

VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE

Ústav hygieny a technologie mléka

Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

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

Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

XVIII. KONFERENCE MLADÝCH
VĚDECKÝCH PRACOVNÍKŮ
S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VFU Brno, 25. 5. 2016



Brno 2016

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

ISBN 978-80-7305-772-5

Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.

OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Detekce <i>Yersinia enterocolitica</i> v ovoci a zelenině zakoupené v tržní síti v České republice	
Verbíková V., Morávková M.	7
Využití typizačních metod ke stanovení vlastností bakterií <i>Listeria monocytogenes</i> izolovaných z humánních a potravinových zdrojů	
Tomáščíková Z., Karpíšková R.	10
Porovnání kvality DNA u technologicky opracované svaloviny tuňáka žlutoploutvého	
Pospíšilová E., Piskatá Z.	13
Jednoduchá metoda stanovení D a z hodnoty u mikroorganismů	
Brychta T., Vorlová L., Karpíšková R., Steinhauserová, I.	16
Sushi Consumers' Preferences Myth in the Czech Republic	
Đorđević Đ., Buchtová H., Abdullah F.A.A., Picková J.	19
Effect of High-Oxygen Atmosphere on the Lipid Oxidation and Antioxidants Activity in Organic Chicken Meat	
Abdullah F.A.A., Buchtová H., Đorđević Đ.	22
Possibilities for Determination of Fattiness of Wild Boar Meat	
Tesařová S., Ježek F., Bořilová G., Steinhauserová I.	25
The Most Frequent Findings in the Inspection of the Game, and the Reasons for the Confiscation of Carcasses in Hunting season 2014/2015 in Hunting Area Hradiště, Czech Republic	
Steinbauer V., Steinhauserová I., Bořilová G.	28
Stanovení tetracyklinových antibiotik v medu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie	
Dluhošová S., Borkovcová I., Kaniová L., Vorlová L.	31
Quality Evaluation of Blossom Honeys Obtained from the Market of the Czech Republic	
Zábrodská B., Dluhošová S., Borkovcová I., Vorlová L.	34
Selected Nutritional Aspects of Processed Vegetable Products	
Tauferová A., Tremlová B.	37

SEKCE 2: VÝŽIVA, DIETETIKA HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A HYGIENA VEGETÁBILIÍ

Produkce zelené hmoty tří odrůd lupiny bílé	
Sedláková K., Straková E., Suchý P., Kroupa L.	43
Zařazení lupiny bílé do diet pro rostoucí zakrslé králíky	
Šimek V., Zapletal D., Suchý P., Kroupa L., Straková E.	46
Quality of Muscle of Selected Cattle Breeds for Meat	
Vopálenský J., Suchý P., Straková E.	49

Addition of Sea Buckthorn Pellets in Diets for Laying Hens and Their Influence on Amount of Fatty Acids in Egg Yolk Krejcarová J., Straková E., Suchý P.	52
SEKCE 3: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE	
Luptouši rodu <i>Myrsidea</i> (Phthiraptera: Amblycera) na ptácích neotropické oblasti Kolenčík S., Sychra O., Literák I.	57
Prevalence of Bacteria Resistant to Fluoroquinolone in Ravens from the Czech Republic and Slovakia Svoboda O., Papoušek I., Literák I.	60
SEKCE 4: VETERINÁRNÍ BIOCHEMIE, CHEMIE A BIOFYZIKA	
Metodika stanovení glutathionu pomocí izotachoforézy Nečasová A., Pechová A., Holasová M., Vyskočilová V.	65
The Evaluation of Concentration of Trace Elements (Cu, Zn, Mn, Se) in Alpaca's Hair Holasová M., Pechová A., Nečasová A.	68
SEKCE 5: VEŘEJNÉ VETERINÁŘSTVÍ A OCHRANA ZVÍŘAT	
Preference, podmínky a zkušenosti majitelů adoptovaných psů Vitulová S., Voslářová E., Večerek V.	73
Vliv povinného čipování na dohledatelnost psů přijatých do útulku k jejich původním majitelům Žák J., Voslářová E., Večerek V., Bedáňová I.	76
Vliv ročního období na mortalitu dojnic přepravovaných na jatky Šimová V., Večerek V., Voslářová E., Bedáňová I.	79
Rozdíly v úhynech krůt při přepravě na jatky během roku Machovcová Z., Voslářová E., Bedáňová I., Malena M., Večerek V.	82
Hodnocení úrovně welfare volně žijících druhů zvířat pomocí neinvazivních metod Malíková M., Voslářová E., Večerek V.	85
The Effect of T-2 toxin on Haematological Parameters in Rainbow Trout (<i>Oncorhynchus mykiss</i>) Vakula J.	88
SEKCE 6: VETERINÁRNÍ TOXIKOLOGIE A TOXIKOLOGIE POTRAVIN	
Vliv kombinace tramadolu hydrochloridu a naproxenu sodného na raná vývojová stádia ryb Sehonová P., Plhalová L., Blahová J., Beránková P., Doubková V., Svobodová Z.	93
Vliv tonalidu na vybrané ukazatele sledované u pstruha duhového a dáňka pruhovaného Enevová V., Blahová J., Plhalová L., Doubková V., Maršálek P., Franc A., Fiorino E., Faggio C., Svobodová Z.	96

Vliv fluorochinolonu enrofloxacinu na parametry oxidativního stresu u dánia pruhovaného (<i>Danio rerio</i>)	
Charvátová N., Želinská G., Dobšíková R., Plhalová L., Blahová J., Svobodová Z.	99
The Effect of the Therapeutic Bath on the Immune System of Fish	
Doubková V., Chmelová L., Svobodová Z.	102
 SEKCE 7: CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT A ZVÍŘAT ZOOLOGICKÝCH ZAHRAD	
Posouzení biochemických a hematologických parametrů u netopýrů v průběhu roku	
Linhart P., Bandouchová H., Brichta J., Kaňová M., Piaček V., Abdelsalam E.E.E., Kováčová V., Pikula J.	107
Zavedenie real-time RT-PCR pre diagnostiku pôvodcu vírusovej hemoragickej septikémie u lososovitých rýb a jej porovnanie s metódami používanými v Českej republike	
Pojezdal Ľ., Navrátil S., Veselý T.	110
<i>Toxoplasma gondii</i>, <i>Neospora caninum</i> a <i>Encephalitozoon cuniculi</i> u zvierat ze zoo a cirkusů v Itálii	
Marková J., Macháčová T., Bártová E., Sedlák K.	113
<i>Neospora</i> spp. a <i>Toxoplasma gondii</i> u koňovitých v západní Africe	
Kobédová K., Bártová E., Sedlák K., Budíková M., Atuman Y.J., Kamani J.	116
New Neotropical Host and Distribution Records on Chewing Lice of the Genus <i>Ricinus</i> (Phthiraptera: Ricinidae)	
Valan M., Sychra O., Literák I.	119
Chewing Lice of Genus <i>Phlopterooides</i> in New Guinea – Australasian Region as the Centre of Area of the Genus	
Najer T., Gustafsson R.D., Sychra O.	122
Prevalence of <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in Three Tick Species in the South Moravia, Czech republic	
Rybářová M.	125

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Detekce *Yersinia enterocolitica* v ovoci a zelenině zakoupené v tržní síti v České republice

Detection of *Yersinia enterocolitica* in Fruit and Vegetable Purchased at Supermarkets in the Czech Republic

^{1,2}Verbíková Veronika, ¹Morávková Monika

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

²Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

Summary

The aim of this study was detection of *Yersinia enterocolitica* in fruits and vegetable purchased in the supermarkets in the Czech Republic during a period of one year 2014. A total of 312 samples including cut green leaves ($n=94$), frozen vegetable ($n=57$), untreated vegetable ($n=54$), fresh and frozen fruit ($n=72$) and sprouts ($n=35$) were analyzed. The samples were examined using cultivation methods according to ČSN EN ISO 10273 and by real-time PCR targeting *ompF* (specific for genus *Yersinia*) and *ail* gene (*Y. enterocolitica* specific factor of virulence). *Yersinia* spp. and *Y. enterocolitica* were isolated from 52 (16.7%) and 31 (9.9%) samples, respectively. Isolates which were confirmed as *Y. enterocolitica* were subjected to further characterization (biotyping, serotyping and detection of *ail* gene). Biotyping revealed only biotype 1A in all of isolates. Serotyping test determined that four isolates belong to serotype O:08 and one to serotype O:05. Only one isolate contained *ail* gene (0.3%). Simultaneously, samples of fruits and vegetable were analyzed using molecular method. Real-time PCR results confirmed *Yersinia* spp. and pathogenic *Y. enterocolitica* (carrying *ail* gene) in 37 (12.0%) and 21 (6.8%) samples. Although the main source of pathogenic *Y. enterocolitica* is considered pork and its products, the results of the study show that unprocessed or minimally processed fruits and vegetables can be another source of pathogenic *Y. enterocolitica* and pose a health risk to consumers.

Keywords: vegetable; fruit; *Yersinia enterocolitica*; zoonosis

Úvod

Rod *Yersinia* patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a v současné době je známo 19 druhů, které zahrnují jak patogenní, tak nepatogenní druhy (Euzéby, 2016). Mezi nejvýznamnější patogenní druhy patří *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pestis* a *Yersinia pseudotuberculosis* (Guern et al., 2016). Patogenní druhy *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* způsobují onemocnění zvané yersinióza, která se u starších lidí, lidí s oslabenou imunitou a dětí projevuje jako gastroenteritida či akutní enterokolitida (Laukkanen–Ninios et al., 2012). V roce 2013 byla yersinióza třetí nejčastěji hlášenou zoonózu v Evropské unii (EFSA, 2015). Hlavním rezervoárem patogenních yersinií jsou prasata a zdrojem infekce konzumace nedostatečně tepelně opracovaného vepřového masa a orgánů (Bottone, 1999), ale jsou známy i případy onemocnění lidí z pitné vody, mléčných výrobků, mořských plodů a čerstvé zeleniny (Lee, 2004). Infekční dávka je poměrně vysoká, uvádí se kolem 10^7 až 10^9 bakterií a nástup příznaků onemocnění je 24 – 48 hodin od požití kontaminované potravin (Drummond et al., 2012).

Bakterie rodu *Yersinia* jsou kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní, většinou urea-pozitivní a mají schopnost se množit i při nízkých teplotách 0 – 4 °C (Fredriksson-Ahomaa, 2007). Druh *Y. enterocolitica* je rozdělen do šesti biotypů 1A, 1B a 2-5 a několika desítek sérotypů (Bottone, 2005; Fredriksson-Ahomaa, 2007). Onemocnění u lidí je většinou spojeno se sérotypy O:3/4, O:5,27/2, O:9/2, O:8/1b (Bottone, 1999) a biotypy 1B a 2-5. Biotyp 1A je ve většině případů uváděn jako nepatogenní (Bottone, 1997). Naopak biotyp 1B je opovažován za nejvíce patogenní (Laukkanen–Ninios et al., 2012).

Materiál a metodika

Vyšetřeno bylo 240 vzorků krájené a mražené zeleniny, nezpracované zeleniny a klíčků a 72 vzorků drobného ovoce zakoupeného v tržní síti České republiky. Vzorky byly zpracovány dle normy ČSN EN ISO 10273. Vzorky byly pomnoženy v tekuté pomnožovací půdě s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB; HiMedia) po dobu 5 dnů při 25°C a v pomnožovacím mediu s irgasanem, tikarcilinem a chlorečnanem draselným (ITC; HiMedia) po dobu 2 dnů při 25°C. Následně byly vzorky vyočkovány na půdu s cefsoludinem, irgasanem a novobicinem (CIN, HiMedia) s alkalizací a bez alkalizace a na Salmonella-Shigela agar s desoxycholátem sodným a chloridem vápenatým (SSDC, HiMedia) a inkubovány při teplotě 30 °C po dobu 24 – 48 hodin. Pět charakteristických kolonií z každé plotny bylo testováno biochemickými testy. Izoláty s pozitivním průkazem ureázy, negativním oxidázovým a pozitivním katalázovým testem (suspektní *Yersinia* spp.), byly potvrzeny pomocí ENTEROtest 24 N (Erba Lachema) a hmotnostní spektrometrie MALDI-ToF. U izolátů byla provedena zkouška na fermentaci rhamnosy (Rh) jako pomocný test k odlišení *Y. enterocolitica* a *Y. kristensenii* (Rh-) od *Y. frederiksenii* a *Y. intermedia* (Rh+). Izoláty *Y. enterocolitica* byly následně podrobeny biotypizací dle biotypizačního schématu (Wauters et al., 1987) a sérotypizací pomocí komerčních antisér (O:3 O:5, O:8, O:9, O:25; SIFIN). Izoláty byly zároveň vyšetřeny pomocí real-time PCR (qPCR) na přítomnost genu *ail*, který souvisí s patogenitou daného kmene. Vzorky ovoce a zeleniny byly též vyšetřeny pomocí molekulárních metod. Po izolaci DNA (Power soil DNA isolation kit – MoBio) byly vzorky sledovány na přítomnost patogenních (*ail* gen) a nepatogenních (*ompF* gen) kmenů *Y. enterocolitica* metodou qPCR.

Výsledky

Zástupci *Yersinia* spp. byly izolovány z 52 (16,7 %) vzorků ovoce a zeleniny. Z toho 31 izolátů bylo zařazeno do druhu *Y. enterocolitica* (9,9 %). Biotypizací byl u všech izolátů prokázán biotyp 1A. Izoláty byly sérotypizovány a byla zjištěna přítomnost *Y. enterocolitica* sérotypu O:08 ve čtyřech vzorcích a *Y. enterocolitica* sérotyp O:05 v jenom vzorku. Přítomnost *ail* genu související s patogenitou *Y. enterocolitica* byla pomocí qPCR prokázána pouze u jednoho izolátu (0,3 %). Molekulární analýza potvrdila přítomnost *Yersinia* spp. u 37 vzorků (12 %) ovoce a zeleniny, z toho patogenní *Y. enterocolitica* byla detekována v 21 vzorcích (6,8 %). Koncentrace *Yersinia* spp. a patogenní *Y. enterocolitica* zjištěná pomocí qPCR analýzy se pohybovala v rozmezí 10^0 až 10^5 CFU/g.

Diskuze

Za hlavní cestu přenosu patogenních *Y. enterocolitica* jsou považovány kontaminované potraviny, ze kterých je izolace patogenních kmenů velmi obtížná. Je to způsobeno především nízkou senzitivitou kultivačních metod (Laukkanen–Ninios et al., 2012). Proto se jako spolehlivější jeví metoda real-time PCR, která je rychlá a má vysokou specifitu a selektivitu (Fábrega a Vila, 2012). Tato skutečnost se potvrdila i v této studii, kdy pomocí kultivační metody byla zjištěna přítomnost patogenních *Y. enterocolitica* v jednom vzorku (0,3 %) a metodou qPCR v 21 vzorcích (6,8 %). Všechny kmeny, které byly zachyceny, byly biotypu 1A. Tento biotyp je uváděn ve většině případů jako nepatogenní (Fábrega a Vila, 2012). Nicméně jsou známy i případy, kdy byly izoláty tohoto biotypu označeny za původce onemocnění člověka (Laukkanen–Ninios et al., 2012).

Závěr

I když za hlavní zdroj patogenních *Y. enterocolitica* je považováno vepřové maso a orgány, výsledky studie ukazují, že nezpracované nebo minimálně zpracované ovoce a zelenina může být dalším zdrojem patogenních *Y. enterocolitica* a představovat zdravotní riziko pro

spotřebitele. Důležité je tedy dodržování správné hygienické praxe při manipulaci s těmito produkty před konzumací, zejména důkladné omytí, případně tepelné opracování.

Poděkování

Práce byla finančně podporována z projektů QJ1210114 a LO1218.

Literatura

AUTHORITY, E. F. S., et al. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*, 2015, 13.1.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clinical microbiology reviews*, 1997, 10.2: 257-276.

BOTTONE, E.J. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes and infection*, 1999, 1.4: 323-333.

BOTTONE, E.J.; BERCOVIER, H.; MOLLARET, H.H. Genus XLI. 2005.

ČSN EN ISO 10273 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu suspektních patogenních *Yersinia enterocolitica*. 2004, 33 p, Praha.

DRUMMOND, N., et al. *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. *Foodborne pathogens and disease*, 2012, 9.3: 179-189.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Dostupné z <http://www.bacterio.net/yersinia.html/>, 2014 zobrazeno 15. 4. 2016

FÀBREGA, A.; VILA, J. *Yersinia enterocolitica*: pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 2012, 30.1: 24-32.

FREDRIKSSON-AHOMAA, M. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: *Foodborne diseases*. Humana Press, 2007. p. 79-113.

LAUKKANEN-NINIOS, R.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M. Epidemiology, virulence genes, and reservoirs of enteropathogenic *Yersinia* species. *Foodborne and waterborne bacterial pathogens: epidemiology, evolution and molecular biology*. Caister Academic Press, Norfolk, 2012, 269-287.

LE GUERN, A.S., et al. *Yersiniosis* in France: overview and potential sources of infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 2016, 46: 1-7.

LEE, Tex-Soo, et al. Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of *Yersinia enterocolitica* and related species from ready-to-eat vegetables available in Korea. *Journal of Food Protection*®, 2004, 67.6: 1123-1127.

WAUTERS, G.; KANDOLO, K.; JANSSENS, M. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 1987, 9: 14-21

Kontaktní adresa: Veronika Verbíková, Mgr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, H14013@vfu.cz, verbikova@vri.cz.

Využití typizačních metod ke stanovení vlastností bakterií *Listeria monocytogenes* izolovaných z humánních a potravinových zdrojů

Use of Typing Methods for Determining the Properties of *Listeria monocytogenes* Isolated from Human and Food Sources

^{1,2}Tomáščíková Zuzana,^{1,2}Karpíšková Renáta

¹Oddělení bakteriologie, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

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

Summary

Listeria monocytogenes is the causative agent of human listeriosis transferred mainly via contaminated food and causes the illness with low incidence but high fatality rate. Various types of methods for epidemiological investigation of listeriosis were used to assess the distribution of pathogenic clones in human population and food chain. In this study, 86 isolates from humans and 105 isolates from food of animal and plant origin were investigated by several typing methods (serotyping, clonogrouping and macrorestriction analysis) and were tested for antimicrobial susceptibility to seven antimicrobial agents used for treatment of listeriosis. Serotyping divided isolates into five serotypes. Most frequent serotype for both human and food isolates was 1/2a. Clonogrouping enabled distribution of isolates into eight clonal complexes. Macrorestriction analysis revealed 73 pulsotypes. All isolates were susceptible to all tested antimicrobial agents.

Keywords: antimicrobial resistance; epidemiology; serotyping; PFGE; clonogrouping

Úvod

Listeria monocytogenes je původce humánní listeriózy, která se vyznačuje nízkou incidencí, avšak vysokou smrtností postižených osob (až 30 %). Vehikulem infekce jsou nejčastěji potraviny. Listeriízy jsou typické dlouhou inkubační dobou a objevují se často jako sporadické případy onemocnění (Vázquez – Boland, 2001), z tohoto důvodu vyžadují epidemiologická šetření komplexní přístup s využitím moderních typizačních metod. Pomocí těchto přístupů lze sledovat distribuci jednotlivých klonů v humánní populaci i v potravinovém řetězci. Cílem studie bylo s využitím typizačních metod (sérotypizace, klonální typizace, makrorestrikční analýzy, rezistence k antimikrobiálním látkám) charakterizovat a porovnat izoláty *L. monocytogenes* humánního a potravinového původu.

Materiál a metody

V rámci studie bylo na Oddělení bakteriologie Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně analyzováno 191 izolátů *L. monocytogenes* humánního a potravinového původu získaných v období 2013 – 2015. Izoláty byly typizovány metodou sklíčkové aglutinace s využitím komerčních antisér (Denka Seiken, Japonsko) v kombinaci s multiplex PCR (Doumith a kol., 2004). Byla provedena makrorestrikční analýza následovaná pulzní gelovou elektroforézou (PFGE) v souladu s Pulse-Net-Europe protokolem (2002) s využitím restrikčního enzymu AscI (New EnglandBioLabs, USA). Výsledky byly analyzovány programem Bionumerics 5.1 (AppliedMaths, Belgie) a posouzeny dle Tenover a kol. (1995). U izolátů sérotypu 1/2a a 4b byla provedena klonální typizace (Chenal – Francisque a kol., 2015). Dále byla testována citlivost izolátů vůči sedmi antimikrobiálním látkám: penicilin (1U), erytromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), meropenem (10 µg), tetracyklin (30 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (25 µg), ampicilin (2 µg) diskovou difuzní metodou na Müller – Hinton agaru (Oxoid, Anglie) s využitím antibiotických disků (Oxoid, Anglie). Reakce byla hodnocena podle standardů EUCAST 2016 a podle Vela a kol. (2001).

Výsledky

Bylo analyzováno 86 izolátů *L. monocytogenes* humánního původu a 105 potravinových izolátů živočišného (n = 90) a rostlinného původu (n =15). Výsledky použitých typizačních metod jsou uvedeny v Tab. 1 a 2. Test citlivosti k antimikrobiálním látkám byl proveden u všech izolátů, všechny byly citlivé.

Tabulka 1: Zastoupení séro skupin (sérotypů) u izolátů *L. monocytogenes*.

Séroskopina (sérotyp)	Humánní izoláty (počet)	Procentuální podíl z humánních izolátů	Potravinové izoláty (počet)	Procentuální podíl z potravinových izolátů
IIa (1/2 a)	45	52,3	59	56,2
IIb (1/2 b)	14	16,3	21	20
IIc (1/2c)	0	0	8	7,62
IVb (4b)	27	31,4	16	15,2
IVa (4c)	0	0	1	0,95

Tabulka 2: Vlastnosti izolátů *L. monocytogenes* na základě použitých typizačních metod.

	Séroskopina (Sérotyp)	Klonální komplex	Počet izolátů	Pulzotyp (počet izolátů)
HU	IIa (1/2a)	CC7	4	763 (1), 763A (1), 756A (1), 711 (1)
		CC8	19	798/810 (13), 822 (1), 717 (5)
		CC121	2	720* (1), 824 (1)
		CC155	1	702 (1)
		nezařazeno	19	720* (1), 724 (1), 732 (1), 735 (3), 746 (1), 775 (1), 815 (1), 833 (1), 722/784 (4), 816/709 (5)
	IIb (1/2b)	NA	14	500 (4), 515 (2), 517 (1), 541 (1), 542 (1), 543 (1), 548 (1), 554 (1), 537A (2)
	IVb (4b)	CC1	6	204 (2), 211 (3), 224 (1)
		CC2	4	200 (2), 201 (2)
		CC4	1	226 (1)
		CC6	16	203 (15), 220 (1)
PO	IIa (1/2a)	CC7	7	711 (2), 763 (3), 763A (2)
		CC8	13	717 (5), 731 (3), 758 (1), 832 (1), 798/810 (3)
		CC121	6	701 (3), 715 (1), 720 (2)
		nezařazeno	33	700 (2), 713 (4), 716 (3), 719 (1), 733 (2), 735 (5), 738 (2), 746 (1), 749 (1), 757 (1), 775 (2), 788 (1), 815 (1), 821 (1), 827 (1), 722/784 (3), 787/825 (1), 816/709 (1)
	IIb (1/2b)	NA	21	500 (4), 502 (2), 503 (2), 515 (1), 516 (2), 517 (1), 524 (1), 530 (1), 546 (2), 547 (1), 548 (1), 550 (1), 551 (1), 552 (1)
	IIc (1/2c)	NA	8	1 (4), 6 (3), 13 (1)
	IVb (4b)	CC1	7	204 (2), 213 (2), 214 (1), 221 (1), 222 (1)
		CC2	5	200 (3), 201 (1), 201A (1)
		CC6	3	203 (3)
		nezařazeno	1	223 (1)
	IVa (4c)	NA	1	225 (1)

HU – humánní izoláty, PO – potravinové izoláty

pulzotypy shodné pro humánní a potravinové kmeny jsou zvýrazněny tučně

*humánní izoláty pulzotypu 720 náležely každý do jiného klonálního komplexu. Kontrolním štěpením enzymem *ApaI* byly zjištěny odlišnosti v pulzotypu, které nebyly při štěpení enzymem *AscI* detekovány.

Diskuze

Základní metodou využívanou při epidemiologických šetřeních listerióz je sérotypizace. V rámci naší studie bylo detekováno pět sérotypů a bylo zjištěno, že potravinový řetězec v České republice je nejčastěji kontaminován kmeny sérotypu 1/2a (séroskupina IIa), s čímž koreluje námi zjištěná nejvyšší četnost tohoto sérotypu v humánní populaci, která tyto potraviny konzumuje (Tab. 1). Nicméně v Evropské Unii byla v letech 2012 - 2014 nejčtenější séroskupinou zodpovědnou za humánní listeriózy IVb (ECDC TESSy, 2015). Kmeny sérotypu 4b (séroskupina IVb) v humánní populaci dominují celosvětově, zatímco z potravin bývají nejčastěji izolovány kmeny sérotypu 1/2a, 1/2b a 1/2c (Vázquez – Boland, 2001). Příčinou tohoto jevu může být vyšší expozice spotřebitelů potravinám kontaminovaným kmeny sérotypu 4b, než potravinám kontaminovaným ostatními sérotypy. Klonální typizace je nová časově nenáročná metoda založená na principu multiplex PCR. Nahrazuje pracnější a ekonomicky náročnější metodu MLST a nabízí vyšší stupeň diskriminace kmenů než sérotypizace. Nejčastěji detekovaný klonální komplex v rámci sérotypu 1/2a byl u humánních i potravinových izolátů CC8. V rámci sérotypu 4b byl nejčtenějším komplexem CC6 u humánních a CC1 u potravinových izolátů. Makrorestrikční analýza následovaná pulzní gelovou elektroforézou je frekventně využívaná typizační metoda s vysokou diskriminační schopností, která je považována za zlatý standard v molekulární epidemiologii. Ze 73 detekovaných pulzotypů v rámci naší studie se 20 pulzotypů vyskytlo zároveň v potravinách i u pacientů. Nejvyšší četnost výskytu v humánní populaci vykazovaly klony pulzotypu 203 a 798/810 (Tab. 2). V rámci potravin byl klon pulzotypu 203 izolován ze syrového vepřového masa, zrajícího sýra a šunky. Klon pulzotypu 798/810 byl získán ze syrového srnčího masa, pařížského salátu a zrajícího sýru. Šunku, sýr a pařížský salát řadíme mezi tzv. potraviny určené k přímé spotřebě, které jsou považovány za častá vehikula infekce (Vázquez – Boland, 2001). Z námi použitých typizačních metod měla nejvyšší diskriminační schopnost makrorestrikční analýza, výrazně nižší stupeň diskriminace vykazovala klonální typizace a nejnižší poskytla sérotypizace. Všechny izoláty humánního i potravinového původu byly citlivé vůči všem testovaným antimikrobiálním látkám užívaným k léčbě humánní listeriózy. Nízký výskyt rezistentních kmenů *L. monocytogenes* v potravinách uvádí i Conter a kol. (2015), podobné výsledky u kmenů z humánních zdrojů popisuje Hansen a kol. (2005).

Závěr

Kombinace několika typizačních metod poskytla cenné informace o vlastnostech kmenů *L. monocytogenes* izolovaných z humánních zdrojů a potravin. Výsledky poukazují na značnou diverzitu *L. monocytogenes* v humánní populaci a v potravinovém řetězci České republiky.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projekty IGA VFU Brno 206/2016/FVHE a MZ AZV 16-31488A. Poděkování náleží Mgr. Tereze Gelbíčové, Ph.D. za pomoc při typizaci kmenů *L. monocytogenes*.

Literatura

Seznam literatury je k dispozici u autora.

Kontaktní adresa: Zuzana Tomáštková, MVDr., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 296/70, Brno 621 00, H14391@vfu.cz.

Porovnání kvality DNA u technologicky opracované svaloviny tuňáka žlutoploutvého

Comparison of DNA Quality in Processed Muscle of Yellowfin (*Thunnus albacares*)

Pospíšilová Eliška, Piskatá Zora

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

Summary

The most common methods that can be used to identify tuna species include methods based on detection of specific DNA (PCR method - Polymerase Chain Reaction and its modification: real-time PCR, digital PCR etc.) The problem in the detection of DNA in the processed products is the possibility of DNA fragmentation during processing technologies. In this study we compared three DNA extraction method: DNeasy Blood and Tissue Kit, DNeasy mericon Food Kit and Chemagic DNA Tissue Kit 10. The effect of the technological processing of DNA was monitored, especially temperature, pressure and the type of processing. It was a raw muscle, muscle conservation (solid and ground muscle), boiling (at 70 °C and 90 °C), smoking hot and cold smoke, next pate and spread. DNA quality was assessed by determining the concentration and the absorbance ratio A260/A280 by spectrometer. Another indicator of the quality of the DNA was amplification in a subsequent PCR. Based on the results the optimal kit and detection rate of DNA damage in the technological process was chosen.

Keywords: DNA isolation; PCR analysis; food authenticity

Úvod

Ověřování autenticity potravin patří k zásadním otázkám v oblasti bezpečnosti potravin. Podle Nařízení Rady (EHS) 1536/1992 se tuňáci rozdělují na pravé tuňáky a nepravé tuňáky *bonito*. Spotřebitelům je nutné zajistit přesné označování tuňákových výrobků, týkající se zejména uvedení názvu druhu tuňáka na obalu výrobku. Vzhledem k nárůstu poptávky a spotřeby tuňákových produktů a vysokým nákladům na výrobu může docházet k záměně jednotlivých druhů tuňáků rozdílné kvality, což může vést ke klamání spotřebitele (Espinera et al., 2009). Tuňákové výrobky podléhají v průběhu výrobního procesu různým účinkům (vysoká teplota, tlak, přidavek ingrediencí aj.), které mohou značně ovlivňovat kvalitu DNA (Cawthorn et al., 2011). V případě dovozu tuňáků ve zpracovaném stavu je druhové ověření podle morfologických znaků znemožněno. Proto je zde snaha o vývoj nových metod schopných identifikovat široké spektrum druhů ryb na základě detekce druhově specifické DNA i ve zpracovaných výrobcích (Lockley and Bardsley, 2000).

Materiál a metody

Příprava vzorků: Vzorky tuňáka byly připraveny ze svalové tkáně tuňáka žlutoploutvého (*Thunnus albacares*), který byl zakoupen na českém trhu jako zmrazený steak. Jeho identifikace byla ověřena pomocí sekvenování podle dílčí sekvence genu pro cytochrom *b* (Seqme, Hradec Králové, Česká republika). Bylo vyrobeno celkem 9 vzorků (viz tabulka 1).

Izolace DNA: Byly použity tři DNA extrakční metody: DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen): kit A, DNeasy mericon Food Kit (Qiagen): kit B a Chemagic DNA Tissue 10 Kit (Elisabeth Pharmacon): kit C. Izolace probíhaly podle návodů výrobce.

Stanovení kvality DNA: Kvalita DNA byla hodnocena dle stanovení koncentrací a poměrů absorbancí A260/A280 pomocí spektrometru (NanoDrop™ 1000, Thermo Scientific).

PCR analýza: Ukazatelem kvality DNA byla dále její amplifikovatelnost v následné PCR. Pomocí programu Primer3 bylo navrženo několik sad primerů amplifikujících úseky DNA rozdílné délky v počtu párů bází (100, 200, 300 a 500 bp). Kandidátním markerem byl mitochondriální gen pro cytochrom oxidázu I, jehož sekvence je popsána u širokého spektra druhů ryb. Reakční směs se skládala z celkového objemu 20 μ l: 10 μ l Master mixu (Top Bio), 4 μ l PCR vody (Top Bio), 10 pmol každého primeru (Generi Biotech) a 4 μ l templátové DNA. Amplifikace byla provedena s úvodní denaturací následovanou 35 cykly 3 min při 95 °C, cykly po 30 s při 95 °C, 30 s při 60 °C a 50 s při 72 °C, s finální extenzí při 72 °C po dobu 5 min a konečné zchlazení na 4 °C. Vizualizace PCR produktů byla provedena elektroforeticky v 1,5% agarózovém gelu v 0,5 X TBE pufru s obsahem 8 μ l gel greenu. Byla zkoumána intenzita bandu při různě dlouhých PCR produktech DNA, jako marker byl použit 100 bp Ladder.

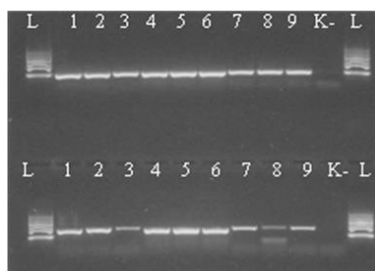
Výsledky a diskuze

Na základě stanoveného množství (koncentrace) DNA spektrometrem můžeme určit rozdílnost v účinnosti jednotlivých kitů (viz tabulka 1). Obecně nejvyšší koncentrace byla zachycena v případě syrové svaloviny s výjimkou kitu A, což mohlo být způsobeno během procesu izolace DNA. Co se týká stanovení kvality DNA z hlediska výpočtu poměru absorbancí A 260/ 280, většina vzorků se nacházela v zadaném rozmezí 1,7 – 2,0 (tabulka 1). Vzorky mimo toto rozmezí mohou být kontaminovány bílkovinami a jinými složkami. Ze získaných hodnot uvedených v tabulce 1 lze považovat za optimální kit B, vzorky obsahovaly nejvíce vyizolované DNA (koncentrace) oproti ostatním a rozmezí čistoty DNA splnilo 7 vzorků z 9. V následné PCR reakci byly testovány 4 sady primerů, které byly navrženy na pro amplifikaci PCR produktů různé délky. Na obrázcích 1 – 6 jsou znázorněny výsledky PCR analýzy pro jednotlivé kity. Během technologických procesů používaných v potravinářství dochází k rozpadu DNA na kratší fragmenty. Kratší úseky DNA byly zachytitelné téměř u všech vzorků (v závislosti na použitém kitu). Prokázalo se, že čím je delší amplifikovaný úsek (500 bp), tím je nižší pravděpodobnost detekce (viz obr. 1 – 6). Nejnižší amplifikovatelnost byla pozorována v případě vzorků pomazánky a paté, čemuž odpovídají i výsledky A 260/280, které byly mimo rozmezí 1,7 – 2,0. U kitu C byly hodnoty koncentrace pro tyto vzorky sice vyšší, ale to mohlo být způsobeno přítomností zbytkových reagentů a jiných nečistot, které se mohou zachytit během extračního postupu a které mohou dále navýšit záchyt při nastavené vlnové délce spektrometru a tím způsobit zdánlivé navýšení koncentrace DNA. Přídavek přísad do těchto výrobků (olej, majonéza, sůl, aj.) může navíc ovlivňovat případné stanovení ve smyslu inhibice PCR. Podle dostupných výsledků PCR analýzy se jeví jako vhodné kity A a B.

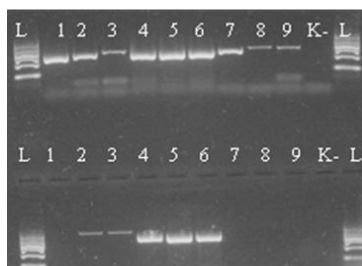
Tabulka 1: Stanovené koncentrace DNA a poměr absorbancí (A 260/280).

Vzorky Podmínky výroby	Technologické opracování svaloviny tuňáka								
	1 <i>syrová</i>	2 <i>konzervovaná celá 121 °C</i>	3 <i>konzervovaná mletá 121 °C</i>	4 <i>vařená 70 °C</i>	5 <i>vařená 90 °C</i>	6 <i>uzená 25 °C</i>	7 <i>uzená 60 °C</i>	8 <i>poma- zánka</i>	9 <i>paté</i>
KIT A									
c [ng/ μ l]	6,4	2,5	2,1	26,8	53,0	42,0	15,6	2,5	1,8
A 260/280	1,8	2,4	1,7	1,9	2,0	1,9	1,5	1,1	2,3
KIT B									
c [ng/ μ l]	51,1	8,2	6,5	27,2	9,2	51,5	5,8	0,2	2,8
A 260/280	1,7	2,0	2,0	1,9	1,9	1,8	2,0	2,1	2,0
KIT C									
c [ng/ μ l]	40,4	4,3	2,3	7,1	4,9	9	1,9	24,7	25,4
A 260/280	1,9	2,0	2,2	2,1	1,8	1,8	1,8	1,5	1,5

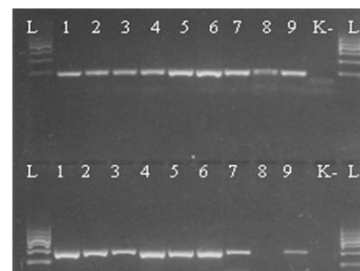
c – koncentrace, A - absorbance



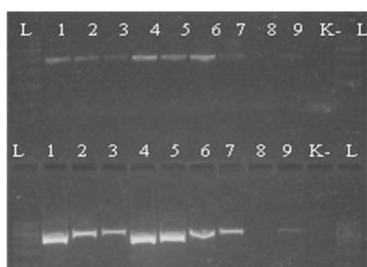
Obr. 1: Kit A 100/200 bp



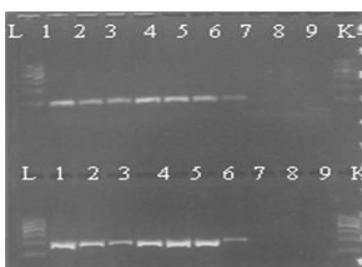
Obr. 2: Kit A 300/500 bp



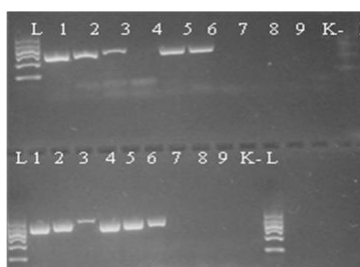
Obr. 3: Kit B 100/200 bp



Obr. 4: Kit B 300/500 bp



Obr. 5: Kit C 100/200 bp



Obr. 6: Kit C 300/500 bp

Závěr

Určení kvality DNA v tuňákových výrobcích velmi závisí na daném opracování a na složení výrobků. Z tohoto důvodu je zapotřebí vyvíjet metody schopné izolovat a detekovat druhově specifickou DNA i ve vysoce technologicky upravených výrobcích. Pomocí spolehlivých analytických metod je tak možné odhalit případné pokusy falšování potravin.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem č. 229/2016 FVHE a projektem č. QJ 15 30 107.

Literatura

CAWTHORN, D., STEINMAN, H. A., WITTHUHN, R. C. Comparative study of different methods for the extraction of DNA from fish species commercially available in South Africa. *Food Chemistry*. 2011. vol. 22. p. 232-244.

ESPINEIRA, M., GONZALEZ-LAVÍN, N., VIEITES, J. M., SANTA CLARA, F. J. Development of method for identification of sromboid and common substitute species in seafood products by Fins. *Food Chemistry*. 2009. vol. 117. p. 698-704.

LOCKLEY, A. K., BARDSLEY, R. G. DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology*, 2000, vol. 11, p. 67-77.

Nařízení Rady (EHS) 1536/1992, kterým se stanoví společně obchodně normy pro konzervované tuňáky a bonita.

Kontaktní adresa: Eliška Pospíšilová, Mgr., Oddělení bezpečnosti potravin a krmiv, VÚVeL Brno, Hudcova 70, 621 00 Brno, pospasilova@vri.cz.

Jednoduchá metoda stanovení D a z hodnoty u mikroorganismů Simple Method for D and Z Value Determination for Microorganisms

¹Brychta Tomáš, ²Vorlová Lenka, ^{2,3}Karpíšková Renáta, ⁴Steinhauserová Iva

¹Státní veterinární ústav Jihlava

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

³Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

⁴Ústav hygieny a technologie masa, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Summary

Heat is lethal for microorganisms and each species has its specified tolerance towards heat. During heat treatment is dependance of death of microorganisms and temperature logarithmic. It depends on the temperature used, time of its action and number of microorganisms present before heating. For purpose of devitalization (sterilization) 3 values were set (D, z, F). Simple method for determination of heat resistance (determination of D, z, F values) of microorganisms usable for predictive modeling or trends monitoring using dry bath incubator will be introduced in this text.

Keywords: D value; z value; *Listeria monocytogenes*; heat resistance

Úvod

V historii tepelného zpracování potravin se jako perlička uvádí, že Napoleonova armáda ztratila více vojáků kvůli zkaženým potravinám než v bitvách. Nicolas Appert v roce 1810 dostal odměnu 12000 franků za objev metody založené na uvaření potravin, zalití voskem a opětovném uvaření. Tato metoda je považována za předchůdce moderního zpracování potravin.

Dnes se pro vyjádření snižování počtu mikroorganismů v závislosti na čase používá několik hodnot, tzv. sterilizačních symbolů. D hodnota, z hodnota a F hodnota. D hodnota (decimal reduction time) je definována jako čas potřebný pro snížení bakteriální populace o 90 % při dané teplotě. Udává se v minutách. Z hodnota je udávána ve °C a je to hodnota, o kterou musí být původní teplota zvýšena, aby se D hodnota snížila na 1/10 (van Asselt a Zwietering, 2006).

F hodnota je udávána v minutách a je stanovována jako násobek D hodnoty pro nejvíce tepelně odolné bakterie vyskytující se v potravině. S ohledem na možný výskyt *C. botulinum* je stanovena na 12ti násobek D hodnoty, pro běžné mikroorganismy se za dostatečný považuje 5ti násobek.– fao principles of canning.

Cílem této studie bylo vyvinout snadnou metodu tepelného ošetření bakteriální suspenze izolátu pro stanovení jeho D a z hodnoty pomocí "Dry Bath Incubatoru" použitelnou jak pro účely stanovení tepelné odolnosti izolátů, tak i pro účely prediktivního modelování jejich přežívání při zpracování potravin.

Materiál a metodika

Pro testování metody byl vybrán kmen *Listeria monocytogenes* CCM 4699. Kmen byl kultivován na TSYEA při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byl vytvořen zákal 0,3 McFarlanda na turbidimetru Lachema DensiLaMetr II. 1,5 ml suspenze byl napipetován do deseti zkumavek typu Eppendorf a ty byly zahřáty na 60 °C v přístroji Biosan TDB-120. Po dobu záhřevu byla teplota monitorována teploměrem ve zkumavce s ředícím médiem bez testovaného kmenu. Po 3 minutách byly zkumavky vyjmuty a zchlazeny. Po zchlazení bylo 0,1 ml vyočkováno paralelně na povrch 2 misek TSYEA a další 1 ml byl použit pro vytvoření

ředící řady. Z druhého a třetího ředění byl vyočkován 1 ml paralelně na 2 petriho misky, který byl zalit TSYEA. Po 24hodinové kultivaci při 37 °C se spočítaly narostlé kolonie.

Výsledky a diskuze

Výsledné počty přeživších bakterií v jednotlivých testovaných zkumavkách jsou uvedeny v KTJ/ml v tabulce 1.

Tabulka 1: Počty kolonií *Listeria monocytogenes* po tepelném ošetření.

Zkum.	KTJ/ml	Zkum.	KTJ/ml	Zkum.	KTJ/ml
1	481	5	496	9	506
2	479	6	519	10	494
3	566	7	521		
4	486	8	511		

Pro uvedené počty KTJ byla stanovena hladina významnosti $< 0,05$.

Metody stanovování D a z hodnoty pro jednotlivé bakterie jsou poměrně staré, vědecké články s touto tematikou se objevují již před druhou světovou válkou. Ale i v dnešní době se některé články zabývají stanovováním těchto hodnot, často v souvislosti s finálním tepelným opracováním u konzumenta.

Juneja a kol. (1996) stanovoval D hodnotu pro *E. coli* O157:H7 v mletém hovězím masu. Maso bylo umístěno do plastového sáčku a zahříváno ve vodní lázni. Statistické zpracování použitelné pro srovnání v textu chybí.

Lianou a Koutsoumanis (2013) testoval tepelnou odolnost a odolnost k pH u různých kmenů *Salmonella enterica*. Pro test použil zkumavky zahříváné ve vodní lázni.

Stopforth a kol. (2008) použil pro testování tepelné odolnosti různých kmenů salmonel kapiláry, které zahříval ve vodní lázni, aby tak simuloval úpravu u spotřebitele.

Naše metoda při porovnání s ostatními metodami nevyužívá vodní lázeň, ve které může být zajištění homogenního rozložení teploty v celém objemu obtížné. V případě platových sáčků a zkumavek je navíc ještě potřeba vzít v úvahu prostup tepla stěnou zkumavky, a v případě sáčku zase objem roztoku, které je potřeba temperovat. Využití zkumavek typu Eppendorf, zvláště těch určených pro PCR, znamená práci s materiálem určeným pro rychlý prostup tepla skrz jeho stěnu a tím menší možnost ovlivnění výsledku.

