalizovaný na chromozóme BTA14 (Boichard *et al.*, 2003) a ním kódovaný enzým katalyzuje finálny krok v syntéze triglyceridov. Oikonomou *et al.* (2008) popisuje možný vplyv daného génu spolu s receptorom pre rastový hormón (*growth hormone receptor* - GHR) na vybrané cesty energetického metabolizmu a krvné ukazovatele, ako aj reprodukčné parametre u dojníc.

#### Materiál a metódy

Vzorky krvi boli odoberané punkciou *v. jugularis* u 42 dojníc plemena slovenský strakatý dobytok a ich krížencov. V krvnom sére boli stanovované koncentrácie parametrov energetického metabolizmu - glukózy, celkových lipidov (TL), triglyceridov

(TG), neesterifikovaných mastných kyselín (NEFA), betahydroxybutyrátu (BHB) a celkového bilirubínu (TBi).

Dna bola izolovaná z celej krvi konzervovanej EDTA komerčným kitom firmy Qiagen (QIAamp DNA Blood Mini Kit). Polymorfizmus K232A vo vzorkách bol identifikovaný metódou PCR-RFLP method podľa Wintera *et al.* (2002). Primery na amplifikáciu DNA fragmentov (dgat-1 forward 5'- catcctctcctcaagctgttct - 3', dgat-1 reverse 5'- gggcgaagagga agtagtagaga - 3') boli navrhnuté modifikáciou primerov použitých Thallerom *et al.* (2003). Na štiepenie 352 bp PCR produktu bola použitá reštrikčné endonukleáza *CfrI* (sp. Fermentas). Alanínový variant bol štiepený na dva fragmenty s dĺžkou 198 bp a 154 bp. Lyzínový variant zostal neštiepený. Separácia fragmentov bola vykonaná elektroforézou v 2% agarózovom géli, na vizualizáciu bolo použité farbivo GelRed dye (sp. Biotium).

V oboch skupinách (genotypy AA a AK) boli u jednotlivých parametrov vyrátané priemerné hodnoty ( $\bar{x}$ ) a smerodajné odchýlky (sd). Na vyhodnotenie bol použitý Studentov *t-test* s hladinou významnosti  $p < 0,05$ .

### Výsledky a diskusia

V práci boli identifikované genotypy AA (38 zvierat) a AK (4 zvieratá), variant KK sa u vybraného súboru dojníc nevyskytoval. Podobné výsledky zaznamenali aj Gautier *et al.* (2007) u normandského plemena a plemena montbeliarde, kedy taktiež neboli detekované jedince genotypu KK. U holsteinov udávajú rovnomernejšiu distribúciu alel, kde podiel AK (heterozygotov) bol 43% a podiel jedincov KK genotypu bol 10%.

Koncentrácie vybraných biochemických parametrov sú spolu s referenčným rozpätím uvedené v tabuľke 1. Podľa Studentovho *t-testu* neboli odchýlky medzi skupinami štatisticky významné, na rozdiel od zistení Oikonomou *et al.* (2008), ktorý popisuje vplyv daného polymorfizmu na sérovú hladinu glukózy po otelení.

Tabuľka 1: Priemerná sérová koncentrácia vybraných parametrov podľa polymorfizmu v lokuse K232A)

<i>index</i>		<b>Glu</b>	<b>TL</b>	<b>TG</b>	<b>NEFA</b>	<b>BHB</b>	<b>Bi</b>
<i>ref.limit</i>		2,5-4,2	1,5-5,2	0,17-0,51	0,10-0,35	do 1,0	do 5,13
		<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>mmol/l</i>	<i>μmol/l</i>
<b>AA</b>	<b>x</b>	4,09	3,42	0,16	0,42	0,62	8,8
	<b>sd</b>	0,758	1,631	0,116	0,292	0,269	5,441
<b>AK</b>	<b>x</b>	3,79	2,92	0,17	0,44	0,60	10,1
	<b>sd</b>	0,210	1,004	0,184	0,132	0,297	2,764

AA – homozygoti, AK - heterozygoti,  $\bar{x}$  – priemer, sd – smerodajná odchýlka

### Záver

Pri rovnakej úrovni výživy, zoohygienických podmienok a porovnateľnej dojivosti sa u niektorých zvierat metabolické poruchy vyskytnú, u iných nie. Preto je na mieste položiť si otázku, čo tieto rozdiely u jednotlivcov spôsobuje. Jednou z možných odpovedí je pátranie v genotype zvierat, čo je možné pomocou molekulárno-biologických metód v spojení s klasickými metódami, ako sú poznatky z fyziológie, biochémie a pod.



**PodĎakovanie**

Práca bola realizovaná v rámci projektu VEGA 1/0614/09 a článok bol napísaný v rámci realizácie projektov "LAGEZ č. 26220120051" a „MARKERY č. 26220220033“ podporenými Európskym fondom regionálneho rozvoja, Operačný program Výskum a vývoj.

**Literatúra**

BOICHARD, D.; GROHS, C.; BOURGEOIS, F.; CERQUEIRA, F.; FAUGERAS, R.; NEAU, A.; RUPP, R.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M. Y.; LEVEZIEL, H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genet Sel Evol.* 2003; 35, s. 77–101.

GAUTIER, M.; CAPITAN, A.; FRITZ, S.; EGGEN, A.; BOICHARD, D.; DRUET, T. Characterization of the DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *J Dairy Sci.* 2007, 90, s. 2980–2988.

KAUPE, B.; WINTER, A.; FRIES, R.; ERHARDT, G. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J Dairy Res.* 2004, 71(2), s. 182-187.

NOVÁK, P.; KUBÍČEK, K.; ODEHNAL, J.; BEŇOVÁ, K.; ZABLOUDIL, F. Tvorba prostredí chovu a řešení problémů vlivu chovu zvířat na životní prostředí v České republice. Zborník referátov z odborného seminára s medzinárodnou účasťou, VÚŽV Nitra, 2002, s. 45 – 59.

OIKONOMOU, G.; ANGELOPOULOU, K.; ARSENOS, G.; ZYGOYIANNIS, D.; BANOS, G. The effects of polymorphisms in the DGAT1, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. The Authors Journal compilation, International Society for Animal Genetics, *Anim Genet.* 2008, 40, s. 10–17.

THALLER, G.; KRAMER, W.; WINTER, A.; KAUPE, B.; ERHARDT, G.; FRIES, R. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J Anim Sci.* 2003, 81, s. 1911-1918.

WINTER, A.; KRAMER, W.; WERNER, F. A.; KOLLERS, S.; KATA, S.; DURSTEWICZ, G.; BUITKAMP, J.; WOMACK, J. E.; THALLER, G.; FRIES, R. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (*DGAT1*) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 2002, 99, s. 9300–9305.

**Kontaktná adresa:** Lenka Lešková, MVDr., Klinika prežúvavcov, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Komenského 73, 041 81, Košice, Slovenská republika, lennina03@azet.sk