Závěr

Námi publikovaná metoda představuje, v porovnání s jinými používanými metodami, jednoduchý způsob stanovení tepelné odolnosti bakterií s využitím přístrojů a materiálu používaných již v jiných oblastech, přesto vhodných pro toto stanovování.

Literatura

FAO Corporate Document Repository [online databáze]. Food nad Agriculture Organization of the United Nations. Rome: FAO, 1996- [přístup 2016-03-16]. Elektronický archiv. Dostupný z WWW: <http://www.fao.org/docrep/003/t0007e/t0007e02.htm>

JUNEJA V.K.; SNYDER O.P; MARMER B.S. Thermal destruction of *Escherichia coli* O157:H7 in beef and chicken: determination of D- and z-values. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, vol. 35, s. 231 – 237.

LIANOU A.; KOUTSOUMANIS K.P.; Evaluation of the strain variability of *Salmonella enterica* acid and heat resistance. *Food microbiology*. 2013, vol. 34, s. 259 – 267.

STOPFORTH J.D.; SUHALIM R.; KOTTAPALLI B.; SAMADPOUR M. Thermal inactivation of D- and Z-values of multidrug-resistant and non-multidrug-resistant *Salmonella* serotypes and survival in ground beef exposed to consumer-style cooking. *Journal of Food Protection*. 2008, vol. 71, s. 509 – 515.

VAN ASSELT E.D.; ZWIETERING M.H. A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, vol. 107, s. 73 - 82.

Kontakní adresa: Tomáš Brychta, MVDr., Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava, brychtat@svujihlava.cz.

Sushi Consumers' Preferences Myth in the Czech Republic

¹Dorđević Đani, ¹Buchtová Hana, ¹Abdullah Fouad A. A., ²Picková Jana

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

²Department of Food Science, Swedish University of Agricultural Sciences

Summary

The aim of the study was comparison between consumers' preferences and sushi potential to be considered as source of omega-3 (n-3) fatty acids. The material for sushi meal fatty acids profile examination were nigiri and maki sushi samples with three different seafood species (*Salmo salar*, *Thunnus albacares*, *Penaeus vannamei*). Consumers' preferences were perceived by the survey which included 1352 respondents. According to gained results these two sushi types cannot be declared as valuable sources of n-3 fatty acids. Sushi types also significantly preordained ($p < 0.05$) fatty acids profile. Sushi meal is well accepted among Czech consumers; more than 80 % of respondents consume sushi, and the majority of them consider it as good source of healthy fats. Oppositely from consumers' perception it can be concluded that sushi main attribute is not fatty acids profile but its sensory characteristics and well accepted exotic nature.

Keywords: maki sushi; nigiri sushi; omega-3 fatty acids; acceptance

Introduction

Fish/seafood inclusion in sushi meal makes this meal a potential good source of health beneficial omega-3 fatty acids (De Silva and Yamao, 2006). Sushi consumers' comprehensions are pointing out that sushi meal health beneficial characteristic is its fatty acids (FAs) composition (Czarniecka-Skubina and Nowak, 2014). Consumers' food preferences are complex issues and depend on many factors. One of important factors can be also cultural differences and acceptance of nontraditional meals for certain regions e.g. sushi in the diet of Czech consumers (Conte et al., 2014). Certain percentage of sushi popularity belongs to accepted assumption that it is a healthy meal choice (Cysneiros et al., 2009).

The aim of this study was to determine omega-3 (n-3) fatty acids content in two sushi types and to compare gained results with consumers' preferences toward sushi meal.

Materials and Methods

Sushi samples (maki and nigiri) contained three different types of fish/seafood (*Salmo salar*, *Thunnus albacares*, *Penaeus vannamei*). The lipid content was determined quantitatively (ČSN ISO 1443:1973). Lipid analyses were performed as described in details by (Mraz and Pickova, 2009) using gas chromatograph (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The questionnaires were carried out in the Czech Republic (CZ) both in-person and online. The research group consisted of 1352 respondents. The study was conducted between May 2015 and October 2015. The questionnaire (n=36) was composed of two types of questions in dependence on respondent's reply do they consume sushi or not. Statistical analysis was performed using statistical software SPSS 20. Value of $p < 0.05$ and $p < 0.01$ were used to indicate statistically significant difference, using t-test one-way ANOVA analysis of variance and chi-squared tests (associations of variables in consumers' preferences). Post hoc Tukey test was used for finding difference among groups.

Results

Data about lipid profiles of sushi samples are shown in Table 1. Respondent's perception about potential health benefits of sushi meal and respondents' frequency of sushi consumption are shown in Figures 1 and 2, respectively.

Table 1: Lipid content (g/8 sushi pieces) and profile of sushi samples.

	nigiri			maki			
	salmon	tuna	shrimp	salmon	tuna	shrimp	shrimp fried
	one serving = 8 pieces of sushi (g/8 sushi pieces, mean ± SD)						
*weight	304.8 ± 20.64	307.2 ± 21.44	250.4 ± 35.76	144.8 ± 11.04	150.4 ± 14.56	198.4 ± 28.96	143.2 ± 12.96
fat content	5.23 ± 0.35 ^a	0.12 ± 0.01 ^a	0.08 ± 0.01 ^b	0.35 ± 0.03 ^b	0.03 ± 0.03 ^b	0.02 ± 0.00 ^b	2.30 ± 0.21 ^a
Σ SFA	1.12 ± 0.08 ^a	0.03 ± 0.00 ^c	0.02 ± 0.00 ^c	0.06 ± 0.00 ^c	0.01 ± 0.00 ^c	0.003 ± 0.00 ^c	0.34 ± 0.03 ^b
Σ MUFA	1.97 ± 0.13 ^a	0.03 ± 0.00 ^d	0.04 ± 0.01 ^d	0.18 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^d	0.66 ± 0.06 ^b
Σ PUFA	0.69 ± 0.05 ^b	0.06 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^e	0.11 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.00 ^e	0.01 ± 0.00 ^e	1.30 ± 0.12 ^a
n-3 FA	0.27 ± 0.02 ^a	0.02 ± 0.00 ^e	0.004 ± 0.001 ^g	0.04 ± 0.00 ^b	0.004 ± 0.00 ^{fg}	0.001 ± 0.00 ^{de}	0.03 ± 0.00 ^c
n-6 FA	0.43 ± 0.03 ^b	0.04 ± 0.00 ^d	0.02 ± 0.00 ^d	0.06 ± 0.00 ^d	0.01 ± 0.00 ^d	0.005 ± 0.00 ^{cb}	1.27 ± 0.11 ^a

Different alphabetic superscript (a, b, c, d, e, f, g) in rows differ significantly at p<0.05; p<0.01; Abbreviations: SFA= saturated fatty acid, MUFA = monounsaturated fatty acid, PUFA = polyunsaturated fatty acid; *weight of 8 sushi pieces in grams

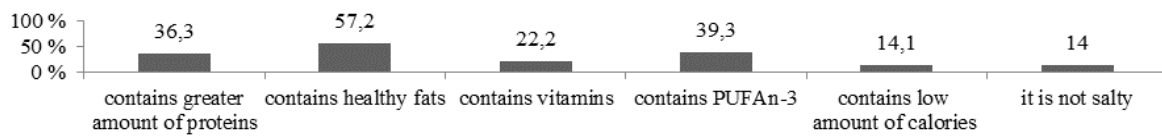


Figure 1: Respondents' comprehension about health benefits of sushi meal.

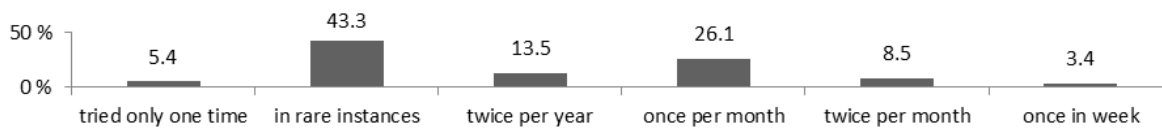


Figure 2: Respondents' frequency of consuming sushi.

More than 80 % (1088 people) of respondents stated that they consume sushi while 19.5 % (263 people) don't consume it. Chi-square test indicated that sushi consumption is dependable (p<0.05) on respondents' age, education and occupation. Respondents with higher monthly income (over 30 000 CZK) consumed sushi more frequently (p<0.05). Only 14.1 % (n=149) of respondents thought that seafood portion in sushi is small. The main reasons for not consuming sushi was that it is cold meal (41.3 %; n=100). Economical issues would make respondents to consume sushi more often (if they have higher income: 42.4 % n=641; if sushi meal is cheaper: 30.6 % n=464).

Discussion

Sushi meal contains far below total fat daily intake of 70 g (Council Regulation (EC) 1169/2011), but it leads to low n-3 FAs content too. Inclusion of fried breaded shrimp resulted in undesirable high n-6 fatty acids and consequently high n-6/n-3 ratio over recommendation for cardiac health (<7.5) (McDaniel et al., 2013). In fried fillets of mackerel authors observed 51.6 fold increment of n-6/n-3 ratio (Candela et al., 1998). The portion of seafood in sushi meal is very important because of polyunsaturated n-3 FAs content, especially that plant sources contain mainly short chained n-3 FAs (Ellulu et al. 2015). Fish portion in sushi meal is low and sushi samples cannot be classified as good source of n-3 FAs (EFSA, 2010). Oppositely, respondents clearly stated that sushi is a good source of n-3 FAs and healthy fats. This respondents' comprehension could be the reason for high acceptance and more frequent sushi consumption than in certain European countries (Czarniecka-Skubina and Nowak, 2014). Younger respondents more accepted sushi confirming that younger persons accept easier foreign products and they are less ethnocentric (Orth and Firbasova, 2002). Following reasons explain not acceptance of sushi: sushi is consumed cold (people

prefer at least one hot meal per day), fish consumption in CZ is low and sushi price also represents certain barrier (Makela et al., 1999; Pieniak et al., 2013).

Conclusion

The study clearly emphasized the proportion of “myth” that sushi meal represents good source of healthy fats. Consumers’ preferences toward sushi meal are totally opposite from real sushi FAs profile. High acceptance of sushi meal in CZ shows the level of respondents misunderstanding. Sushi acceptance and worldwide popularity don’t belong only to nutritional profile but to exotic attributes of sushi meal and consumers’ curiosity pursuance especially toward globally developed brands such as sushi.

Acknowledgment

Supported by the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno (Institutional Research: 2014, 2015; Internal Mobility Agency: No 2014-FVHE-12). The analysis were partly done at the Swedish University of Agricultural Sciences.

References

- CANDELA, M.; ASTIASARAN, I.; BELLO, J. Deep-fat frying modifies high-fat fish lipid fraction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 1998, vol. 46, p. 2793-2796.
- CONTE, F.; PASSANTINO, A.; LONGO, S.; VOGLAROVA, E. Consumers’ attitude towards fish meat. *Italian Journal of Food Safety*. 2014, vol. 3, p. 178-181.
- CYSNEIROS, R.M.; ARIDA, R.M.; TERRA, V.C.; SONODA, E.Y.; CAVALHEIRO, E.A.; SCORZA, F.A. To sushi or not to sushi: Can people with epilepsy have sushi from time to time? *Epilepsy & Behavior*. 2009, vol. 16, p. 565-566.
- CZARNIECKA-SKUBINA, E.; NOWAK, D. Japanese cuisine in Poland: attitudes and behaviour among Polish consumers. *International Journal of Consumers Studies*. 2014, vol. 38, p. 62-68.
- DE SILVA, D.; YAMAO, M.A. Yen for sushi: an analysis of demographic and behavioural patterns of sushi consumption in Japan. *Journal of Foodservice*. 2006, vol. 17, p. 63-76.
- EFSA. Scientific Opinion on Dietary Reference Values for fats, including saturated fatty acids, polyunsaturated fatty acids, monounsaturated fatty acids, trans fatty acids, and cholesterol. *EFSA Journal*. 2010, vol. 8, p. 1461.
- ELLULU, M.S.; KHAZAI, H.; ABED, Y.; RAHMAT, A.; ISMAIL, P.; RANNEH, Y. Role of fish oil in human health and possible mechanism to reduce the inflammation. *Inflammopharmacol*. 2015, vol. 23, p. 79-89.
- MAKELA, J.; KJAERNES, U.; EKSTROM, M.P.; FURST, E.L.; GRONOW, J.; HOLM, L. Nordic meals: methodological notes on a comparative survey. *Appetite*. 1999, vol. 32, p. 73-79.
- MCDANIEL, J.; ICKES, E.; HOLLOMAN, C. Beneficial n-3 polyunsaturated fatty acid levels and n6:n3 ratios after 4-week EPA + DHA supplementation associated with reduced CRP: A pilot study in healthy young adults. *Modern Research Inflammation*. 2013, vol. 2, p. 59-68.
- MRAZ, J.; PICKOVA, J. Differences between lipid content and composition of different parts of fillets from crossbred farmed carp (*Cyprinus carpio*). *Fish Physiology and Biochemistry*. 2009, vol. 35, p. 615-623.
- ORTH, U.R.; FIRBASOVA, Z. Ethnocentrism and consumer evaluations of Czech made yoghurt. *Agricultural Economics*. 2002, vol. 48, p. 175-181.
- PIENIAK, Z.; VANHONACKER, F.; VERBEKE, W. Consumer knowledge and use of information about fish aquaculture. *Food Policy*. 2013, vol. 40, p. 25-30.

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

Effect of High-Oxygen Atmosphere on the Lipid Oxidation and Antioxidants Activity in Organic Chicken Meat

Abdullah Fouad A. A., Buchtová Hana, Đorđević Dani

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

Summary

The aim was evaluation the effect of high-oxygen modified atmosphere packaging (MAP) obverse air atmosphere packaging on thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and antioxidant activity in breast and thigh of fresh chicken from organic production system. In total 24 half of broilers (Color yield hybrid) was obtained and storage (14 days at 2 ± 2 °C). Half of samples (12) were packaged in MAP (80% O₂/20% CO₂) and 12 samples in air atmosphere. Measurement of gases mixture in MAP as well as TBARS and antioxidants activity in the breast and thigh were conducted at 2nd, 7th, 10th and 14th day of storage. The percentage of O₂ in MAP decreased, whereas the amount of CO₂ increased during storage period. TBARS values are significantly different ($P < 0.01$) between MAP and air atmosphere packaging at 10th and 14th day of storage for breast and at 14th day for thigh, where in MAP values was higher. Type of packaging not had significantly effect on the antioxidant activity.

Keywords: *organic meat; broiler; lipid oxidation; MAP; high-oxygen*

Introduction

Packaging of chicken in the modified atmosphere of oxygen (O₂) and carbon dioxide (CO₂) mixture are widely used in the poultry processing plant in the Czech Republic (Hulánková et al. 2010). Various compositions of O₂ (25-90%) and CO₂ (15-80%) could be used, but 80% O₂/20% CO₂ is the most common combination use (McMillin 2008). O₂ is not essential for chicken meat and could be lead to differences in taste and smell as in the case of turkey meat (Floros and Matsos 2005), but it inhibited growth of anaerobic bacteria (D'Aoust 1991). Increase lipid oxidation is one of high-oxygen disadvantage. Quality and acceptability of meat are limited by lipid oxidation (Balamatsia et al. 2007). The organic meat is characterized by a high TBARS level, which could be due to a high content of Fe ions that catalyze peroxidation, and to a great degree of unsaturation of intramuscular lipids. Grass consumption by organic chickens increases the amount of alpha-tocopherol and carotenoids in their meat and thus its antioxidant activity (Castellini and Mourvaki 2007).

Material and Methods

In total 24 half carcass of fresh chicken were obtained from organic production farm, one day after slaughtering. Half of samples (12) was packaged using modified atmosphere packaging (MAP) (80% O₂/20% CO₂) and second half of samples (12) was not packaged (in AIR). All samples were stored for 14 days at 2 ± 2 °C. The samplings were conducted on 2nd, 7th, 10th and 14th day of storage. On each experimental day, 3 samples from each type of packaging were taken for detection of gases mixture in MAP (%) using the Check Point II gas analyser (PBI Dansensor AS, Ringsted, Denmark), thiobarbituric acid (TBA) and antioxidant activity. Distillation method was used to determine TBA, the oxidation products were quantified as malondialdehyde equivalents (mg/kg). Antioxidants activity was determined by using free radical scavenging ability 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl according to Heilerova et al. (2003). Statistical significance ($P < 0.05$) was estimated by t-test and ANOVA analysis of variance, with post hoc Tukey test for finding differences between independent variances. Correlation between TBA and antioxidants activity was conducted by Pearson's correlation analysis. SPSS 20 statistical software (IBM Corporation, Armonk, USA) was used.

Results

The amount of O₂ in the modified atmosphere decreased significantly ($P < 0.05$) on 10th day of storage, whereas the amount of CO₂ in the high-oxygen modified atmosphere increased significantly ($P < 0.05$) on the 7th day and 14th of storage (Table 1).

Table 1: Gases mixture in MAP in %.

gas	2 nd day	7 th day	10 th day	14 th day	stat. sign.
O ₂	76.83±1.12 ^{bd}	78.23±0.64 ^{cd}	71.53±3.23 ^a	75.23±0.85 ^b	$P < 0.05$
CO ₂	15.93±0.12 ^a	18.07±0.67 ^b	17.73±1.07 ^{cb}	20.82±0.15 ^d	$P < 0.05$
remain gases	7.22±1.24 ^b	3.73±0.60 ^{dc}	10.73±3.88 ^a	3.97±0.82 ^{cb}	$P < 0.05$

Values in the same row with different letters ^{a, b, c, d} are significantly different

Correlation between TBARS and storage time was significant ($P < 0.05$), coefficient of determination (R^2) was 0.685 (breast in MAP) and 0.642 (thigh in MAP). Differences ($P < 0.01$) in TBARS between samples of MAP and air atmosphere packaging were observed on the 14th of storage (Table 2).

Table 2: Thiobarbituric acid reactive substances (mg/kg) in organic broiler meat.

day	breast		Stat. sign.	thigh		Stat. sign.
	MAP	AIR		MAP	AIR	
2 nd	47.70±32.96 ^A	36.15±7.40	NS	70.60±36.06	47.55±22.70	NS
7 th	146.83±32.80 ^B	54.67±35.61	NS	121.37±60.87	75.63±28.59	NS
10 th	180.00±46.88 ^{bB}	45.03±27.36 ^a	**	220.00±145.80	47.57±11.00	NS
14 th	149.63±14.43 ^{bB}	73.63±10.30 ^a	**	214.37±38.85 ^b	63.63±11.03 ^a	**
Stat. sign.	*	NS		NS	NS	

Values in the same row with different letters ^{a, b} are significantly different between MAP and AIR, values in the same column with different letters ^{A, B, AB} are significantly different among days of storage, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, NS No significance

Correlation between antioxidant activity and storage time of breast samples in air atmosphere packaging was statically significant ($P < 0.05$), coefficient of determination (R^2) was 0.595. Correlation between TBARS and antioxidant activity was not found. Any statistical differences of antioxidants activity were not observed between the samples in MPA and air atmosphere packaging as well as during storage period (Table 3).

Table 3: Antioxidant activity (% inhibition) in organic broiler meat.

day	breast (% inhibition)		Stat. sign.	thigh (% inhibition)		Stat. sign.
	MAP	AIR		MAP	AIR	
2 nd	23.65 ± 2.80	23.04±0.94	NS	23.09 ± 3.15	27.50 ± 3.89	NS
7 th	23.59 ± 1.80	22.90±0.69	NS	26.46 ± 4.40	26.75 ± 2.01	NS
10 th	24.36 ± 2.04	25.75±0.41	NS	26.44 ± 1.08	28.50 ± 1.16	NS
14 th	25.09 ± 0.61	24.74±1.18	NS	27.54 ± 2.34	26.17 ± 0.49	NS
Stat. sign.	NS	NS		NS	NS	

Values in the same row/column represent the differences between MAP and AIR/among days of storage, NS No significance.

Discussion

Decrease amount of O₂ and increase CO₂ in the MAP during storage period are consistent with the findings of Tománková et al. (2012). According to Balamatsia et al. (2007), there are many factors related to exhaustion of O₂ and conversion to CO₂ including to: rapid growth and metabolism of bacteria, enzymatic activity of muscle and decarboxylation of biogenic amines. MAP samples had higher TBARS values than samples in air modified atmosphere packaging. Similar to present results Tománková et al. (2012) observed that high-oxygen MAP increased the TBA values of samples during storage period.

Conclusion

Type of packaging had significant effect on composition of gas mixture in MAP and on TBARS values but not had significant effect on antioxidant activity of evaluated samples. In order to enrich this study we suggest using more than one method to investigate antioxidant activity and compare the present results with chicken meat from conventional production system.

Acknowledgment

Financial support for this study was provided by the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, Czech Republic (Institutional research for year 2015) as well as Erasmus + program, subscriber agreement no. P24/ 2015.

References

- BALAMATSIA, C.C., PATSIAS, A., KONTOMINAS, M.G., SAVVAIDIS, I.N. Possible role of volatile amines as quality-indicating metabolites in modified atmosphere packaged chicken fillets: Correlation with microbiological and sensory attributes. *Food Chemistry*. 2007, vol. 104, p. 1622–1628.
- CASTELLINI, C, MOURVAKI, E. Sensory attributes of organic poultry meat and consumer perception. *European Symposium on the quality of poultry meat*. Praha 2-5 Sept. 2007, p. 1-6.
- D'AOUST, J.Y. Psychrotrophy and foodborne *Salmonella*. *International Journal of Food Microbiology*. 1991, vol. 13, p. 207-216.
- FLORAS, J.D., MATSOS K.I. Introduction to modified atmosphere packaging. In HAN JH (Ed.): *Innovations in Food Packaging*. 1st ed. Elsevier Academic Press, London, 2005, p. 159-171.
- HEILEROVA, L., BUCKOVA, M., TARAPCIK, P., ŠILHAR, S., LABUDA, J. Comparison of antioxidative activity data for aqueous extracts of Lemon Balm (*Melissa officinalis* L.), Oregano (*Oreganum vulgare* L.), Thyme (*Thymus vulgaris* L.) and Agrimony (*Agrimonia eupatoria* L.) obtained by conventional methods and the DNA-based biosensor. *Czech Journal of Food Sciences*. 2003, vol. 21, p. 78-84.
- HULÁNKOVÁ, R., BOŘILOVÁ, G., STEINHAUSEROVÁ, I. Influence of Modified Atmosphere Packaging on the Survival of *Salmonella Enteritidis* PT 8 on the Surface of Chilled Chicken Legs. *Acta Veterinaria Brno*. 2010, vol. 79, p. 127–132.
- MCMILLIN, KW. Where is MAP going? A review and future potential of modified atmosphere packaging for meat. *Meat Science*. 2008, vol. 80, p. 43-65.
- TOMÁNKOVÁ, J., BOŘILOVÁ, G., STEINHAUSEROVÁ, I., GALLAS L. Volatile Organic Compounds as Biomarkers of the Freshness of Poultry Meat Packaged in a Modified Atmosphere. *Czech Journal of Food Science*. 2012, vol. 30, no. 5, p. 395–403.

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

Possibilities for Determination of Fattiness of Wild Boar Meat

Tesařová Simona, Ježek František, Bořilová Gabriela, Steinhauserová Iva

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

Summary

Consumption of wild game meat has an increasing tendency in Central Europe. The main hunted animal in the Czech Republic is the wild boar. Fattiness of wild boar meat is caused by many factors. The aim of this study was to determine fattiness in wild boar meat intended for human consumption with two different methods: by Soxhlet analysis - determination of fat in meat chemically and determination of content of superficial fat on heart of wild boar by separation. Preliminary results indicate that the content of fat in meat and content of superficial fat on the heart are in a positive correlation, but they are not statistically significant.

Keywords: *wild game; wild boar; meat; fattiness; fat; heart*

Introduction

Due to the fact that people nowadays are focusing more on a healthier lifestyle, consumers are more often looking for wild game meat these days (Strazdina et al., 2014; Soriano et al. 2006; Rywotycki, 2003).

In the Czech Republic wild boars are the most common hunted animals from the group of mammals. In total 168 974 wild boars were hunted in the Czech area in 2014 in the land area of 6 874 450 ha (eAGRI, 2015).

In the European Union meat from domestic pigs is evaluated according to SEUROP degrees. The main purpose is to ensure clear condition for the market (Font-i-Furnols et al., 2016; Regulation (EU) No 1308/2013). This sorting is carried out according to the estimated content of lean meat listed in European and Czech laws.

For the classification of fattening pigs in the Czech Republic we use authorized methods according to the Commission Implementing Decision 2013/187/EU.

Degrees of fattiness or content of lean meat in muscles of wild boars after hunt are not presently being evaluated. The main goal of this work was to find possible ways of determining dependency of fattiness in meat and the content of superficial fat on the heart.

Materials and Methods

In total, we analyzed 37 samples of meat and heart from wild boar (*Sus scrofa*). Samples were taken with cooperation of the Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno. Analyzed samples came from ten different hunting grounds in the Czech Republic. Wild boars were in different ages. Gender distribution was 20 to 17, females and males, respectively. Meat samples were gained from medial part of shoulder. Hearts originated from the same animals, were whole without any damages. All samples were collected during hunting season 2015/2016 intended for human consumption.

Meat from medial part of shoulders were analyzed for the content of total fat by Soxhlet method according to ISO 1443 and result were calculated in percentage.

The second method that was used was separation of superficial fat from wild boar hearts. Fat was separated carefully with scalpel to avoid damages on cardiac muscles. Hearts were weighed before preparation – whole, cleaned and after removal of superficial fat. From differences of obtained values, were calculated content of fat in percentage (%).

Results from wild boars were analyzed by statistical program (Statistica v. 7.0, Statsoft, CZ).

Results and Discussion

In human population, obesity causes increase of content of epicardial fat, as well as visceral abdominal fat (Sacks and Fain, 2007). Methods in human medicine are aimed on measuring the volume of epicardial fat and mostly non-invasive methods are used (echocardiography multidetector-computed tomography and magnetic resonance imaging) (Yamada and Sata, 2015).

In the study of Milersky (2001) the possibility of evaluating the content of lean meat and fattiness on live lambs was examined. An ultrasonic measuring device was used to measure back fat thickness. It was found, that the thickness is in slight correlation with percentage of kidney fat from lambs as well as with subjective assessment of fattiness.

Our detected content of superficial fat on the samples of heart were between 3,30% and 10,01%, and determined content of fat in muscles of shoulder were observed between 0,24% and 1,94%.

In the study from Hungary (Skobrák Bodnár et al., 2015) they found strong correlation between the body weight and the size of heart in wild boars. These results we can consider as an indicator, that content of superficial fat should be higher with higher weight of carcass. Our results are in positive correlation ($r=0,26$) between fat on the surface of heart and fattiness of muscles, without statistical significance ($P>0,05$). This is only a pilot study. In following study we will gain additional samples to confirm or deny this hypothesis.

Conclusion

Results show positive correlation ($r=0,26$) between content of fat on heart with fattiness of meat, but they are not statistically significant ($P>0,05$). These results are preliminary. We expect collection of more samples from wild boar for this research. In continuous research we will evaluate correlation between fat on heart and gender, age and seasons of the year.

Acknowledgement

Research was financially supported by project IGA VFU 225/2016/FVHE.

References

- COMMISSION IMPLEMENTING DECISION 2013/187/EU: amending Decision 2005/1/EC authorising methods for grading pig carcasses in the Czech Republic as regards the formulas of the authorised methods and the presentation of such carcasses. In: Official Journal of the European Union, 2013, p. 103-106.
- eAGRI - resortní portál Ministerstva zemědělství [online]. 2015 [cit. 2016-04-6]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/file/438311/MZE_MZP_VLS_2014.
- FONT-I-FURNOLS, M.; ČANDEK-POTOKAR, M.; DAUMAS, G.; GISPERT, M.; JUDAS, M.; SEYNAEVE, M. Comparison of national ZP equations for lean meat percentage assessment in SEUROP pig classification. *Meat Sci.* 2016, vol. 113, p. 1-8.
- ISO 1443:1973, *Meat and meat products – Determination of total fat content*.
- MILERSKI, M. In vivo assessment of meatiness and fattiness of Charollais ram-lambs. *Czech J Anim Sci.* 2001, vol. 46, no. 6, p. 275-280.
- REGULATION (EU) No 1308/2013 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL: establishing a common organisation of the markets in agricultural products and repealing Council Regulations (EEC) No 922/72, (EEC) No 234/79, (EC) No 1037/2001 and (EC) No 1234/2007. In: Official Journal of the European Union, 2013, 1308/2013, p. 671-854.
- RYWOTYCKI, R. The influence of environment, mode of nutrition and animal species on level of nitrosamine contamination in venison. *Meat Sci.* 2003, vol. 65, p. 1045-1053.

SACKS, H.S.; FAIN, J.N. Human epicardial adipose tissue: A review. *Am Heart J.* 2007, vol. 153, no. 6, p. 907-917.

SKOBRÁK BODNÁR, E.; JÁVOR, A.; BODNÁR, K. Measurement on the body size of the wild boar in game farms. *Lucrări Ştiinţifice – Seria Zootehnie.* 2015, vol. 63, p. 3-8.

SORIANO, A.; CRUZ, B.; GÓMEZ, L.; MARISCAL, C.; GARCÍA RUIZ, A. Proteolysis, physicochemical characteristics and free fatty acid composition of dry sausages made with deer (*Cervus elaphus*) or wild boar (*Sus scrofa*) meat: A preliminary study. *Food Chem.* 2006, vol. 96, p. 173-184.

STRAZDINA, V.; JEMELJANOVŠ, A.; STERNA, V.; IKAUNIECE, D. Nutritional characteristics of wild boar meat hunted in Latvia. *Foodbalt.* 2014, p. 32-36.

YAMADA, H.; SATA, M. The role of pericardial fat: The good, the bad and the ugly. *J Cardiol.* 2015, vol. 65, p. 2-4.

Contact address: Simona Tesařová, MVDr., Department of Meat Hygiene and Technology, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, VFU Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, H13013@vfu.cz.

The Most Frequent Findings in the Inspection of the Game, and the Reasons for the Confiscation of Carcasses in Hunting Season 2014/2015 in Hunting Area Hradiště, Czech Republic

^{1,2}Steinbauer Vladimír, ¹Steinhauserová Iva, ¹Bořilová Gabriela

¹*Military Veterinary Institute, VVS Hradiště, Hlučín*

²*Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno*

Summary

Hunting area Hradiště is one of the largest integrated hunting area in Europe, with an area of about 35,500 hectares. It is located in the Doupovské hory and is managed by the state enterprise Vojenské lesy a statky s. p. These kinds of game are standardized for hunting area Hradiště: red deer, roe deer, mouflon, wild boar. Furthermore a large number of sika deer and a lesser extent fallow deer occur in the hunting area. These two types of game are not standardized, and due to their origin they do not have established rules for breeding. On average more than 4500 heads of game is hunted here per year. Veterinary inspector's activities in the game meat processing are done by the inspectors of Military Veterinary Institute in two facilities for dealing with game. In the one where a tour of caught pieces in skin including internal organs is made and in the device for storing game. Based on Veterinary Inspector activities the most frequent findings in the inspection of the game, and the reasons for the confiscation of carcasses in hunting season 2014/2015 were evaluated.

Keywords: *inspection of game; hunting area Hradiště; confiscation of game; Military Veterinary Institute*

Introduction

Scientific knowledge in the field of Hygiene game still belongs to current and do not clearly applied knowledge into practice, which interferes with the transmitted through generations "guaranteed" methods of treatment venison, processing and for all.

Hunting area Hradiště CZ 4103404411 is the largest integrated hunting area in the Czech Republic and among the largest producers of hunted game. Game management is managed by the state enterprise Vojenské lesy a statky s. p. – division Karlovy Vary. The Division Karlovy Vary has two facilities for the handling of venison with locations in communities Valeč CZ 41840018, in the village Lučiny CZ 41840007 and devices for storing game in Klasterec CZ 17,120th All facilities are located within the complex of forest management and its operation is ensured trained staff of relevant forest management.

A system of veterinary control and supervision of hygiene is ensured through the game trained persons who are employees of a division Karlovy Vary and primarily military veterinary inspectors, who perform all the surveyor activities within its scope. Military inspectors are either professional soldiers or civilian employees of the Army of Czech Republic.

The facilities Game-handling is carried out by an official inspection of the skin, including organs that are supplied together with a game. Thanks to the setting of this control system are military inspectors veterinarians only state supervision, which assesses hunted game, including authorities, unlike state supervision in processing plants. Based on the expert examination inspectors are able to assess the entire health condition of game, edibility and also on the basis of statistical evaluation to assess the health status of wild populations of game animals in hunting area Hradiště.

Veterinary inspection is carried out on a forest management buildings. Valeč in the village Valeč and in the village of Dolní Lomnice - Lučiny. On both forest administrations buildings

are built equipment for handling game and now there is a campaign official veterinary inspection. If the piece designation as worthy to be eaten is passed to the protocol for further processing. In most cases, the animals weighed into contractual processing plants. Otherwise, if a piece of hunted game recognized as inedible is disposed through a decontamination enterprise. In the presence of pathological changes in the suspected disease are military inspectors sampled and sent for further tests - microbiological, histological and pathological to the state veterinary institute or laboratory Military Veterinary Institute in Hlučín.

Results

Table 1: Numbers of hunted game in hunting area Hradiště, period 1. 4. 2014 - 31. 3. 2015.

Kind of game	<i>LS Valeč</i>	<i>LS D. Lomnice</i>	<i>LS Klášterec nad Ohří</i>
Red Deer	37	87	107
Red Deer - doe	57	132	225
Red Deer - fawn	48	126	179
TOTAL	142	345	511
Sika Deer	48	123	80
Sika Deer - doe	143	290	275
Sika Deer - fawn	115	202	208
TOTAL	306	615	563
Roe Deer	113	64	33
Roe Deer - doe	144	53	45
Roe Deer - roe	136	49	40
TOTAL	393	166	118
Fallow Deer	3	0	1
Fallow Deer - doe	1	1	8
Fallow Deer - fawn	1	0	2
TOTAL	5	1	11
Mouflon	0	2	0
Mouflon - doe	3	3	2
Mouflon - fawn	2	4	3
TOTAL	5	9	5
Wild boar	373	503	357
TOTAL	373	503	357

Table 2: Numbers hunter game and examined, period 1. 4. 2014 - 31. 3. 2015.

Kind of game	Number of hunted game	Examined carcasses	%
Red Deer	998	456	45,7
Sika Deer	1484	729	49,1
Roe Deer	683	499	73,1
Fallow Deer	17	12	70,6
Mouflon	19	8	42,1
Wild boar	1233	602	48,8
TOTAL	4434	2306	52

Table 3: Confiscation whole carcasses and the reasons, period 1. 4. 2014 - 31. 3. 2015.

Kind of game	Spoilage of game, Late trace	Damaged by bullets	Cachexia	Pollution	Others	Total
Red Deer	9		2			11
Sika Deer	9	1	2	1		13
Roe Deer	6	4	1	2	3	16
Fallow Deer						
Mouflon						
Wild boar	6		1	3	2	12
TOTAL	30	5	6	6	5	52

Discussion and Conclusion

The total results of the individual official veterinary inspections in hunting area Hradiště and frequent findings and reasons for the game carcasses confiscations was in period 1. 4. 2014 - 31. 3. 2015 totally 52 pieces of game from total number of inspected game carcasses 2,306 reveal a very erudite approach of hunters and knowledge of hygiene of game meat production. Statistics are not included pieces that were marked with a seal - it is mainly the pieces quite technologically damaged by methods of hunts, spoilage game carcassesl, late to trace and dead game or game that showed signs of the disease.

Close cooperation between military veterinary inspectors and regular training in hygiene of game meat processing for hunting employees of Vojenské lesy a statky s. p. - division Karlovy Vary, the equipment, applying new scientific knowledge in the field of hygiene and modernizing venison facilities ensure production quality, healthy, tasty and safe game meat.

Contact address: Vladimír Steinbauer Bc. DVM., Military Veterinary Institute, VVS Hradiste, 364 71 Bochoř, vsteinbauer@centrum.cz.

Stanovení tetracyklinových antibiotik v medu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie

Determination of Tetracycline Antibiotics in Honey Using High-Performance Liquid Chromatography

Dluhošová Sandra, Borkovcová Ivana, Kaniová Lenka, Vorlová Lenka

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

Summary

Honey is food of natural character. Adulterant must not be added to the honey. The detection of antibiotic residues in honeys on the Czech market is the topical problem in the last time. In this study, we developed a method suitable for the determination of tetracycline antibiotics (oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline) in honey focused on the optimizing sample preparation and clean up step prior to the chromatographic determination. Flower honey without antibiotics from the market enriched by tetracycline antibiotics at concentrations ranging from 0.1 to 4.0 mg/l was used to develop this method. Sample preparation involved the solid phase extraction (SPE) which is necessary for estimation of an adequate concentration of antibiotics in honey matrices. SPE was carried out in several modifications. The best recovery achieved using a SPE column C18 (500 mg, 6 ml) and methanol as the extraction solvent. Recovery of tetracycline antibiotics ranged from 62.6 to 99.2 %.

Keywords: honey; tetracycline antibiotics; HPLC; solid phase extraction; recovery

Úvod

Med je z hlediska platné legislativy chápán jako zcela přírodní živočišná potravina, která neobsahuje cizí příměsi. Je považována za potravinu pozitivně působící na lidské zdraví. Přítomnost reziduí jakýchkoli antimikrobiálních látek v medu je zakázána. V Evropské unii není ve včelařství povoleno použití antibiotik a nejsou pro ně zavedeny žádné maximální limity reziduí (MLR). Na českém trhu se prodávají nejen medy vyprodukované v České republice a v zemích Evropské unie, ale i ze zemí mimo Evropskou unii, kde už pohled na používání antibiotik je zcela odlišný a medy z těchto oblastí mohou obsahovat jejich rezidua. Tetracykliny jsou antibiotika se širokým spektrem účinku používána jako veterinární léčiva i doplňkové látky (Khong *et al.*, 2005). Ve včelařství je využíváno jejich profylaktických nebo terapeutických účinků v prevenci a léčbě bakteriálních onemocnění jako je mor a hniloba včelího plodu (Peres *et al.*, 2010). Rezidua tetracyklinů v medu jsou potenciálním rizikem pro spotřebitele. Mohou mít negativní dopady na lidské zdraví projevující se alergiemi, toxickými reakcemi a bakteriální rezistencí patogenů (Yang *et al.*, 2014). Nejčastěji používanými antibiotiky z tetracyklinové skupiny jsou oxytetracyklin (OTC), tetracyklin (TC) a chlortetracyklin (CTC) (Khong *et al.*, 2005; Reybroeck *et al.*, 2012).

Z důvodu aktuálnosti problematiky antibiotik v medu jsme k detekci tetracyklinových antibiotik v medu zavedly metodu vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) se zaměřením na přípravu vzorku pomocí extrakce na tuhou fázi (SPE).

Materiál a metody

Chemikálie:

Všechny chemikálie byly analytického stupně čistoty. Methanol HPLC a acetonitril HPLC (Lach-Ner, ČR), ethylacetát (Merck, Německo), kyselina šťavelová dihydrát, kyselina citrónová monohydrát, komplexon III a hydrogenfosforečnan sodný dihydrát (Penta, ČR).

Voda HPLC čistoty byla připravena použitím Aqua Osmotic 03 device (Tišnov, ČR). Standardy tetracyklin, oxytetracyklin a chlortetracyklin (Sigma-Aldrich, Německo). SPE kolony HLB Oasis 500 mg, 6 ml, Sep-Pak 500 mg, 3 ml (Waters, Irsko), chromatografická kolona Nova-Pak C8, 3,9 x 150 mm, 4 µm (Waters, Irsko). Citráto-fosfátový pufr McIlvaine o pH = 4 s přidavkem Na₂EDTA. Roztoky standardů tetracyklinů v Na₂EDTA-McIlvaine pufru byly připraveny před analýzou vždy čerstvé a uchovány v lednici. Jako modelový med byl použit květový med Včelpo, s.r.o. zakoupen v tržní síti v roce 2015.

Příprava vzorku:

10 g medu bylo rozpuštěno v 50 ml Na₂EDTA-McIlvaine pufru a byly přidány standardy tetracyklinových antibiotik v koncentracích 0,1 až 4 mg/l pro oxytetracyklin a tetracyklin a 0,2 až 8 mg/l pro chlortetracyklin. Směs byla kvantitativně převedena do polypropylenové vzorkovnice a odstředěna při 5000 otáčkách po dobu 5 minut. K přečištění medové matrice a zakoncentrování analytů pomocí SPE bylo použito postupu z aplikačních listů firmy Waters a dvou modifikací (Tabulka č. 1). Po aktivaci a kondicionaci SPE kolonek a nanesení roztoku vzorku byly analyty eluovány organickým rozpouštědlem. Po jeho odpaření byla provedena rekonstituce vzorku pro HPLC stanovení mobilní fází, obsahující 12 mM kyseliny šťavelové.

Tabulka 1: Různé postupy SPE ke stanovení tetracyklinů v medu.

	Postup 1	Postup 2	Postup 3
Kolona pro SPE	HLB Oasis 500 mg, 6 ml Sep-Pak 500 mg, 3 ml	HLB Oasis 500 mg, 6 ml Sep-Pak 500 mg, 3 ml	HLB Oasis 500 mg, 6 ml
Extrakční rozpouštědlo	ethylacetát	methanol	methanol

HPLC stanovení:

Tetracykliny byly stanoveny metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi (RP-HPLC) s gradientovou elucí. Analýza byla provedena pomocí separačního modulu Alliance 2695 s PDA detektorem 2996. Separace probíhala na koloně Nova-Pak C8, 150 x 3,9 mm, 4 µm. Jako mobilní fáze byly použity methanol:acetonitril (50:50) a kyselina šťavelová. Podmínky pro chromatografii byly: průtok 0,8 ml/min, teplota kolony 35 °C, velikost nástřiku 30 µl. Detekce probíhala v UV oblasti při vlnové délce 355 nm. K vyhodnocení byla použita metoda kalibrační přímky pomocí softwaru Empower 2.

Výsledky a diskuse

Antibiotika se v medu vyskytují ve stopových množstvích. Proto je nutné použít metodu k zakoncentrování těchto analytů pomocí SPE kroku. Srovnáním tří postupů za použití různých SPE kolon a extrakčních rozpouštědel jsme byly schopny určit nízké koncentrace antibiotik do hodnoty 0,1 mg/l. Námi navržené koncentrace vycházely z limitních hodnot 100 µg/kg pro mléko a svalovinu (Nařízení Komise (EU) č. 37/2010). Postupem dle aplikačního listu firmy Waters (Postup 1) jsme detekovaly množství tetracyklinů do koncentrace 0,5 mg/l pro OTC a TC a 1 mg/l pro CTC. Výtěžnost byla do 26 %. Postupem 2 s methanolem jako extrakčním rozpouštědlem jsme nestanovily žádná antibiotika. Tak nízká výtěžnost mohla být způsobena vymytím zachycených tetracyklinů na SPE koloně při druhém promývání methanolem. Výtěžnost tetracyklinů u postupu 3 byla 62,6 – 95,4 % pro OTC, 64,6 – 99,1 % pro TC a 80,2 – 99,2 % pro CTC. Tetracykliny byly dobře detekovatelné do koncentrace 0,1 mg/l. Při postupu 3 jsme SPE kolonu promývaly jednou pětiprocentním methanolem, tudíž nedošlo k takové ztrátě navázaných tetracyklinů a výtěžnost byla vyšší. Během analýz bylo

nutné zohlednit tvorbu inaktivních komplexů tetracyklinů s ionty kovů, k čemuž sloužil krok rozpuštění medové matrice v Na₂EDTA-McIlvaine pufru (Gajda *et al.*, 2013; Oka *et al.*, 2000), a silnou vazbu tetracyklinových antibiotik na silanolové skupiny chromatografických sorbentů SPE i HPLC. Tyto vazby jsou příčinou nízkých výtěžností a asymetrických píků a použití kyseliny šťavelové jako aditiva do mobilní fáze tyto vazby omezil (Nakazawa *et al.*, 1999).

Závěr

Cílem této práce bylo vyvinout vhodnou metodu k určení tetracyklinových antibiotik v medu pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie. Byly aplikovány postupy SPE při přípravě vzorků. Jako nejúčinnější byl zhodnocen postup 3 s použitím jedné SPE kolony a methanolu jako extrakčního rozpouštědla. Touto metodou jsme detekovaly koncentrace od 4 do 0,1 mg/l a výtěžnost tetracyklinů se pohybovala od 62,6 do 99,2 %.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno 214/2016/FVHE.

Literatura

GAJDA, A.; POSYNIK, A.; BOBER, A.; BLADEK, T.; ZMUDZIKI, J. Oxytetracycline residues in honey analyzed by liquid chromatography with UV detection. *Journal of apicultural science*. 2013, vol. 57, no. 1, s. 25-32.

KHONG, S. P.; HAMMEL, Y. A.; GUY, P. A. Analysis of tetracyclines in honey by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*. 2005, vol. 19, no. 4, s. 493-502.

NAKAZAWA, H.; INO, S.; KATO, K.; WATANABE, T.; ITO, Y.; OKA, H. Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. *Journal of chromatography B – Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 1999, vol. 732, no. 1, s. 55-64.

OKA, H.; ITO, Y.; MATSUMOTO, H. Chromatographic analysis of tetracycline antibiotics in foods. *Journal of chromatography A*. 2000, vol. 882, no. 1-2, s. 109-133.

PERES, G. T.; RATH, S.; REYES, F. G. A HPLC with fluorescence detection method for the determination of tetracyclines residues and evaluation of their stability in honey. *Food control*. 2010, vol. 21, no. 5, s. 620-625.

REYBROECK, W.; DAESELEIRE, E.; DE BRABANDER, H. F.; HERMAN, L. Antimicrobials in beekeeping. *Veterinary microbiology*. 2012, vol. 158, no. 1-2, s. 1-11.

YANG, X.; ZHANG, S.; YU, W.; LIU, Z.; LEI, L.; LI, N.; ZHANG, H.; YU, Y. Ionic liquid-anionic surfactant based aqueous two-phase extraction for determination of antibiotics in honey by high-performance liquid chromatography. *Talanta*. 2014, vol. 124, s. 1-6.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) č. 37/2010 ze dne 22. prosince 2009 o farmakologicky účinných látkách a jejich klasifikaci podle maximálních limitů reziduí v potravinách živočišného původu [2010]. L15, s. 1 – 72. [cit. 2016-04-14] Dostupné online z: <http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-5/reg_2010_37/reg_2010_37_cs.pdf>.

Kontaktní adresa: Sandra Dluhošová, MVDr., Ústav hygieny a technologie mléka, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H14015@vfu.cz.

Quality Evaluation of Blossom honeys Obtained from the Market of the Czech Republic

Zábrodská Blanka, Dluhošová Sandra, Borkovcová Ivana, Vorlová Lenka

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

Summary

The aim of the study was the quality evaluation of blossom honeys from the market in the Czech Republic. The analysis was conducted on 46 samples of blossom honeys including basic physico-chemical parameters proposed by Regulation: water content, electrical conductivity, acidity, the content of 5-hydroxymethylfurfural (HMF), diastase activity and pH value. It was found that all examined honey samples were in accordance with Decree no. 76/2003 Coll. and didn't exceed limits for water content, electrical conductivity and acidity. Oppositely, exceeded limits were observed for HMF (< 40 mg/kg) and diastase activity (> 8 ° Schade) in 4 and 6 samples, respectively. Out of 46 analyzed samples 17 % (8 samples) didn't fulfill Regulation requirements. Although, according to more strict Czech standards (ČSV 1/1999 - Český med) 52 % of samples (24) would be declared as inadequate, due to lower allowed HMF maximum limit (< 20 mg/kg). The results are emphasizing the necessity for more frequent inspections of honeys present in the market of the Czech Republic by supervisory authorities, especially HMF content should be checked more often.

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

Introduction

Given the increase in demand for good quality blossom honey, and the current scarcity of honey in the Czech food market, the Czech Agriculture and Food Inspection Authority has noted that the issue of poor quality blossom honey available in the Czech Republic is becoming increasingly pressing. Honey is often transported across international borders and therefore its quality in the market is highly variable.

A particular problem is the unsatisfactory physico-chemical indicators such as diastase enzyme activity or hydroxymethylfurfural (HMF) content. Consumers find honey that is liquid and without crystals highly desirable. Consequently, dealers tend to maintain honey in liquid form as long as possible (Bartáková et al. 2011). This is mainly achieved through the application of heat (Tosi et al. 2004). Heating honey to temperatures below 40 °C usually does not alter its physico-chemical and nutritional characteristics. Heating to higher temperatures, however, decreases the activity of important beneficial enzymes like diastase (Tosi et al., 2004; Babacan and Rand, 2007; Tosi et al., 2008; Samborski and Czelejewska, 2014), whose activity limit is legally regulated (Decree No. 76/2003 Coll.). Heating also increases the content of HMF (Tosi et al., 2002; Fallico et al., 2004; Turhan et al. 2008), high concentrations of which can have adverse health effects (Islam et al., 2014). Limits on HMF content are therefore specified in the legislation.

Material and Methods

In this study we analyzed forty-six samples of blossom honey available for sale in the Czech market. The suppliers were Bihophar (blossom, creamed blossom, Mexican blossom honey, Spanish citrus monoblossom, blossom honey from southern France, organic blossom honey from eco-production, organic creamed blossom honey from organic farming), Bill (wild-flower blossom,) Marlene (blossom honey) Jankar Profi (Czech 100% forest blossom honey, blossom, creamed blossom) ABH (blossom honey) Clever (blossom honey) Conferia (blossom honey) Finest Tesco (eucalyptus monoblossom, orange monoblossom, Acacia monoblossom) Včelpo (blossom, lime monoblossom, forest blossom, Grandfather's forest

blossom, blossom, creamed blossom honey) Product Bohemia (blossom honey, mixed, mixed blossom from the Czech-Moravian Highlands, blossom from the Czech-Moravian Highlands), Medokomerc (lime monoblossom, meadow, forest, meadow blossom, forest blossom) and Langnese (mixed honey - honeydew and blossom, from mountain blossom, fruit blossom, Mediterranean blossom).

The country of origin was declared as Czech Republic, mixture of honey from the EC and non-EC, and mixture of honey from the EC and mixture of non-EC honey. The samples are kept in their glass or plastic sales packaging at room temperature (25 ± 3 °C) and analyzed within seven months of purchase.

We determined basic physico-chemical parameters, like water content, electrical conductivity, titratable acidity, 5-HMF content, pH and diastase activity. These parameters were determined according to the methods described in the Harmonized methodology of the European Honey Commission (Bogdanov, 2009) and compared with the limits set out under current legislation.

Results and Discussion

The analysis revealed that six samples were not in compliance with the diastase activity limits according to Decree 76/2003 Coll. (min. 8 Schade units) and four samples did not comply with the decree with regard to HMF (40 mg/kg). Eight of the forty-six honey samples (17%) were non-compliant. However, when assessed according to the quality standards of the Czech Beekeepers Union 1/1999 an additional nineteen samples (a total of 52%) did not comply with the HMF limits (max. 20 mg / kg).

Table 1: Analysis of physico-chemical parameters of blossom honey from the Czech market.

Analyzed parameter	Water [%]	Electrical conductivity [mS/m]	Titratable acidity [meq/kg]	pH	Diastase activity [Schade units]	HMF [mg/kg]
Statistical function						
Average	17,60	30,61	14,28	4,07	11,17	22,67
SD	0,88	14,61	6,00	11,68	3,00	0,19
Median	17,60	25,65	13,00	4,05	10,82	20,07
MAX	19,80	77,17	36,00	4,45	18,53	55,31
MIN	15,60	13,20	4,00	2,05	5,55	3,71

Only six samples showed diastase activity below regulation limits. However, twenty-four other samples showed values of diastase activity at the lower limit of this legislation. In twenty-three samples HMF values were above the threshold set by the quality standards (ČSV 1/1999). It follows that these samples may not be in compliance with regulatory requirements over the entire period of minimum durability. These samples were very likely heated, which may have been during cross-border transport, but possibly also by Czech businesses in order to liquefy it.

Given the situation in the Czech market, it is important therefore to increase the frequency of inspections by supervisory authorities, with a particular focus on the content of HMF.

Conclusion

Honey sold in the Czech Republic is possibly being liquefied via excess heating, leading to increased HMF contents and decreased diastase activity. These results emphasize the need for more frequent inspections by supervisory authorities on honey available for sale in the Czech Republic. The inspections should focus on HMF content in the honey, given that a large quantity of honey does not originate in the Czech Republic.

Acknowledgements

This study was supported by the project IGA VFU Brno 214/2016/FVHE.

References

- BABACAN, S.; RAND, A.G. Characterization of honey amylase. *Journal of Food Sciences*. 2007, vol. 72, p. 50-55.
- BARTÁKOVÁ, K.; DRAČKOVÁ, M.; BORKOVCOVÁ, I.; VORLOVÁ, L. Impact of microwave heating on hydroxymethylfurfural content in Czech honeys. *Czech Journal of Food Sciences*. 2011, vol. 29, no. 4, p. 328–336.
- BOGDANOV, S. Harmonised methods of the international honey commission [online]. 2009. p. 1-63 [cit. 2015-10-26]. Dostupné z: www.ihc-platform.net/ihcmethods2009.pdf
- CODEX ALIMENTARIUS – Revised Codex Standard for honey - 2001 Codex stan. 12 – 1981, Rev. 1 (1987), Rev. 2 (2001), p. 1-8. Dostupné z: www.fao.org/docrep/012/i1400e/i1400e.pdf
- ČESKÝ SVAZ VČELARŮ Svazová norma ČESKÝ MED Norma jakosti ČSV 1/1999.
- FALLICO, B.; ZAPPALA', M.; ARENA, E.; VERNERA, A. Effects of conditioning on HMF content in unifloral honeys. *Food Chemistry*. 2004, vol. 85, p. 305–313.
- ISLAM, M.N.; KHALIL, M.I.; ISLAM, M.A.; GAN, S.H. Toxic compounds in honey. *Journal of Applied Toxicology*. 2014, vol. 34, no. 7, p. 733-742.
- MZe Vyhláška č. 76/2003 Sb., kterou se stanoví požadavky pro přírodní sladidla, med, cukrovinky, kakaový prášek a směsi kakaa s cukrem, čokoládu a čokoládové bonbony. *Sbírka zákonů*, 2003, část 32, p. 2470-2487.
- SAMBORSKA, K.; CZELEJEWSKA, M. The influence of thermal treatment and spray dryiny on the physicochemical properties of Polish honeys. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014, vol. 38, no. 1, p. 413-419.
- STÁTNI ZEMEDĚLSKÁ A POTRAVINÁŘSKÁ INSPEKCE Potraviny na pranýři [online]. [cit.2014-11-14]. Dostupné z: www.potravinynapranryri.cz
- TOSI, E.; CIAPPINI, M.; RE, E.; LUCERO, H. Honey thermal treatment effects on hydroxymethylfurfural content. *Food Chemistry*. 2002, vol. 77, p. 71–74.
- TOSI, E.A.; RE, E.; LUCERO, H.; BULACIO, L. Effect of honey high-temperature short-time heating on parameters related to quality, crystallisation phenomena and fungal inhibition. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* 2004, vol. 37, p. 669–678.
- TOSI, E.; MARTINET, R.; ORTEGA, M.; LUCERO, H.; RE, E. Honey diastase activity modified by heating. *Food Chemistry*. 2008, vol. 106, p. 883–887.
- TURHAN, I.; TETIK, N.; KARHAN, M.; GUREL, F.; REYHAN TAVUKCUOGLU, H. Quality of honeys influenced by thermal treatment. *LWT - Food Science and Technology*. 2008, vol. 41, p. 1396–1399.

Contact address: Blanka Zábrodská, Mgr., Dept. of Milk Hygiene and Technology, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, H13015@vfu.

Selected Nutritional Aspects of Processed Vegetable Products

Tauferová Alexandra, Tremlová Bohuslava

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

Summary

This work deals with selected nutritional aspects of processed vegetable products, namely with the content of dominant carotenoid pigments in these products and their antioxidant capacity. Carotenoid pigments lycopene and β -carotene were determined with the help of high-performance liquid chromatography. Antioxidant capacity was determined by DPPH assay. Analyses were performed on the set of 10 samples of processed vegetable products obtained from czech market. Our results are applicable for the eventual utilization in food databases, although they have shown that products of the same type may vary significantly in the carotenoid content that is related to the amount of vegetable raw material used in the production. The total antioxidant capacity of all samples varied from 368.08 to 421.55 $\mu\text{g/g TE}$.

Keywords: *processed vegetable products; carotenoid; lycopene; β -carotene; antioxidant capacity*

Introduction

Processed vegetable products are easily accessible, easy to store, they have relatively long shelf life and, in some consumer groups especially among children and elder consumers, they are better accepted than fresh vegetables because of their texture. Although vegetables are the main ingredient in these products, their nutritional value can differ significantly and therefore has to be monitored. This study is focused on the determination of the content of dominant carotenoids, related lipophilic antioxidant capacity and also hydrophilic antioxidant capacity that is mainly due to the presence of ascorbic acid and polyphenolic compounds.

Lycopene and β -carotene belong to dominant carotenoids in a typical human diet and consequently in human blood and tissues (Rao and Rao, 2007). Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 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). Lycopene exhibits a special ability to neutralize free radicals, almost twice as high as that of β -carotene (Shi and Le Maguer, 2000). Carrot (*Daucus carrot* L.) represents other important source of valuable biologically active antioxidant carotenoids, such as β -carotene which is the dominant carotenoid of carrot (Luciano *et al.*, 2009). Tomatoes and carrots are often processed into various types of vegetable products. The ability to quench free radicals belongs to important aspects of food nutritional quality, especially regarding the growing negative effects of the environment that are observable as the increased incidence of various civilization diseases.

Materials and Methods

10 samples of processed vegetable products were used for the analysis, namely 4 samples of puréed vegetable baby food and 6 samples of tomato ketchups. All samples have been opened just before the analysis.

Quantitative analysis of lycopene and β -carotene using HPLC/PDA

The content of lycopene and β -carotene was determined using the method of reversed phase high performance liquid chromatography with photodiode array detection (RP-HPLC/PDA). Carotenoids were detected at 470 nm, which is the absorption maximum of lycopene and at 455 nm, which is the absorption maximum of β -carotene. The quantification of carotenoids in samples was performed using the external standard method.

Extraction procedure

Each sample was extracted with diethylether : n-hexane (1 : 1) according to Aruna *et al.* (2009). During the work, some crucial conditions to reduce the oxidation risk and the isomerization of carotenoids were observed, especially subdued light, covering of the flasks containing the samples with aluminium foil, the fastest possible performance of individual steps and subsequently immediate analysis.

Determination of antioxidant capacity by DPPH (2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging method

The DPPH assay method is based on the reduction of DPPH, a stable free radical. The free radical DPPH with an odd electron gives a maximum absorption at 517 nm (purple colour). Antioxidants react with DPPH and as a consequence, DPPH is reduced to the DPPH-H and decolorization (yellow colour) occurs. The reaction is observed spectrophotometrically. Trolox was chosen as a standard antioxidant. The antioxidant capacity of each sample was quantified using the calibration curve.

Extraction procedure

Each sample was extracted with pure acetone (p.a.) to obtain lipophilic fraction and also with 50% ethanol (p.a.) to obtain hydrophilic fraction. The extraction proceeded for 30 min in the dark in an ultrasonic bath.

Results and Discussion

Table 1: Carotenoid content and antioxidant capacity of hydrophilic (HAOC) and lipophilic (LAOC) extracts obtained from samples of processed vegetable products expressed as fresh weight.

Sample	Carotenoids [µg/g]		AOC [µg/g TE]		
	βC	Lyc	LAOC	HAOC	TAOC
carrot purée	28.23 ± 0.26	ND	208.16 ± 1.75	199.10 ± 1.09	407.27 ± 1.18
carrot purée	6.53 ± 0.14	ND	196.26 ± 2.33	171.81 ± 47.01	368.08 ± 45.46
carrot with potatoes	5.22 ± 0.10	ND	221.21 ± 2.33	199.09 ± 1.92	420.30 ± 4.08
mixed vegetables	14.49 ± 0.25	ND	214.29 ± 1.57	184.80 ± 7.67	399.09 ± 6.54
tomato ketchup	ND	34.06 ± 0.36	206.68 ± 5.08	214.87 ± 1.79	421.55 ± 6.86
tomato ketchup	ND	26.30 ± 0.48	209.16 ± 2.26	208.42 ± 2.36	419.93 ± 3.32
tomato ketchup	ND	34.96 ± 1.56	197.18 ± 0,84	208.66 ± 2.47	405.84 ± 2.26
tomato ketchup	ND	115.67 ± 0.69	213.20 ± 1.80	174.04 ± 25.62	387.24 ± 27.19
tomato ketchup	ND	40.74 ± 1.08	214.74 ± 2.70	169.07 ± 1.88	383.81 ± 4.57
tomato ketchup	ND	19.97 ± 14.13	211.13 ± 2.58	208.35 ± 1.92	419.48 ± 0.91

*Values expressed as mean ± standard deviation obtained from 3 measurements per replicate.

Lyc = lycopene, βC = β-carotene, ND = not detectable, TE = trolox equivalents, TAOC = total antioxidant capacity.

Processing of vegetables leads to the changes in its antioxidant capacity. Losses of hydrophilic antioxidants during the whole process of tomato purée production were quantified by Georgé *et al.* (2011) and they make 43 percent decrease in polyphenols and 80 percent decrease in ascorbic acid content. Nevertheless, the participation of ascorbic acid on the antioxidant capacity of tomatoes is lower than 0.4 percent. On the other hand, the influence of thermal processing on the dominant substance contributing to the antioxidant properties of tomatoes and tomato products, that is lycopene, is positive. Biological accessibility and the content of lycopene both increase with the thermal processing (Dewanto *et al.*, 2002). Regarding carrots and β-carotene, even when thermal processing results in β-carotene loss by isomerization or degradation, the increase in β-carotene bioaccessibility is high enough to

transcend this negative effect. It can be concluded that thermal processing mostly increases also β -carotene bioaccessibility (Knockaert *et al.*, 2015).

Table 2: Carotenoid content and antioxidant capacity of fresh carrot, tomato and processed vegetable products (expressed as fresh weight) obtained from relevant studies.

Vegetable/Product	Carotenoids		AOC - total	
	β C	Lyc	LAOC	HAOC
Carrot (F)	-	-	77,59 – 377,94 $\mu\text{g/g TE}^a$	
Carrot (P)				
1	TC 1774 \pm 24 $\mu\text{g}/100 \text{ ml } \beta\text{CE}^b$		1631,9 \pm 37,5 $\mu\text{g/ml TE}^b$	
2	TC 203.3 to 324.9 $\mu\text{g/g } \beta\text{CE}^c$		about 500 $\mu\text{g/g TE}^c$	
3	TC 935.0 \pm 27.4 $\mu\text{g/g } \beta\text{CE}^d$		-	-
Tomato (F)	TC 10 mg/100 g ^e		-	-
	4.27 $\mu\text{g/g}^f$	5.14 mg/100 g ^f	about 934,83 $\mu\text{g/g TE}^f$	
Tomato (P)			45,05 $\mu\text{g/g TE}^f$	889,78 $\mu\text{g/g TE}^f$
4	369 \pm 20.0 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}^g$	1024 \pm 98.3 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}^g$	-	-
5	85.7 \pm 29.3 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}^g$	2782 \pm 653 $\mu\text{g}/100 \text{ ml}^g$	-	-
6	3.8 $\mu\text{g/g}^h$	5.6 $\mu\text{g/g}^h$	about 381 $\mu\text{g/g TE}^h$	
			79 $\mu\text{g/g TE}^h$	302 $\mu\text{g/g TE}^h$

Samples: F = fresh, P = processed; 1 = fresh carrot juice, 2= fresh-cut carrot product, 3 = thermally processed purée, 4 = fresh tomato juice, 5 = pasteurised tomato juice, 6 = tomato soup.

TC = total carotenoids, βCE = β -carotene equivalents.

Sources: a = Koley *et al.*, 2014; b = Martínez-Flores *et al.*, 2015; c = Du *et al.*, 2012; d = Patras *et al.*, 2009; e = Pernice *et al.*, 2010; f = Kaur *et al.*, 2013; g = Sánchez-Moreno *et al.*, 2006; h = Arnao *et al.*, 2001.

Conclusions

All of our samples of carrot containing baby food have contained significantly lower amounts of β -carotene than the amounts found both in fresh and processed carrot and also have reached lower total antioxidant capacity when compared with the data of processed carrots from other studies. As for tomato products represented by ketchups, our samples have contained significantly lower levels of lycopene and β -carotene than in fresh and pasteurised tomato juice, but our values were similar to the amounts of carotenoids found in tomato soup as shown in similar study. Also the value of antioxidant capacity of ketchups was comparable with the total antioxidant capacity of tomato soup. Our results are applicable for the eventual utilization in food databases, although they have shown that products of the same type may vary significantly in the carotenoid content that is related to the amount of vegetable raw material used in the production.

References

Literature is available on request at tauferovaa@vfu.cz.

Contact address: Alexandra Tauferova, Ing., Department of Plant Origin Foodstuffs Hygiene and Technology, FVHE UVPS Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42 Brno, tauferovaa@vfu.cz.

SEKCE 2

*Výživa, dietetika hospodářských zvířat
a hygiena vegetábilí*

Produkce zelené hmoty tří odrůd lupiny bílé

Production of Green Matter of Three Varieties of White Lupin

¹Sedláková Kateřina, ¹Straková Eva, ²Suchý Pavel, ²Kroupa Leo

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

Summary

The objective of the study was to compare the production ability of three varieties of white lupins (*Amiga*, *Dieta* and *Zulika*), grown at Nový Jičín university farm of the Veterinary and Pharmaceutical University Brno. Each variety was grown on the area of about 10 ha, under identical soil and climate conditions. Sampling of green matter was carried out random selection of 10 samples from the area of 1 m² of each variety. Sampling were made at 15 weeks of age stand when they were at the stage of fully developed green pods. In terms compared production per hectare, of individual varieties tested lupine white grown in the same soil and climatic conditions, we concluded that the highest production potential in the 15-week age showed a variety *Zulika*, in comparison with the variety *Diet* and *Amiga*. From a nutritional point of view, the variety *Zulika* we can assessed very positive, because it contained the green matter most of nitrogenous substances.

Keywords: white lupin; *Amiga*; *Dieta*; *Zulika*; production of green matter; chemical analysis

Úvod

Rod *Lupinus* zahrnuje asi 300 druhů jedno a víceletých bylin. Začátkem minulého století byly vyšlechtěny nové, tzv. „sladké“, druhy lupiny s nízkým obsahem alkaloidů (hořkých látek) a s vysokým obsahem bílkovin. To byl podnět pro obnovený zájem o její využití a lupina se stala zdrojem proteinů jak ve výživě lidí, tak ve výživě zvířat (Dijkstra et al., 2003). Lupina se ve 20. století tak stala součástí moderního zemědělství a potravinových systémů. V Evropě se pěstují především dva druhy *Lupinus luteus* a *L. albus*, v Austrálii *L. angustifolius* (Cowling et al., 1998). Šlechtění variet s pevnými lusky a variet s nízkým obsahem alkaloidů umožnilo, že se tyto druhy přestaly používat jako zelené hnojivo a zelená píce a staly se luštěninou sklizenou na semeno. Živinové složení semen lupiny je výjimečné, má vysoký obsah proteinů a rozpustné vlákniny a oproti obilninám, nízký obsah škrobu (Pettersson et al., 1997). *Lupinus albus*, *L. angustifolius* a *L. luteus* mají relativně nízký obsah oleje, v uvedeném pořadí 10, 6 a 5 %, lupiny neobsahují antinutriční faktory jako jsou inhibitory trypsinu a saponiny. V sušených semen v ČR povolených odrůd lupin (*Lupinus albus*, *L. angustifolius* a *L. luteus*), se jednotlivé obsahové látky v závislosti na odrůdě a klimatických podmínkách pohybují v poměrně širokém rozmezí (Suchý et al., 2006).

Materiál a metodika

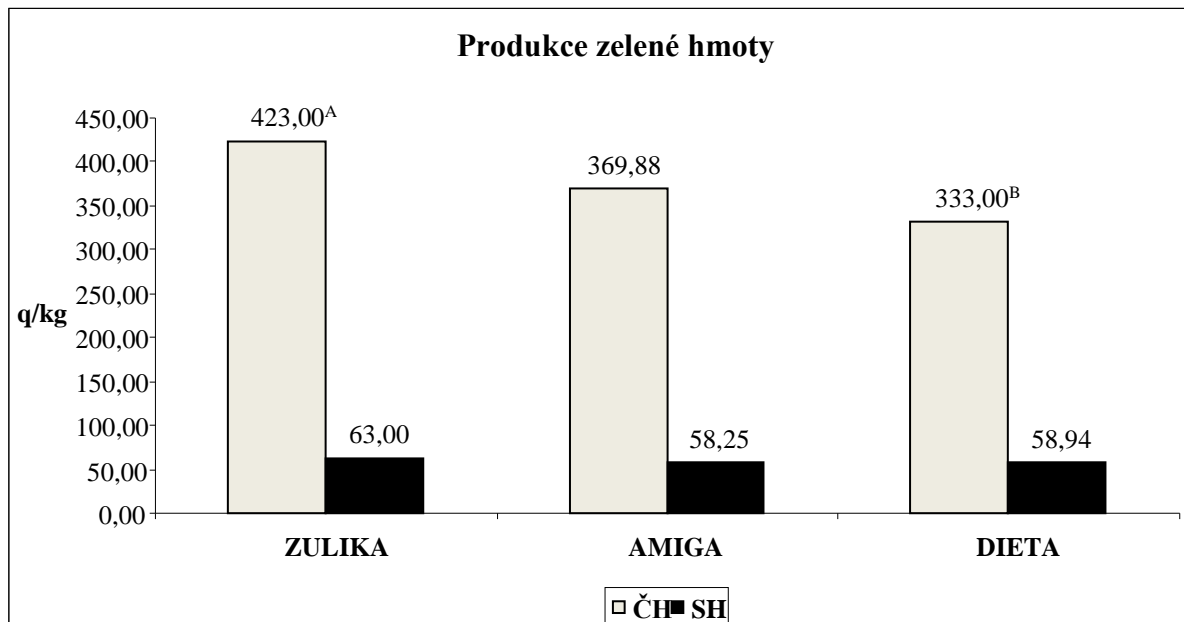
Cílem práce bylo srovnání produkční schopnosti tří odrůd ze skupiny bílých lupin ve stejných půdních a klimatických podmínkách ŠZP Nový Jičín v roce 2015. Do experimentu byly vybrány tři perspektivní odrůdy, a to odrůda *Dieta*, *Amiga* a *Zulika*. Každá z těchto odrůd byla pěstována na ploše 10 ha. Jednotlivé odrůdy byly zasety současně 11. 4. 2015 v množství 2 q/ha. Sklizeň všech tří odrůd byla realizována v termínu 28. 8. 2015. Odběr zelené hmoty byl realizován náhodným výběrem 10 vzorků z plochy 1 m² od každé odrůdy. Odběry byly provedeny v 15 týdnu stáří porostu, kdy byly porosty ve stádiu plně vyvinutých zelených lusků. V následujícím období se dále významně nezvyšoval objem porostu a následovalo zrání zelených lusků a sesychání zelené hmoty. Odebrané vzorky porostu byly následovně usušeny a homogenizovány pro analytické rozborů. V rámci chemické analýzy byly u odebraných vzorků semen stanoveny tyto uvedené živiny: sušina vysoušením vzorku při 105°

C do konstantní hmotnosti, dusíkaté látky metodou dle Kjeldahla analyzátozem Buchi (*firma Centec automatika, spol. s.r.o.*), tuk extrakcí petroletherem přístrojem ANKOM^{XT10} Fat Analyzer (*firma O.K. SERVIS BioPro*), hrubá vláknina a jednotlivé frakce (ADF, NDL, NDF) přístrojem ANKOM²²⁰ Fiber Analyzer (*firma O.K. SERVIS BioPro*), škrob byl stanoven polarimetricky, popel vážkově po zpopelnění vzorku při teplotě 550 °C za předepsaných podmínek, brutto energie (BE) kalorimetricky přístrojem AC 500 (*firma LECO*), bezdusíkaté látky výtažkové a organická hmota byly stanoveny výpočtem.

Dosažené výsledky byly zpracovány matematicko-statistickými metodami za použití statistického programu Unistat 5.6 for excel. Bylo provedeno vyhodnocení průměrných hodnot a jejich rozdílů mnohonásobným porovnáním pomocí testu Tukey-HSD, na hladině významnosti $P \leq 0,01$ a $P \leq 0,05$. Každý ukazatel je prezentován hodnotou průměru (\bar{x}) a směrodatnou odchylkou ($\pm SD$).

Výsledky a diskuze

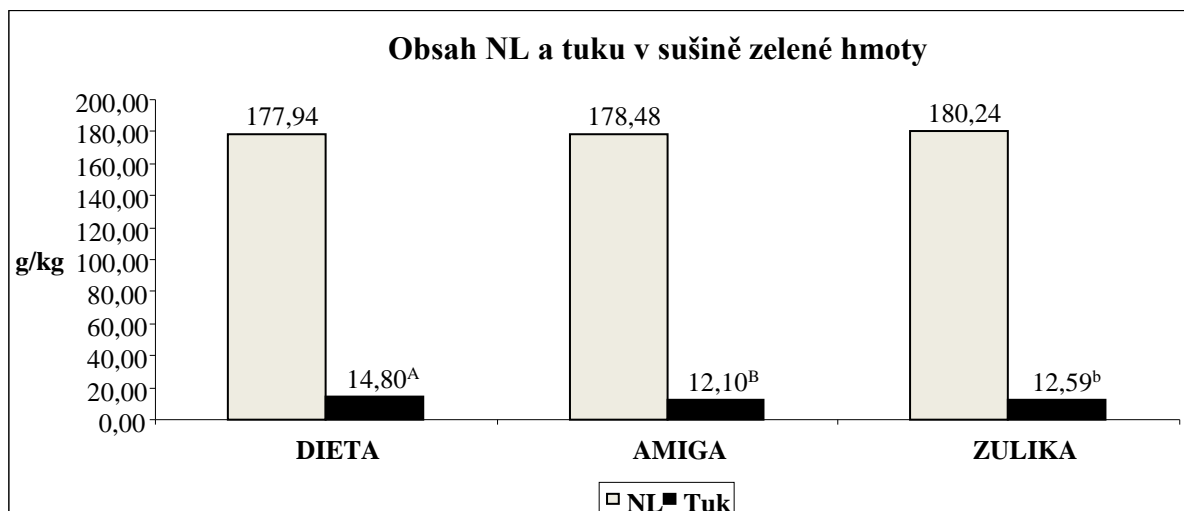
Průměrné hodnoty výnosů zelené hmoty (sušiny) v 15 týdnu stáří porostu naznačují, že nejproduktivnější odrůdou je Zulika 4,23 kg/m² (0,63 kg/m²), dále Amiga 3,70 kg/m² (0,58 kg/m²) a nejmenší produkci měla odrůda Dieta 3,33 kg/m² (0,59 kg/m²). V produkci zelené hmoty na 1 m² byla prokázána vysoce signifikantně vyšší průměrná hodnota u odrůdy Zulika ve srovnání s Dietou. U sušiny porostu tato průkaznost prokázána nebyla, je to dáno rozdílným obsahem vody v čerstvém porostu. Z výsledků průměrné produkce zelené hmoty (sušiny) jsme vypočítali hektarový výnos v zelené hmotě a sušině, jak uvádí graf 1. Při posouzení hektarového výnosu čerstvé zelené hmoty byla nejvyšší produkce u odrůdy Zulika, nižší u Amiga a nejnižší u Dieta. V hektarovém výnosu sušiny byla z testovaných odrůd nejproduktivnější Zulika.



Graf 1: Hektarové výnosy zelené hmoty v čerstvé hmotě (ČH) a sušině (SH) u tří testovaných odrůd lupiny bílé.

V předložené práci nás zajímala nejen kvantita produkce, ale i její kvalita, hodnocena na základě živinového složení sušiny zelené hmoty u testovaných odrůd. V grafu 2 je uveden obsah NL a tuku v sušině zelené hmoty u tří testovaných odrůd lupin. Mezi průměrnými hodnotami NL nebyly prokázány statisticky významné rozdíly mezi odrůdami, i přesto, že

odrůda Zulika vykazovala nejvyšší jejich obsah. Naopak u odrůdy Dieta byl prokázán statisticky signifikantně nejvyšší $P \leq 0,01$ obsah tuku ve srovnání s Amigou a Zulikou.



Graf 2: Průměrný obsah NL a tuku u tří testovaných odrůd bílých lupin (AB, CD vysoce průkazný rozdíl mezi průměrnými hodnotami $P \leq 0,01$).

Závěr

Z hlediska srovnání hektarové produkce jednotlivých testovaných odrůd lupiny bílé pěstovaných ve stejných půdních a klimatických podmínkách jsme dospěli k závěru, že nejvyšší produkční potenciál v 15 týdnu stáří porostu vykazovala odrůda Zulika, ve srovnání s odrůdou Dieta a Amiga. Odrůda Zulika na 1 ha vyprodukovala nejvíce: zelené hmoty v čerstvé i suché hmotě, dusíkatých látek, vlákniny a vlákninových frakcí, organické hmoty, popelovin a brutto energie. Rovněž z výživářského hlediska lze odrůdu Zulika hodnotit velmi kladně, protože obsahovala v zelené hmotě i nejvíce dusíkatých látek.

Poděkování

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

Literatura

COWLING, W.A.; HUYGHE, C.; SWIECICKI W. Lupin breeding. In: GLADSTONES, J.S.; ATKINS, C.A.; HAMBLIN, J. (Eds.): Lupins as crop plants: Biology, production and utilization. CAB International, Oxon, UK, 1998, p. 93-120.

DIJKSTRA, D.S.; LINNEMANN, A.R.; VAN BOCKEL, T.A. Towards sustainable production of protein-rich foods: Appraisal of eight for Western Europe. PART II: Analysis of the technological aspects of the production chain. Crit Rev Food Nutr 43, 2003: p. 481 – 506.

PETTERSON, D.S.; SIPSAS, S.; MACINTOSH, J.B. The chemical composition and nutritive value of Australian pulses, Greins Research and Development Corporation, Canberra, Australia, 1997, 68 p.

SUCHÝ, P.; STRAKOVÁ, E.; HERZIG, I. Nutriční a dietetická hodnota tuzemských proteinových krmiv jako alternativa sóji a sójových produktů. Část I – Lupina. Výzkumný ústav živočišné výroby Praha-Uhřetěves, Vědecký výbor výživy zvířat, 2006, 54 s.

Kontaktní adresa: Kateřina Sedláková, Mgr., Ústav výživy zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H14012@vfu.cz.

Zařazení lupiny bílé do diet pro rostoucí zakrslé králíky

The Inclusion of White Lupine Seeds in Diets for Growing Dwarf Rabbits

¹ Šimek Vlastimil, ¹ Zapletal David, ¹ Suchý Pavel, ¹ Kroupa Leo, ² Straková Eva

¹ Ústav zootechniky a zoohygiény, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

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

Summary

The aim of this study was to evaluate the growth of the dwarf rabbits in relation to the different diets. The study was conducted on a total of 39 rabbits belong to the Dwarf Lop breed. These animals were divided into two groups. The control group received a foreign commercial diet for dwarf rabbits till the end of the experimental period. The experimental group received two specific types of the experimental diet in relation to the age. These two types of the experimental diets contained a lupine seed. The first type of the experimental diet was used from birth to the 7th week of age. Subsequently, the weaned rabbits received the second diet from 8th week till the 15th week of age. The kits from the experimental group showed a higher live weight (LW) at the 3rd week of age ($P > 0,05$). The rabbits from the experimental group showed a lower LW from the 5th week to the 7th week of age ($P < 0,05$) and also at the 9th week of age ($P < 0,01$). The LW of rabbits in the experimental group increased from the 11th week of age. At the 13th week and 15th week of age, the experimental rabbits showed a higher LW than those in the control group ($P > 0,05$). The obtained findings indicate that the white lupine seed can be the suitable component in the diets for dwarf rabbits. Regarding the optimization of the dwarf rabbit growth, there is need to perform further extended studies.

Keywords: dwarf rabbit; growth; lupine seed

Úvod

Chov zakrslých králíků jako společenských zvířat se v nedávné době velmi rozšířil (González-Redondo a Contreras-Chacón, 2012). Tento zájem chovatelů vyústil v souběžný rozvoj králíčí medicíny, technik chovu i výživy. U krmení zakrslých králíků by měl být respektován především dobrý zdravotní stav a další specifity jejich mimoprodukčního využití (Proença a Mayer, 2014). Studie u masných králíků prokázaly, že lupina bílá může být vhodnou surovinou v krmných směsích (Uhlířová *et al.*, 2015). Vliv zařazení semen lupiny bílé nebyl doposud sledován u genofondu zakrslých králíků. Cílem této studie je tedy zhodnocení využití lupiny bílé v dietě pro zakrslé králíky.

Materiál a metody

Studie byla provedena na celkem 39 králíciích plemene zakrslý beran. Všichni králíci pocházeli ze zájmového chovu. Králíci byli rozděleni do 2 skupin. Kontrolní skupina po celou dobu přijímala kompletní dietu pro zakrslé králíky zahraniční provenience. Experimentální skupina byla krmena kompletní dietou, navrženou pro účely této studie, splňující obecné nutriční předpoklady. Do 7. týdne věku tyto mladí králíci byli krmeni společnou dietou s králíci. Od 8. do 15. týdne věku králíci přijímali druhý typ experimentální diety. V obou experimentálních dietách byla významně zastoupena lupina bílá. Králíci v obou skupinách byli krmeni jednou denně dietou, přičemž měli neomezený přístup k pitné vodě. Luční seno bylo předkládáno třikrát týdně. Individuální hmotnost mladých králíků byla poprvé zaznamenána v 21 dnech. Následně probíhalo vážení v intervalu 14 dní, až do 105. dne věku. Výsledky byly zpracovány v programu STATISTICA CZ. Z dosažených hmotností byly vypočteny průměrné denní přírůstky (ADG). Skupiny byly mezi sebou testovány pomocí Tuckeyova HSD testu. Statisticky významný rozdíl je dále v textu uveden jako $P < 0,05$ (*).

Výsledky a diskuse

Výsledky průměrných denních hmotnostních přírůstků mláďat zakrslých králíků a jejich průměrné živé hmotnosti jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. V období prvních 21 dní života králíčat byl průměrný denní přírůstek neprůkazně vyšší u pokusné skupiny vůči kontrolní skupině ($P > 0,05$). V období od 22. do 35. dne byl ADG průkazně vyšší u kontrolní skupiny. Hmotnost mláďat v 35. dni věku byla v kontrolní skupině průkazně vyšší ($P < 0,05$). Rovněž při vážení mláďat v 49. dnu věku byla živá hmotnost mláďat v kontrolní skupině průkazně vyšší ($P < 0,05$), avšak ADG se v období 36. – 49. dne věku statisticky významně nelišil ($P > 0,05$). Obdobný byl výsledek ADG mezi 50. a 63. dnem věku. V období mezi 64. a 77. dnem věku vykazovala experimentální skupina průkazně vyšší přírůstek než kontrolní skupina. Patrně i to s sebou neslo fakt, že při vážení v 77. dni věku již nebyl zaznamenán průkazný rozdíl v živé hmotnosti mláďat z kontrolní a experimentální skupiny. Mezi 78. – 91. dnem věku byl ADG v experimentální skupině neprůkazně vyšší oproti kontrole. Živá hmotnost mláďat z experimentální skupiny byla 91. den věku neprůkazně vyšší oproti kontrolní skupině. Mezi 92. – 105. dnem věku byl sice ADG experimentální skupiny nižší, avšak živá hmotnost králíků v experimentální skupině ve 105. dnu věku byla vyšší ($P > 0,05$). Na konci sledování tak králíci z kontrolní skupiny dosáhli poněkud nižší živé hmotnosti (1080,9 g) než jedinci v experimentální skupině (1106,0 g). V obou případech byla zaznamenána mírně odlišná hmotnost ve srovnání se standardem plemene (Zadina, 2003), což potvrzuje majoritní vliv výživy na růstové charakteristiky.

Tabulka 1: Průměrný denní přírůstek u rostoucích zakrslých králíků.

Věk (dny)	Dieta				P
	Kontrolní		Experimentální		
	x	SEM	x	SEM	
1-21	7,94	1,18	9,09	2,38	NS
22-35	16,63	1,17	9,44	2,47	*
36-49	10,04	0,63	11,35	1,14	NS
50-63	12,48	1,10	9,84	3,49	NS
64-77	4,90	1,35	11,49	2,34	*
78-91	5,50	5,02	8,13	3,15	NS
92-105	18,11	3,05	11,83	1,75	NS

x – aritmetický průměr, SEM – střední chyba průměru, *: $P < 0,05$

Tabulka 2: Průměrná živá hmotnost u rostoucích zakrslých králíků.

Věk (dny)	Dieta				P
	Kontrolní		Experimentální		
	x	SEM	x	SEM	
21	188,75	20,54	194,40	39,62	NS
35	420,17	29,28	335,08	51,9	*
49	563,60	30,60	484,2	60,1	*
63	736,40	38,8	570,5	112,4	**
77	799,00	36,40	740,40	125,80	NS
91	821,70	77,40	921,20	126,40	NS
105	1080,9	85,20	1106,00	118,80	NS

x – aritmetický průměr, SEM – střední chyba průměru, **: $P < 0,01$, *: $P < 0,05$

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že živá hmotnost mláďat zakrslých králíků a průměrný denní přírůstek byly statisticky významně ovlivněny typem diety. Průměrné denní přírůstky u experimentální skupiny vykazovaly větší vyrovnanost v celém sledovaném období. Výsledky naší práce ukázaly, že lupina bílá může být vhodnou komponentou v dietách pro zakrslé králíky. Pro optimalizaci růstu u těchto zakrslých králíků bude potřeba provedení ještě dalších studií.

Poděkování

Práce vznikla za podpory institucionálních prostředků Ústavu zootechniky a zoohygieny a Ústavu výživy zvířat FVHE VFU Brno.

Literatura

GONZÁLEZ-REDONDO, P.; CONTRERAS-CHACÓN, G.M. Perceptions among university students in Seville (Spain) of the rabbit as livestock and as companion animal. *World Rabbit Sci.* 2012, vol. 20, no. 3, s. 155-162.

PROENCA, L.M.; MAYER, J. Prescription diets for rabbits. *Vet Clin Exot Anim.* 2014, vol. 17, s. 485-502.

UHLÍŘOVÁ, L.; VOLEK, Z.; MAROUNEK, M.; TŮMOVÁ, E. Effect of feed restriction and different crude protein sources on the performance, health status and carcass traits of growing rabbits. *World Rabbit Sci.* 2015, vol. 23, no. 4, s. 263-272.

ZADINA, J. *Vzorník plemen králíků*. 2003. Český svaz chovatelů, Brno, Czech Republic. 371 s.

Kontaktní adresa: Vlastimil Šimek, MVDr., Ústav zootechniky a zoohygieny, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, simekv@vfu.cz.

Quality of Muscle of Selected Cattle Breeds for Meat

¹Vopálenský Josef, ¹Suchý Pavel, ²Straková Eva

¹ Institute of Zootechnology and Zoohygiene, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno

² Institute of Animal nutrition, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences in Brno

Summary

Beef production is affected by breed and utilisation type selection. The relevant breeds are those specially bred for meat and combined utilisation types with prevailing use for meat production. Intensity of utilisation of individual cattle breeds depends on the area, mainly characterised by proportion and usability of meadows and pastures and breeding conditions. Quality beef with specific sensory properties may also be produced by breeds with primary purpose of landscape improvement and protection (Galloway, Scottish mountain cattle etc.). The purpose of the present study was assessment of nutritional value of muscle of selected cattle breeds for meat on the basis of in-house performed analyses. The selected cattle breeds were subject to extensive pasture-based breeding. The animals came from pastures in the Šumava mountains in the surroundings of the town of Volary. The cattle were fed by grass with clover proportion. Ten muscle samples were obtained from every breed from the “high beefsteak” section. The muscle samples came from bulls and were declared as “beef meat”.

Keywords: beef; nutritional value

Introduction

Beef production is affected by breed and utilisation type selection. The most relevant breeds are those specially bred for meat and combined utilisation types with prevailing use for meat production. Intensity of utilisation of individual cattle breeds depends on the area where they are bred, mainly characterised by proportion and usability of meadows and pastures and breeding conditions. Quality beef with specific sensory properties may also be produced by breeds with primary purpose of landscape improvement and protection. These are breeds originally intended to be bred in prevalently extensive breeding conditions. Some examples may be Galloway or Scottish mountain cattle.

Purpose

The purpose of the present study was assessment of nutritional value of muscle of selected cattle breeds for meat on the basis of in-house performed analyses. The selected cattle breeds were subject to extensive pasture-based breeding. The study population included selected breeds for meat production, namely *Aberdeen Angus*, *Blonde D'aquitaine*, *České strakaté*, *Galloway*, *Charolais*, *Gasconne*, *Limousine*, *Masný simentál* and *Salers*.

Materials and Methods

The selected cattle breeds for meat production were subject to extensive pasture-based breeding. The animals came from pastures in the Šumava mountains in the surroundings of the town of Volary. The cattle were fed by grass. Monitoring of grass dynamics during the vegetation period was published in the context of the DSP conference last year. Ten muscle samples were obtained from every breed from the “high beefsteak” section. The muscle samples came from bulls of the studied breeds at the age of 16 – 18 months. The samples were taken by ZEFA Volary. The company offers certified original products branded “Šumava – originální produkt[®]” [Šumava Mountains – Original Product]. The company guarantees production from breeds fed at Šumava mountain pastures with transparent meat origin.

The muscle samples were homogenised and monitored for humidity by drying under defined conditions and weighing. Protein was expressed as nitrogen multiplied by coefficient 6.25. Nitrogen was specified in Buchi analyser (*made by Centec automatika, spol. s.r.o.*). Fat was measured by ANKOM^{XT10} Fat Analyzer (*made by O.K. SERVIS BioPro*), and gross energy (BE) was determined by calorimetric process in AC 500 (*made by LECO s.r.o., Plzeň*) by burning in the calorimetric bottle under oxygen pressure. Studied macro elements included calcium, phosphorus and magnesium. The results were processed by Unistat CZ statistical software, version 5.6 for Excel, were mean values and their differences were analysed by multiple comparison by Tukey – HSD test, with statistical significance levels $P \leq 0.01$ and $P \leq 0.05$.

Results

Mean values: dry matter, nitrogen substances, fat, Ca, P, Mg (g/kg), BE (MJ/kg), of 10 muscle samples (“high beefsteak” section) in selected cattle breeds for meat (*Aberdeen Angus, Blonde D'aquitaine, České strakaté, Galloway, Charolais, Gasconne, Limousine, Masný simentál, Salers*), taken in bulls of the given breeds at the age of 16 – 18 months, including statistical characteristics (SD – standard deviation, P – statistical significance) are shown in Table 1 below.

Table 1: Mean values: dry matter, nitrogen substances, fat, Ca, P, Mg (g/kg), BE (MJ/kg), of 10 muscle samples (“high beefsteak” section) in selected cattle breeds for meat (*Aberdeen Angus, Blonde D'aquitaine, České strakaté, Galloway, Charolais, Gasconne, Limousine, Masný simentál, Salers*), taken in bulls of the given breeds at the age of 16 – 18 months, including statistical characteristics (SD – standard deviation, P – statistical significance).

Breed	Gall	Lim	ČS	Sal	Cha	Gas	MS	BA	AA
Dry matter (g/kg)	245.21^A	251.10^C	261.77	267.51^b	267.95^b	269.74^b	271.53^B	277.27^{B,D}	277.56^{B,D}
SD	17.648	13.269	12.056	23.968	14.861	8.378	7.753	22.275	11.630
Breed	AA	BA	Sal	MS	Cha	Gall	Gas	ČS	Lim
NL (g/kg)	791.06^A	821.99^C	835.68	849.44	858.11	858.94	868.29^b	868.76^b	897.57^{B,d}
SD	45.835	72.069	60.595	25.795	57.657	42.621	25.091	47.017	60.361
Breed	Gall	Lim	ČS	Cha	Gas	Sal	MS	BA	AA
Fat (g/kg)	68.50^A	80.44^C	102.99	107.49	108.81	118.86	129.70	145.00^b	171.61^{B,d}
SD	18.812	59.111	41.168	58.144	23.578	58.285	30.311	81.066	43.301
Breed	Sal	Gall	Lim	AA	Gas	Cha	MS	BA	ČS
Ca (g/kg)	0.83^A	1.02^C	1.08^E	1.09	1.11^b	1.24^B	1.28^B	1.30^B	1.36^{B,D,f}
SD	0.337	0.245	0.202	0.123	0.034	0.176	0.161	0.155	0.168
Breed	BA	MS	AA	Sal	ČS	Gas	Gall	Lim	Cha
P (g/kg)	6.65	6.87	6.96	7.09	7.14	7.18	7.54	7.55	7.71
SD	1.187	0.385	0.500	0.968	0.931	0.302	0.714	0.867	0.891
Breed	AA	BA	MS	Lim	Cha	ČS	Gas	Sal	Gall
Mg (g/kg)	0.48^A	0.63^C	0.63^E	0.64^{G,Ch}	0.72^J	0.72^J	0.74	0.97^{B,D,F,i}	1.02^{A,D,F,H,k,m}
SD	0.079	0.134	0.186	0.199	0.096	0.104	0.023	0.272	0.435
Breed	Gall	Lim	Cha	ČS	Gas	Sal	MS	BA	AA
BE (MJ/kg)	23.20^A	23.52^C	23.92^E	24.00	24.01	24.03	24.37	24.57^b	25.16^{B,D,f}
SD	0.332	0.955	0.896	0.806	0.514	0.968	0.628	1.365	0.673

The dry matter values measured by us are statistically highly significantly ($P \leq 0.01$) higher in the cattle breed for meat *Aberdeen Angus* when compared to *Galloway*, in *Blonde D'aquitaine* when compared to *Galloway*, in *Masný simentál* when compared to *Galloway*, in *Aberdeen Angus* when compared to *Limousine*, and in *Blonde D'aquitaine* when compared to *Limousine*. The dry matter values are statistically significantly ($P \leq 0.05$) higher in the cattle

breed for meat *Gasconne* when compared to *Galloway*, in *Charolais* when compared to *Galloway*, and in *Salers* when compared to *Galloway*.

The obtained values of nitrogen substances (NL) are statistically highly significantly ($P \leq 0.01$) higher in the cattle breed for meat *Limousine* when compared to *Aberdeen*. Nitrogen substance values are statistically significantly ($P \leq 0.05$) higher in the cattle breed for meat *České strakaté* when compared to *Aberdeen Angus*, in *Gasconne* when compared to *Aberdeen Angus*, and in *Limousine* when compared to *Blonde D'aquitaine*.

The fat values are statistically highly significantly ($P \leq 0.01$) higher in the cattle breed for meat *Aberdeen Angus* when compared to *Galloway*, and in *Aberdeen Angus* when compared to *Limousine*. The fat values are statistically significantly ($P \leq 0.05$) higher in the cattle breed for meat *Blonde D'aquitaine* when compared to *Galloway*. Also the differences in values of Ca, P, Mg (g/kg), BE (MJ/kg) in some cattle breeds for meat are statistically highly significant ($P \leq 0.01$) or significant ($P \leq 0.05$).

Discussion

The present study aimed at assessment of nutritional values of muscle by in-house analyses (of dry matter, NL, fat, Ca, P, Mg, BE) in selected cattle breeds for meat (*Aberdeen Angus*, *Blonde D'aquitaine*, *České strakaté*, *Galloway*, *Charolais*, *Gasconne*, *Limousine*, *Masný simentál* and *Salers*) bred on pastures by extensive breeding methods. Bureš (2010) reports that the most significant features characterising chemical composition of meat include dry matter content, protein and fat levels or potentially also ligament proportion or fatty acid content.

For example the study entitled *Vliv užitkového typu volů na kvalitativní parametry jatečně upraveného těla a hovézího masa [Effect of usability type of bulls on qualitative parameters of carcass and beef]*, published in *Maso 2/2015* by Dráčková (2015) deals with comparison of crossbreed of *České strakaté* cattle and *Galloway* breed and *České strakaté* cattle with *Charolais* breed. Bureš (2010) also reports that a number of literature references confirm that qualitative parameters of meat are significantly affected by the animal breed.

Conclusion

The present study assessed nutritional value of muscle of selected cattle breeds for meat on the basis of in-house performed analyses. The compared values included dry matter content, nitrogen substances (NL), fat, calcium (Ca), phosphorus (P), magnesium (Mg) and gross energy (BE) and the compared cattle breeds included *Aberdeen Angus*, *Blonde D'aquitaine*, *České strakaté*, *Galloway*, *Charolais*, *Gasconne*, *Limousine*, *Masný simentál* and *Salers*. The selected cattle breeds were bred by extensive pasturing methods on pastures in the Šumava mountains in the surroundings of the town of Volary. The results reveal statistically highly significant ($P \leq 0.01$) or statistically significant ($P \leq 0.05$) differences in the selected nutritional values of muscle between some of the studied cattle breeds for meat.

References

- BUREŠ, Daniel a Luděk BARTOŇ. *Využití masných plemen chovaných v ČR pro křížení a produkci jatečného skotu: certifikovaná metodika*. Praha: Výzkumný ústav živočišné výroby, 2010. ISBN 978-80-7403-070-3.
- DRÁČKOVÁ, E., ŠUBRT, J., FILIPČÍK, R. *Vliv užitkového typu volů na kvalitativní parametry jatečně upraveného těla a hovézího masa; Maso: odborný časopis pro výrobce, zpracovatele a prodejce masa, masných výrobků a lahůdek*. Praha: České a slovenské odborné nakladatelství, 2015, XXVI., č. 2. ISSN 1210-4086.

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

Addition of Sea Buckthorn Pellets in Diets for Laying Hens and Their Influence on Amount of Fatty Acids in Egg Yolk

¹Krejcarová Jana, ¹Straková Eva, ²Suchý Pavel

¹*Department of Animal Nutrition, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

²*Department of Animal Husbandry and Animal Hygiene, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno*

Summary

The aim of this study was to find out the effect of sea buckthorn pellets, which were added to the feed mixture for laying hens. Sea buckthorn pellets are formed as a waste product during obtaining the juice from the sea buckthorn fruits. These pellets are rich in nutrients and bioactive compounds. We tried to use these pellets as a potential source of fatty acids (FA) in egg yolk. 1 kg of pellets contained (results are in 100% dry matter): 212.7 g of crude protein, 145.8 g of crude fat, 177.6 g of crude fiber, 442.1 g of nitrogen-free extract substances and 21.7 g of ash. 100 g of sea buckthorn oil contained: 61.69 g of FA, 14.14 g of saturated fatty acids (SFA), 47.55 g of unsaturated fatty acids (UFA), 22.49 g of monounsaturated fatty acids (MUFA), 13.63 g of n-6 FA and 11.43 g of n-3 FA. 32 laying hens were included in this study. Laying hens were kept in enriched cages. Four groups were created - 1 control group (without supplement of pellets) and 3 experimental groups (with 2, 5, 10% supplement of pellets). Length of experiment was 4 weeks. Every week 40 eggs of each group were collected. The results show that addition of sea buckthorn pellets in feed mixture for laying hens has favourable effect on amount of FA in egg yolk (higher amount of SFA, MUFA and n-3 FA). The amount of FA was determined by gas chromatography. The results show that supplement of sea buckthorn pellets in feed mixture for laying hens highly significantly increased ($P \leq 0.01$) quantity of FA in egg yolks.

Keywords: *Hippophae rhamnoides*; fruit pellets; chemical composition; n-3 fatty acids; n-6 fatty acids; feed mixture for laying hens

Introduction

Common sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) belongs to the family *Elaeagnaceae*. It is dioecious tree or shrub with rigid thorns, which reaches a height of 3 to 4 m (Li and Beveridge, 2003). Its natural habitat is in areas of northwest Europe and Central Asia (Suryakumar and Gupta, 2011). Its fruits are small and have oval or round shape. Ripe berries have a colour from yellow to reddish. Sea buckthorn fruits have a look of drupe. Berries are very juicy and rich in oil content. The dark green coloured leaves have trichomes on their surface. The leaves are narrow, lanceolate and they have alternating arrangement (Li and Beveridge, 2003; Suryakumar and Gupta, 2011). Whole plant contains very valuable bioactive compounds, but especially sea buckthorn fruits. Sea buckthorn is great source of natural antioxidants (main sea buckthorn antioxidants are ascorbic acid, tocopherols, carotenoids and flavonoids). They are also rich in proteins, lipids, vitamins (sea buckthorn fruits have very high amount of vitamin C) and mineral substances (Christaki, 2012). UFA are the most abundant FA in sea buckthorn. Linoleic acid (18:2n6) and α -linolenic acid (18:3n3) are the highest represented FA in oil which was obtained from sea buckthorn seeds. Palmitoleic acid (16:1n7) dominates in oil, which was obtained from whole sea buckthorn fruits (Yang and Kallio, 2001). Sea buckthorn is rich source of other essential FA from the group of n-3 FA, n-6 FA, n-7 FA and n-9 FA (Solcan et al., 2012). Sea buckthorn is often used in human nutrition. Sea buckthorn found its application also in animal nutrition. Sea buckthorn is used for its big number of positive effects on health of organisms.

Material and Methods

This work was based on requirements of sea buckthorn growers, who cultivate sea buckthorn for obtaining juice of its fruits. During obtaining of juice from sea buckthorn berries waste products are formed, they are called the pellets. We tried to find a use for them. We tried to use them in the field of animal nutrition. During harvesting of 1 ha area 1,500 l of sea buckthorn juice is obtained and around 570 kg of sea buckthorn waste products are formed.

The study was carried out on laying hens Isa Brown. 32 laying hens were included in the experiment. 4 groups of laying hens were created - it was created 1 control group (K) and 3 experimental groups (P1, P2 and P3). Laying hens were kept in enriched cages with controlled light, thermal, zoohygienic and feed-technological mode. Laying hens of control group were feed by feed mixture without addition of sea buckthorn pellets. Laying hens of experimental groups received feed mixture with addition of sea buckthorn pellets (group P1 received 2% addition, group P2 received 5% addition and P3 received 10% addition). Length of this study was 4 weeks. Every week 40 eggs from each group were taken. Over the course of the experiment 160 eggs of each group were obtained.

Chemical analysis included determining the content of individual FA in sea buckthorn oil. By chemical analysis of sea buckthorn were detected these SFA: C12:0, C14:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0 and C22:0, these MUFA: C16:1, C17:1, C18:1, C20:1 and C22:1, these FA of group n-6 FA: C18:2n6, C18:3n6, C20:2n6 and C22:2n6 and these FA of group n-3 FA: C18:3n3, C20:5n3 and C22:6n3. Within chemical analysis of fat in egg yolk was determined amount of FA, UFA, MUFA, polyunsaturated fatty acids (PUFA) and FA from group n-6 and n-3 FA. Amount of individual FA in sea buckthorn pellets and content of FA in egg yolks were determined by gas chromatography.

Results and Discussion

Chemical analysis of sea buckthorn pellets shows that sea buckthorn pellets are also very rich in nutrient content. 1 kg of sea buckthorn pellets contained (results are presented in 100% dry matter): 212.7 g of crude protein, 145.8 g of crude fat, 177.6 g of crude fiber, 442.1 g of nitrogen-free extract substances and 21.7 g of ash.

During chemical analysis of sea buckthorn oil was detected amount of individual FA. Results of fat qualitative analysis confirm that oil obtained from sea buckthorn pellets has very interesting composition of individual FA. 100 g of sea buckthorn oil contained: 61.69 g of FA, 14.14 g of SFA, 47.55 g of UFA, 22.49 g of MUFA, 13.63 g of n-6 FA and 11.43 g of n-3 FA. Sea buckthorn oil has comparatively low amount of SFA. Palmitic acid (C16:0) is the most dominant SFA (12.420 g/100 g sea buckthorn oil). Stearic acid (C18:0) is also very important SFA, which was determined in sea buckthorn oil (1.220 g/100 g sea buckthorn oil). Other SFA are represented in very low quantity or they were not detected at all. For sea buckthorn oil is typical especially high amount of MUFA. Sea buckthorn oil has high content of palmitoleic acid (C16:1) (11.320 g/100 g sea buckthorn oil). High quantity of palmitoleic acid is characteristic for sea buckthorn oil unlike other vegetable oils. Oleic/elaidic acid (C18:1n9t + C18:1n9c) is also represented in high quantity in sea buckthorn oil (11.030 g/100 g sea buckthorn oil). Other MUFA are represented in the footsteps, or they are not present in sea buckthorn oil at all. Sea buckthorn oil is very good source of PUFA of group n-6 FA. Linoleic/linolelaidic acid (C18:2n6c + C18:2n6t) is dominant acid of n-6 FA (13.140 g/100 g sea buckthorn oil), other FA of this group are contained only in small amount or they are not included. Sea buckthorn is suitable source of PUFA of group n-3 FA. Linoleic acid (C18:3n3) is represented in the highest amount of n-3 FA (11.370 g/100 g sea buckthorn oil). Other FA from group of n-3 FA are represented only in low amount or they are absent. Chemical analysis of fat in egg yolk contained assessment of amount of FA, quantity of SFA

and UFA and ratio between UFA and SFA, amount of MUFA, PUFA, ratio between MUFA and PUFA, representation of n-3 FA, n-6 FA and ratio between n-6 FA and n-3 FA. The results demonstrate that there were changes in some of observed parameters of fat in egg yolk. The amount of FA were higher in egg yolks of laying hens in experimental groups in compared with the control group of laying hens. We found an increase in amount of FA, SFA, MUFA and n-3 FA in experimental groups. These changes and their statistical difference are presented in Table 1 and Table 2.

Table 1: Results of amount of FA, SFA and UFA in egg yolk and ratio between UFA and SFA.

	Σ FA (g/100 g of fat)	SFA (g/100 g of fat)	UFA (g/100 g of fat)	UFA/SFA
K	75.687	25.462 ^A	50.225	1.976 ^A
P1	75.641	25.687	49.955	1.946
P2	76.139	26.508 ^B	49.632	1.874 ^B
P3	76.073	26.325 ^B	49.749	1.895 ^B

^{A,B} a highly significant difference ($P \leq 0.01$)

Table 2: Results of amount of MUFA and PUFA in egg yolk, ratio between MUFA and PUFA, amount of n-3 FA and n-6 FA in egg yolk and their mutual ratio.

	MUFA (g/100 g of fat)	PUFA (g/100 g of fat)	MUFA/PUFA	n-6 FA (g/100 g of fat)	n-3 FA (g/100 g of fat)	n-6 FA/n-3 FA
K	37.538 ^A	12.688 ^A	2.973 ^A	11.603 ^A	1.085	14.859
P1	38.817 ^B	11.138 ^B	3.514 ^B	10.042 ^B	1.096	13.185
P2	39.091 ^B	10.541 ^B	3.808 ^B	9.372 ^B	1.169	11.677
P3	38.256	11.493 ^B	3.415 ^B	10.298 ^B	1.195	13.917

^{A,B} a highly significant difference ($P \leq 0.01$)

Conclusion

The results of experiment confirm that sea buckthorn pellets can be used as a component in feed mixture for laying hens. They can be used especially for these effects: unique FA composition of sea buckthorn oil, favourable effect on amount of FA, SFA, MUFA, n-3 FA in egg yolk.

Acknowledgement

The project was supported by the Internal Grant Agency VFU Brno. Grant No. 1/2014/FVHE.

References

- CHRISTAKI, E. *Hippophae rhamnoides* L. (sea buckthorn): a potential source of nutraceuticals. *Food and Public Health*. 2012, vol. 2, no. 3, p. 69-72.
- LI, T.S.C.; BEVERIDGE T.H.J. *Sea buckthorn (Hippophae rhamnoides L.): Production and utilization*. Ottawa: NRC Research Press, 2003. 133 s. ISBN 0-660-19007-9.
- SOLCAN, C.; GORU, M.; FLORISTEAN, V.; OPRISAN, B; SOLCAN, G. The hepatoprotective effect of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides*) berries on induced aflatoxin B1 poisoning in chickens. *Poultry science*. 2013, vol. 92, p. 966-974.
- SURYAKUMAR, G.; GUPTA, A. Medicinal and therapeutic potential of Sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 2011, vol. 138, p. 268-278.
- YANG, B.; KALLIO, H.P. Fatty acid composition of lipids in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) berries of different origins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, vol. 49, p. 1939–1947.

Contact address: Jana Krejcarová, MVDr., Department of Animal Nutrition, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1/3, 612 42 Brno, H14002@vfucz.

SEKCE 3

Veterinární ekologie

**Luptouši rodu *Myrsidea* (Phthiraptera: Amblycera) na ptácích
neotropické oblasti**

**Chewing Lice of the Genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Amblycera)
from Birds of Neotropical Region**

Kolenčík Stanislav, Sychra Oldřich, Literák Ivan

*Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie,
Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno*

Summary

Recently described *Myrsidea alexanderi* were found in *Pheugopedius maculipectus* (Troglodytidae) from Honduras. Moreover, there were found nine new host-lice associations: *Myrsidea psittaci* ex *Agelaioides badius* (Paraguay), *Myrsidea paleno* ex *Basileuterus culicivorus* and *Myiothlypis leucoblephara* (Paraguay), *Myrsidea nesomimi borealis* ex *Mimus saturninus* (Brazil), *Myrsidea* spp. ex *Icterus dominicensis* and *Molothrus rufoaxillaris* (Brazil and Costa Rica), *Myrsidea serini* ex *Poospiza melanoleuca* (Paraguay) and *Myrsidea lightae* ex *Saltator atriceps* and *Saltator coerulescens* (Honduras and Paraguay).

Keywords: *Amblycera; Myrsidea; chewing lice; birds; Neotropical Region*

Úvod

Rod *Myrsidea* Waterston, 1915 je druhově nejpočetnějším rodem luptoušů v rámci skupiny Phthiraptera s více než 350 popsány druhy (Valim & Weckstein 2013), přičemž minimálně 200 druhů parazituje na ptácích z neotropické oblasti. Tyto počty jsou ale pravděpodobně jen fragmentem skutečné druhové rozmanitosti. Valim a Weckstein (2013) odhadují, že jen v Brazílii může být v budoucnu popsáno ještě přibližně 930 druhů rodu *Myrsidea*. Naše znalosti o distribuci a hostitelsko-parazitických vztazích druhů rodu *Myrsidea* se liší v různých částech neotropické oblasti. Poměrně dobře prozkoumány jsou oblasti Brazílie a Kostariky (Valim & Weckstein 2013, Sychra *et al.* 2014), zatímco informace z ostatních zemí jsou hodně limitovány. Například navzdory velkému počtu pěvců žijících v Hondurasu, zde byly zaznamenány jen *Myrsidea mirabilis* (Carriker, 1903) z *Psarocolius wagleri* (Gray, 1844) a *Myrsidea balteri* Clay, 1968 z *Quiscalus mexicanus* (Gmelin, 1788). V Paraguayi to byly pouze *Myrsidea fallax* Keler 1938 z *Cyanocorax cyanomelas* (Vieillot, 1818) a *Myrsidea psittaci* Carriker, 1955 z *Molothrus bonariensis* (Gmelin, 1789) (Valim & Cicchino, 2015; González-Acuña *et al.*, 2006).

Materiál a metody

V letech 2004 až 2014 bylo na 19 lokalitách v 5 zemích neotropické oblasti (Brazílie, Honduras, Kostarika, Paraguay a Peru) vyšetřeno na výskyt ektoparazitů celkem 3013 ptáků. Luptouši rodu *Myrsidea* (Phthiraptera: Amblycera) byli sbíráni metodou vytřepávání a podrobnou prohlídkou těla ptáků a následně uchovávaní v 96% etanolu. Metody sběru, tvorby trvalých preparátů a lokality sběru jsou detailně popsány jinde (Sychra *et al.* 2014, Kolencik *et al.* 2016).

Výsledky

***Myrsidea alexanderi* Kolenčík, Sychra, Valan & Literák, 2016**

Typový materiál: Hostitel *Pheugopedius maculipectus* Lafresnaye, 1845 (Troglodytidae): Holotyp ♀, Atlántida, Tela, Botanical Garden Lancetilla, Honduras (15°44' N, 87°27' W), 10–16. 8. 2014. Paratypy: 3♀, 5♂ stejné data jako holotyp.

Poznámky: *Myrsidea alexanderi* byla recentně posána jako nový druh. Je to první záznam všenky z *Pheugopedius maculipectus*.

***Myrsidea lightae* Price, Johnson, and Dalglish, 2008**

Vyšetřený materiál: Hostitel *Saltator atriceps* (Lesson, 1832) (Thraupidae): 6♀, 2♂, Atlántida, Tela, Botanical Garden Lancetilla, Honduras (15°44' N, 87°27' W), 13. 8. 2014. Hostitel *Saltator coerulescens* Vieillot, 1817 (Thraupidae): 19♀, 27♂, Los Tres Gigantes Biological Station in the Pantanal, Paraguay (20°04' S, 50°09' W), 6–9. 8. 2012.

Poznámky: Je to první záznam *M. lightae* z *S. atriceps* a *S. coerulescens*. Je to první záznam *M. lightae* z Hondurasu a Paraguaye.

***Myrsidea nesomimi borealis* Palma & Price, 2010**

Vyšetřený materiál: Hostitel *Mimus saturninus* (Lichtenstein, 1823) (Mimidae): 2♀, 1♂, Nova Andradina, Mato Grosso do Sul, Brazílie (22°15' S, 53°21' W), 17. 7. 2006.

Poznámky: Je to nově zaznamenaná všenko-hostitelská vazba pro *Myrsidea nesomimi borealis* a také první záznam této všenky z Brazílie. Palma a Price (2010) popsali dva poddruhy – *Myrsidea nesomimi nesomimi* a *Myrsidea nesomimi borealis* – ze 4 endemických druhů ptáků na Galápagách: z *Mimus macdonaldi* Ridgway, 1890 a *Mimus trifasciatus* (Gould, 1837) pro *M. n. nesomimi*; z *Mimus parvulus* (Gould, 1837) a *Mimus melanotis* (Gould, 1837) pro *M. n. borealis*. Morfometrickou analýzou jsme identifikovali náš materiál jako *M. n. borealis*. Pro definitivní potvrzení taxonomického postavení *Myrsidea nesomimi* z pevniny (Brazílie) i z Galapág bude zapotřebí více materiálu a podpora analýzou DNA.

***Myrsidea paleno* Kounek & Sychra, 2011**

Vyšetřený materiál: Hostitel *Basileuterus culicivorus* (Deppe, 1830) (Parulidae): 1 ♀, San Rafael National Park, Paraguay (26°30' S, 55°47' W), 21. 8. 2012. Hostitel *Myiothlypis leucoblephara* (Vieillot, 1817) (Parulidae): 1 ♀, San Rafael National Park, Paraguay (26°30' S, 55°47' W), 18. 8. 2012.

Poznámky: Jedná se o nové všenko-hostitelské vazby pro *Myrsidea paleno* a první záznam této všenky z Paraguaye.

***Myrsidea psittaci* Carriker, 1955**

Vyšetřený materiál: Hostitel *Agelaioides badius* (Vieillot, 1819) (Icteridae): 3♀, Margarida, Cerra de Bodoquena, Brazílie (21°30' S, 56°40' W), 21. 7. 2006.

Poznámky: Je to první záznam *Myrsidea psittaci* v Brazílii. *Agelaioides badius* je nový hostitel *Myrsidea psittaci*, přičemž je to už sedmý dokumentovaný hostitel tohoto luptouše.

***Myrsidea serini* (Séguy, 1944)**

Vyšetřený materiál: Hostitel *Poospiza melanoleuca* (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837) (Thraupidae): 1♀, 1♂, Los Tres Gigantes Biological Station in the Pantanal, Paraguay (20°04' S, 50°09' W), 6. a 8. 8. 2012.

Poznámky: Jedná se o novou všenko-hostitelskou vazbu *Myrsidea serini* a *Poospiza melanoleuca*.

***Myrsidea* spp.**

Poznámky: U ptáků druhu *Icterus dominicensis* (Linnaeus, 1766) (Kostarika) a *Molothrus rufoaxillaris* Cassin, 1866 (Brazílie) byly zjištěny jen nymfy, což vylučuje přesné druhové určení, ale v obou případech se jedná o novou všenko-hostitelskou vazbu.

Diskuse

Vedle recentního popisu nového druhu rodu *Myrsidea* u střízlíka skvrnitoprsého *Pheugopedius maculipectus* (Troglodytidae) v Hondurasu (Kolencik et al. 2016), bylo zaznamenáno devět nových parazito-hostitelských vazeb: *Agelaioides badius* s *Myrsidea psittaci* v Paraguayi, *Basileuterus culicivorus* a *Myiothlypis leucoblephara* s *Myrsidea paleno* v Paraguayi, *Mimus saturninus* s *Myrsidea nesomimi* v Brazílii, *Icterus dominicensis* a *Molothrus rufoaxillaris* s *Myrsidea* spp. v Brazílii a Kostarice, *Poospiza melanoleuca* s *Myrsidea serini* v Paraguayi a *Saltator atriceps* a *Saltator coerulescens* s *Myrsidea lightae* v Hondurasu a Paraguayi. Práce přispěla k rozšíření znalostí o zoogeografickém rozšíření všenek rodu *Myrsidea* v neotropické oblasti.

Poděkování

Poděkování patří všem, kteří nám pomáhali během práce v terénu.

Literatura

- GONZÁLES-ACUÑA; D., VERGARA, F.; MORENO, L.; BARRIENTOS, C.; ARDILES, K. & CICCHINO, A. Lice (Insecta: Phthiraptera) from species of the families Furnariidae, Tyrannidae, Turdidae and Icteridae (Aves: Passeriformes) from Chile. *Gayana*. 2006 vol. 70, s. 210–219.
- PALMA, R.L.; PRICE, R.D. The species of *Myrsidea* Waterston (Insecta: Phthiraptera: Menoponidae) from the Galápagos Islands, with descriptions of new taxa. *Tuhinga – Records of the Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa*. 2010, vol. 21, s. 135–146.
- KOLENCIK, S., SYCHRA, O., VALAN, M., LITERÁK, I. (2016) New data on the taxonomy and distribution of ten Neotropical chewing lice of the genus *Myrsidea* (Phthiraptera: Menoponidae), including the description of a new species. *Zootaxa*, vol. 4085, s. 233–247.
- SYCHRA, O., KOUNEK, F., PAPOUŠEK, I., ČAPEK, M., CÁRDENAS-CALLIRGOS, J.M., FRANCO, S. & LITERÁK, I. Chewing lice (Phthiraptera: Amblycera et Ischnocera) from wrens (Passeriformes: Troglodytidae), with description of a new species of *Myrsidea*. *Acta Entomologica Musei Nationalis Pragae*. 2014, vol. 54, s. 1–28.
- VALIM, M.P.; CICCHINO, A.C. Six new species of *Myrsidea* Waterston, 1915 (Phthiraptera: Menoponidae) from New World jays of the genus *Cyanocorax* Boie (Passeriformes: Corvidae), with notes on the chorionic structure of eggs. *Systematic Parasitology*. 2015, vol. 90, s. 191–211.
- VALIM, M.P.; WECKSTEIN, J.D. A drop in the bucket of the megadiverse chewing louse genus *Myrsidea* (Phthiraptera, Amblycera, Menoponidae): ten new species from Amazonian Brazil. *Folia Parasitologica*. 2013, vol. 60, s. 377–400.

Kontaktní adresa: Stanislav Kolenčík, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého 1946/1, 612 42 Brno, stanislav.kolencik@gmail.com.

Prevalence of Bacteria Resistant to Fluoroquinolone in Ravens from the Czech Republic and Slovakia

Svoboda Ondřej, Papoušek Ivo, Literák Ivan

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

Summary

In total, 661 fecal samples of ravens from localities near Ústí nad Labem (Czech Republic) and Prešov (Slovakia) were examined ($n_{\text{Ústí nad Labem}} = 374$, $n_{\text{Prešov}} = 287$) for the presence of bacteria resistant to fluoroquinolones in which the resistance genes were localized on plasmids. The prevalences of *Escherichia coli* strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin were 21 % and 21 % among ravens from Ústí nad Labem and Prešov, respectively. The prevalences of *Klebsiella pneumoniae* strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin were 19 % and 14 % in ravens from Ústí nad Labem and Prešov, respectively. Plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrB17*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrS2* and *oqxAB* were found in *E. coli* resistant strains. In *K. pneumoniae* resistant strains, plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrB19* and *oqxAB* were found.

Keywords: *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; PMQR; fluoroquinolone; resistant bacteria

Introduction

Although wild birds are not commonly exposed to antimicrobial agents, they can often carry bacterial strains resistant to certain antibiotics (Halová et al., 2014). The bacteria *Escherichia coli* as a part of common microflora of gastrointestinal tract of humans and animal is considered as significant indicator organism, which can be used for monitoring of origin and evolution of bacterial antibiotic resistance in humans and animals (Santos et al., 2013). In previous years, it was discovered that the number of coliform bacteria carrying genes coding broad-spectrum beta-lactamases (ESBL) and plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) increased. This situation was documented on the water birds by Taušová et al. (2012) and on the American crows (*Corvus brachyrhynchos*) in USA by Halová et al. (2014). Based on these studies and regarding to fact, that birds from Corvidae family can be considered as significant vectors and reservoirs of resistant bacteria also in Europe, with often occurrence of resistant bacteria in the domestic birds as well (Literák et al. 2012, 2013), it was conducted an epidemiologic study focusing on common ravens (*Corvus corax*). Ravens, which are potential significant vectors was not yet tested in this manner in Europe.

Material and Methods

During January and May 2013, a representative amount of fecal samples from ravens was collected into sterile plastic bags on chosen localities in the Czech Republic (CR) and Slovakia (SR). In Ústí nad labem, CR it was 374 samples, in Prešov, SR 287 samples. These samples were transported into laboratory, suspended in buffered peptone water and incubated for 24 hours in 37 °C. Subsequently they were frozen on -80 °C. Samples were next individually testing for presence of the *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* resistant to ciprofloxacin. Each sample was inoculated on selective agar medium with corresponding antibiotic and was observed for bacterial grow. Samples cultivated on medium with antibiotic were characterized via mass spectrometry (MALDI-TOF). Identified isolates from agar with ciprofloxacin were tested by the PCR method for plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes. Tested PMQR genes were *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *qepA*, *aac(6')-ib-cr*, *oqxAB*. Obtained PCR products were sekvenated and further characterized.

Results

In total, 661 fecal samples of ravens from localities near Ústí nad Labem (Czech Republic) and Prešov (Slovakia) were examined ($n_{\text{Ústí nad Labem}} = 374$, $n_{\text{Prešov}} = 287$) for the presence of bacteria resistant to fluoroquinolones in which the resistance genes were localized on plasmids. The prevalences of *Escherichia coli* strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin were 21 % and 21 % among ravens from Ústí nad Labem and Prešov, respectively. The prevalences of *Klebsiella pneumoniae* strains with reduced susceptibility to ciprofloxacin were 19 % and 14 % in ravens from Ústí nad Labem and Prešov, respectively. Plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrB17*, *qnrB19*, *qnrS1*, *qnrS2* and *oqxAB* were found in *E. coli* resistant strains. In *K. pneumoniae* resistant strains, plasmid-mediated quinolone resistance genes *qnrB19* and *oqxAB* were found.

The prevalences of *E. coli* with plasmid-mediated quinolone resistance genes in ravens from Ústí nad Labem were for isolates with individual genes as follows: *qnrB19* 1%, *qnrS1* 1% and *oqxAB* 0,3%. In *K. pneumoniae* strains from the same locality, it was 2,9% *oqxAB*. The prevalences of *E. coli* with plasmid-mediated quinolone genes in ravens from Prešov were as follows: *qnrB17* 0,3%, *qnrB19* 0,7%, *qnrS1* 2,4% and *qnrS2* 0,3%. In *K. pneumoniae* from Prešov, it was for *qnrB19* 0,3% and for *oqxAB* 2,4%.

Discussion

Common raven has proven itself as a model organism for monitoring bacteria carrying genes coding antimicrobial resistance, as described in study from North America (Janecko et al., 2014). Janecko et al. (2014) suggested suitability of raven as a model for observing resistant bacterial strains in environment. Alternatively the rook (*Corvus frugilegus*) could be good model organism (Jamborová et al., 2014). Aim of our study was to compare two localities in central Europe. From the above results is apparent, that situation in Slovakia appears more serious than in Czech Republic, which can have several reasons. The main reason could be different food sources for ravens in both localities. As omnivores, ravens feed on various food, from small rodents, plants up to opportunistic way of feeding on waste dumps (Nogales, 1997). It is possible, that feeding on waste dumps in given localities can lead to colonizing of gastrointestinal tract by resistant microflora (Literák et al., 2012). Also it is important to take into consideration, that although raven does not migrate, it could travel long distances in search for food. Therefore it is possible, that some ravens can get in contact with resistant microorganisms somewhere else outside the location in which they were sampled. For ravens from Ústí nad Labem, it is possible to consider Germany, for ravens from Prešov, for example Poland and Hungary as well as Ukraine. For instance in Hungary, it was reported first occurrence of *qnrS1* in pigs in Europe (Szmolka et al., 2011), in year 2012, it is reported first incidence *qnrS1* in CR (Taoušová et al., 2012), first ever reference to incidence of *qnrS1* in Europe was from the French university Hospital from clinical isolates in 2006 (Poirel et al., 2006). Based on our findings we can conclude, that wildlife animals and humans can influence each other and that there is possibility of transmission of resistant microflora from one to other including domestic animals. Bacteria with genes of resistance towards antibiotics are also still spreading through the environment.

Conclusion

When dealing with epidemiology issues of antibiotic resistance in bacteria, it should be paid attention also to the synanthropic wildlife birds as hosts, reservoirs and vectors of resistant bacteria.

References

- HALOVA, D., I. PAPOUSEK, I. JAMBOROVA, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in enterobacteriaceae from American crows: High prevalence of bacteria with variable qnrB genes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014, 58(2), 1257-1258.
- JAMBOROVA, I., M. DOLEJSKA, J. VOJTECH, et al. Plasmid-mediated resistance to cephalosporins and fluoroquinolones in various *Escherichia coli* sequence types isolated from rooks wintering in Europe. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81(2), 648-657.
- JANECKO, N., A. CIZEK, D. HALOVA, R. KARPISKOVA, P. MYSKOVA a I. LITERAK. Prevalence, characterization and antibiotic resistance of *Salmonella* isolates in large corvid species of Europe and North America between 2010 and 2013. *Zoonoses and Public Health*. 2015, 62(4), 292-300.
- LITERAK, I., M. MICUDOVA, D. TAUSOVA, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance genes in fecal bacteria from rooks commonly wintering throughout Europe. *Microbial Drug Resistance*. 2012, 18(6), 567-573
- LITERAK, I., T. REITSCHMIED, D. BUJNAKOVA, et al. Broilers as a source of quinolone-resistant and extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in the Czech Republic. *Microbial Drug Resistance*. 2013, 19(1), 57-63
- NOGALES, M., E. C. HERNANDEZ. Diet of common ravens on El Hierro, Canary Islands. *Journal of Field Ornithology*. 1997, 68, 382-391.
- POIREL, L., C. LEVIANDIER a P. NORDMANN. Prevalence and Genetic analysis of plasmid-mediated quinolone resistance determinants QnrA and QnrS in Enterobacteriaceae isolates from a French University Hospital. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2006, 50(12), 3992-3997.
- SANTOS, T., N. SILVA, G. IGREJAS, et al. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*. 2013, 24, 25-31.
- SZMOLKA, A., D. FORTINI, L. VILLA, A. CARATTOLI, M. F. ANJUM a B. NAGY. First Report on IncN plasmid-mediated quinolone resistance gene qnrS1 in porcine *Escherichia coli* in Europe. *Microbial Drug Resistance*. 2011, 17(4), 567-573.
- TAUSOVA, D., M. DOLEJSKA, A. CIZEK, L. HANUSOVA, J. HRUSAKOVA, O. SVOBODA, G. CAMLIK a I. LITERAK *Escherichia coli* with extended-spectrum β -lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance genes in great cormorants and mallards in Central Europe. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012, 67(5), 1103-1107

Contact address: Ondřej Svoboda, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H13390@vfu.cz.

SEKCE 4

Veterinární biochemie, chemie a biofyzika

Metodika stanovení glutathionu pomocí izotachoforézy

A Methodics for Isotachophoretic Glutathione Evaluation

Nečasová Andrea, Pechová Alena, Holasová Milada, Vyskočilová Věra

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Glutathione is the most abundant thiol-scavenging nonprotein intracellular compound in each body cell. Apart from its antioxidant function, glutathione plays an essential role in detoxification processes and it is an important cell signalling regulator as well. The objective of the present work was to set up a methodics for direct determination of GSH and GSSG in erythrocyte lysates from blood of dairy cows. Results show that this method is suitable for detection of GSH and GSSG within a single analysis, samples are stable at least during a working day. The analysis takes less than 30 minutes.

Keywords: GSH; GSSG; blood samples; erythrocyte; dairy cows

Úvod

Glutathion je klíčovou sloučeninou podílející se na udržení homeostázy uvnitř buněk. Tento tripeptid (γ -glutamylcysteinylglycin) je nezbytnou součástí především při neutralizaci kyslíkových radikálů. V cytosolu buněk se vyskytuje v mmol koncentracích, jeho množství v plazmě je pak přibližně 500x nižší. Řada metod je dnes dostupných ke stanovení glutathionu v biologických vzorcích (Reid, 2000), ale pouze několik z nich je vhodných pro přímé a rutinní stanovení. Nejčastěji používanou metodou je vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC), která ovšem vyžaduje poměrně složitější přípravu vzorku a derivatizaci obsaženého GSH (Asensi, 1994 a Lenton, 1999). Další metoda založená na nepřímém stanovení celkového a oxidovaného glutathionu vychází z měření absorbance barevného produktu DTNB (5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoová kyselina), jehož koncentrace přímo odpovídá koncentraci GSH. GSH je stabilizován přidávkem m-2-VP (1-methyl-2-vinylpyridintrifluoromethansulfát), redukce GSSG je dosaženo glutathionreduktasou v přítomnosti NADPH. GSH je potom stanoven výpočtem z celkového a oxidovaného glutathionu (Boutolleau, 1997 a Senft, 2000). Stanovení glutathionu pomocí izotachoforézy poskytuje možnost přímého stanovení jak GSH, tak i GSSG v krevních lysátech během jedné analýzy s dostatečnou citlivostí.

Materiál a metody

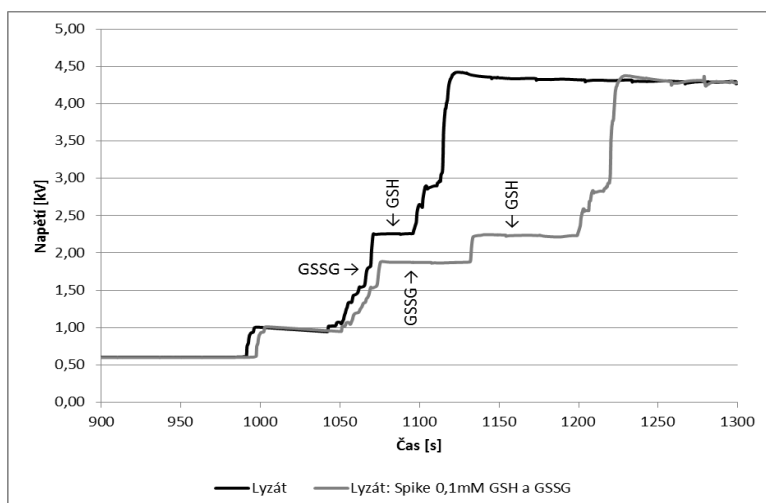
Redukovaný (GSH), oxidovaný (GSSG) glutathion, L-histidin (L-his), β -alanin (β -ala), 1N HCl a MHEC (methyl-2-hydroxyethylcelulosa) byly zakoupeny od Sigma-Aldrich (Česká republika). K separaci byl použit izotachoforetický analyzátor EA 303A s vodivostní detekcí, dodávaný s autosamplerm Basic-Marathon typ 819 (Villa Labeco, Slovenská republika) a pracující se softwarem ACES. Systém byl složen z předseparační a analytické kolony vybavené dvěma kapilárami z FEP (fluorovaný kopolymer ethylenu a propylenu), s délkou kapiláry 90 mm a vnitřním průměrem 0,8 mm, resp. 160 mm a 0,3 mm. Objem dávkovaného vzorku byl konstantně 20 μ l. K separaci byl použit modifikovaný elektrolytový systém dle Tsikase (1989). Vodící elektrolyt tvořila 10 mmol/l HCl a 0,075% methylhydroxyethylcelulosa (MHEC) s pH upraveným na 3,3 dodáním 15,62 mmol/l β -ala. Jako koncový elektrolyt (TE) sloužila 15 mmol/l kapronová kyselina s přidáním 10 mmol/l L-His o pH 5,6. Odběr vzorků krve byl proveden punkcí v. coccygea dojnic holštýnského skotu v rámci kontroly zdravotního stavu. Krev byla odebrána do heparinizovaných hemosek, ihned zchlazena na 4°C a při této teplotě uchována po celou dobu přípravy vzorku. Ze vzorků krve byla odstředěna plazma, erythrocyty byly poté 3x promyty ve fyziologickém roztoku o

teplotě 4 °C a následně 5 minut inkubovány v ledové vodě. Takto zhotovený erytrocytární lyzát byl uchován při teplotě 4 °C až do doby analýzy.

Výsledky a diskuse

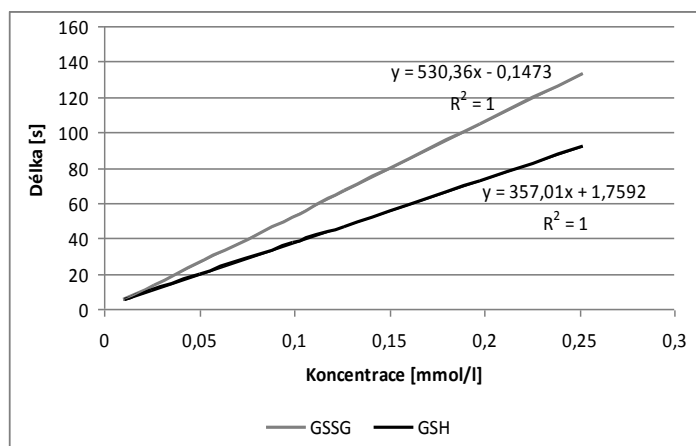
Testovali jsme podmínky odběru a zpracování vzorku, jeho stabilitu během analýzy, vhodné pH elektolytového systému, reprodukovatelnost a opakovatelnost metody.

Pořadí separace dle mobility určující rychlost migrace je nejdříve oxidovaný glutathion, poté redukovaný glutathion (Graf 1).



Graf 1: Grafické znázornění záznamu vzorků lyzátů erytrocytů: Lyzát: ředěno 20x, Lyzát: Spike 0,1 mmol/l GSH a GSSG: ředěno 20x, přídavek 0,1mmol/l GSH a 0,1mmol/l GSSG.

Z měření vyplývá, že při hodnotě LE 3,3 a TE 3,8 dochází k ideální separaci GSH a GSSG bez interference dalších složek. Také trvání jedné analýzy je při těchto hodnotách pH vyhovující. Stanovením standardů GSH a GSSG v rozmezí koncentrací 0,01 – 0,2 mmol/l byly sestrojeny sedmibodové kalibrační křivky (Obr. 1).



Obrázek 1: Kalibrační křivky výsledků koncentrací v rozmezí 0,01 mmol/l – 0,25 mmol/l.

Byla testována spontánní oxidace GSH během přípravy a analýzy vzorku a vhodné antikoagulační činidlo. Jako vhodný antikoagulant se osvědčil heparin a udržení teploty 4°C po odběru a během zpracování vzorku zajistilo stabilitu GSH vůči oxidaci minimálně v průběhu jednoho pracovního dne. Tabulka č. 1 uvádí výsledky opakovaných měření

standardů GSH a GSSG o koncentraci 0,1 mmol/l. Průměrná koncentrace GSH byla 0,101 mmol/l a GSSG 0,094 mmol/l. RSD pro RSH (Relative step heights) GSH a GSSG byly 1,24%, resp. 1% a pro délku zóny 1,7%, resp. 2%. Během 10 po sobě jdoucích měření při laboratorní teplotě došlo k nárůstu GSSG o 4,3% a úbytku GSH o 2%. Vzorek je tedy dostatečně stabilní minimálně během jednoho pracovního dne. V tabulce č. 2 jsou uvedeny koncentrace vzorků lyzátů erytrocytů a jejich přídavky GSH a GSSG o koncentraci 0,1 mmol/l. Výtěžnost pro GSH činila 98,2% a pro GSSG 97,2%.

Tabulka 1: Výsledky měření standardů o $c = 0,1$ mmol/l. RSH (Relative step heights).

Měření:	GSH:			GSSG:		
	Koncentrace [mmol/l]	RSH	Délka zóny [s]	Koncentrace [mmol/l]	RSH	Délka zóny [s]
Průměr	0,101	0,452	27,224	0,094	0,351	44,4
SD	0,002	0,006	0,46	0,002	0,003	0,894
RSD	1,561	1,241	1,69	2,301	0,995	2,014

Tabulka 2: Koncentrace GSH a GSSG ve vzorcích lyzátů erytrocytů, ředěno 20x.

Měření:	Vzorek č. 1			
	Koncentrace [mmol/l]		Přídavek [0,1mmol/l]	
	GSH	GSSG	GSH	GSSG
Průměr [mmol/l]	0,079	0,007	0,176	0,104
SD [mmol/l]	0,003	0,000	0,009	0,005
RSD [%]	3,645	5,200	4,853	4,682
Výtěžnost [%]			98,2	97,2

Závěr

Cílem naší práce bylo zavedení metodiky pro stanovení redukované a oxidované formy glutathionu a její standardizace pro měření reálných vzorků krve přežvýkavců.

Metoda stanovení glutathionu pomocí izotachofórey s vodivostní detekcí je vhodná pro stanovení obou forem glutathionu přímo a to v průběhu jedné analýzy v lyzátech erytrocytů. Opakováním jednotlivých analýz bylo prokázáno, že vzorky jsou stabilní v délce běžného pracovního dne. Celková doba analýzy činila 25 minut.

Literatura

- TSIKAS, D., BRUNNER, G. Application of capillary isotachophoresis to the analysis of glutathione conjugates. *J Chromatogr A*. Amsterdam: 1989, roč. 470, č. 1, s.191-199.
- ASENSI, M., SASTRE, J., PALLARDO, F. V., GARCIA DE LA ASUNCION, J., ESTRELA, J. M., VIÑA, J. A high-performance liquid chromatography method for measurement of oxidized glutathione in biological samples. *Anal Biochemistry*. Valencie: 1994, roč. 217, č. 2, s. 323-328.
- LENTON, K. J., THERRIAULT, H., WAGNER, J. R., Analysis of glutathione and glutathione disulfide in whole cells and mitochondria by postcolumn derivatization high-performance liquid chromatography with ortho-phtalaldehyde. *Anal Biochem*. Québec: 1999, roč. 274, č. 1, s. 125-130.
- SENFT, A. P., DALTN, T. P., SHERTZER, G. Determining glutathione and glutathione disulfide using the fluorescence probe *o*-phtalaldehyde. *Anal Biochem*. Ohio: 2000, roč. 280, č. 1, s. 80-86.
- BOUOLLEAU, D., LEFÉVRE, G., ETIENNE, J. Determination of glutathione with the GSH-400 method: value of derivative spectrophotometry. *Anal Biol Clin*. Paříž: 1997, roč. 55, č. 6, s. 592-596.

Kontaktní adresa: Andrea Nečasová, MVDr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1, 612 42 Brno, H14004@vfu.cz.

The Evaluation of Concentration of Trace Elements (Cu, Zn, Mn, Se) in Alpaca's Hair

Holasová Milada, Pechová Alena, Nečasová Andrea

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

Summary

The aim of our work was to monitor the concentration of Cu, Zn, Mn and Se in alpaca's hair and to evaluate the effect of coat colour on their concentration. The samples were collected from 54 alpacas (18 males, 36 females) from farms in Czech Republic. For the determination of copper, zinc and manganese concentration were used the flame AAS - Atomic Absorption Spectroscopy technique and for the selenium concentration the hydride AAS technique. The average concentrations of trace elements in alpaca's hair were: Cu – $10,22 \pm 2,9$ mg/kg DM; Zn – $129,81 \pm 18,8$ mg/kg DM; Mn – $13,15 \pm 14,0$ mg/kg DM; Se – $479,0 \pm 241,0$ µg/kg DM. The concentrations of manganese and selenium were significantly influenced by the coat colour ($P < 0,01$).

Keywords: hair; alpaca; trace elements; copper; zinc; manganese; selenium; AAS

Introduction

The concentration of trace elements is an important factor in the evaluation of alpaca health and it is mostly determined in blood (Husáková et al. 2012). In present study we used hair as an alternative biological material for assessing the content of microelements in the body. Actually according to the studies of Bencko 1995 and Kosla et al. 2011 hair can be used as a suitable indicator of the content of bioelements or toxic elements in human and animal organism. According to the study of Senofonte et al. 2000 hair can reflect the content in the body better than blood or urine and the concentration of these elements is in this biological material higher. Generally there are many studies monitoring the concentration of trace elements or bioelements in hair of humans or animals for example Combs 1987, Christodouloupoulos et al. 2003, Hawkins et al. 2009, Kosla et al. 2011, Pavlata et al. 2011, Roug et al. 2015, Senofonte et al. 2000. But there are not any studies about trace elements in alpaca's hair in literature yet. So the aim of our work was to monitor the concentration of Cu, Zn, Mn and Se in alpaca's hair and to evaluate the effect of coat colour on their concentrations.

Materials and Methods

The optimized cleaning procedure of hair samples is shown in the Table 1.

Table 1: Sample processing – cleaning procedure and drying.

Washing solution	Procedure	Repetitions
0.5% Triton X-100	Washing 60 min.	3
0.5% Triton X-100	Washing 15 – 20 hours	1
0.5% Triton X-100	Washing 60 min	2
Distilled water	Washing 60 min.	1
Acetone	Washing 60 min.	1
Distilled water	Washing 60 min.	2
	Drying (75°C) 60 – 90 min.	

The mineralization of hair samples was performed by microwave digestion in Microwave Labstation Ethos SEL (Milestone, Italy). We used 0.25 g of treated hair for Cu, Zn and Mn

determination and for determination of Se 0.5 g, always together with HNO₃ and H₂O₂. The content was mineralized at 200°C for 35 minutes applying maximal power of 1000W.

Then the resulting solutions for the Se determination were evaporated. All the samples were diluted with deionised water into 25 ml volumetric flasks. We used an Atomic Absorption Spectrometer ContrAA 700 (Analytik Jena, Germany) for the determination of Cu, Zn, Mn and Se concentration. The concentration of Cu, Zn and Mn was measured by Flame AAS technique and the Se concentration in reduced samples was measured by Hydride Generation AAS technique with hydride generation unit HS 600.

Results and Discussion

The animals were divided according to the colour of coat into 4 groups – white hair, beige hair, brown hair and black hair. The concentrations of Cu, Zn, Mn and Se were determined in all collected samples. The values of average concentrations, standard deviations and relative standard deviations are shown in the Tables 2, 3. The data were evaluated with single-factor analysis of variance ANOVA in programme UNISTAT. As a reference material we used SRM 1577c Bovine Liver and SRM 1566b Oyster Tissue.

Table 2: The concentrations of Cu, Zn, Mn and Se in alpaca's hair.

	Cu	Zn	Mn	Se
\bar{x}	10,22 mg/kg	129,81 mg/kg	13,15 mg/kg	479,0 µg/kg
SD	2,9 mg/kg	18,8 mg/kg	14,0 mg/kg	241,0 µg/kg
RSD	28,4 %	14,6 %	107,3 %	50,8 %

\bar{x} – average, SD – standard deviation, RSD – relative standard deviation

Table 3: The concentrations of Cu, Zn, Mn and Se according to the coat colour.

		White hair	Beige hair	Brown hair	Black hair
Cu	\bar{x} [mg/kg]	11,39	10,02	9,55	9,86
	SD [mg/kg]	2,9	2,1	2,2	3,8
	RSD [%]	25,8	21,5	23,5	38,3
Zn	\bar{x} [mg/kg]	132,77	118,63	130,78	129,91
	SD [mg/kg]	14,9	21,2	17,3	24,6
	RSD [%]	11,2	17,9	13,2	18,9
Mn	\bar{x} [mg/kg]	3,26	20,06	14,19	20,61
	SD [mg/kg]	2,8	25,6	12,2	12,6
	RSD [%]	86,5	127,5	85,8	61,2
Se	\bar{x} [µg/kg]	315,09	341,40	495,94	719,39
	SD [µg/kg]	138,8	145,0	194,8	251,7
	RSD [%]	44,0	42,5	39,3	35,0

\bar{x} – average, SD – standard deviation, RSD – relative standard deviation

The average concentrations of Cu and Zn were in similar values in all coat colour groups for each element. According to the single-factor analysis of variance they weren't significantly influenced by the coat colour. The values of relative standard deviation of these elements for all monitoring animals were much lower (Cu 28,4 %, Zn 14,6 %) than for Mn and Se (Mn 107,3 %, Se 50,8 %). The Se concentrations were directly proportional to the degree of coloration of hair. In white hair the average concentration was the lowest (315,09 µg/kg DM) and in black

hair the highest (719,39 µg/kg DM) on the other hand. The similar results were concluded in the study about Holstein dairy cows of Christodoulopoulos et al. 2003, where they found that white hair of these animals contained significantly less Se than black hair.

The Mn average concentration was again the lowest in white hair (3,26 mg/kg DM) than in the rest coat colour groups of the animals. But the values were similarly higher in beige and black hair (20,06 mg/kg DM; 20,61 mg/kg DM) and somewhat lower average concentrations were found in brown hair (14,19 mg/kg DM). So Mn concentrations were significantly influenced by the coat colour ($P < 0,01$) but they weren't directly proportional to the hair pigmentation. In the study of Chyla et al. 2000 was determined the content of minor and trace elements by the dogs according to the colour of hair too. They found that generally in black hair was greater elements concentrations than in fair hair. We have confirmed the same fact in the hair of alpacas only by the concentrations of Se and Mn.

Conclusion

We determined concentrations of Cu, Zn, Mn and Se in all collected samples of alpaca's hair. Then we evaluated the effect of coat colour on their concentration. According to the results of our analysis we have found that the concentrations of manganese and selenium were significantly influenced by the coat colour ($P < 0,01$). The content of these elements was the lowest in white hair of alpacas and the highest in black hair on the other hand. This fact wasn't confirmed by the concentrations of copper and zinc in this study.

References

- BENCKO V. Use of human hair as a biomarker in the assessment of exposure to pollutants in occupational and environmental settings. *Toxicology*. 1995, vol. 101, p. 29-39.
- COMBS D. K.: Hair of analysis as an indicator of mineral status of livestock. *Journal of Animal Science*. 1987, vol. 65, p. 1753-1758.
- HAWKINS D. P.; RAGNARSDÓTTIR K. V. The Cu, Mn and Zn concentration of sheep wool: Influence of washing procedures, age and colour of matrix. *Science of Total Environment*. 2009, vol. 407, p. 4140-4148.
- HUSÁKOVÁ T.; PAVLATA L. Vyhodnocení výskytu karencí stopových prvků s ohledem na způsob krmení u lam a alpák v České republice. *Závěrečná zpráva projektu IGA VFU Brno*. 2012, s. 1-7.
- CHRISTODOULOPOULOS G.; ROUBIES N.; KARATZIAS H.; PAPASTERIADIS A. Selenium concentration in Blood and Hair of Holstein Dairy Cows. *Biological Trace Element Research*. 2003, vol. 91, p. 145-150.
- CHYLA M. A.; ZYRNICKI W. Determination of Metal Concentrations in Animal Hair by the ICP Method. *Biological Trace Element Research*. 2000, vol. 75, p. 187-194.
- KOSLA T.; SKIBNIEWSKA E. M.; SKIBNIEWSKI M. The state of bioelements in the hair of free-ranging European bison from Bialowieza Primeval Forest. *Polish Journal of Veterinary Sciences*. 2011, vol. 14, no. 1, p. 81-86.
- PAVLATA L.; CHOMÁT M.; PECHOVÁ A.; MIŠUROVÁ L.; DVOŘÁK R. Impact of long-term supplementation of zinc and selenium on their content in blood and hair in goats. *Veterinarni Medicina*. 2011, vol. 56, p. 63-74.
- ROUG A.; SWIFT P. K.; GERSTENBERG G.; WOODS L. W.; KREUDER-JOHNSON CH.; TORRES S. G.; PUSCHNER B. Comparison of trace mineral concentrations in tail hair, body hair, blood and liver of mule deer (*Odocoileus hemionus*) in California. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2015, p. 1-11.
- SENOFONTE O.; VIOLANTE N.; CAROLI S. Assessment of reference values for elements in human hair of urban schoolboys. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 2000, vol. 14, p. 6-13.

Contact address: Milada Holasová, MVDr., Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Farmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, Brno 612 42, Czech Republic, H13004@vfu.cz.

SEKCE 5

Veřejné veterinářství a ochrana zvířat

Preference, podmínky a zkušenosti majitelů adoptovaných psů

Preferences, Conditions, and Experiences of Adopters of Shelter Dogs

Vitulová Svatava, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

Even though the conditions of good – quality welfare of abandoned dogs in shelters, rescue sites, deposits and sanctuaries are fulfilled, finding new homes for these animals is highly desirable. Successful adoption process is when the owner's possibilities, conditions, skills and abilities provide optimal conditions for dogs and adopted animals are not returned to the shelter. It is influenced by lots of factors. This paper deals with circumstances surrounding the process of choosing a dog by the adopter, the postadoption time and the most common problems the adopter faces. It also defines some features of successful adopters.

Keywords: *successful adoption; features and conditions of adopters; shelter dog*

Úvod

Téma úspěšně adoptovaných psů, tedy takových, kteří u svých osvojitelů zůstanou, je velmi aktuální. Proces adopce je ovlivněn mnoha faktory, faktory týkající se samotného psa, prostředí útulku a možnostmi nového majitele. Průnik těchto oblastí pak stanovuje optimální stav pro adopci. Pokud jde o preference majitelů při výběru psa, existuje řada studií, které definují nejčastější požadavky na vzhled, velikost, stáří a pohlaví psa, např. Lepper et al. (2002), Němcová and Novák (2003), Normando et al. (2006), Žák et al. (2015). V 97 % jsou novými majiteli lidé, kteří již mají zkušenosti se psy (Němcová and Novák, 2003). Co se týče chování, Wells and Hepper (2000) uvádějí, že nejméně u 25 % adoptovaných psů se projeví problematické chování, a to je hlavním důvodem pro vrácení psa do útulku. Ve výčtu nežádoucích projevů dominuje bojácnost, agresivita mezi psy - samci, útky, nadměrné štěkání a hyperaktivita, agresivita k jiným psům. Cílem předložené práce bylo provést předběžný průzkum okolností adopce, preferencí a podmínek těch, kteří již mají zkušenost s adopcí psa z útulku. Tyto informace pak budou výchozími daty pro další výzkum, jehož cílem je specifikace a sumarizace faktorů ovlivňujících adopci sledováním adoptovaných psů z konkrétních útulků.

Materiál a metodika

V období červenec až září 2015 byl proveden dotazníkový průzkum u majitelů adoptovaných psů v ČR. Dotazník byl umístěn na kynologických stránkách, stránkách spolupracujících útulků a depozit. Odpovědní formuláře obsahovaly otázky sociologické, typově uzavřené, otevřené i multiple – choice. Stěžejní byly otázky směřující na důvody adopce, specifikaci postadopčních problémů v chování, jejich výčet a pořadí. Výsledky byly testovány pomocí chí-kvadrát testu.

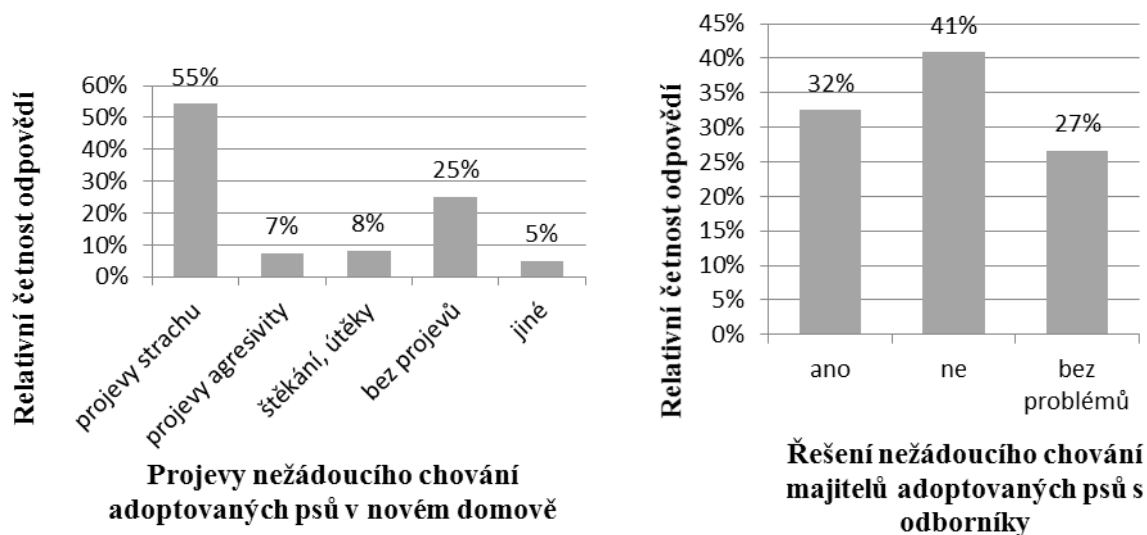
Výsledky

Dotazník vyplnilo celkem 394 respondentů. Preference majitelů, pokud jde o pohlaví psa, ukazují, že lidé dávají spíše přednost fenám. 55 % majitelů adoptovalo feny, z toho 18 % jich bylo kastrováných. Z 45 % adoptovaných psů bylo kastrováných 10 % zvířat. Nejčastější věk psů byl v rozmezí 1-5 let (37 %), následovala zvířata ve věku 3-12 měsíců (31 %), téměř pětina adoptovaných psů bylo ve věku nad 5 let (19 %) a ve 13 % to byla štěňata ve věku do tří měsíců. Pokud jde o velikost psa, více než polovina psů byla střední velikosti, tedy od 30 cm do 50 cm (51 %). 26 % psů bylo menších než 30 cm a 23 % bylo naopak větších než 50

cm. Více než polovina adoptovaných psů byli kříženci (55 %) a v 54 % respondenti uvedli, že při převzetí zvířete byly na zvířeti zřejmé známky nebo následky nevhodné péče či týrání.

Pokud jde o osobnost majitele, jeho možnosti a zkušenosti, v naprosté většině to byly ženy (96 %), které psa adoptovaly. 43 % respondentů bylo v produktivním věku, tedy ve věku 30 až 60 let. Podle očekávání mělo 83 % majitelů adoptovaných psů zkušenosti s výchovou a výcvikem jiných psů.

Jako postadopční problémy se objevily v největší míře projevy strachu a to v 55 %. 25 % respondentů uvedlo, že se žádné problémové chování nevyskytlo. Jako další komplikace majitelé uváděli nadměrné štěkání, útoky a projevy agresivity (viz graf č. 1). Byla prokázána statisticky významná závislost mezi jedinci, kteří byli před adopcí týráni nebo měli na sobě známky špatného zacházení a problémy v chování, které se projevovalo při zvykání na nový domov. Zjišťovali jsme také způsoby, jak osvojitelé řešili potíže s adaptací psa na nový domov. 32 % osvojitelů, tedy téměř třetina, hledala pomoc a rady u odborníků. 27 % nepotřebovala odbornou radu a 41 % respondentů uvedlo, že neměli s adoptovanými psy problém (graf č. 2).



Graf 1: Problémové projevy při zvykání.

Graf 2: Konzultace s odborníky.

Diskuse

Uvedená zjištění získaná pretestováním převážně korespondují s výsledky posledních studií. Například pokud jde o věk adoptovaných zvířat, snáze se adoptují zvířata mladší, jak uvádějí Lepper et al. (2002), Němcová and Novák (2003), Normando (2006) a Žák et al. (2015). Pokud se týká pohlaví, osvojitelé preferují feny nad psy, což odpovídá výsledkům studií Leppera et al. (2002), Marstona et al. (2003), Diesela et al. (2010) a Žáka et al. (2015). Převažují kříženci nad čistokrevnými psy.

Majiteli adoptovaných psů jsou lidé se zkušenostmi se psy v produktivním věku, což koresponduje se studií Němcové a Nováka (2003). V naprosté většině převažují ženy, což také uvádějí například Normando et al. (2006). Velmi pozitivní je zjištění, že přes veškeré těžkosti, které respondenti uvedli, 96 % z nich je s adopcí spokojeno a proces by znovu opakovalo, jen 4 % účastníků průzkumu by adoptovat psa již nechtělo, i když jejich adopce nakonec byla úspěšná, a pouze 1 % není spokojeno s adoptovaným psem a nechtělo by již tuto zkušenost nikdy opakovat. Studií, které se zabývají charakteristikou osvojitelů, je velmi málo, proto je na ně zaměřen náš současný výzkum.

Závěr

Podrobná analýza faktorů ovlivňujících ať už pozitivně nebo negativně adopční proces může pomoci zlepšit a zjednodušit samotnou adopci, vyprofilovat osobnost potenciálních osvojitelů, zacílit tak pozornost na správnou skupinu populace. Ve svém důsledku také může být nápomocná zlepšení strategie útulků, podmínek welfare a rovněž stanoví předpoklady pro vytvoření systému prevence nesprávných postupů při procesu adopce.

Literatura

DIESEL, G.; BRODBELT D.; PFEIFFER, D.U. Characteristics of relinquished dogs and their owners at 14 rehoming centers in the United Kingdom. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2010, vol. 13, no. 1, s. 15-30.

LEPPER, M.; KASS P.H.; HART, L. Prediction of adoption versus euthanasia among dogs and cats in a California animal shelter. *Journal of Applied Animal Welfare Science*. 2002, vol. 5, no. 1, s. 29-42.

MARSTON, L.C.; BENNETT, P.C. Reforging the bond—towards successful canine adoption, *Applied Animal Behaviour Science*. 2003, vol. 83, no. 3, s. 227-245.

NĚMCOVÁ, D.; NOVÁK, P. Adoption of dogs in the Czech republic. *Acta veterinaria Brno*. 2003, vol. 72, s. 421-427.

NORMANDO, S.; STEFANINI, C.; MEERS, L.; ADAMELLI, S.; COULTIS, D.; BONO, G. Some factors influencing adoption of sheltered dogs. *Anthrozoos: A Multidisciplinary Journal of the Interactions of People*. 2006, vol. 19, no. 3, s. 211-224 .

WELLS, D.L.; HEPPER, P.G. Prevalence of behaviour problems reported by owners of dogs purchased from an animal rescue shelter. *Applied Animal Behaviour Science*. 2000, vol. 69, no. 1, s. 55-65.

ŽÁK, J.; VOŠLÁŘOVÁ, E.; VEČEREK, V.; BEDÁŇOVÁ, I. Sex, age and size as factors affecting the length of stay of dogs in Czech shelters. *Acta veterinaria Brno*. 2015, vol. 84, no. 4, s. 407- 413.

Kontaktní adresa: Svatava Vitulová, Ing., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H14022@vfu.cz.

Vliv povinného čipování na dohledatelnost psů přijatých do útulku k jejich původním majitelům

Effects of Mandatory Microchipping of Dogs on Their Traceability to Original Owners

Žák Jiří, Voslářová Eva, Večerek Vladimír, Bedáňová Iveta

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

Summary

This article is focused on monitoring and evaluation the impact of mandatory microchipping and registration of dogs, specifically on traceability of sheltered dogs to their original owners. It was demonstrated that the mandatory microchipping and registration of dogs has significantly increased the traceability of sheltered dogs to their original owners. In the I. period (2004-2008) prior to the introduction of mandatory microchipping, traceability of dogs was only 67.55% of all microchipped dogs admitted to the shelter. The rest (32.45%) were not traceable. In the II. period (2010-2014) after the introduction of mandatory microchipping, the traceability of dogs has significantly increased (80%). Mandatory microchipping as well as registration of dogs can significantly increase the success of tracing the individual sheltered dog to its original owner.

Key words: *registrace; mikročipování; pes; dohledatelnost*

Úvod

Mikročipování zájmových zvířat, především psů, se stává čím dál více diskutovaným opatřením v boji s problematikou opuštěných zvířat ve 21. století napříč celou EU i USA. Celosvětovým předpokladem je, že povinné čipování psů může pomoci s dohledem nad počty psů chovaných v dané zemi, lepší identifikaci a propojení zvířete s konkrétním majitelem, ale také se snížením počtu opuštěných zvířat každoročně přijímaných do útulků. Některé státy jako např. Irsko nebo Anglie zavedli povinné čipování všech psů teprve nedávno (Council, B., 2013). V České republice je tato možnost ponechána jednotlivým obcím, které se v tomto ohledu řídí zákonem na ochranu zvířat proti týrání. Dalšímu prosazování povinného čipování však mohou bránit problémy spojené s registrací takovýchto zvířat. Mezi tyto problémy patří např. nekompletní data v registru, zastaralé údaje v registru, (zvíře již patří jinému chovateli), nebo nedostupné telefonní číslo v registru, nebo že čip není zaregistrován vůbec (Lord et al., 2009). Všechny tyto problémy vedou k tomu, že není možné dohledat majitele zvířete, přestože je zvíře čipované.

Materiál a metodika

Za období od 1. ledna 2004 do 31. prosince 2014 byly získány záznamy o celkovém počtu 4 455 psů, kteří byli přijati do městského útulku v Děčíně, kde bylo zavedeno povinné čipování v září roku 2009. Pro lepší statistickou analýzu byl proto celý rok 2009 vyřazen ze studie. Pro účely studie byly psi přijatí do tohoto útulku rozdělení do dvou skupin. Jedna skupina byla tvořena psy, které si v útulku vyzvedl jejich původní majitel (psi dohledatelní). Druhá skupina psů byla tvořena psy, které nebylo možné dohledat k jejich původním majitelům a tyto psy si v útulku jejich původní majitel již nevyzvedl (psi nedohledatelní). Dále byli tito psi rozdělení na psy s implantovaným mikročipem a psy bez mikročipu. Sledované období bylo rozděleno na dvě samostatná období. První období (2004-2008) představuje období před zavedením povinného čipování ve městě. Druhé období (2010-2014) představuje období po zavedení povinného čipování ve městě. Doba pobytu psů byla stanovena jako počet dní od data přijetí psa do útulku po datum jeho navrácení původnímu majiteli.

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí softwaru Unistat 5.1. (Unistat Ltd., GB). Data pro dobu v útulku byla testována na normalitu použitím Kolmogorov-Smirnov testu. Protože data neodpovídala normálnímu rozdělení, byla vyhodnocena pomocí Kruskal-Wallis ANOVA a neparametrického vícevýběrového mediánového testu jako post hoc test pro porovnání jednotlivých dvojic srovnávaných skupin.

Výsledky

Z celkového počtu 4455 psů přijatých do útulku za období deseti let, mělo 1379 (31.0%) psů implantován fungující mikročip při jejich přijetí do útulku. Zbytek, 3076 (69.0%) psů nemělo žádný mikročip. Z těch s mikročipem, 1056 (76.6%) psů bylo dohledatelných k jejich původním majitelům, zbytek psů s mikročipy, 323 (23.4%) nebylo dohledatelných k jejich původním majitelům. Tyto psy si jejich původní majitelé v útulku již nevyzvedli a psi zůstali proto v útulku jakožto opuštění (nedohledatelní). V I. období, pouze 379 (17.5%) z 2127 přijatých psů do útulku v tomto období mělo funkční mikročip. Z těchto bylo pouze 256 (67.5%) psů dohledatelných a navraceni původnímu majiteli. V II. období, bylo čipováno statisticky ($p < 0.001$) mnohem více psů (1000, 43.8% z 2283) přijatých do útulku, než v prvním období. Z těchto psů bylo statisticky mnohem více psů (800, 80.0%) dohledatelných a následně vrácených původnímu majiteli, než v I. období před zavedením povinného čipování a registrace těchto psů. Za sledované období 10 let měli dohledatelní čipovaní psi statisticky významně ($p < 0.001$) kratší dobu pobytu v útulku (0 dnů), než psi nečipovaní (1 den), než si je v útulku vyzvedl jejich původní majitel.

Diskuze

Výrazně nízké počty psů přijatých do útulků, kteří byli dohledatelní a vráceni původním majitelům hlásí někteří zahraniční autoři (Patronek et al., 1998; Lord et al., 2009; Lancaster E. et al., 2015). Důvodem může být nesnadná identifikace těchto psů a nemožnost dohledat původního majitele. V druhém období naší studie, tedy po zavedení povinného čipování se poměr přijatých psů do útulku významně změnil ve prospěch dohledatelných psů, v porovnání s prvním období. Je možné říci, jak ukazuje tento příspěvek, že povinné čipování psů pomohlo snížit počty nedohledatelných psů ve městě. Tento jev by se dal vysvětlit např. lepší kontrolou nad chovem psů ve městě a lepším propojením psa s konkrétním majitelem. Nicméně, i přesto je v druhém období útulku stále značný podíl psů, kteří v útulku zůstávají jako opuštění i přes nařízení povinného čipování psů a není možné je dohledat k původním majitelům, a to i přesto, že někteří měli čip. Bylo prokázáno nescetněkrát, že mikročipované a správně registrované zájmové zvíře je s mnohem větší pravděpodobností úspěšně shledáno s původním majitelem, než zvířata bez mikročipu (Lord et al., 2009; Dingman et al., 2014; Fatjó et al., 2015). Pro plné využití výhod, které přináší povinné mikročipování psů, je však nezbytná správná registrace těchto zvířat ve spolehlivém registru. Dohledatelnost mikročipovaných zvířat k jejich majitelům není vždy stoprocentní, jak ukazuje tento příspěvek, ale také např. jedna USA studie (Lord et al. 2009), kde bylo dohledatelných pouze 73% čipovaných zvířat, přitom 42% mikročipovaných psů nebylo vůbec dohledatelných v registrech. Důvodem, proč někteří mikročipovaní psi nejsou registrováni může být např. strach některých majitelů zvířat z možného postihu za pozdější a eventuálního opuštění zvířete, týrání zvířete. Důvodem, ale však může být prostá nevědomost, plynoucí z neznalosti povinnosti čipované zvíře rovněž zaregistrovat, nebo také nechota splnit další administrativní zatížení spojené s předchozím čipováním zvířete. (Röhlf et al., 2010) Propojení implantace mikročipu, tedy návštěvy veterinárního lékaře, který čipování provede, s registračním procesem by mohlo tento problém vyřešit, jak uvádí studie (Lord et al. 2009). Možná, pokud by byla registrace přímo spojena s mikročipováním zvířete skrze schváleného veterinárního lékaře, mohlo by to zvýšit počet správných registrací mikročipovaných psů.

Lepší a intenzivnější osvětová činnost skrze masová média může rovněž pomoci lidem připomenout, aby nezapomněli registrovat svá očiipovaná zvířata. V tomto ohledu hrají významnou roli právě také soukromí veterinární lékaři, kteří provádí mikročipování těchto zvířat a mají tak možnost svým klientům připomenout registraci svého zvířete. (Lord et al., 2009; Dingman et al., 2014). Jiné problémy s registrací ještě budou muset být vyřešeny, např. v případech, kdy zvíře mění majitele. Někteří autoři navrhuji, že proces registrace zájmových zvířat by měl být nápodoběn tomu, který je vytvořen pro registraci vozidel (Lancaster et al., 2015).

Závěr

Povinné čipování zvířat se stává čím dál více populárnějším opatřením pro regulaci chovu zájmových zvířat a pro lepší dohled nad počty zvířat a snížení počtu opuštěných zvířat. Spolu s povinným čipováním zvířat je však vyžadována povinná registrace takovýchto zvířat. Povinnost registrace čipovaných zvířat je obvykle ponechávána na samotném chovateli, který však nemusí proces registrace vůbec uskutečnit a tak je snížena efektivita praktického dopadu povinného čipování. Propojení procesu mikročipování přímo s následnou registrací takového zvířete může pomoci se zvýšením počtu správných registrací. V případě, že by za registraci čipovaných zvířat měli být zodpovědní veterinární lékaři, je nutné takové úvahy primárně diskutovat s organizacemi sdružující soukromé veterinární lékaře.

Poděkování

Poděkování náleží městskému útulku Děčín, který pro účely studie poskytl data ze své evidence psů přijatých do útulku.

Literatura

- COUNCIL, B. Microchipping and scanning: Where do vets' responsibilities lie? *Vet. Rec.* 2013, vol. 172, s. 520–523.
- DINGMAN, P.A.; LEVY, J.K.; ROCKEY, L.E.; CRANDALL, M.M. Use of visual and permanent identification for pets by veterinary clinics *The Veterinary Journal.* 2014, vol. 201, s. 46–50.
- FAJTÓ, J.; BOWEN, J.; GARCÍA, E.; CALVO, P.; RUEDA, S.; AMBLÁS, S.; LALANZA, F. J. Epidemiology of Dog and Cat Abandonment in Spain (2008–2013). *Animals.* 2015, vol. 5, s. 426–441.
- LANCASTER E., RAND J., COLLECOTT S.; PATERSON M. Problems Associated with the Microchip Data of Stray Dogs and Cats Entering RSPCA Queensland Shelters. *Animals,* 2015, vol. 5, s. 332–348.
- LORD, L.K.; INGWERSEN, W.; GRAY, J.L.; WINTZ, D.J. Characterization of animals with microchips entering animal shelters. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 2009, vol. 235, s. 160–167.
- PATRONEK, G.; GLICKMAN, L.; Moyer, M.. Population dynamics and the risk of euthanasia for dogs in an animal shelter. *Anthrozoös.* 1995, vol. 8, s. 31–43.
- RÖHLF, V.I.; BENNETT, P.C.; TOUKHATSI, S.; COLEMAN, G. Why do even committed dog owners fail to comply with some responsible ownership practices? *Anthrozoös.* 2010, vol. 23, s. 143–155.

Kontaktní adresa: Jiří Žák, MVDr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého třída 1, Brno 612 42, H14411@vfu.cz.

Vliv ročního období na mortalitu dojnic přepravovaných na jatky

Effects of Season of the Year on Transport-Related Mortality in Dairy Cows

Šimová Veronika, Večerek Vladimír, Voslářová Eva, Bedáňová Iveta

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

The number of animals that die during transport to a slaughterhouse or shortly after being delivered to a slaughterhouse may serve as an indicator of animal welfare during transport. The aim of this study was to determine the mortality rate in excluded dairy cows resulting from transport to slaughter in the Czech republic in the period from 2009 to 2014, and to investigate the effect of season of the year. The total mortality rate of transported dairy cows amounted to 0,207 % during the monitored period. The season of the year has a significant impact on the mortality rate among transported dairy cows. The highest mortality rate (0,284 %) was observed in spring months, contrarily, the lowest mortality rate (0,137 %) was found in autumn months.

Keywords: *dairy cows; mortality; transport; ambient temperature*

Úvod

Nedostatky v péči o welfare přepravovaného skotu mohou vést ke zvýšené mortalitě těchto zvířat a také ke zhoršené kvalitě z nich získaného masa. Proto je velmi důležité dodržovat důsledně požadavky na pohodu zvířat, uzákoněné v platné legislativě, a snížit tak stresovou zátěž přepravovaných zvířat na co nejnižší úroveň.

Byla zjištěna celá řada faktorů, které mohou mít na welfare přepravovaných zvířat negativní vliv (např. věk a zdravotní stav zvířat, doba přepravy, intervaly pro napájení, krmení a odpočinek, zacházení se zvířaty při jejich nakládání a vykládání, hustota osazení zvířat ve vozidle, rozmístění zvířat na ložné ploše vozidla, konstrukce a vybavení vozidla, způsob řízení vozidla, mikroklima ve vozidle a další). Nevhodné klimatické podmínky představují významný stresor, kterému musí zvířata při přepravě čelit. Teplota prostředí ovlivňuje mikroklima (teplota vzduchu, relativní vlhkost vzduchu, teplotně-vlhkostní index) uvnitř dopravního prostředku. V souvislosti s vlivem teploty prostředí na přepravovaný skot je třeba vzít v úvahu zejména možnost vzniku hypertermie a její dopady na fyziologii zvířat (únava, dehydratace, teplota tělesného jádra a další). Teplotní stres je faktorem, který prokazatelně přispívá k vysoké mortalitě skotu při přepravě (Caulfield *et al.*, 2014). Pravděpodobnost úhynu zvířat se rovněž zvyšuje, pokud průměrná teplota prostředí klesne pod -15 °C (Gonzales *et al.*, 2012). Obecně tedy můžeme říci, že welfare přepravovaných zvířat ohrožují teploty mimo termoneutrální zónu charakteristickou pro daný živočišný druh, tj. jak teploty příliš vysoké, tak teploty příliš nízké. Je třeba zohlednit i skutečnost, že rozdíly v teplotě prostředí nesouvisí pouze s ročním obdobím, ale také se zeměpisnou polohou. Navíc se vnímavost skotu na teplotní podmínky liší nejen v závislosti na kategorii přepravovaného skotu, ale též v závislosti na plemenné příslušnosti a produkčním typu skotu. Proto je při sledování sezónních vlivů na welfare přepravovaných zvířat důležité zohlednit a definovat specifické okolnosti, za nichž se přeprava uskutečňuje.

Materiál a metody

V období let 2009 až 2014 zaznamenávali veterinární inspektoři počty vyřazených dojnic přepravovaných na jatky v České republice a rovněž počty vyřazených dojnic, které v souvislosti s tímto transportem uhynuly. Údaje shrnující čísla získaná ze všech uskutečněných transportů skotu v České republice ve sledovaném časovém období byly

shromážděny v databázi informačního centra Státní veterinární správy. Získaná data byla následně exportována do programu Excel pro statistické zpracování. Na základě získaných výsledků byly vyhodnoceny rozdíly v mírách úhynu mezi jednotlivými ročními obdobími (*jaro* – březen, duben, květen; *léto* – červen, červenec, srpen; *podzim* – září, říjen, listopad a *zima* – prosinec, leden, únor) v každém roce a pro celé sledované období. Sezónní vliv na mortalitu vyřazených dojnic přepravovaných na jatky byl zjištěn na základě výpočtu celkového množství přepravovaných dojnic a celkového množství dojnic, které uhynuly během určitého ročního období v průběhu celého sledovaného období a výpočtu míry tohoto úhynu v procentech. Všechna data byla analyzována pomocí statistického programu Unistat 6.5. (Unistat Ltd., GB). Statistické porovnání bylo provedeno s využitím chí-kvadrát testu a kontingenčních tabulek. Pokud četnost sledovaného znaku byla nižší než 5, byl použit Fisherův exaktní test. Hladina významnosti byla 0,05.

Výsledky a diskuse

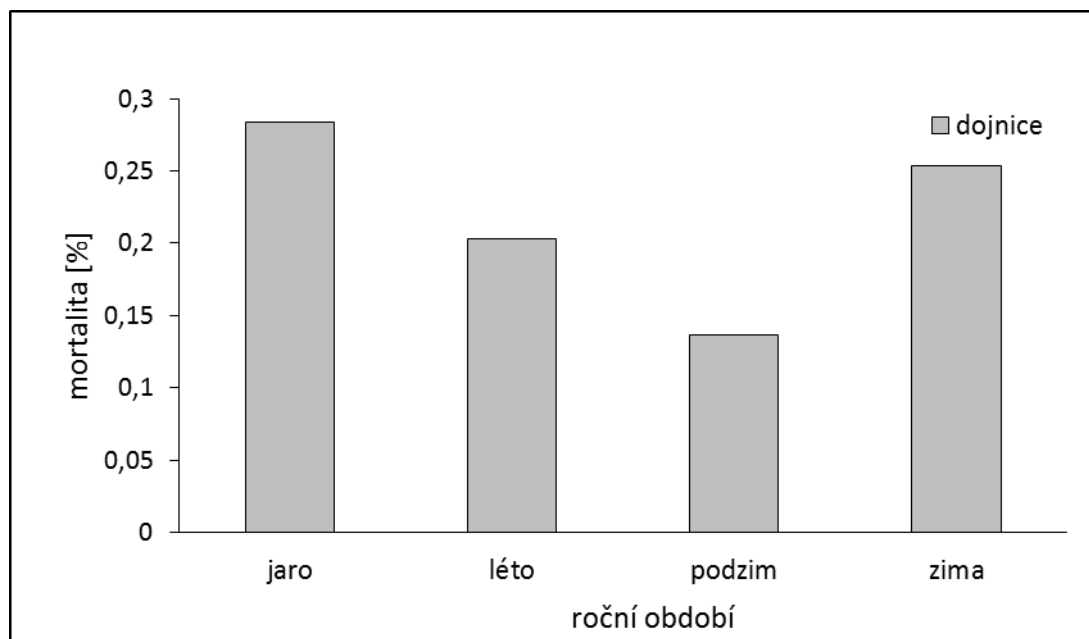
Z celkového počtu 703 733 sledovaných dojnic, přepravovaných na různé jatky v České republice v letech 2009 až 2014, jich 1 538 uhynulo. Úhrnná mortalita vyřazených dojnic v souvislosti s přepravou tak činila 0.207 %.

Vliv ročního období na mortalitu přepravovaných vyřazených dojnic je uveden v tabulce 1. Z této tabulky vyplývá, že transport vyřazených dojnic probíhal z hlediska počtu přepravovaných jedinců v jednotlivých ročních obdobích relativně rovnoměrně, nicméně počty uhynulých zvířat se lišily. Graf 2 znázorňuje rozdíly v úhynech vyřazených dojnic v závislosti na ročním období. Přepravované dojnice vykazovaly nejvyšší mortalitu v průběhu jarních měsíců (0,284 %), následovaly měsíce zimní (0,253 %). Mortalita dojnic byla v těchto ročních obdobích statisticky vysoce významně vyšší než v létě ($P = 0,002$) a na podzim ($P < 0,001$). Nejnižší mortalita přepravovaných dojnic byla zaznamenána v podzimních měsících (0,137 %).

Tabulka 1: Počet dojnic přepravovaných na jatky a počet dojnic uhynulých v důsledku této přepravy podle ročních období v letech 2009 až 2014.

Dojnice	Roční období	Jaro	Léto	Podzim	Zima
	Počet zvířat				
přepravované		175 184	170 732	180 865	176 952
uhynulé		497	346	247	448

Pokud porovnáme naše výsledky se závěry předchozích studií (např. Vecerek *et al.*, 2006), které dávaly zvýšenou míru úhynu skotu při přepravě do souvislosti především s teplotními extrémy, je patrné, že došlo k určitému posunu. V současné době se zdají být rizika spojená s extrémními teplotami dobře zvládnutá, což v praxi znamená, že přepravní podmínky byly v tomto ohledu patřičně přizpůsobeny požadavkům příslušných ročních období. Cernicchio *et al.* (2012) dospěli k závěru, že výkyvy teplot, obvykle pozorované během podzimu a časného jara, mohou mít vliv na zdravotní stav a užitkovost skotu, u kterého došlo v důsledku dlouhodobého transportu k váhovému úbytku. V rámci naší studie jsme nejvyšší míru úhynu přepravovaných dojnic zaznamenali v jarních měsících, následovaly měsíce zimní. Důvodem může být snížená kvalita krmiva v jarním období, oslabená imunita zvířat na přelomu zimy a jara a rovněž zvýšený výskyt respiračních infekcí v tomto období.



Graf 1: Mortalita dojníc ve vztahu k ročnímu období v letech 2009 až 2014.

Závěr

Pokud jde o souvislost mezi mírou úhynu přepravovaných dojníc a ročním obdobím, námi zjištěné výsledky se liší od závěrů dřívějších studií. Nejvyšší mortalitu přepravovaných dojníc jsme zaznamenali v jarních měsících (jiné studie spojují vyšší mortalitu spíše s obdobími teplotních extrémů – tj. s letním a zimním obdobím, kdy se teploty pohybují mimo termoneutrální zónu). Mortalitu dojníc při přepravě je možné dále snížit, pokud budou důsledně dodržovány všechny požadavky na welfare zvířat při přepravě. Aby se zabránilo zvýšené mortalitě zvířat v jarních měsících, je třeba zlepšit kvalitu krmiva podávaného v tomto období a průběžně pečovat o kondici zvířat tak, aby byla schopná úspěšně čelit přepravnímu stresu.

Literatura

CAULFIELD, M.P.; CAMBRIDGE, H.; FOSTER, S.F.; MCGREEVY, P.D. Heat stress: A major contributor to poor animal welfare associated with long-haul live export voyages. *The Veterinary Journal*. 2014, vol. 199, no. 2, s. 223-228.

CERNICCHIARO, N.; WHITE, B.J.; RENTER, D.G.; BABCOCK, A.H.; KELLY, L.; SLATTERY, R. Effects of body weight loss during transit from sale barns to commercial feedlots on health and performance in feeder cattle cohorts arriving to feedlots from 2000 to 2008. *Journal of Animal Science*. 2012, vol. 90, no. 6, s. 1940-1947.

GONZALEZ, L.A.; SCHWARTZKOPF-GENSWEIN, K.S.; BRYAN, M.; SILASI, R.; BROWN, F. Relationships between transport conditions and welfare outcomes during commercial long haul transport of cattle in North America. *Journal of Animal Science*. 2012, vol. 90, no. 10, s. 3640-3651.

VECEREK V, MALENA M JR, MALENA M, VOŠLÁROVA E, BEDANOVA I. Mortality in dairy cows transported to slaughter as affected by travel distance and seasonality. *Acta Veterinaria Brno*. 2006, vol. 75, no. 3, s. 449-454.

Kontaktní adresa: Veronika Šimová, MVDr. Mgr., Ústav veřejného a soudního veterinárního lékařství, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, simova172@seznam.cz.

Rozdíly v úhynech krůt při přepravě na jatky během roku

Differences in Mortality Rates of Turkeys Transported to the Slaughterhouse During the Year

¹Machovcová Zuzana, ¹Voslářová Eva, ¹Bedáňová Iveta, ²Malena Milan, ¹Večerek Vladimír

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno
²Státní veterinární správa ČR

Summary

Mortality of turkeys transported for slaughter was observed in individual months in the period from 2009 to 2014. The overall mortality of turkeys in relation to their transport was 0.147% in the monitored period. However, the mortality rates varied in individual months, they ranged from 0.055% to 0.321%.

Keywords: turkeys; mortality; transport

Úvod

Přeprava krůt na jatky tvoří významný podíl v přepravě drůbeže. Během procesu nakládání, přepravy a vykládání je drůbež vystavena mnoha potenciálně stresujícím faktorům, které zhoršují úroveň welfare přepravovaných ptáků a mohou vést až k případným úhynům jedinců (Nijdam aj., 2004). Negativní vliv přepravního stresu se promítá i do snížené kvality krůtího masa (Owens a Sams, 2000). V České republice se vlivem přepravního stresu působícího na krůty během přepravy zabývali Voslářová aj. (2006) a Voslářová aj. (2007). Úrovní úhynů krůt od odchytu až po čas porážky se v zahraničí dále zabývali Prescott aj. (2000), Petracci aj. (2006) a Weeks (2015). Cílem předložené práce bylo analyzovat počet přepravených krůt na jatky v jednotlivých měsících v průběhu roku a počet uhynulých jedinců v souvislosti s touto přepravou v České republice v období let 2009 až 2014 a posoudit tak vliv měsíce přepravy na úroveň úhynů.

Materiál a metody

Ve spolupráci se Státní veterinární správou ČR jsme v období let 2009-2014 sledovali počty krůt přepravených na jatky v České republice a počty uhynulých jedinců v souvislosti s touto přepravou. Získané údaje jsme dále analyzovali pro jednotlivé měsíce v roce. Pro každý měsíc v roce byla také zjištěna průměrná měsíční teplota ze záznamů Českého hydrometeorologického ústavu. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu Unistat v. 6.5. (Unistat Ltd., GB). Porovnání četnosti úhynů transportovaných krůt mezi jednotlivými měsíci za celé sledované období 2009-2014 bylo provedeno pomocí procedury 2x2 kontingenční tabulky a χ^2 testu (Zar, 1999).

Výsledky a diskuse

V České republice bylo v období let 2009-2014 celkem přepraveno 762 789 krůt, z nichž 1 125 (0,147 %) jedinců uhynulo v souvislosti s touto přepravou. Úroveň úhynů krůt je v námi sledovaném období nižší, než zjistili Voslářová aj. (2006) a Voslářová aj. (2007), kteří analyzovali úhyny krůt v obdobích 1997-2004 a 1997-2006 a zjistili úhyny na úrovni 0,280 %, resp. 0,272 %. Úhyny krůt v ČR zjištěné jak v naší studii, tak i v dřívějších studiích v ČR jsou výrazně nižší, než zjistili Petracci aj. (2006) v Itálii (0,38 %).

Počty krůt přepravených na jatky v České republice a počty jedinců uhynulých v souvislosti s touto přepravou v závislosti na kalendářním měsíci námi sledovaného období jsou uvedeny v Tabulce 1. Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v úhynech krůt při přepravě v jednotlivých měsících, kdy se úroveň úhynů pohybovala v rozmezí 0,055 % (listopad) až 0,321 % (květen). Nejvyšší úhyny byly zjištěny v období od května do září, kdy průměrná měsíční teplota, při které se přeprava uskutečňovala, přesahovala 12,77 °C. K podobným výsledkům dospěli Petracci aj. (2006) v Itálii, kteří zjistili výrazně vyšší mortalitu u krůt při přepravě v létě (0,52 %). Zvýšený výskyt úhynů krůt byl dále pozorován i při průměrné měsíční teplotě -1,95 °C v lednu (0,221 %). Obdobně Večerek aj. (2006), kteří sledovali úhyny brojlerových kuřat při přepravě na jatky v České republice, zjistili zvýšenou mortalitu jak v zimních tak i v letních měsících. Zvýšenou mortalitu autoři vysvětlují negativním dopadem velmi vysokých nebo naopak extrémně nízkých teplot na welfare přepravovaných brojlerů. Vliv sezónních změn teplot se může lišit vzhledem k různým klimatickým podmínkám v různých oblastech. Teplotní stres se však významně podílí na celkovém stresu působícím na drůbež během přepravy. Průkazný nárůst mortality u drůbeže při přepravě je spojován s teplotami nad 15 °C a pod 5 °C, stejně tak se při těchto teplotách zvyšuje riziko poranění (Nijdam aj., 2004).

Tabulka 1: Úhyny krůt při přepravě v závislosti na kalendářním měsíci roku a průměrné měsíční teplotě prostředí.

Měsíc	Průměrná měsíční teplota (°C)	Počet přepravených krůt	Počet uhynulých krůt	% uhynulých krůt
1	-1,950	39431	87	0,221
2	-1,550	50313	46	0,091
3	3,383	80293	64	0,080
4	9,483	71106	103	0,145
5	12,767	59552	191	0,321
6	16,200	50598	116	0,229
7	18,550	41449	63	0,152
8	17,500	49097	143	0,291
9	13,300	45475	113	0,248
10	7,917	49914	48	0,096
11	4,650	92964	51	0,055
12	-0,433	132597	100	0,075

Závěr

Studie prokázala negativní dopad vysokých i nízkých teplot okolního prostředí na úhyny krůt při přepravě. V praxi je žádoucí upravit podmínky přepravy krůt s ohledem na očekávanou teplotu prostředí během přepravy, zejména zajistit ochranu krůt před působením teplotních extrémů. Snížení expozice krůt extrémním teplotám a zajištění dobrých podmínek při přepravě řadíme mezi důležité faktory, které vedou k redukci počtu uhynulých krůt během přepravy na jatky.

Literatura

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

OWENS, C.M.; SAMS, A.R. The Influence of Transportation on Turkey Meat Quality. *Poultry Science*. 2000, vol. 79, s. 1204-1207.

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

PRESCOTT, N.B.; BERRY, P.S.; HASLAM, S.; TINKER, D.B. Catching and Crating Turkeys: Effects on Carcass Damage, Heart Rate, and Other Welfare Parameters. *J. Appl. Poultry Res.* 2000, vol. 9, s. 424-432.

VECEREK, V.; GRBALOVA, S.; VOŠLAROVA, E.; JANACKOVA, B.; MALENA, M. Effects of Travel Distance and the Season of the Year on Death Rates of Broilers Transported to Poultry Processing Plants. *Poultry Science*. 2006, vol. 85, s. 1881-1884.

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

VOŠLAROVA, E.; JANACKOVA, B.; RUBESOVA, L.; KOZAK, A.; BEDANOVA, I.; STEINHAUSER, L.; VECEREK, V. Mortality Rates in Poultry Species and Categories during Transport for Slaughter. *Acta vet. Brno.* 2007, vol. 76, s. 101-108.

WEEKS, C.A. Poultry Handling and Transport. *Livestock Handling and Transport*. 2014, 4th Edition (ed. T. Grandin), s. 378-398.

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

Kontaktní adresa: Zuzana Machovcová, MVDr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, h15366@vfu.cz.

Hodnocení úrovně welfare volně žijících druhů zvířat pomocí neinvazivních metod

Assessing the Welfare of Wild Animals Using Non-Invasive Methods

Malíková Martina, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

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

Summary

The aim of this study was to review available methods of assessing the animal welfare using non-invasive methods, namely determining stress markers in different biological materials (feces, urine, saliva, hair, milk). The paper emphasizes advantages of non-invasive methods in comparison to the traditional use of invasive methods in stress assessment. Invasive methods are usually based on blood sampling which can cause additional stress to animals. Furthermore, blood sampling can be difficult if not impossible at all in some wild and zoo animals.

Keywords: stress; welfare; non-invasive methods; wild animals; feces

Úvod

Jedním ze základních předpokladů k zajištění optimálních podmínek pro život zvířete je snaha co nejvíce omezit negativní působení stresu (Möstl and Palme, 2002). Je všeobecně známo, že stresová odpověď vyvolaná stresory různé povahy ovlivňuje v určité míře všechny biologické systémy, které se následně snaží určitými mechanismy udržet homeostázu v těle zvířete (Moberg, 2000). Dlouhodobé působení stresu může nejen negativně ovlivnit chování jedince, ale v první řadě snížit jeho odolnost vůči onemocněním (Millspaugh and Washburn, 2004). Termín welfare zvířat je aktivně diskutován nejen ve vědecké sféře, ale i ve společnosti obecně (Möstl and Palme, 2002), a se zvyšujícím se zájmem zlepšit danému zvířeti podmínky pro život roste i snaha vědců zjistit, jak efektivně měřit stres a tím hodnotit úroveň welfare zvířat.

Metody hodnocení úrovně stresové odpovědi

Stres podstatně ovlivňuje různé tělesné funkce. Byl prokázán jeho negativní vliv na činnost vnitřních orgánů, imunitní systém, reprodukci i chování zvířete (Sapolsky *et al.*, 2000). Jednotlivec, který se vyrovnává s působením určitého stresoru, vykazuje stresovou reakci, která je tvořena řadou fyziologických a behaviorálních změn. Hlavním mediátorem stresové odpovědi je hypotalamo-hypofyzární osa (Sapolsky *et al.*, 2000), která zapříčiňuje mimo jiné uvolnění glukokortikoidních hormonů (Goymann *et al.*, 1999), z nichž jsou nejvýznamnějšími a nejdůležitějšími kortizol a kortikosteron (Sapolsky *et al.*, 2000). Přesněji jde o jejich metabolity, které jsou druh od druhu v různém poměru vylučovány do krve (Von Holst, 1998) a jiných biologických materiálů, konkrétně do moči, slin, mléka, srsti, fécés apod. V současnosti existuje mnoho metod, kterými lze hodnotit úroveň stresové odpovědi u pozorovaného jedince. Doposud však nebyla nalezena ta jediná správná a přesná, která by úroveň této odpovědi plně zhodnotila (Hofer and East, 1998). Nejužívanější metodou, kterou můžeme kvantifikovat úroveň působení stresu na organismus, je stanovení stresových ukazatelů z krve (Palme *et al.*, 2005). Ne vždy je však použití této invazivní metody žádoucí. Odběr krve samotný působí jako silný stresor a dokonce je většinou nemožné, někdy až nebezpečné, takovýto odběr provést u některých zoo a volně žijících zvířat (Palme and Möstl, 1996; Palme *et al.*, 1999; Palme *et al.*, 2005; Arias *et al.*, 2013). Další nevýhodou odběrů krve je skutečnost, že naměřené koncentrace metabolitů vypovídají pouze o aktuálním stavu zvířete, měří tedy akutní stres, a pokud je bráno v úvahu, že vylučování glukokortikoidních hormonů podléhá cirkadiální pulzaci, nevypovídaly by naměřené hodnoty exaktně o

endokrinním statusu zvířete (Sapolsky *et al.*, 2000; Touma and Palme, 2005). Nejen že je tedy odběr krve bolestivou, stresující a mnohdy neproveditelnou metodou, ale i metodou, která nedokáže zhodnotit úroveň stresové odpovědi za delší časový úsek. V posledních letech se stávají mnohem více využívanými neinvazivní metody hodnocení úrovně stresové odpovědi, které jsou aplikovány na stále se zvyšující počet druhů laboratorních, zájmových, hospodářských nebo zoo a volně žijících zvířat, a jsou dále široce užívány pro vyjádření vztahu mezi endokrinním a behaviorálním statusem zvířete (Touma and Palme, 2005). Na rozdíl od metod invazivních zohledňují kolísání v hladinách metabolitů během dne (Palme, 2005; Palme *et al.*, 2005) a měří působení stresu za delší časový úsek, měří tedy chronický stres, který přesněji vypovídá o endokrinním statusu jedince. Oproti metodám invazivním mají řadu dalších výhod. Především mohou být odebrány jednoduše, bez větší manipulace se zvířetem, opakovaně od jednoho jedince a dokonce i u velmi malých zvířat (Touma and Palme, 2005). Například jak uvádějí Palme *et al.* (2005), sběr vzorků fécés je nenáročný, zvíře nevyrušuje a zbytečně nestresuje a umožňuje odebírat vzorky opakovaně a po dlouhý časový interval. Navíc jsou vzorky fécés reprezentovány směsí různých metabolitů glukokortikoidů z krevní plazmy a tím poskytují jednotný obraz o funkci nadledvin (Goymann *et al.*, 1999). Další výhody neinvazivních metod dále uvádějí Goymann (2005) pro ptáky, Narayan (2013) pro obojživelníky a Hodges *et al.* (2010) pro savce. Mimo odběru vzorků fécés, můžeme k analýzám použít i vzorky srsti, moči, slin anebo mléka, avšak odběr takovýchto vzorků vyžaduje určitou míru manipulace se zvířetem a mohou být tedy použity pouze v některých případech (Möstl and Palme, 2002), což podstatně limituje jejich praktické využití u zoo a volně žijících zvířat podobně jako u metod invazivních. Je nutné mít také na paměti, že mezi druhy existují značné rozdíly v množství vylučovaných metabolitů do jednotlivých biologických materiálů. Např. Palme *et al.* (2005) uvádějí, že se množství metabolitů vyloučených ve fécés druh od druhu značně liší (od pouhých 7 % u prasat po 86 % u koček). U některých druhů (koček nebo potkanů) je vysoké procento obsaženo ve vyloučených výkalech, zatímco u jiných (ovce, prase, pes nebo slon) je hlavní cestou eliminace moč. Navíc metabolismus a samotná exkrece steroidních hormonů se mezi jednotlivými druhy i pohlavím značně liší (Touma *et al.*, 2003; Palme, 2005; Palme *et al.*, 2005). Při volbě odebíraných vzorků je tedy nezbytně nutné zohlednit, od jakého druhu zvířete bude vzorek odebírán (Palme, 2005).

Závěr

Na základě výše uvedených skutečností je zřejmé, že neinvazivní metody stanovení steroidních hormonů mohou být považovány za nejvhodnější metodu hodnocení úrovně stresové odpovědi u volně žijících druhů zvířat a mohou tak přispět nejen ke zlepšení welfare při jejich chovu v zajetí, ale i při dalších pravděpodobně velmi stresujících situacích, jakými jsou například jejich transport a manipulace s nimi v zoologických zahradách.

Literatura

- ARIAS, N.; REQUENA, M.; PALME, R. Measuring faecal glucocorticoid metabolites as a non-invasive tool for monitoring adrenocortical activity in South American camelids. *Animal welfare*. 2013, **22**, 25-31.
- GOYMANN, W.; MÖSTL, E.; VAN'T HOF, T.; EAST, M.L.; HOFER, H. Noninvasive Fecal Monitoring of Glucocorticoids in Spotted Hyenas, *Crocuta crocuta*. *General and Comparative Endocrinology*. 1999, **114**, 340-348.
- GOYMANN, W. Noninvasive Monitoring of Hormones in Bird Droppings: Physiological Validation, Sampling, Extraction, Sex Differences, and the Influence of Diet on Hormone Metabolite Levels. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005, **1046**, 35-53.
- HODGES, K.; BROWN, J.; HEISTERMANN, M. Endocrine monitoring of reproduction and stress. In: KLEIMAN, D.G. *et al.* *Wild Mammals in Captivity: Principles and Techniques for Zoo*

Management. Chicago and London: The University of Chicago Press, 2010. 2nd Edition. ISBN-13: 978-0-226-44009-5.

HOFER, H.; EAST, M.L. Biological conservation and stress. *Advances in the Study of Behavior*. 1998, **27**, 405-525.

MOBERG, G.P. Biological responses to stress: implications for animal welfare. In: MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. *The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare*. Wallingford, UK: CABI Publishing, 2000. ISBN 0 85199 2000.

MÖSTL, E.; PALME, R. Hormones as indicators of stress. *Domestic Animal Endocrinology*. 2002, **23**, 67-74.

MILLSPAUGH, J.J.; WASHBURN, B.E. Use of fecal glucocorticoid metabolite measures in conservation biology research: considerations for application and interpretation. *General and Comparative Endocrinology*. 2004, **138**, 189-199.

NARAYAN, E.J. Non-invasive reproductive and stress endocrinology in amphibian conservation physiology. *Conservation Physiology*. 2013, **1**, 1-16.

PALME, R.; MÖSTL, E. Measurement of cortisol metabolites in faeces of sheep as a parameter of cortisol concentration in blood. *International Journal of Mammalian Biology*. 1996, **62**, 192-197.

PALME, R.; ROBIA, CH.; MESSMANN, S.; HOFER, J.; MÖSTL, E. Measurement of faecal cortisol metabolites in ruminants: a non-invasive parameter of adrenocortical function. *Wiener Tierärztliche Monatsschrift*. 1999, **86**, 237-241.

PALME, Rupert. Measuring Fecal Steroids Guidelines for Practical Application. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005, **1046**, 75-80.

PALME, R.; RETTENBACHER, S.; TOUMA, C.; EL-BAHR, S.M.; MÖSTL, E. Stress Hormones in Mammals and Birds: Comparative Aspects Regarding Metabolism, Excretion, and Noninvasive Measurement in Fecal Samples. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005, **1040**, 162-171.

SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews*. 2000, **21**(1), 55-89.

TOUMA, CH.; PALME, R. Measuring Fecal Glucocorticoid Metabolites in Mammals and Birds: The Importance of Validation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2005, **1046**, 54-74.

TOUMA, CH.; SACHSER, N.; MÖSTL, E.; PALME, R. Effect of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice. *General and Comparative Endocrinology*. 2003, **130**, 267-278.

VON HOLST, D. The concept of stress and its relevance for animal behavior. *Advances in the Study of Behavior*. 1998, **27**, 1-131.

Kontakní adresa: Martina Malíková, MVDr., Ústav ochrany zvířat a welfare, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H15367@vfu.cz.

The Effect of T-2 toxin on Haematological Parameters in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*)

Vakula Josef

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

Summary

T-2 toxin, a trichothecenes mycotoxin, is produced by microscopic fungi *Fusarium* spp. Feeding with plant feed contaminated with mycotoxins represents a risk for fish health. In this study we assessed the effect of two concentration (1 mg.kg⁻¹ and 1.8 mg.kg⁻¹) of T-2 toxin containing feed on haematological parameters in rainbow trout after subchronic 28-day exposure. We recorded significantly ($P < 0.01$) increased red blood cell count (RBC) in the concentration 1 mg.kg⁻¹ and 1.8 mg.kg⁻¹ compared to control and statistically significant ($P < 0.01$) decrease of levels of haemoglobin among control group and tested groups 1.8 mg.kg⁻¹ and among both tested groups each other. The statistically significant ($P < 0.01$) lower values of mean corpuscular haemoglobin value (MCH) and mean corpuscular volume (MCV) were observed in both group. In group 1.8 mg.kg⁻¹ arrived to statistically significant ($P < 0.05$) decrease of (MCHC). Packed cell volume (PCV) did not decrease statistically significant in both tested groups. We analysed also leucogram. These results show that estimated T-2 toxin content limit in feed mixtures for salmonids fish should be up to 1 mg.kg⁻¹.

Keywords: trichothecenes; mycotoxin; hematotoxic effect; rainbow trout

Introduction

T-2 toxin belongs to the group of trichothecenes mycotoxins type A, which are produced by microscopic fungi *Fusarium*. Toxic effect of T-2 toxin on humans and animals has been proved. In this context, its neurotoxicity, hepatotoxicity, immunotoxicity, toxic effects on reproduction and its ability to reduce body weight is mentioned (Marasas a kol., 1969; Bondy a Pestka, 2000; Grizzle a kol., 2004). T-2 toxin significantly affects haematological parameters, causes histopathological changes and has an impact on feed conversion and weight gain in fish. (Manning a kol., 2003; Balogh a kol., 2009).

Material and Methods

95 pieces of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (260 ± 30 g) were used for the experiment. Fish were divided into five tanks of 1 m³, where the control group (n = 19) was in one tank, the first experimental (n = 36) and the second experimental group (n = 40) each occupied two tanks. Tanks filled with tap water left to stand were connected to the recirculation system. Light regime in fish took place in the system 12:12 h light:dark cycle. During the two-week acclimatization and during the experiment the fish were fed by diets on total amount of 1% of their weight twice a day. The control group received feed without the presence of T-2 toxin, while the experimental groups received feed with two concentrations (1 and 1.8 mg.kg⁻¹) of T-2 toxin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). The water temperature during the experiment varied from 14.5 to 15.5 ° C, oxygen saturation from 88.1 to 97.2% and a pH of from 7.3 to 8.2. Chemical indicators of water were determined as follows: total ammonia 0.1 to 0.6 mg / L, 40 mg NO₃⁻ / L NO₂⁻ 0.5 to 0.15 mg / L and Cl⁻ 16 mg / L. After finishing the test (after 28 days) blood of the fish was drawn for hematology. There was also an analysis of mycotoxins in the feed by liquid chromatography. Statistical analysis of gained data was performed by using the 5.6 Unistat for Excel programme.

Results

The results of hematological examinations are shown in Table 1.

Table 1: Hematological parameters in rainbow trout after 28-day exposure of two concentrations of T-2 toxin 1 mg.kg⁻¹ (n = 36) and 1.8 mg.kg⁻¹ (n = 40) and in control group (n = 19). Data are presented as mean ± standard deviation. Highly significant differences (p<0.01) among the various test groups are labelled with different letters of the alphabet.

parameter	control	T-2 toxin 1 mg.kg ⁻¹	T-2 toxin 1,8 mg.kg ⁻¹
number of erythrocytes [10 ¹² /l]	1,30 ± 0,186 ^a	1,76 ± 0,280 ^b	1,9 ± 0,407 ^b
hemoglobin [g/l]	85,80 ± 6,20 ^a	80,7 ± 7,52 ^a	65,1 ± 11,95 ^b
hematocrit [l/l]	0,31 ± 0,046 ^a	0,28 ± 0,055 ^b	0,28 ± 0,077 ^b
MCH [p/g]	66,10 ± 11,57 ^a	47,2 ± 9,29 ^b	35,4 ± 7,69 ^b
MCV [fl]	247,5 ± 52,94 ^a	159,5 ± 39,25 ^b	154,9 ± 58,68 ^b
MCHC [l/l]	0,27 ± 0,043 ^a	0,30 ± 0,046 ^a	0,25 ± 0,071 ^b

The number of erythrocytes was significantly (P <0.01) increased at both concentrations of mycotoxin compared to the control. There was also a statistically significant decrease in hemoglobin (P <0.01) between the control and the group with a concentration of T-2 toxin 1.8 mg.kg⁻¹. There were no statistically significant differences in hematocrit values. A statistically significant decrease (P <0.01) in the values of MCH was observed between the control and the tested concentrations. A statistically significant decrease (PH <0.01) in values of MCV occurred at both tested concentrations compared to the control. At the concentration of 1.8 mg.kg⁻¹ there was a statistically significant (P <0.05) decrease in MCHC values compared to the control and the concentration at 1 mg.kg⁻¹.

Discussion

The results of hematological examination proved negative effect of T-2 toxin on red blood cell indices. A significant increase in (P <0.01) the number of erythrocytes in both tested concentrations in comparison with the control indicates increased erythropoiesis under stress induced by exposure to mycotoxin. Significant decrease (pH <0.01) in hemoglobin between the control group and the two tested concentrations may indicate a nutritional stress (Hlophe and Moyo, 2014) or low protein diets (Sakthivel, 1988; Qiang et al. 2013), respectively low usability of protein feed as in our case. The weight of the tested fish at the end of the experiment was lower than in the control group. Increased number of erythrocytes, together with a low content of hemoglobin causes a statistically significant decrease (P <0.01) in the values of MCH and MCHC observed among the tested groups. Reducing the value of MCV

may indicate a qualitatively impaired erythropoiesis. In both the tested groups there was proved mild not statistically significant decrease in hematocrit. Similar results were achieved by Manning et al. (2003) in *Ictalurus punctatus* fed by diets containing T-2 toxin; moreover he stated that low hematocrit is the result of damage of hematopoietic parts anterior kidney.

Conclusion

Our study confirmed the increased susceptibility of rainbow trout to the effects of T2 toxin contained in the feed. The tested concentrations of 1 mg.kg⁻¹ and 1.8 mg.kg⁻¹ induced changes in some hematological indices in red blood cells.

Acknowledgements

The study was financially supported by the project IGA 31/2014 / FVHE, CZ.1.07 / 2 March 00 / 30.0053.

References

- BALOGH, K.; HEINCINGER, M.; FODOR, J.; MÉZES, M. Effect of long term feeding of T-2 and HT-2 toxin contaminated diet on the glutathione redox status and lipid peroxidation processes in common carp (*Cyprinus carpio* L.). *Acta Biologica Szegediensis*. 2009, vol. 53, no. 1, s.23-27.
- BONDY, G.S.; PESTKA, J.J. Immunomodulation by fungal toxins. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews*. 2000, vol. 3, no. 2, s. 109–143.
- GRIZZLE, J.M.; KERSTEN, D.B.; MCCracken, M.D.; HOUSTON, A.E.; SAXTON, A.M. Determination of the acute 50% lethal dose T-2 toxin in adult bobwhite quail; additional studies on the effect of T-2 mycotoxin on blood chemistry and the morphology of internal organs. *Avian Diseases*. 2004, vol.48, no.2, s.392–399.
- HLOPHE, S.N.; MOYO, N.A.G. Replacing Fishmeal with Kikuyu Grass and Moringa Leaves: Effects on Growth, Protein Digestibility, Histological and Haematological Parameters in *Clarias gariepinus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 2014, vol. 14, s. 795-806.
- MANNING, B.B.; LI, M.H.; ROBINSON, E.H.; GAUNT, P.S.; CAMUS, A.C.; ROTTINGHAUS, G.E. Response of channel catfish to diets containing T-2 toxin. *Journal of Aquatic Animal Health*. 2003, vol. 15, s. 229-238.
- MARASAS, W.F.O.; AMBURG, J.R.; SMALLEY, E.B.; STRONG, F.M.; RAGLAND, W.L.; DEGURSE, B.E. Toxic effect on trout, rats and mice of T-2 toxin produced by the fungus *Fusarium tricinctum* (Cd.) Snyder et Hans. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1969, vol. 15, no. 2, s. 471-482.
- QIANG, J.; YANG, H.; WANG, H.; KPUNDEH, M.D.; XU, P. Interacting effects of water temperature and dietary protein level on hematological parameters in Nile tilapia juveniles, *Oreochromis niloticus* (L.) and mortality under *Streptococcus iniae* infection. *Fish & Shellfish Immunology*. 2013, vol. 34, no. 1, s. 8-16.
- SAKTHIVEL, M. Effects of varying dietary protein level on the blood parameters of *Cyprinus carpio*. *Proceedings of the Indian National Academy of Sciences: Animal Sciences*. 1988, vol. 97, no. 4, s. 363-366.

Contact address: Josef Vakula, Ing., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, H13021@vfu.cz.

SEKCE 6

Veterinární toxikologie a toxikologie potravin

Vliv kombinace tramadolu hydrochloridu a naproxenu sodného na raná vývojová stádia ryb

Effect of Mixture of Tramadol Hydrochloride and Naproxen Sodium on Fish Early-Life Stages

¹Sehonová Pavla, ¹Plhalová Lucie, ¹Blahová Jana, ²Beránková Petra,
¹Doubková Veronika, ¹Svobodová Zdeňka

¹Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Fakulta Veterinární Hygieny a Ekologie, Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno

²Ústav farmakologie a farmacie, Fakulta Veterinárního lékařství, Veterinární a Farmaceutická Univerzita Brno

Summary

The aim of this study was to perform the fish embryo acute toxicity (FET) test on zebrafish (*Danio rerio*) and the early life stage toxicity test on common carp (*Cyprinus carpio*) with mixture of tramadol hydrochloride and naproxen sodium and assess their effect on fish early life stages. The FET was performed using method inspired by OECD guideline 236. Embryo-larval toxicity test with *C. carpio* was performed according to OECD guideline 210. Hatching was significantly influenced in both acute and subchronic toxicity assays. Subchronic exposure influenced also mortality, early ontogeny, both morphometric and condition characteristics and caused changes in antioxidant enzyme activity and increased lipid peroxidation. The LOEC value was found to be 10 µg/l of these substances.

Keywords: aquatic contamination; *Danio rerio*; *Cyprinus carpio*; toxicity test; oxidative stress

Úvod

Hlavním zdrojem reziduí léčiv v povrchových vodách je nízká účinnost jejich odstranění v čistírnách odpadních vod.

Naproxen sodný (NS) patří do skupiny nesteroidních antiflogistik. Jeho rezidua jsou v povrchových vodách pravidelně detekována. Verlicchi et al. (2012) naměřili 11 µg/l naproxenu v nemocničních odpadních vodách v Itálii. Tramadol hydrochlorid (TH) působí jako agonista na µ-opioidních receptorech a zároveň blokuje zpětné vychytávání noradrenalinu a serotoninu (Raffa et al., 1992). Kasprzyk-Hordern et al. (2009) naměřili koncentrace tramadolu v odpadních vodách ve Velké Británii > 30 µg/l. Naproti tomu, Wick et al. (2009) naměřili koncentrace tramadolu 0,24 µg/l na odtoku z čistírny odpadních vod v Německu.

Cílem práce bylo zhodnotit vliv kombinace tramadolu hydrochloridu a naproxenu sodného na raná vývojová stádia ryb.

Materiál a metody

Byly provedeny 2 testy toxicity. Koncentrační řada byla zvolena 10; 50; 100 a 200 µg/l u obou testů toxicity a byla odvozena na základě environmentálních koncentrací sledovaných látek. Každá koncentrace se skládala z obou testovaných látek ve stejném poměru. Nejprve byl proveden test embryonální toxicity s embryi *D. rerio* dle modifikované metodiky OECD 236 (OECD, 2013). V průběhu testu byla hodnocena mortalita a subletální endpointy (Nagel, 2002).

Test embryo-larvální toxicity byl proveden na kapru obecném (*C. carpio*) dle metodiky OECD 210. Test byl ukončen po 32 dnech. V průběhu testu byly pravidelně odebrány vzorky pro hodnocení délko-hmotnostních parametrů, rychlosti vývoje, vývojových deformit a histopatologické vyšetření. Na konci testu byly dále odebrány vzorky pro stanovení aktivity antioxidantních a detoxikačních enzymů a lipidní peroxidace.

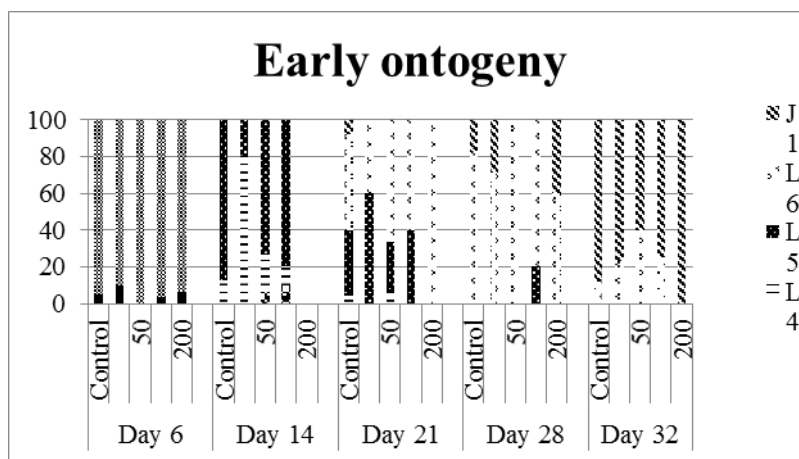
Výsledky a diskuze

V embryonálním testu toxicity na *D. rerio* nebyly kromě dřívějšího vylíhnutí plůdku v koncentracích 50 a 200 µg/l pozorovány žádné další změny ve srovnání s kontrolou.

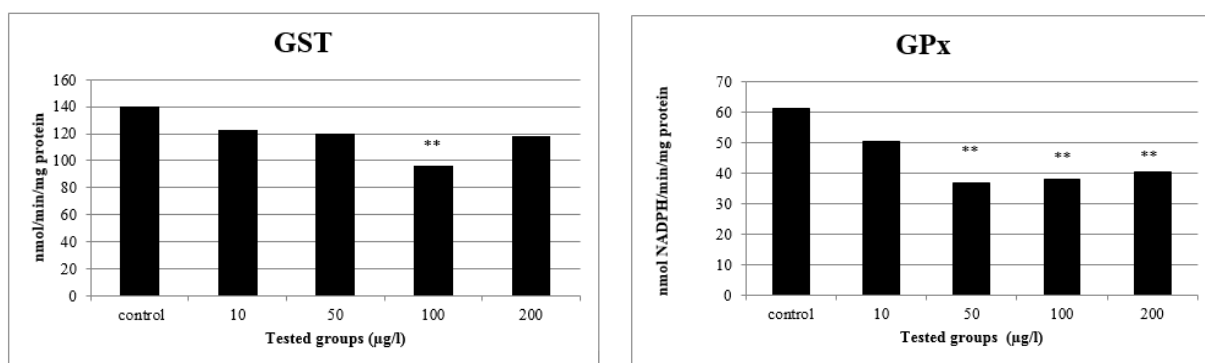
Subchronické působení kombinace TH a NS na embryonarvální stádia *C. carpio* se projevilo zvýšenou mortalitou v nejvyšší testované koncentraci 200 µg/l. Dále byla u testovaných skupin ve srovnání s kontrolou pozorována retardace vývoje (graf 1) a morfologické anomálie. Histopatologické vyšetření odhalilo změny na žábřácích a kůži.

Rovněž byl pozorován pokles v aktivitě glutation-peroxidázy (GPx) a glutation-S-transferázy (GST) (graf 2). Stancova et al. (2015) sledovali vliv naproxenu na parametry oxidativního stresu u juvenilních *D. rerio* během 14denního experimentu. Již po 3 dnech expozice bylo pozorováno signifikantní zvýšení GPx a GST v koncentracích 1 a 10 µg/l ve srovnání s kontrolou. Aktivita těchto enzymů se na konci testu vrátila do normálu. Snížení aktivity sledovaných enzymů v naší provedené studii mohlo být následek vyčerpání organismu po dlouhodobém působení testovaných látek. Navíc byl testován efekt dvou látek ve směsi, což mohlo díky chemickým interakcím mezi těmito látkami negativní efekt polutantů zesílit.

Hodnoty TBARS byly signifikantně vyšší v koncentracích 50 (p<0,05) a 100 µg/l (p<0,01) ve srovnání s kontrolou, což poukazuje na zvýšenou lipidní peroxidaci po působení polutantů.



Graf 1: Výskyt jednotlivých vývojových stádií v kontrole a exponovaných skupinách u *C. carpio*.



Graf 2: Aktivita GST a GPx u *C. carpio* po subchronickém působení kombinace tramadolu hydrochloridu a naproxenu sodného (** pro p<0,01).

Závěr

Výsledky testu subchronické toxicity potvrzují, že i nízké koncentrace reziduí léčiv v povrchových vodách mohou mít nezanedbatelný vliv na organismy vodního prostředí.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU 226/2015/FVHE.

Literatura

KASPRZYK-HORDERN, B., DINSDALE, R.M., GUWY, A.J. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Research*. 2009, vol. 43, s 363–380.

NAGEL, R. DarT: The embryo test with zebrafish *Danio rerio* – a general model in ecotoxicology and toxicology. *ALTEX 19*. 2002, s. 38–48.

OECD (1992): OECD Guideline 210 for testing of chemicals: Fish, Early-life Stage Toxicity Test, 18 pp.

OECD (2013): OECD Guideline 236 for the testing of chemicals: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, 22 pp.

RAFFA, R.B., FRIDERICHS, E., REIMANN, W., SHANK, R.P., CODD, E., VAUGHT, J.L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an “atypical” opioid analgesic. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1992, vol. 260, s. 275–285.

STANCOVA, V., PLHALOVA, L., TICHY, F., DOUBKOVA, V., MARSALEK, P., HOSTOVSKY, M., SVOBODOVA, Z. Oxidative stress indices and histopathological effects of the nonsteroidal antiinflammatory drug naproxen in adult zebrafish (*Danio rerio*). *Neuroendocrinology Letters*. 2015, vol. 36, s. 101–106.

VERLICCHI, P., AUKIDY, M.A., GALLETI, A., PETROVIC, M., BARCELÓ, D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *The Science of the Total Environment*. 2012, vol. 430, s. 109–118.

WICK, A., FINK, G., JOSS, A., SIEGRIST, H., TERNER, T.A. Fate of beta blockers and psychoactive drugs in conventional wastewater treatment. *Water Research*. 2009, vol. 43, s. 1060–1074.

Kontaktní adresa: Pavla Sehonová, Mgr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1, 612 42 Brno, H14023@vfu.cz.

Vliv tonalidu na vybrané ukazatele sledované u pstruha duhového a dánia pruhovaného

Effect of Tonalide Exposure on Selected Indices in Rainbow Trout and Zebrafish

¹Enevová Vladimíra, ¹Blahová Jana, ¹Plhalová Lucie, ¹Doubková Veronika, ¹Maršálek Petr, ²Franc Aleš, ³Fiorino Emma, ³Faggio Caterina, ¹Svobodová Zdeňka

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

²Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Farmaceutická fakulta, Ústav technologie léků

³Department of Biological and Environmental Sciences, University of Messina, Itálie

Summary

The aim of this study was to assess the effects of subchronic tonalide exposure on selected indices in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and zebrafish (*Danio rerio*). For 2 month, *Danio rerio* at initial age of 30 days were exposed to tonalide at environmental concentrations (50; 500; 5 000 and 50 000 ng/l). At the end of the experiment, the fish were killed, immediately frozen and stored at -85 °C. Selective oxidative stress markers and vitellogenin concentrations were measured in whole body homogenates. Another experiment was performed on rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Tonalide was added to feed at environmental concentrations (854 and 8 699 ng/g) during a 6 weeks subchronic test. At the end of experiment, blood samples were taken and plasma samples were used for determination of vitellogenin. Selected tissues samples were used for analysis of oxidative stress markers. We observed significant changes in most of oxidative stress markers in zebrafish. We do not confirmed effect of tonalide exposure on vitellogenesis in rainbow trout and zebrafish.

Keywords: polycyclic musk compounds; oxidative stress markers; fish; vitellogenesis

Úvod

Musk sloučeniny (tzv. syntetické analogy pižma) se řadí do skupiny relativně nových syntetických perzistentních organických polutantů. Uvedené sloučeniny se rozšířeně využívají jako vonné složky v přípravcích pro osobní potřebu nebo různých čistících a pracích prostředcích. Jejich produkce se celosvětově neustále zvyšuje a v současnosti se pohybuje okolo 10 000 tun ročně. Hlavním zdrojem kontaminace je především masivní používání výrobků pro osobní péči a různých detergentů. Musk sloučeniny lze detekovat jak ve vodě, tak i v sedimentu a odtud mohou dále vstupovat do potravního řetězce a kumulovat se v tkáních vodních organismů (Vávrová et al. 2010). Musk sloučeniny vykazují obecně relativně nízkou akutní toxicitu pro vodní organizmy. Riziko představuje především dlouhodobá expozice environmentálními koncentracím. V dlouhodobých toxikologických studiích prováděných na vodních organizmech bylo potvrzeno, že musk sloučeniny mohou fungovat jako potencionální endokrinní disruptory. U vybraných druhů ryb byly zaznamenány histopatologické změny na gonádách a zároveň byla potvrzena indukce syntézy vitellogeninu (VTG) v játrech samců (Yamauchi et al. 2008). Mimo jiné bylo zjištěno, že musk sloučeniny mohou u ryb podpořit tvorbu reaktivních kyslíkových radikálů a následně indukovat oxidativní stres. Změny antioxidačního ochranného systému pak mohou vést k porušení struktury důležitých biomolekul, způsobovat poruchy vývoje nebo zpomalení růstu (Fernandes et al. 2013).

Materiál a metody

Hodnocení účinků tonalidu bylo realizováno v rámci dvou subchronických testů toxicity, ve kterých byl testován účinek tonalidu aplikovaného ve vodě a v krmivu. V prvním testu byly

po dobu 2 měsíců exponovány juvenilní stádia dáňia pruhovaného účinkům tonalidu aplikovaného ve vodě (v rozmezí 50 – 50 000 ng/l). Po ukončení testu byly odebrány vzorky ryb pro analýzu ukazatelů oxidativního stresu (glutathion reductáza – GR, glutathion peroxidáza – GPx, glutathion S-transferáza – GST, lipidní peroxidace stanovená pomocí kyseliny thiobarbiturové – TBARS a kataláza – CAT). Dále bylo provedeno kvantitativní stanovení VTG v celotělních homogenátech metodou ELISA za využití komerčního kitu. V druhém testu byl v průběhu 6 týdnů hodnocen účinek tonalidu v krmivu (854 a 8 699 ng/g) na vybrané ukazatele pstruha duhového. Kontrolní skupina byla krmena komerčním krmivem bez přídavku tonalidu. Ryby byly umístěny v recirkulačním systému a krmeny 2x denně v dávce 1% celkové hmotnosti ryb. Po ukončení experimentu byl proveden odběr krve a následně bylo v plazmě samců provedeno stanovení VTG s využitím ELISA kitu. Pohlaví ryb bylo určeno makroskopicky při pitvě. Ve vybraných tkáních pak byla provedena analýza ukazatelů oxidativního stresu (GR, GPx, GST, CAT, TBARS). Koncentrace testované látky v krmivu i ve vodě byla ověřena pomocí plynové chromatografie s hmotnostní detekcí. Statistické zpracování získaných výsledků bylo provedeno pomocí statistického programu Unistat 5.6.

Výsledky a diskuze

Výsledky ukazatelů oxidativního stresu analyzované u dáňia pruhovaného jsou uvedeny v tabulce 1. Statisticky významné změny byly zjištěny pouze v případě GPx, GST a TBARS. U ostatních ukazatelů nebyly zjištěny signifikantní změny, a proto nejsou v tabulce uvedeny. V tabulce 2 jsou uvedeny výsledky analýzy VTG z experimentu na dáňiu pruhovaném. Vitellogenin byl analyzován v deseti vzorcích z každé skupiny, pozitivní nálezy byly zaznamenány v kontrole i experimentálních skupinách s výjimkou koncentrace 50 ng/l. Nejvyšší koncentrace byly zaznamenány ve skupinách vystavených 5 000 a 50 000 ng/l testované látky.

Tabulka 1: Výsledky oxidativního stresu u dáňia pruhovaného (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

skupina	GPx (nmol/min/mg protein)	GST (nmol/min/mg protein)	TBARS (nmol/g)
kontrola	67,77±10,21	198,27±6,90	70,10±10,33
50 ng/l	26,08±1,23*	177,87±2,23	107,18±15,56
500 ng/l	24,69±1,59**	188,09±3,51	261,89±28,91**
5 000 ng/l	32,06±1,22	186,02±9,36**	136,54±14,51**
50 000 ng/l	25,76±0,88**	157,68±3,04	261,42±24,16

Tabulka 2: Obsah vitellogeninu (VTG) v celotělním homogenátu dáňia pruhovaného.

skupina	počet pozitivních vzorků/ % pozitivních vzorků	rozmezí analyzovaných koncentrací VTG (ng/ml)
kontrola	1 /10	2 389,0
50 ng/l	0/0	-
500 ng/l	1/10	2 788,3
5 000 ng/l	2/20	1 437,3 – 6 511,8
50 000 ng/l	3/30	497,0 – 8 966, 4

Při analýze jednotlivých tkání získaných v rámci experimentu se pstruhem duhovým nebyly zjištěny žádné statisticky významné změny mezi skupinami. Dále byla provedena analýza VTG, získané výsledky jsou uvedeny v tabulce 3. Pozitivní nálezy byly zaznamenány ve všech skupinách včetně kontroly. Překvapivé pozitivní nálezy v kontrolní skupině mohou být

způsobeny původem testovaných ryb, které pocházely z komerční farmy, kde mohly být vystaveny působení látek s endokrinními účinky. Podobný závěr byly zaznamenán v práci kolektivu autorů Haluzová et al. (2009), kteří detekovali VTG ve vzorcích plazmy kapra obecného, který pocházel z kontrolní skupiny.

Tabulka 3: Obsah vitellogeninu (VTG) v plazmě pstruha.

skupina	počet pozitivních vzorků / % pozitivních vzorků	rozsahy analyzovaných koncentrací VTG (ng/ml)
kontrola	4/20	303,2 – 985,9
854 ng/g	5/25	173,1 – 945,0
8 699 ng/g)	3/15	361,9 – 609,8

Závěr

Ze získaných výsledků je patrné, že významnější změny byly zaznamenány v případě testu toxicity na dániu pruhovaném, kde expozice tonalidu způsobila indukci antioxidantních a detoxikačních enzymů. Námi zjištěné výsledky se shodují se závěry uváděnými v literatuře, které potvrzují, že tonalid aktivuje detoxikační mechanismy v organismu a je schopen dále indukovat oxidativní stres. Z výsledků analýzy VTG je zřejmé, že tonalid v testovaných koncentracích nepůsobí jako endokrinní disruptor.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 248/2015/FVHE.

Seznam literatury

FERNANDES, D., DIMASTROGIOVANNI, G., BLÁZQUESZ, M., PORTE, C. Metabolism of the polycyclic musk galaxolide and its interference with endogenous and xenobiotic metabolizing enzymes in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Environmental Pollution*. 2013, 174, s. 214–221.

HALUZOVÁ, I., BLAHOVÁ, J., SMEJKALOVÁ, L., KRUŽÍKOVÁ, K., HAVELKOVÁ, M., GROCH, L., MODRÁ, H., ŠLAIS, M., SVOBODOVÁ, Z. Effects of subchronic exposure to Successor® 600 (pethoxamid 600 g L-1) on common carp *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology Letters*. 2009, vol. 30, suppl. 1, s. 230-235.

VÁVROVÁ, M., KUBÍČKOVÁ, K., ZOUHAR, L., MRAVCOVÁ, L., ČÁSLAVSKÝ, J. Syntetické vonné látky a jejich stanovení ve vodním prostředí. *Chemické Listy*. 2010, 104, s. 618–622.

YAMAUCHI, R., ISHIBASHI, H., HIRANO, M., MORI, T., KIM, J.W., ARIZONO, K. Effects of synthetic polycyclic musks on estrogen receptor, vitellogenin, pregnane X receptor, and cytochrome P450 3A gene expression in the liver of male medaka (*Oryzias latipes*). *Aquatic Toxicology*. 2008, 90, s. 261–268.

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

Vliv fluorochinolonu enrofloxacinu na parametry oxidativního stresu u dánia pruhovaného (*Danio rerio*)

Effect of Fluoroquinolone Enrofloxacin on Oxidative Stress Parameters in Zebrafish (*Danio rerio*)

Charvátová Nina, Želinská Gabriela, Dobšíková Radka, Plhalová Lucie, Blahová Jana, Svobodová Zdeňka

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno

Summary

The aim of this study was to assess the impact of enrofloxacin on oxidative stress parameters in zebrafish (*Danio rerio*). The test was performed according to the OECD Guideline No. 215 (Fish, Juvenile Growth Test). Enrofloxacin belongs to the group of fluoroquinolone chemotherapeutics. This group of antimicrobial drugs is frequently detected in the aquatic environment in relatively high concentrations. A semistatic method was used, with bath replacement twice daily. The test was completed after 14 days. The three-month-old individuals of zebrafish were placed in twelve 30liter test aquaria with 30 specimens in each aquarium. The tested concentrations were 5.0, 10.0, and 500.0 µg/l of enrofloxacin. Glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR), glutathione S-transferase (GST), and lipid peroxidation (TBARS) were investigated to determine the effects of enrofloxacin on oxidative stress in zebrafish. The results of our study indicate that subchronic exposure of zebrafish to tested concentrations of fluoroquinolone enrofloxacin affects selected oxidative stress parameters (i.e. GST, GPx, and TBARS) and enhances antioxidant activity in the exposed fish.

Keywords: antibiotics; fish; antioxidant enzymes; lipid peroxidation

Úvod

Enrofloxacin je chemoterapeutikum patřící do skupiny fluorovaných chinolonů (FQs). Je to první fluorovaný chinolon registrovaný pro veterinární použití. Využívá se především pro léčbu recidivujících nebo komplikovaných infekcí urogenitálního traktu. Rezidua FQs jsou dlouhodobě nacházena v povrchových vodách v koncentracích 0,05-0,5 µg/l (Campagnolo et al., 2002). Jejich původem jsou obvykle nedostatečně přečištěné odpadní vody z chovů hospodářských zvířat, především drůbeže (Kotyza a kol., 2009).

Naším cílem bylo zhodnocení vlivu působení enrofloxacinu na změny parametrů oxidativního stresu u juvenilních stadií dánia pruhovaného (*Danio rerio*). Pro stanovení účinku enrofloxacinu byly měřeny a vyhodnoceny parametry oxidačního stresu, tj. glutathion reduktáza (GR), glutathion-S-trasnsferáza (GST), glutathion peroxidáza (GPx) a marker lipidní peroxidace (TBARS).

Materiál a metody

Tříměsíční jedinci dánia pruhovaného (*Danio rerio*) byli umístěni do dvanácti 30l testovacích akvárií po 30 kusech. Ryby v kontrolních a testovaných skupinách s koncentrací enrofloxacinu (5 µg/l, 10 µg/l a 500 µg/l) byly testovány v triplikacích. Pro špatnou rozpustnost ve vodě bylo jak u pokusných, tak u kontrolních skupin použito rozpouštědlo (dimethylsulfoxid, DMSO) v koncentraci 0,05%. Test toxicity byl proveden průtočnou metodou s pravidelnou výměnou lázně po 12 hodinách. Délka trvání testu činila 14 dní. V testovacích nádobách byla každodenně kontrolována kvalita vody (pH, obsah kyslíku a teplota). Třetí a sedmý den pokusu bylo odebráno 9 kusů ryb a na konci pokusu (14. den) 15 kusů ryb pro stanovení parametrů oxidativního stresu. Test byl ukončen usmrcením ryb

předávkováním anestetikem (MS 222). Po ukončení pokusu byly ryby zmrazeny (na teplotu -85 °C) pro následné stanovení parametrů oxidativního stresu.

Stanovení jednotlivých parametrů oxidativního stresu bylo provedeno v celotělním homogenátu (homogenizace ve fosfátovém pufru). Katalytická koncentrace GST je stanovena spektrofotometricky na základě detekce tvorby konjugátu mezi redukovaným glutathionem a substrátem 1-chlor-2,4-dinitrobenzenem (Habig et al., 1974) při 340 nm. Metody měření aktivity GPx a GR jsou založeny na katalýze přeměny oxidovaného glutathionu (GSSG) na glutathion redukovaný (GSH) za spotřeby NADPH, úbytek NADPH se měří spektrofotometricky při 340 nm (Carlberg and Mannervik 1975; Flohe and Gunzler 1984). Pro stanovení lipidní peroxidace se využívá TBARS test (thiobarbituric acid reactive substances – látky reaktivní s kyselinou thiobarbiturovou). Metoda je založená na stanovení barevných adduktů, vznikajících reakcí produktů lipidní peroxidace s kyselinou thiobarbiturovou, které jsou měřeny spektrofotometricky (Livingstone et al., 1990).

Výsledky

Výsledky hodnocení biomarkerů oxidativního stresu při prvním odběru (3. den pokusu) prokázaly statisticky vyšší ($p < 0,05$) katalytickou koncentraci enzymu GST ve skupině s koncentrací enrofloxacinu 500 $\mu\text{g/l}$ ve srovnání s kontrolou a statisticky vyšší hodnotu ($p < 0,01$) TBARS v koncentraci 500 $\mu\text{g/l}$ oproti kontrole. Dále byla prokázána statisticky nižší katalytická koncentrace enzymu GPx ($p < 0,05$) ve skupině s koncentrací enrofloxacinu 10 $\mu\text{g/l}$ v porovnání s kontrolou. Ke statisticky významnému zvýšení ($p < 0,05$) katalytické koncentrace GPx došlo ve skupině vystavené působení enrofloxacinu v koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$ oproti kontrole při 2. odběru (7. den pokusu). U ostatních enzymatických a neenzymatických parametrů nebyla zjištěna žádná statisticky významná změna ve 2. ani v 3. odběru v porovnání s kontrolou.

Diskuse

Kontinuální vstup léčiv do vodního prostředí i v nízkých koncentracích může představovat potenciální dlouhodobé riziko pro vodní a suchozemské organismy (Klavarioti et al., 2009). Mnoho cizorodých látek znečišťujících vodní prostředí má schopnost vyvolat oxidativní stres v organismu ryb (Slaninova et al., 2009). Výsledky hodnocení biomarkerů oxidativního stresu prokázaly statisticky vyšší hodnotu glutathion-S-transferázy ve srovnání s kontrolou ($p < 0,05$) ve skupinách s koncentrací enrofloxacinu 500 $\mu\text{g/l}$. Zvýšení aktivity GST v nejvyšší testované koncentraci na začátku testování ukazuje na aktivaci a zintenzivnění detoxikačního mechanismu při metabolizaci cizorodých látek v organismu. Při 2. a 3. odběru nebylo následně zjištěno statisticky významné zvýšení GST, tento výsledek může ukazovat na postupné ustálení detoxikační kapacity. Bartoskova et al. (2014) ve své studii testovala vliv norfloxacinu na dánío pruhované (*Danio rerio*). Z jejich výsledků vyplývá, že vyšší aktivita GST byla prokázána pouze u skupiny vystavené environmentální koncentraci norfloxacinu (0,0001 mg/l). Vzájemnou rozdílnost výsledků můžeme zdůvodnit použitím odlišné testovací látky i přesto, že se jedná o látku ze stejné skupiny chemoterapeutik, tj. fluorovaných chinolonů, a jinou délkou testování. Z výsledků naší studie vyplývá, že hodnoty TBARS byly ve srovnání s kontrolou statisticky vyšší ($p < 0,01$) pro koncentraci enrofloxacinu 500 $\mu\text{g/l}$. Tento výsledek ukazuje na míru oxidativního poškození buněčných membrán. Výsledky měření katalytické koncentrace GPx ukazují na postupné zvýšení detoxikační aktivity organismu.

Závěr

V práci byl prokázán vliv testovaných koncentrací fluorochinolonového chemoterapeutika enrofloxacinu na vybrané parametry oxidativního stresu po subchronickém působení léčiva na organismus akvarijní ryby druhu *Danio rerio*.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA 249/2015/FVHE.

Literatura

- BARTOSKOVA, M.; DOBSIKOVA, R.; STANCOVA, V.; PANA, O.; ZIVNA, D.; PLHALOVA, L.; BLAHOVA, J.; MARSALEK, P. (2014). Norfloxacin - Toxicity for zebrafish (*Danio rerio*) focused on oxidative stress parameters. *BioMed research international*. 2014, s. 1-6.
- CAMPAGNOLO, E.R.; JOHNSON, K.R.; KARPATI, A.; RUBIN, C.S.; KOLPIN, D.W.; MEYER, M.T. Antimicrobial residues in animal waste and water resources proximal to large-scale swine and poultry feeding operations. *Science of the Total Environment*. 2002, vol. 299, no. 1, s. 89-95.
- CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, vol. 250, no. 14, s. 97-106.
- FLOHÉ, L.; GÜNZLER, W.A. Assays of glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*. 1984, vol. 105, s. 114-120.
- HABIG, W.H.; PABST, M.J.; JAKOBY, W.B. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 1974, vol. 249, no. 22, s. 7130-7139.
- KLAVARIOTI, M.; MANTZAVINOS, D.; KASSINOS, D. Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environment International*. 2009, vol. 35, no. 2, s. 402-417.
- KOTYZA, J.; SOUDEK, P.; KAFKA, Z.; VANĚK, T. Léčiva–,nový “environmentální polutant. *Chemické listy*. 2009, vol. 103, s. 540-547.
- LIVINGSTONE, D.; MARTINEZ, P.G.; MICHEL, X.; NARBONNE, J.F.; O'HARA, S.; RIBERA, D.; WINSTON, G.W. Oxyradical production as a pollution-mediated mechanism of toxicity in the common mussel, *Mytilus edulis* L., and other molluscs. *Functional Ecology*. 1990, s.415-424.
- SLANINOVA, A.; SMUTNA, M.; MODRA, H.; SVOBODOVA, Z. Oxidative stress in fish induced by pesticides. *Neuroendocrinology Letters*. 2009, vol. 30, no. 11, s. 2.

Kontaktní adresa: Nina Charvátová, MVDr., Ústav ochrany zvířat, welfare a etologie, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H14393@vfu.cz.

The Effect of the Therapeutic Bath on the Immune System of Fish

Doubková Veronika, Chmelová Livia, Svobodová Zdeňka

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

Summary

*The influence of therapeutic baths on the immune system of common carp (*Cyprinus carpio*) was investigated. Baths were carried out in solutions of formaldehyde and sodium chloride. A total of 192 two-year-old carps was used, carps were divided into 16 groups. Four groups were subjected to a bath in the formaldehyde at the concentration of 0.17 ml. l⁻¹ 38% formaldehyde, the duration of the bath was 60 minutes. Another four groups were then bathed in a solution of NaCl 30 g. l⁻¹ for 30 minutes. The remaining 8 groups then served as a control for each group undergoing baths. Bath influence on the immune system was observed immediately after the bath and then 24, 48 hours and 10 days after the bath. The following parameters were monitored at given intervals: the lysozyme concentration in skin mucus, IgM concentrations in blood plasma and oxidative burst of phagocytes in the blood. Significant difference ($p < 0.05$) was detected in the values of oxidative burst of phagocytes. This parameter increased 24 hours after the bath in a reduction of formaldehyde and 24 hours and 10 days after the bath in the salt.*

Keywords: *therapeutic bath; salt; carp; immune system*

Introduction

The therapeutic baths were applied to control ectoparasitic diseases. The sodium chloride, formaldehyde, malachite green, potassium permanganate, chloramine, hydrogen peroxide, peracetic acid and praziquantel were used as therapeutic baths. Formaldehyde and sodium chloride were used in this study. The sodium chloride was applied to control ectoparasitic diseases such as *Cryptobia*, *Ichtyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*. The formaldehyde bath was used to control diseases caused by *Cryptobia*, *Ichtyobodo*, *Chilodonella*, *Trichodina*, *Trichodinella*. These baths are used on the veterinary advice only (Svobodová et al., 2007). The formaldehyde is the carcinogen and it causes headache, nausea, irritation of eyes and respiration tract of mammals (Monakhová et al., 2007; Wang et al., 2012).

Materials and Methods

A total of 192 carps was used in this study. These carps were divided into 16 groups (8 control and 8 experimental groups for formaldehyde and salt). Four experimental groups were exposed to formaldehyde bath (0.17 ml.l⁻¹ 38% formaldehyde) for 60 minutes and four groups were exposed to salt bath (30 g.l⁻¹ NaCl) for 30 minutes. The remaining 8 groups then served as a control for each group undergoing baths. Bath influence on the immune system was monitored immediately after bath and then 24, 48 hours and 10 days after the bath. Indices monitored at given intervals are as follows: concentration of lysozyme in skin mucus, blood plasma IgM and blood oxidative burst of phagocytes.

Oxidative burst of phagocytes is nonspecific immunity. Oxidative burst is caused by transient in oxygen consumption. This parameter was determined in blood samples (Bartůňková et Paulík, 2005). The chemiluminescence method was used for this assessment. The chemiluminescence was caused by zymozan, which can start activity of phagocytes. The light was detected by luminometer (Hořejší et Bartůňková, 2005).

IgM is parameter of specific immunity and it is a substance produced by B lymphocytes. The concentration of IgM was determined from the sample of blood plasma. The precipitation

method was used. Zinc sulfate was used for this determination (McEwan, 1970; Polson et al., 2003). The Bio-Rad was used for this assessment.

Lysozyme is an enzyme, which cleaves the cell wall and damaged cells are dying (Pállfy, et al., 2009). Concentration of lysozyme was determined by radial diffusion in agarose gel with *Micrococcus luteus*. The sample consisted of skin mucus (Lee et Yang, 2002). The concentration was determined as average diffusion zone in dependence on the calibration curve.

Results and Discussion

Significant difference ($p < 0,05$) was detected in oxidative burst of phagocytes, this parameter increased 24 hours after the formaldehyde bath. Significant difference ($p < 0,05$) was detected in oxidative burst of phagocytes after salt bath too. But in this measurement, significant difference was recorded 24 hours and 10 days after the salt bath.

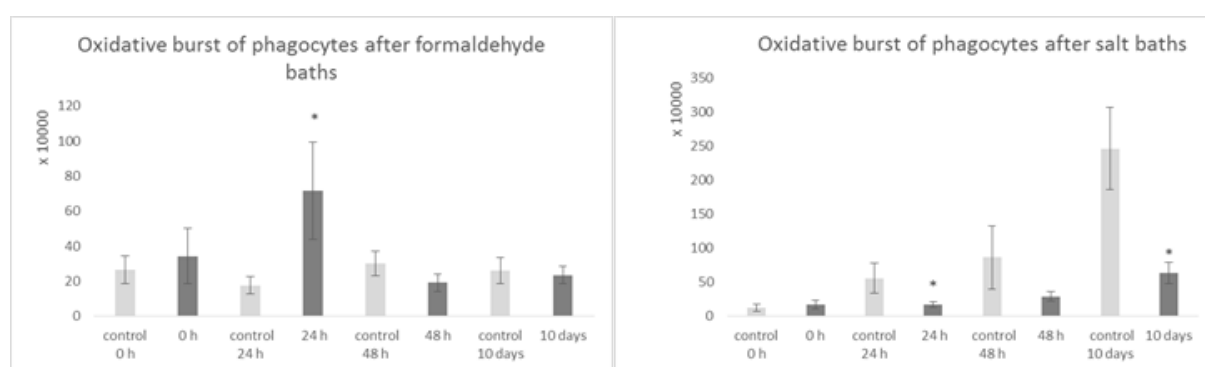


Figure 1: The oxidative burst of phagocytes after the therapeutic baths.

The concentration of IgM was determined in the range from 3 mg.ml⁻¹ to 9,2 mg.ml⁻¹ but without the significant differences. The very similar results were determined in fish after the salt bath.

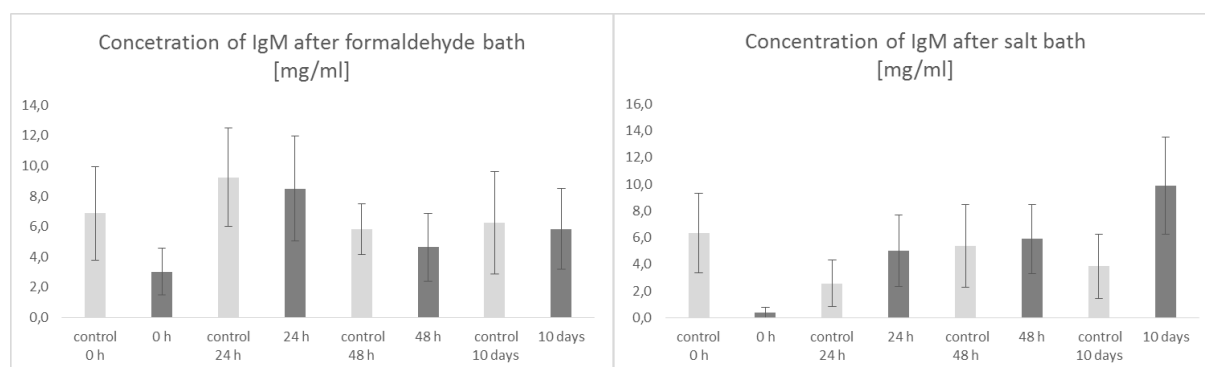


Figure 2: The concentration of IgM after the therapeutic baths.

Concentration of lysozyme was determined in the range from 0,8 to 2,3 mg.ml⁻¹ and significant difference ($p < 0,05$) was determined in the fish 10 days after the formaldehyde bath.

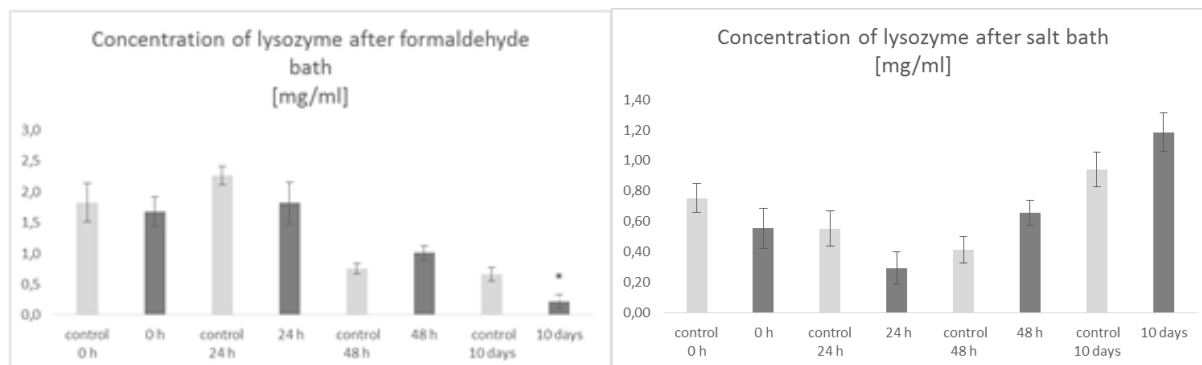


Figure 3: The concentration of lysozyme after the therapeutic bath.

Conclusion

The effect of formaldehyde and salt baths on the fish immune system was demonstrated. Significant differences were determined by oxidative burst of phagocytes after formaldehyde and salt baths and by concentration of lysozyme after the formaldehyde bath. The immune system was affected not only immediately after use of therapeutic bath but also in 10-day interval.

Acknowledgements

This research was supported by the internal grant IGA 225/2015/FVHE of the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno.

References

- BARTUŇKOVÁ J., HOŘEJŠÍ V.. *Základy imunologie*. 2005, Triton, 279p., ISBN 80-7254-686-4.
- BARTUŇKOVÁ J., PAULÍK M.. *Vyšetřovací metody v imunologii*. Grada Publishing, a.s., 2005, ISBN 80-247-0691-1.
- LEE Y.C., YANG D.V.. Determination of lysozyme activities in a microplate format. *Analytical Biochemistry*, 2002, vol. 310(2), pp. 223-224.
- McEWAN A.D., FISHER E.W., SELMAN I.E., PENHALE W.J.. A turbidity test for the estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clinica Chimica Acta*, 1970, vol. 27, pp. 155-163.
- MONAKHOVA Y. B., JENDRAL J. A., LACHENMEIER D. W.. The margin of exposure to formaldehyde in alcoholic beverages. *Arch. Industrial Hygiene and Toxicology*, 2012, vol. 63, pp 227–237.
- PÁLFFY R., GARDLÍK R., BEHULIAK M., KADASI L., TURNA J., CELEC P.. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Molecular Medicine*, 2009, vol. 15(1-2), pp. 51–59.
- POLSON C., SARKAR P., INCLEDON B., RAGUVARAN V., GRANT R.. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography – tandem mass spectrometry. *Journal Chromatography B*, 2003, vol. 785, pp. 263-275.
- SVOBODOVÁ Z., KOLÁŘOVÁ J., NAVRÁTIL S., VESELÝ T., CHLOUPEK P., TESARČÍK J., ČÍTEK J.. *Nemoci sladkovodních a akvarijních ryb*. 4. přeprac. vyd. Praha: Informatorium, 2005, 264p, ISBN 978-807-3330-514
- WANG T., GAO X., TONGJ., CHEN L.. Determination of formaldehyde in beer based on cloud point extraction using 2,4-dinitrophenylhydrazine as derivative reagent. *Food Chemistry*, 2012, vol. 131, pp. 1577–1582.

Contact address: Veronika Doubková, Mgr., Department of Animal Protection, Welfare and Behaviour, FVHE VFU Brno, Palackého 1, 612 42, H13022@vfu.cz.

SEKCE 7

*Choroby volně žijících zvířat a zvířat
zoologických zahrad*

Posouzení biochemických a hematologických parametrů u netopýrů v průběhu roku

Assessment of Biochemical and Hematological Values in Bats During the Year

Linhart Petr, Band'ouchová Hana, Brichta Jiří, Kaňová Miroslava, Piaček Vladimír, Abdelsalam Ehdad Eltayeb Eltigani, Kováčová Veronika, Pikula Jiří

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

Summary

*The objective of this study was to evaluate differences among biochemical parameters in great mouse-eared bat (*Myotis myotis*) individuals during three different life stages: hibernation, lactation and normal activity. We found important differences connected with metabolic changes which should be considered when assessing bat health.*

Keywords: bats; biochemical values; metabolism

Úvod

V Evropě je popsán výskyt 39 druhů netopýrů, přičemž na našem území se vyskytuje 26 druhů, z toho 6 je zařazeno mezi kriticky ohrožené druhy a ostatní mezi silně ohrožené druhy živočichů. Všechny druhy netopýrů vyskytující se na území ČR patří mezi zvláště chráněné živočichy (GAISLER a BENDA, 1998).

Mezi ostatními savci zaujímají netopýři unikátní místo. Během svého aktivního období života mají, vzhledem k velikosti těla, velmi vysoký bazální metabolismus. Jsou to jediní savci schopni aktivního letu a stejně tak jako u ptáků je i u netopýrů tato činnost energeticky velmi náročná (WOLK a BOGDANOWICZ, 1987). Druhým extrémem v rámci jejich metabolismu je jejich schopnost přečkávat období s absencí potravy ve stavu hibernace, kdy jsou netopýři schopni výrazně snížit svoji metabolickou aktivitu a také snížit svou teplotu na hodnotu blízkou teplotě prostředí (KLIMPEL a MELHORN, 2014).

Jednou z možností posouzení metabolické aktivity a celkového zdravotního stavu u netopýrů je zhodnocení biochemických a hematologických parametrů. Dostupná data, týkající se těchto parametrů, jsou však u hmyzožravých netopýrů relativně omezená. Vzhledem k malé velikosti netopýrů a k jejich variabilní metabolické aktivitě mohou být hodnoty těchto parametrů ovlivněny širokou škálou různých faktorů (WIMSATT, 1977). Kromě hibernace může výrazně ovlivňovat metabolismus a tedy i krevní parametry například březost a laktace. Z tohoto důvodu jsme se v naší studii zaměřili na porovnání krevních parametrů u zvířat hibernujících, samic v laktaci a jedinců s běžnou aktivitou během podzimu a to konkrétně u netopýra velkého (*Myotis myotis*).

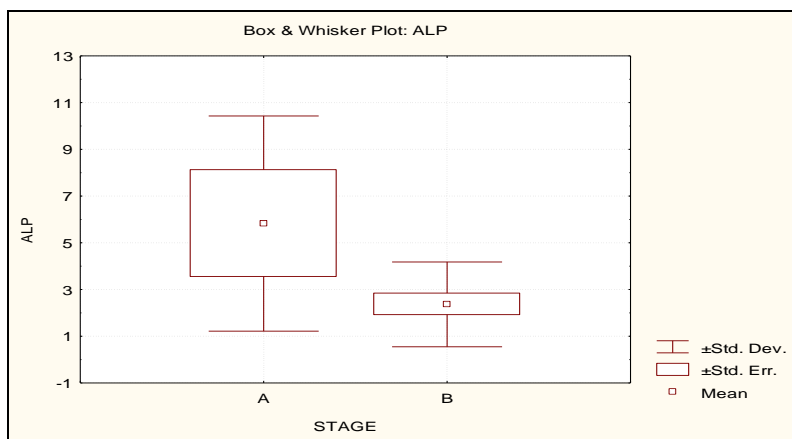
Materiál a metody

Vzorky krve netopýrů druhu *Myotis myotis* byly odebrány na několika lokalitách od jedinců v období aktivní fáze života, od jedinců v období hibernace a od laktujících samic. Netopýři byli odchyceni v rámci plánovaných odchytů prováděných pracovníky Ústavu biologie obratlovců AV ČR. Netopýrům byl odebrán vzorek krve z v. saphena, místo odběru bylo ošetřeno tkáňovým lepidlem, aby nedošlo ke ztrátám krve. Biochemické parametry krve byly zpracovány přímo v terénu mobilním biochemickým analyzátozem VetScanVS2 (Abaxis, USA). Pro účely této dílčí studie byly stanoveny následující parametry: albumin, ALP, ALT, amyláza, bilirubin, močovina, Ca, P, kreatinin, glukóza, Na⁺, K⁺, celková bílkovina a

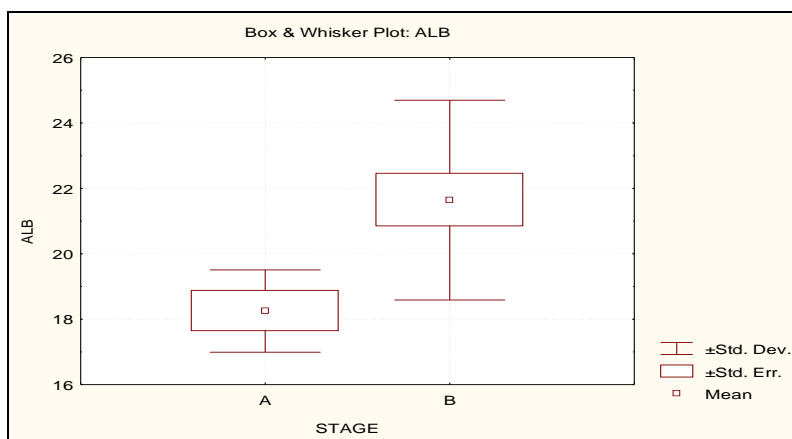
globuliny. Získané hodnoty byly statisticky zpracovány pomocí programu Statistica pro Windows.

Výsledky a diskuse

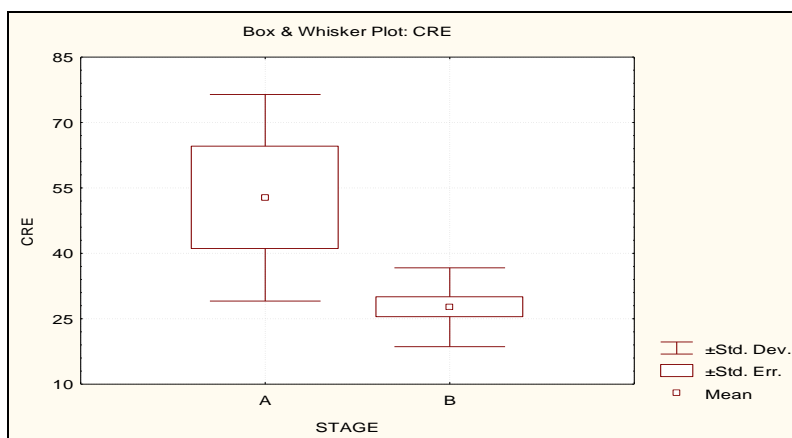
Biochemické parametry byly porovnávány mezi jednotlivými skupinami zvířat (A- laktující samice, B-aktivní jedinci a C-hibernující jedinci). Při porovnání biochemických parametrů u aktivních zvířat a u laktujících samic byly zjištěny vysoce statisticky průkazné rozdíly u hodnot ALP, albuminu, kreatininu a Na (viz grafy 1-4).



Graf 1: Alkalická fosfatáza – srovnání laktujících samic (A) a jedinců s normální aktivitou (B).



Graf 2: Albumin – srovnání laktujících samic (A) a jedinců s normální aktivitou (B).



Graf 3: Kreatinin – srovnání laktujících samic (A) a jedinců s normální aktivitou (B).



Graf 4: Sodík – srovnání laktujících samic (A) a jedinců s normální aktivitou (B).

Všechny tyto rozdíly přímo souvisí s enormní zátěží samic během laktace. Zvýšení hodnot ALP je dáno mobilizací Ca z kostní tkáně. Vzhledem k velikosti těla, intenzitě metabolismu a rychlosti růstu mláďat netopýrů má produkce mléka u samic za následek pokles hodnot albuminu, zvýšení katabolických procesů (výrazně vyšší hodnoty kreatininu související se svalovou námahou a částečným odbouráváním svalové hmoty pro zajištění produkce mléka) a pokles hodnot Na daný mírnou dehydratací. Při porovnání biochemických parametrů u aktivních a hibernujících netopýrů byly zjištěny vysoce statisticky průkazné rozdíly mezi hodnotami amylázy, fosforu, sodíku, draslíku a statisticky významný rozdíl u hodnot celkové bílkoviny. Zde jsou rozdíly v parametrech dány především výrazně sníženou perfúzí tkání včetně ledvin a rovněž dehydratací hibernujících zvířat.

Závěr

Z výše uvedených výsledků je patrné, že u hmyzožravých netopýrů se mohou jednotlivé biochemické parametry poměrně výrazně lišit v závislosti na aktuálním metabolickém stavu a tyto rozdíly nemusí nutně znamenat zdravotní problém daného jedince. Tato velká variabilita je dána extrémními, nicméně fyziologickými, výkyvy v intenzitě metabolismu. Je tedy zřejmé, že při posuzování zdravotního stavu netopýrů je třeba přihlídnout i k aktuálnímu metabolickému stavu a toto by rovněž mělo být zohledněno i při stanovování referenčních hodnot pro tato zvířata.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VFU Brno č. 239/2015/FVHE.

Literatura

- GAISLER, J., BENDA, P. Comments to the number and the names of European bat species. *Vespertilio*, 1998, Revúca, Praha, 3: pp. 135-146.
- KLIMPEL, S., MEHLHORN, H. Bats (Chiroptera) as vectors of diseases and parasites: facts and myths. Heidelberg: Springer, 2014, xii, 187 pp. ISBN 978-3-642-39332-7.
- WIMSATT, W. A. Biology of bats. New York, Acad. Press, 1977, 651 pp. ISBN 0-12-758003-4.
- WOLK, E., BOGDANOWICZ, W. Hematology of the hibernating bat. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1987, 88: pp. 637-639
- THRALL M. A., BAKER D. C., CAMPBELL T. W., DENICOLA D., FETTMAN M. J., LASSEN E. D., REBAR A., WEISER G. Veterinary hematology and clinical chemistry. Ames, Blackwell Publishing, 2006, 518 pp. ISBN 978-0-7817-6850-4.

Kontaktní adresa: Petr Linhart, Mgr., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého 1, 612 42 Brno, H14007@vfu.cz.

Zavedenie real-time RT-PCR pre diagnostiku pôvodcu vírusovej hemoragickej septikémie u lososovitých rýb a jej porovnanie s metódami používanými v Českej republike

Introduction of Real-Time RT-PCR Assay for Detection of Viral Haemorrhagic Septicaemia Virus in Salmonids and Its Comparison with Methods Currently Used in Czech Republic

^{1,2}Pojezdal Lubomír, ¹Navrátil Stanislav, ²Veselý Tomáš

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

²Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Oddělení virologie

Summary

In our study we introduced a one-step real-time RT-PCR assay for detection of Viral haemorrhagic septicaemia virus in tissue samples from fish. We also tested the sensitivity of the assay and compared it to methods currently used for diagnostic of the virus in Czech Republic, namely the conventional end-point RT-PCR and cell culture isolation. The specificity of the assay was also tested, via analysis of several isolates of genetically similar Infectious hematopoietic necrosis virus.

Keywords: VHSV; diagnostics; real-time PCR; Czech Republic

Úvod

Vírus vírusovej hemoragickej septikémie (VHSV) patrí medzi celosvetovo najvýznamnejšie patogény lososovitých rýb. Jeho výskyt, spojený so závažnými ekonomickými dôsledkami predovšetkým vo farmovom chove pstruha dúhového, má v Českej republike stúpajúcu tendenciu.¹ Rutinne používané metódy diagnostiky patogéna majú nevýhody v podobe časovej - kultivácia vírusu na bunkovej línii, alebo technickej - konvenčná RT-PCR, náročnosti.² Cieľom projektu bolo zaviesť metódu one-step real-time RT-PCR pre rýchlu diagnostiku VHSV, overiť jej citlivosť na spektre izolátov vírusu pôvodom z ČR, vylúčiť krížovú reaktivitu metódy na príbuzný vírus infekčnej hematopoetickej nekrózy (IHNV) a porovnať vlastnosti real-time RT-PCR so v súčasnosti používanými metódami.

Materiál a metódy

Vzorky: Celkovo bolo použitých 25 izolátov VHSV a 8 izolátov IHNV pochádzajúcich z potvrdených ohnisk ochorení na území ČR z obdobia 1996 až 2015. Tieto boli poskytnuté vo forme supernatantu z bunkovej kultúry. Taktiež bolo analyzovaných 41 terénnych vzoriek z tkanív rýb, získaných v rokoch 2014 až 2016.

Kultivácia: Izoláty vírusu boli kultivované po dobu sedem dní na bunkovej kultúre Rainbow trout gonad (RTG), na ktorej bol tiež stanovený titer troch vybraných izolátov vírusu.

Extrakcia RNA: Celková RNA bola zo vzoriek izolovaná pomocou kitu RNeasy Mini Kit (Qiagen), prípadne pomocou kitu QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen).

Konvenčná RT-PCR: Metóda, zostávajúca z troch samostatných reakcií (RT-PCR, nested-PCR a vizualizácia výsledkov elektroforézou) bola prebraná z metodiky Národní referenční laboratoře pro virové choroby ryb a jej popis poskytne autor na požiadanie.

Real-time RT-PCR: Metodika bola prevzatá od Jonstrup a kol.³ Popis primerov a sondy značenej fluorescenčným farbivom 6-FAM sa nachádza v tabuľke 1. Reakcia bola založená na kite Quantitect Probe RT-PCR kit (Qiagen). Objem jednej reakcie bol 25 µl a obsahovala 12.5 µl 2x QuantiTect Probe RT-PCR Master Mix, 250 nM koncentráciu sondy, 900 nM

koncentráciu oboch primerov, 0.25 μ l QuantiTect RT Mix a 5 μ l extrahovanej RNA. Teplotný profil reakcie bol 50 °C po 30 min, 95 °C po 15 min, nasledovaných 40 cyklami zloženými z 94 °C po 15 s, 60 °C po 40 s a 72 °C po 20 s.

Tabuľka 1: Primery a sonda pre real-time RT-PCR.

FW primer	5' - AAA CTC GCA GGA TGT GTG CGT CC – 3'
BW primer	5' - TCT GCG ATC TCA GTC AGG ATG AA – 3'
Probe	5' - 6-FAM TAG AGG GCC TTG GTG ATC TTC TG BHQ-1 – 3'

Výsledky

Konvenčnou RT-PCR, ako aj kultiváciou na bunecnej línií, bol vírus VHS detekovaný v 24 z 25 vyšetovaných izolátov. Jeden z izolátov bol označený za negatívny.

Pomocou real-time PCR bol vírus detekovaný vo všetkých 25 analyzovaných izolátoch VHSV. Hodnoty prahového cyklu (Ct) sa pre jednotlivé izoláty pohybovali v rozpätí 17,3 až 25,8 cyklu s výnimkou izolátu, ktorý porovnané metódy označili za negatívny, s hodnotou Ct 33,3.

Pri testovaní desaťnásobnej titrácie extrahovanej RNA dvoch vybraných izolátov VHSV pomocou konvenčnej RT-PCR bola prítomnosť genetickej informácie patogéna preukázaná v riedení 10^{-4} a 10^{-5} .

Analýza totožnej desaťnásobnej titrácie RNA preukázala prítomnosť vírusu pri riedení 10^{-6} (Ct 32,7) a 10^{-7} (Ct 32,2). Účinnosť amplifikácie PCR dosahovala hodnotu 100%.

U konvenčnej RT-PCR ani real-time RT-PCR nebola preukázaná krížová reaktivita s analyzovanými izolátmi IHNV.

Titrácia troch izolátov vírusu na bunkovej línií RTG preukázala titre vírusu $1,9 \times 10^4$, $1,9 \times 10^5$ a 4×10^5 . Týmto hodnotám odpovedajú výsledné Ct z real-time RT-PCR: 23,5, 20,56 a 19,4.

Výsledky analýzy 41 terénnych vzoriek z tkanív rýb boli zhodné pre metódy konvenčnej RT-PCR, real-time RT-PCR ako aj kultiváciu na bunkovej línií. Pozitívnych bolo 6 testovaných vzoriek.

Diskusia

Vyššia citlivosť real-time RT-PCR oproti konvenčnej RT-PCR sa prejavila vo dvoch výsledkoch. V prípade analýzy desaťnásobných titrátov extrahovanej RNA, kedy bola citlivosť real-time RT-PCR metódy u oboch vzoriek desaťnásobne vyššia oproti konvenčnej RT-PCR a pri analýze spektra izolátov, kedy zavádzaná metóda odhalila stopy pôvodcu vo vzorke, označenej bežnými metódami za negatívnu. U tohto izolátu pravdepodobne došlo k degradácii väčšiny vírusu v dôsledku nevhodných skladovacích podmienok.

Rozdiel v hodnotách Ct pre jednotlivé izoláty súvisí s rôznym množstvom vírusu v každej vzorke, čomu nasvedčuje korelácia medzi titrom vírusu stanoveným kultiváciou na bunecnej línií a hodnotou Ct u troch vybraných izolátov. Taktiež tomu odpovedá vysoká hodnota Ct u izolátu, kde bol vírus ostatnými metódami nedetekovateľný a obsahoval pravdepodobne minimálne množstvo genetickej informácie. Nie je však možné vylúčiť možnosť vplyvu rôznorodnej genetickej štruktúry jednotlivých izolátov. Túto skutočnosť môže potvrdiť sekvenčná analýza daných izolátov.

Nepřítomnosť krížovej reakcie na geneticky príbuzný vírus IHN je podmienkou pre použitie real-time RT-PCR ako diagnostickej metódy.

Záver

Metóda one-step real-time RT-PCR preukázala účinnosť na všetky dostupné kmene pôvodcu VHS doposiaľ izolované na území ČR. Citlivosť metódy oproti v súčasnosti používanej konvenčnej RT-PCR bola rádovo vyššia. Real-time RT-PCR bola schopná zachytiť prítomnosť genetickej informácie vírusu vo vzorkách, ktoré stratili schopnosť infikovať bunečnú líniu pri kultivácií.

Zavedená metóda nevykazuje krížovú reaktivitu na žiaden dostupný kmeň IHNV.

Real-time RT-PCR bola tiež úspešne testovaná na terénnych vzorkách z tkanív rýb, kde preukázala zhodu s bežne používanými metódami.

Na základe získaných informácií je možné one-step real-time RT-PCR možné odporučiť k rutínnej diagnostike prítomnosti vírusu VHS v tkanivách rýb.

PodĎakovanie

Projekt bol financovaný grantom IGA VFU Brno 238/2015/FVHE. Riešenie projektu prebehlo vo Výzkumném ústavu veterinárneho lékařství v Brne.

Literatúra

¹ RESCHOVÁ S, POKOROVÁ D, VESELÝ T: Virová hemoragická septikémie lososovitých ryb v ČR. Veterinářství. 2012, vol. 62 (12), s. 760-762.

² OIE Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals 2014

<http://www.oie.int/en/international-standard-setting/aquatic-manual/access-online> (cit. 10.11.2015)

³ JONSTRUP S P, KAHNS S, SKALL H F, BOUTRUP T S, OLESEN N J: Development and validation of a novel Taqman-based real-time RT-PCR assay suitable for demonstrating freedom from viral haemorrhagic septicaemia virus. Journal of Fish Diseases. 2013, vol. 36 (1), s. 9-23.

Kontaktná adresa: Ľubomír Pojezdal, MVDr., Ústav ekologie a chorob zvěře, ryb a včel, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H14009@vfu.cz.

***Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* a *Encephalitozoon cuniculi* u zvířat ze zoo a cirkusů v Itálii**

***Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in Zoo and Circus Animals from Italy**

¹Marková Jiřina, ¹Machačová Tereza, ¹Bártová Eva, ²Sedlák Kamil

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

²Oddělení virologie a sérologie, Státní veterinární ústav, Praha

Summary

Sera of 74 animals from three zoos and four circuses of Napoli province, southern Italy were tested for antibodies to *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* by indirect fluorescence antibody test, a titre ≥ 50 was considered positive. In animals from families Elephantidae and Potoroidae, antibodies to *T. gondii* and *N. caninum* were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. Antibodies to *T. gondii* were detected in 51% (38/74) animals; to *N. caninum* in 12% (9/74) and to *E. cuniculi* in 20% (14/69) animals. The highest *T. gondii* (95%) and *N. caninum* (27%) seroprevalence were recorded in felids (*Panthera leo*, *P. tigris bengalensis*). There were found differences depending on monitored characteristics (family, gender, age, country of birth, origin, housing, contact with dogs and cats). This is the first study determining antibodies to these parasite species in zoo and circus animals from southern Italy and the first serological study of *E. cuniculi* in camels.

Keywords: toxoplasmosis; neosporosis; encephalitozoonosis; serology; zoo and circus

Úvod

Toxoplasma gondii, *Neospora caninum* a *Encephalitozoon cuniculi* jsou parazité, kteří jsou schopni infikovat široké spektrum teplokrevných zvířat včetně zoo a cirkusových zvířat. Tyto infekce bývají obvykle subklinické, ačkoliv zejména v případě *T. gondii* může být u této skupiny zvířat pozorována klinická nebo dokonce letální manifestace. Protilátky proti *T. gondii* a *N. caninum* byly detekovány i u zvířat v evropských zoologických zahradách (Sedlák a Bártová 2006; Cano-Terriza et al. 2015). Cílem této studie bylo zjistit seroprevalenci parazitů *T. gondii*, *N. caninum* a *E. cuniculi* u skupiny zoo a cirkusových zvířat z jižní Itálie.

Materiál a metodika

V roce 2014 bylo odebráno 74 vzorků krve od 14 druhů zvířat (8 čeledí) ze tří zoologických zahrad a čtyř cirkusů z Neapolské provincie v jižní Itálii (Tabulka 1). Protilátky proti *T. gondii*, *N. caninum* a *E. cuniculi* byly detekovány v sérech pomocí nepřímého imunofluorescenčního testu (IFAT) za použití antigenu IFR (VMRD, Pullman, USA) a konjugátů specifických pro dané čeledi (Bovidae, Camelidae, Cervidae, Equidae, Felidae a Hominidae). Séra byla ředěna v dvojnásobném ředění od základního ředění 1:50; vzorky s titry ≥ 50 byly považovány za pozitivní. U zvířat z čeledí Elephantidae a Potoroidae byly protilátky proti *T. gondii* detekovány nepřímým ELISA testem (ID Screen Toxoplasmosis Indirect Multi-species, IDvet, Francie) s mikro-titračními destičkami pokrytými P30 *T. gondii* antigenem. Séra byla ředěna v poměru 1:10 a vyšetřována dle manuálu. Výsledná optická denzita (OD) byla měřena na spektrofotometru při 450 nm; vzorky s hodnotami S/P % ≥ 50 byly považovány za pozitivní. Pro detekci protilátek proti *N. caninum* byl u těchto čeledí použit cELISA test (*N. caninum* Antibody Test Kit, VMRD, USA), OD byla měřena na

spektrofotometru při 630 nm; vzorky s hodnotami inhibice $\geq 30\%$ byly považovány za pozitivní.

Tabulka 1: Výsledky sérologického vyšetření (*Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* a *Encephalitozoon cuniculi*) u zoo a cirkusových zvířat seřazené podle různých charakteristik.

Charakteristika	Testovaná zvířata	IFAT pozitivní (%)		Testovaná zvířata	IFAT pozitivní (%)	
		<i>T. gondii</i>			<i>N. caninum</i>	<i>E. cuniculi</i>
Čeď						
Bovidae	10	2 (20%)		10	1 (10%)	0 (0%)
Camelidae	23	7 (30%)		23	0 (0%)	14 (61%)
Cervidae	2	2		2	1	0
Elephantidae *	4	4		4	0	NT
Equidae	8	0		8	1 (13%)	0
Felidae	22	21 (95%)		22	6 (27%)	0 (0%)
Hominidae	4	2		4	0	0
Potoroidae *	1	0		1	0	NT
Pohlaví						
Samec	44	22 (50%)		44	6 (14%)	10 (25%)
Samice	30	16 (53%)		30	3 (10%)	4 (14%)
Věk (rok)						
0 - 1	5	2 (40%)		5	2 (40%)	1
$\geq 2 - 5$	31	14 (45%)		31	2 (6%)	8 (26%)
$\geq 6 - 9$	19	10 (53%)		19	2 (11%)	4 (21%)
$\geq 10 - 14$	5	4 (80%)		5	1 (20%)	1 (20%)
≥ 15	14	8 (57%)		14	2 (14%)	0 (0%)
Země původu						
Francie	2	1		2	0	0
Holandsko	2	1		2	0	2
Maďarsko	1	1		1	0	0
Itálie	29	15 (52%)		29	5 (17%)	7 (25%)
Rumunsko	4	2		4	0	0
Španělsko	19	12 (63%)		19	4 (21%)	2 (11%)
Neznámý původ	17	6 (35%)		17	0	3 (23%)
Původ						
Zoo	29	11 (38%)		29	2 (7%)	7 (27%)
Cirkus	45	27 (60%)		45	7 (16%)	7 (16%)
Způsob chovu						
Jednotlivě	4	2		4	0	1
Pár	6	2 (33%)		6	0 (0%)	4 (80%)
Skupina	38	21 (55%)		38	8 (21%)	4 (11%)
Neznámý	26	13 (50%)		26	1 (4%)	5 (20%)
Kontakt s kočkami						
Ano	57	27 (47%)		57	6 (11%)	11 (21%)
Ne	17	11 (65%)		17	3 (18%)	3 (19%)
Kontakt se psy						
Ano	41	23 (56%)		41	3 (7%)	9 (23%)
Ne	33	15 (45%)		33	6 (18%)	5 (17%)
Celkem	74	38 (51%)		74	9 (12%)	14 (20%)

* Zvířata z čeledí Elephantidae a Potoroidae byla testovaná na protilátky proti *T. gondii* a *N. caninum* enzymoimunoanalýzou (ELISA); NT – netestováno

Výsledky a diskuze

Protilátky proti *T. gondii* byly detekovány u 51% zvířat s titry 50 – 3200 a protilátky proti *N. caninum* u 12% zvířat s titry 50 – 1600. Nejvyšší *T. gondii* (95%) a *N. caninum* prevalence (27%) byly zjištěny u zvířat z čeledi Felidae; u *Panthera leo* a *P. tigris bengalensis* byly zjištěny protilátky proti oběma parazitům současně. Podobně vysokou seroprevalenci (50%)

zjistil metodou IFAT Andre' et al. (2010) u 161 Brazílských divokých kočkovitých šelem. Protilátky proti oběma parazitům byly metodou IFAT detekovány také např. u dvou z 10 lvů a jednoho z 11 tygrů chovaných soukromě nebo v zoologických zahradách v USA (Spencer et al., 2003). Protilátky proti *T. gondii* byly v naší studii zjištěny také u 2 ze 4 (50%) šimpanzů. Mnohem vyšší prevalence 73% (8/11) byla zjištěna u zvířat z čeledi Hominidae v zoo v České republice (Sedlák a Bártová 2006). Séra všech 4 slonů indických (*Elephas maximus*) byla pozitivní na protilátky proti *T. gondii*. Wiengcharoen et al. (2012) detekovali latex aglutinačním testem protilátky u 15 ze 115 (13%) slonů žijících v zajetí v Thajsku.

Protilátky proti *E. cuniculi* byly zjištěny u 20% zvířat s titry 50 – 1600 a to pouze u zvířat z čeledi Camelidae (61%). Jedná se o první studii zaměřenou na detekci protilátek proti *E. cuniculi* u velbloudů.

Výsledky sérologického vyšetření v závislosti na sledovaných faktorech (čeleď, pohlaví, věk, původ, ustájení, kontakt se psy a kočkami) jsou shrnuty v Tabulce 1. Hlavním zdrojem infekce *T. gondii* a *N. caninum* pro masožravce je konzumace masa obsahujícího tkáňové cysty těchto parazitů. Naopak býložravci jsou většinou infikováni pozřením vody nebo krmiva kontaminovaného oocystami parazitů, které jsou vylučovány definitivními hostiteli. Fuehrer et al. (2010) detekovali všechny tři parazity v mozku hlodavců odchycených v Rakouské zoo. Volně žijící hlodavci a ptáci tak mohou být dalším zdrojem infekce pro zoo zvířata.

Poděkování

Tato studie byla financována z grantu IMA 2014FVHE-17 VFU Brno.

Literatura

- ANDRE', M.R.; ADANIA, C.H.; TEIXEIRA, R.H.F.; SILVA, K.F.; JUSI, M.M.G.; MACHADO, S.T.Z.; DE BORTLLI, C.P.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; ALEGRETTI, S.M. Antibodies to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in captive neotropical and exotic wild canids and felids. *Journal of Parasitology*. 2010, vol. 96, s. 1007-1009.
- CANO-TERRIZA, D.; GUERRA, R.; LECOLLINET, S.; CERDÀ-CUÉLLAR, M.; CABEZÓN, O.; ALMERÍA, S.; GARCÍA-BOCANEGRA, I. Epidemiological survey of zoonotic pathogens in feral pigeons (*Columba livia* var. *domestica*) and sympatric zoo species in Southern Spain. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2015, vol. 43, s. 22-27.
- FUEHRER, H.P.; BLOSCHL, I.; SIEHS, C.; HASSL, A. Detection of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* and *Encephalitozoon cuniculi* in the brains of common voles (*Microtus arvalis*) and water voles (*Arvicola terrestris*) by gene amplification techniques in western Austria (Vorarlberg). *Parasitology Research*. 2010, vol. 107, s. 469-473.
- SEDLÁK, K.; BÁRTOVÁ, E. Seroprevalence of antibodies to *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in zoo animals. *Veterinary Parasitology*. 2006, vol. 136, s. 223-231.
- SPENCER, J.A.; HIGGINBOTHAM, M.J.; BLAGBURN, B.L. Seroprevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in captive and free-ranging nondomestic felids in the United States. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*. 2003, vol. 34, s. 246-249.
- WIENGCHAROEN, J.; NOKKAEW, W.; PRASITHPON, S.; PRASOMTONG, P.; SUKTHANA, Y. *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* antibodies in captive elephants (*Elephas maximus indicus*) in Kanchanaburi province. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 2012, vol. 42, no. 2, s. 235-240.

Kontaktní adresa: Jiřina Marková, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H14005@vfu.cz.

***Neospora* spp. a *Toxoplasma gondii* u koňovitých v západní Africe** ***Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in Equids from West Africa**

**¹Kobédová Kateřina, ¹Bártová Eva, ²Sedlák Kamil, ³Budíková Marie,
⁴Atuman Yakubu Joel, ⁵Kamani Joshua**

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Česká Republika

²Oddělení virologie a sérologie, Státní veterinární ústav Praha, Česká Republika

³Ústav matematiky a statistiky, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno, Česká Republika

⁴NVRI Outstation Investigation Laboratory Bauchi, Bauchi, Nigérie

⁵Parasitology Division, National Veterinary Research Institute, Plateau, Nigérie

Summary

Neospora spp. and *Toxoplasma gondii* are considered to be a globally distributed parasites affecting wide range of warm-blooded animals. Neosporosis has caused clinical illness in horses and consumption of horse meat has been epidemiologically linked to clinical toxoplasmosis in humans. This work is aimed at determination of *Neospora* spp. and *T. gondii* antibodies in horses and donkeys from three states of Nigeria. A total of 144 serum samples were collected from clinically healthy animals (120 horses and 24 donkeys). The sera were tested for antibodies to *Neospora* spp. and *T. gondii* by indirect fluorescence antibody test, a titer ≥ 50 was considered positive. Antibodies to *Neospora* spp. and *T. gondii* were detected in 8 % horses with titers 50 and in 24 % horses with titers 50 – 800, respectively. Co-infection of both parasites was proved in three horses (3 %). Statistical differences were found only for *T. gondii* seroprevalence in horses with different use, locality, origin and management (p -value ≤ 0.05). Antibodies to *T. gondii* were detected in four (17 %) of 24 donkeys with statistical difference (p -value ≤ 0.05) in animals of different use; antibodies to *Neospora* spp. were not proved in any of the donkeys. This is the first seroprevalence study of *Neospora* spp. and *T. gondii* in equids from Nigeria.

Keywords: *Equus caballus*; *Equus asinus*; IFAT; neosporosis; toxoplasmosis

Úvod

Neospora spp. a *Toxoplasma gondii* jsou paraziti infikující řadu teplokrevných živočichů. *Neospora* (*Neospora caninum* a *Neospora hughesi*) způsobuje u koní onemocnění spojené s neurologickými příznaky a aborty plodů (Dubey a Porterfield 1990; Pitel et al. 2003a). Seroprevalence neosporózy se u koní pohybuje v rozmezí od 1 % ve Švédsku do 31 % v USA (Dubey et al. 2003; Jakubek et al. 2006). Parazit *T. gondii* je schopen infikovat všechny teplokrevné živočichy, včetně koňovitých a i když tito jsou k infekci méně citliví, mohou být postiženi encefalomyelitidami (Tassi et al. 2007). Toxoplazmóza je zoonotickou infekcí přenosnou pozřením nedostatečně tepelně opracovaného masa nebo syrového mléka. Ve Francii byly zaznamenány vážné klinické případy toxoplazmózy u lidí, spojené s konzumací syrového koňského masa (Pomares et al. 2011). Cílem této studie bylo detekovat parazity *Neospora* spp. a *T. gondii* u koní a oslů v Africe a determinovat rizikové faktory pro obě infekce.

Materiál a metodika

Vzorky krve byly odebrány celkem od 120 klinicky zdravých koní pocházejících ze tří nigerijských států (Bauchi, Katsina a Plateau) a od 24 oslů z Bauchi. Krev byla odebírána v období 2014 - 2015, séra byla uchována při teplotě -20 °C. Protilátky proti *Neospora* spp. a *T. gondii* byly detekovány pomocí nepřímé imunofluorescence (NIFR) s použitím komerčně dostupného antigenu *N. caninum* a *T. gondii* IFR (VMRD, Pullman, Chicago, USA) a anti-koňského IgG FITC konjugátu (VMRD). Získaná data byla statisticky zpracována pomocí

Chí-kvadrát testu a Fisherova exaktního testu; rozdíly s $p \leq 0,05$ byly považovány za statisticky významné. U kobyl nebyly protilátky proti *Neospora* spp. detekovány, proto nebylo vyhodnoceno riziko závislosti neosporózy na pohlaví koní.

Výsledky

Protilátky proti *Neospora* spp. byly prokázány metodou NIFR u 10 (8 %) koní s titrem 50 a protilátky proti *T. gondii* u 29 (24 %) koní s titry 50 ($n = 14$), 100 ($n = 9$), 200 ($n = 4$), 400 ($n = 1$) a 800 ($n = 1$). Protilátky proti *Neospora* spp. byly detekovány u 11 % samců s titrem 50, zatímco samice byly negativní. Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn u žádné ze sledovaných charakteristik. Prevalence protilátek proti *T. gondii* byla vyšší u samic (41%) v porovnání se samci (21%) a zvyšovala se s věkem zvířat; nicméně bez statisticky významného rozdílu. Z 11 koní mladších jednoho roku byly pouze u jednoho detekovány protilátky proti *T. gondii*. Riziko infekce *T. gondii* bylo 92x větší u importovaných koní (Súdán, Thajsko, Čad, Francie, Nigérie), než u místních koní ($p = 0,0126$). Byly zjištěny i statistické rozdíly v prevalenci u koní různého využití (plemenitba, ceremoniály, výzkum, sport; $p = 0,0097$), u koní z různých oblastí (Bauchi, Katsina, Plateu; $p = 0,0019$) a u koní chovaných odlišným způsobem (pastva, ustájení; $p = 0,0396$). Vyšší prevalence *T. gondii* byla zjištěna u koní ze státu Katsina, koní sportovních a z hlediska způsobu chovu u koní ustájených. Koinfekce *Neospora* spp. s *T. gondii* byla detekována u tří sportovních koní (3 %) s titry 50 (věk 5 let), 100 (věk 2,5 let) a 200 (věk 3 roky) pro *T. gondii*. Dva z nich měli přístup na pastvu a patřili mezi nigerijská lokální plemena; třetí kůň, původem z Thajska, byl chován ve stáji. Protilátky proti *Neospora* spp. nebyly prokázány u žádného z oslů. *T. gondii* protilátky byly zjištěny u čtyř (17 %) z 24 oslů s titry 50, 50, 100 a 200. Statistický rozdíl ($p = 0,0184$) byl zjištěn u oslů různého využití (60 % u koní na práci a 5 % u koní pro transport).

Diskuse

V naší studii byla zjištěná seroprevalence *Neospora* spp. stejná nebo nižší ve srovnání s jinými studii u koní v Evropě; nebyl prokázán žádný statisticky významný rozdíl v prevalenci protilátek proti *Neospora* spp. a sledovanými znaky vyšetřovaných koní. V Africe existují pouze tři prevalenční studie zabývající se detekcí *T. gondii* u koní. Protilátky proti tomuto parazitu byly prokázány modifikovaným aglutinačním testem u 18 % ze 158 koní v Tunisu (Boughattas, 2011), ELISA testem u 25 % ze 100 pracovních koní v Egyptě (Haridy, 2009) a nepřímým hemaglutinačním testem u 37 % ze 70 koní (využívaných k pólu) v Nigérii (Aganga, 1983). Podobně jako v naší studii byla vyšší prevalence u samic ve srovnání se samci zjištěna u koní v Egyptě (Haridy, 2009). Kouam et al. (2010) prokázali, že prevalence *T. gondii* u koní v Řecku se liší v závislosti na oblasti, odkud koně pochází a na jejich využití; naopak prevalence *T. gondii* nebyla ovlivněna pohlavím, věkem ani plemenem u koní v Itálii (Bártová et al., 2015). O prevalenci *Neospora* spp. a *T. gondii* u oslů je ve světě nedostatek informací. El-Ghaysh (1998) detekoval *T. gondii* protilátky ELISA testem u 66 % oslů v Egyptě. Vyšší prevalence *Neospora* spp. (12 % v cELISA) ve srovnání s *T. gondii* (5 % v LAT a 8 % v NIFR) byla zaznamenána u 238 oslů v Itálii (Machačová et al., 2013, 2014). Zatímco infekce parazitem *T. gondii* se u koňovitých v Nigérii zdá být častá, s infekcí způsobené *Neospora* spp. se zvířata setkávají méně. Možným zdrojem obou protozoárních infekcí může být potrava, voda nebo pastviny kontaminované oocystami *Neospora* spp. a *T. gondii*, vylučované do prostředí definitivními hostiteli (psi a kočky).

Literatura

AGANGA, A. O., KWANASHIE, G. G., BELINO, E. D. Toxoplasma antibodies in polo horses of Nigeria. *International Journal of Zoonoses*. 1983, vol. 10, s. 155–158.

- BÁRTOVÁ, E., MACHAČOVÁ, T., SEDLÁK, K., BUDÍKOVÁ, M., MARIANI, U., VENEZIANO, V. Seroprevalence of antibodies of *Neospora* spp. and *Toxoplasma gondii* in horses from southern Italy. *Folia Parasitologica*. 2015, vol. 62, s. 43.
- BOUGHATTAS, S., BERGAOUI, R., ESSID, R., AOUN, K., BOURATBINE, A. Seroprevalence of *T. gondii* infection among horses in Tunisia. *Parasites and Vectors*. 2011, vol. 4, s. 218.
- DUBEY, J. P., PORTERFIELD, M. L. *Neospora caninum* (Apicomplexa) in an aborted equine fetus. *Journal of Parasitology*. 1990, vol. 76, s. 732-734.
- DUBEY, J. P., MITCHELL, S. M., MORROW, J. K., RHYAN, J. C., STEWART, L. M., GRANSTROM, D. E., ROMAND, S., THULLIEZ, P., SAVILLE, W. J., LINDSAY, D. S. Prevalence of antibodies to *Neospora caninum*, *Sarcocystis neurona*, and *Toxoplasma gondii* in wild horses from central Wyoming. *Journal of Parasitology*. 2003, vol. 89, s. 716-720.
- EL-GHAYSH, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in Egyptian donkeys using ELISA. *Veterinary Parasitology*. 1998, vol. 80, s. 71-73.
- HARIDY, F. M., SHOUKRY, N. M., HASSAN, A. A., MORSY, T. A. ELISA-seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in draught horses in Greater Cairo, Egypt. *Journal of the Egyptian Society of Parasitology*. 2009, vol. 39, s. 821-826.
- JAKUBEK, E. B., LUNDÉN, A., UGGLA, A. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora* sp. infections in Swedish horses. *Veterinary Parasitology*. 2006, vol. 138, s. 194-199.
- KOUAM, M. K., DIAKOU, A., KANZOURA, V., PAPADOPOULOS, E., GAJADHAR, A. A., THEODOROPOULOS, G. A. Seroepidemiological study of exposure to *Toxoplasma*, *Leishmania*, *Echinococcus* and *Trichinella* in equids in Greece and analysis of risk factors. *Veterinary Parasitology*. 2010, vol. 170, s. 170-175.
- MACHAČOVÁ, T., BÁRTOVÁ E., DI LORIA, A., SEDLÁK, K., GUCCIONE, J., FULGIONE, D., VENEZIANO, V. Seroprevalence and risk factors of *Neospora* spp. in donkeys from Southern Italy. *Veterinary Parasitology* 2013, vol. 198, s. 201-204.
- MACHAČOVÁ, T., BÁRTOVÁ E., DI LORIA, A., SEDLÁK, K., MARIANI, U., FUSCO, G., DUBEY, J. P. Seroprevalence of *Toxoplasma gondii* in donkeys (*Equus asinus*) in Italy. *Journal of Veterinary Medical Sciences*. 2014, vol. 76, s. 265-267.
- PITEL, P. H., ROMAND, S., PRONOST, S., FOUCHER, N., GARGALA, G., MAILLARD, K., THULLIER, P., COLLOBERT-LAUGIER, C., TAINTURIER, D., FORTIER, G., BALLEST, J. J. Investigation of *Neospora* sp. antibodies in aborted mares from Normandy, France. *Veterinary Parasitology*. 2003a, vol. 118, s. 1-6.
- POMARES, Ch., AJZENBERG, D., BORNARD, L., BERNARDIN, G., HASSEINE, L., DARDÉ, M. L., MARTY, P. Toxoplasmosis and horse meat, France. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2011, vol. 17, s. 1327-1328.
- TASSI, P. *Toxoplasma gondii* infection in horses. *Parassitologia*. 2007, vol. 49, s. 7-15.

Kontaktní adresa: Kateřina Kobédová, MVDr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic, kobedovak@vfu.cz.

New Neotropical Host and Distribution Records on Chewing Lice of the Genus *Ricinus* (Phthiraptera: Ricinidae)

Valan Miroslav, Sychra Oldřich, Literák Ivan

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

Summary

Ricinus is the genus with the largest chewing lice body that parasitizes passerine birds. Compared to other genera, *Ricinus* is characterized by the blood feeding behavior, tend to move more quickly, low prevalence, and low mean intensity, and therefore it is not often collected. Herein, we present new information regarding *Ricinus* distribution in Neotropical Region. Two chewing louse species supposedly new to science were found: *Ricinus* sp. 1 ex *Corythopsis delalandi* (Lesson, 1831) and *Ricinus* sp. 2 ex *Euphonia laniirostris* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 from Paraguay and Costa Rica, respectively. New host–louse associations are recorded for *Ricinus dalglishi* Nelson, 1972 ex *Helmitheros vermivorum* (Gmelin, 1789), and *Ricinus vireoensis* Nelson, 1972 ex *Vireo pallens* Salvin, 1863. These two records are, together with *R. vireoensis* Nelson, 1972 ex *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766) first evidence of the genus *Ricinus* occurring in Honduras

Keywords: birds; passerines; chewing lice; louse; Phthiraptera; Amblycera; *Ricinus*; ectoparasites; Neotropical Region; Costa Rica; Paraguay; Honduras

Introduction

Ricinus is indeed an interesting genus of chewing lice. Its position in tree of life within the Phthiraptera order is still unresolved, and it is unclear how it is related to other chewing lice genera which as their name say are feather feeding parasites. In contrary, *Ricinus* is characterized by the blood feeding behavior. Compared to other genera, *Ricinus* is one of the largest chewing lice which parasitizes passerine birds and due to negatively correlated parasite size and abundance it has lower prevalence and lower mean intensity. Being the bigger parasite often means being an easy target, but *Ricinus* complemented this by moving significantly faster. Eventually, all of this led to the fact that it is rarely collected.

Considering the genus in restricted sense, forty-five of 72 known *Ricinus* species (Price *et al.*, 2003, Valan *et al.*, 2016) occur in Neotropics. Nelson (1972) contributed with proper descriptions of 42 species in 1972 and thereafter only three new species are added by Mey (1984), Oniki (2000) and Oniki *et al.* (2004). The aim of this study is to acquire better knowledge of *Ricinus* distribution in Neotropical Region.

Materials and Methods

Ricinus chewing lice were sampled at various localities in Costa Rica and Honduras in years 2010 and 2014, respectively. Birds were caught by mist nets. Chewing lice were collected using fumigation chamber method and visual examination (Clayton and Drown 2001). Once sampled, unharmed birds were released back to the wild and lice were preserved in 96% ethyl alcohol.

Specimens were sorted to the genera level, sexed, and aged under a stereo microscope. Adults were slide mounted (Palma 1978) and scientific taxon identification were based only on adult specimens while juvenile specimens are deposited in the freezer on -72°C to enable further molecular studies.

Collected specimens are deposited at the Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, UVPS Brno, Czech Republic and in addition we

examined the specimens of the taxa studied herein deposited at the Smithsonian Institution National Museum of Natural History (SNHM). Type specimens are deposited at the Moravian Museum, Brno, Czech Republic (MMBC). Host names follow Clements *et al.* (2015).

Results

Taxonomy

Phthiraptera Haeckel, 1896

Amblycera Kellogg, 1896

Ricinidae Neumann, 1906

Ricinus De Geer, 1778

Ricinus De Geer, 1778:69. Type species: *Ricinus fringillae* De Geer, 1778

Ricinus dalgleishi Nelson, 1972 sensu lato

Type host. *Geothlypis trichas* (Linnaeus, 1766) Common Yellowthroat (Parulidae)

Material examined: 4 f (female), 5 m (male), 6 N (nymph) ex *Helmitheros vermivorum* (Gmelin, 1789) (Passeriformes: Parulidae) Worm-eating Warbler, Honduras, Islas de la Bahía, Utila (16°06'07.6"N 86°54'00.5"W), 23 August 2014, col. Literak, slide No. UT22. 1 f same data as previous, 26 August 2014, slide No. UT65. 1 f, 1 m, 2 N Jamaica, Marshall's Pen, Mandeville, W. I., February 1981, col. Dalgleish, slide No. 814 (SMNH); 2f same data as previous, 24–30 December 1982.

New host–parasite association.

Ricinus vireoensis Nelson, 1972

Type host. *Vireo griseus* (Boddaert, 1783) White-eyed Vireo (Vireonidae)

Material examined: 4 f, 4 N ex *Vireo pallens* Salvin, 1863 (Passeriformes: Vireonidae) Mangrove Vireo, Honduras, Islas de la Bahía, Utila (16°06'07.6"N 86°54'00.5"W) 27 August 2014, col. Literak, slide No. UT87, 3 f, 7 N ex *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766) (Passeriformes: Vireonidae) Red-eyed Vireo, Honduras, Islas de la Bahía, Utila (16°06'07.6"N 86°54'00.5"W), 24 August 2014, col. Literak, slide No. UT43.

New host–parasite association.

Ricinus sp.1 n. sp.

Type host. *Corythopsis delalandi* (Lesson, 1831) Southern Antpipit (Tyrannidae)

Material examined: 2 f, 2 N ex *Corythopsis delalandi* (Lesson, 1831) (Passeriformes: Tyrannidae) Southern Antpipit, Paraguay, San Rafael National Park, Kanguery Biological Station (26°30'S, 55°47'W, 183 m a.s.l.), 20 August 2012, col. Literak, slide No. PG107.

New species.

Ricinus sp.2 n. sp.

Type host. *Euphonia laniirostris* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 Thick-billed Euphonia (Fringillidae)

Material examined: 10 f, 1 m, 8 N ex *Euphonia laniirostris* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 (Passeriformes: Fringillidae) Thick-billed Euphonia, Costa Rica, Las Tablas, La Amistad Lodge (8°54'N, 82°47'W; 1300 m a.s.l.) 18 August 2010, col. Literak, slide No. LT15. 4f, 1N ex *E. laniirostris* same data as allotype except collected on 19 August 2010.

New species.

Conclusions

Herein, we presented new information regarding *Ricinus* distribution in Neotropical Region. Two chewing louse species new to science are found: *Ricinus* sp. 1 ex *Corythopsis delalandi* (Lesson, 1831) and *Ricinus* sp. 2 ex *Euphonia lanirostris* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837 from Paraguay and Costa Rica, respectively. Two new host–louse associations are recorded for *Ricinus dalgleishi* Nelson, 1972 ex *Helmitheros vermivorum* (Gmelin, 1789), and *Ricinus vireoensis* Nelson, 1972 ex *Vireo pallens* Salvin, 1863. These two later records are, together with *R. vireoensis* ex *Vireo olivaceus* (Linnaeus, 1766) first evidence of the genus *Ricinus* occurring in Honduras.

Acknowledgment

We are greatly indebted to Stanislav Kolenčik and Alberto Velasquez Castillo who collaborated in the field work in Honduras. We also thank Floyd Shockley and David Floyd curators at the Smithsonian Institution National Museum of Natural History (SNHM) for their support and assistance during a research stay of the first author who was granted project IMA 2014-FVHE-16.

References

- CLAYTON, D.H. & DROWN, D.M. Critical evaluation of five methods for quantifying chewing lice (Insecta: Phthiraptera). *Journal of Parasitology*. 2001, vol. 87, pp. 1291–1300. <http://dx.doi.org/10.2307/3285290>
- CLEMENTS, F.J.; SCHULENBERG, S.T.; ILIFF, J.M.; ROBERSON, D.; FREDERICKS, T.A.; SULLIVAN, L.B.; WOOD, L.C.; *The eBird/Clements checklist of birds of the world: Version 2015*. Downloaded from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/>
- MEY, E. Kubanische Mallophagen III. (Ergebnisse der 1. Kubanisch - Deutschen “Alexander-von-Humboldt” Expedition 1967/68, Nr. 37). *Reichenbachia*. 1984, vol. 22, pp. 243–245.
- NELSON, B.C. A Revision of the New World Species of *Ricinus* (Mallophaga) Occurring on Passeriformes (Aves). *University of California Press, Berkeley*. 1972, 175 pp.
- ONIKI, Y. *Ricinus butleri* n.sp. (Insecta, Phthiraptera, Amblycera, Ricinidae) from the Rufous-capped Spinetail *Synallaxis ruficapilla* (Aves, Passeriformes, Furnariidae). *Rudolstädter naturhistorische Schriften*. 2000, vol. 10, pp. 53–58.
- ONIKI, Y., MEY, E. & WILLIS, E.O. *Ricinus ruficapillus* n. sp. (Insecta, Phthiraptera, Amblycera, Ricinidae) – a second *Ricinus* species on the Rufous-capped Spinetail *Synallaxis ruficapilla* (Aves, Passeriformes, Furnariidae). *Rudolstädter naturhistorische Schriften*. 2004, vol. 12, pp. 129–132.
- PALMA, R.L. Slide mounting of lice: a description of the Canada balsam technique. *New Zealand Entomologist*. 1978, vol. 6, pp. 432–436. <http://dx.doi.org/10.1080/00779962.1978.9722313>
- PRICE, R.D.; HELLENTHAL, R.A. & PALMA, R.L. 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. & CLAYTON, D.H. (Eds.), *The Chewing Lice: World Checklist and Biological Overview*. *Illinois Natural History Survey, Champaign*. 2003, pp. 1–448.
- VALAN M.; SYCHRA O. & LITERAK I.: Chewing lice of genus *Ricinus* (Phthiraptera, Ricinidae) deposited at the Zoological Institute of the Russian Academy of Sciences, Saint Petersburg, Russia, with description of a new species. *Parasite*. 2016, vol. 23, no. 7, pp. 1–10.

Contact address: Miroslav Valan, DVM., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VFU Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, miroslav.valan@yahoo.com.

Chewing Lice of Genus *Philopteroides* in New Guinea – Australasian Region as the Centre of Area of the Genus

¹Najer Tomáš, ²Gustafsson R. Daniel, ¹Sychra Oldřich

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

²Department of Biology, University of Utah, Salt Lake City

Summary

Within taxonomical revision of *Philopterus* s. l. (Phthiraptera: Ischnocera) genera complex were described two new species of genus *Philopteroides* from family of Berrypeckers (Paramythiidae). By description of these two species, the presence of genus *Philopteroides* in New Guinea was proved, what confirms our hypothesis about Australasian region as a biodiversity centre of this genus. From 15 nowadays known species, only two are known outside this region (in Senegal and Uganda). Genus *Philopteroides* is further split into more species-group, both newly described species belong to *beckeri* group, which was until now known from Uganda only. This similarity seems to confirm our theory, as well, however, compared to African species those from New Guinea still show noticeable morphological differences. During the study was used innovative system of morphological description including until now neglected patterns, which was previously proved in other Ischnoceran species.

Keywords: Phthiraptera; Ischnocera; Philopteridae; *Philopteroides*; lice; new species; Passeriformes; Paramythiidae; berrypeckers; New Guinea

Introduction

The genus *Philopteroides* Mey, 2004, was divided into two species groups by Valim & Palma (2013), which differ in the dimensions of the preantennal area and the depth of the median indentation of the hyaline margin. To date, only two species have been placed in the *beckeri* species-group, while the remaining ten described species are placed in the *mitsusui* species-group.

Philopteroides was not previously known from the bird family Paramythiidae or from New Guinea. Therefore, both the geographical range and the host distribution of this louse genus are extended with the descriptions of the two new species presented in this paper, from the only two species currently placed in the Paramythiidae (Clements *et al.* 2015). All other specimens of *Philopteroides* from New Guinea examined by us belong to the *mitsusui* species-group, suggesting either that the host distribution of this species-group may be limited in New Guinea, or that the *beckeri* species-group is paraphyletic and based on characters that are not phylogenetically informative. No comprehensive phylogeny of the *Philopterus* complex has yet been published, and relationships within *Philopteroides*, as well as between this genus and the other members of the complex (see Mey 2004), are therefore unknown.

Material and Methods

All examined specimens were mounted on slides in Canada balsam, and are deposited in the Natural History Museum, London, United Kingdom (NHML). The figures were drawn using light microscope CX31RBSF (Olympus, Tokyo, Japan), fitted with a drawing tube, then edited using Adobe Illustrator CS6 on a tablet PTZ-930 (Wacom, China).

Dimensions taken (Table 5, with mean values in parentheses) follow Valim & Palma (2013), but some abbreviations have been changed. All dimensions are given in millimeters and were taken using an optical scale of light microscope CX21FS1 (Olympus, Tokyo, Japan). Head chaetotaxy follows Clay (1951), as modified by Mey (1994); the head sensilla follow Valim & Silveira (2014), with our tentative interpretation. Thoracic chaetotaxy follows Mey (1994).

Female terminalia terminology (inner genital sclerite, subvulval sclerites) follows Clay (1958).

We propose a new system of naming leg setae for the *Philopterus*-complex, but comparisons with the *Brueelia*-complex (Gustafsson & Bush *in prep.*) show that accurate homologisation of leg chaetotaxy may be difficult. A descriptive system may be necessary for each group of closely related louse genera, until a broader study of leg chaetotaxy within the Ischnocera is performed. The following standardized abbreviations were used for leg chaetotaxy: *c* = coxa; *t* = trochanter; *f* = femur; *a* = anterior setae; *d* = dorsal setae; *dm* = dorsal marginal setae; *p* = posterior setae; *v* = ventral setae. Setal numbers and terminology for thorax and abdomen follow Valim & Palma (2013), with the difference that there are no spine-like setae present in the new species described, so the letters *l* and *s* in the code of sternal setae mean long and short, without any difference in shape. We regard as pleural setae those placed on the lateral sides of the tergo-pleurites, which are in this case visible mainly from the ventral side. The short and long trichoid setae on each side of pterothorax are mentioned as metapleural setae. Host taxonomy follows Clements *et al.* (2015).

Results

There were two new species of genus *Philopterooides* Mey, 2004, described within this study:

***Philopterooides sinancorellus* Najer, Gustafsson & Sychra, new species**

Type host. *Oreocharis arfaki* (Meyer, 1875) (Passeriformes: Paramythiidae) – tit berrypecker.

Type locality. Morobe District, Papua New Guinea.

***Philopterooides gigas* Najer, Gustafsson, and Sychra, new species**

Type host. *Paramythia montium montium* De Vis, 1892 (Passeriformes: Paramythiidae) – crested berrypecker.

Type locality. Mur Mur Pass, Western Highlands District, Papua New Guinea.

Other host. *Paramythia montium brevicauda* Mayr & Gilliard, 1954 (Passeriformes: Paramythiidae) – crested berrypecker.

Discussion

The known geographical distribution of the 15 described species of *Philopterooides* is as follows: New Zealand (5 spp.), New Guinea and Vietnam (2 spp. each), India, Taiwan, Micronesia, Senegal, Uganda and the Indo-Malayan region (1 sp. each; Valim & Palma 2013). Considering this distribution, it is likely that further species of *Philopterooides* will be found in Australia and other islands of Australasia, which would appear as the geographical centre of this louse genus, with most species known from islands or mountainous areas with high levels of endemism. However, the African records are puzzling and would need further research.

Considering that at least one species of the *beckeri* species-group (*Ph. pilgrimi* Valim & Palma, 2013) has a sympatric distribution with four other species belonging to the *mitsusui* species-group within New Zealand (Valim & Palma 2013), the different species-groups are not structured geographically. Furthermore, neither the genus nor the proposed species-groups are distinctively host specific because all known species parasitise at least 10 host families, with the four members of the *beckeri* species-group having hosts from three families. However, in some cases, morphologically similar species of *Philopterooides* seem to parasitise hosts of the same family (e.g. Acanthisittidae; Pycnonotidae, Paramythiidae), suggesting that when more species become known, a pattern of host-lice relationships may emerge.

The two new species of *Philopteroides* described in this paper differ from *Ph. beckeri* (the type of the species-group), in several characters, including some immediately obvious, as the very large size of *Ph. gigas*. This would indicate that the *beckeri* species-group may prove to be artificial after more species are discovered and described. Also, *Philopteroides* is in much need of molecular studies to elucidate relationships among species as well as between species-groups, and indeed among all genera of the *Philopterus*-complex. Obviously, fresh material collected from suitable hosts occurring in Australasia, Asia, and Africa is needed for such studies.

Acknowledgements

Tomas Najer's visit to PIPeR, where this work was carried out, was funded by project IMA UVPS Brno 2014-FVHE-01. Daniel Gustafsson was funded by grant 36/07 1.4 from the Swedish Taxonomic Initiative. Also, we are indebted to Ricardo L. Palma (Museum of New Zealand Te Papa Tongarewa, Wellington, New Zealand), and one anonymous reviewer for many helpful suggestions which improved our original manuscript.

References

- CLAY, T. An introduction to a classification of the avian Ischnocera (Mallophaga): Part I. *The Transactions of the Royal Entomological Society of London*. 1951, 102(2), 171–194.
- CLAY, T. Three new species of *Degeeriella* Neumann (Mallophaga) from the Falconiformes (Aves). *Proceedings of the Royal Entomological Society London*. 1958, (B) 27(1–2), 1–7.
- CLEMENTS, J.F., SCHULENBERG, T.S., ILIFF, M.J., ROBERSON, D., FREDERICKS, T.A., SULLIVAN, B.L. & WOOD, C.L. *The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2015*. 2015, Available from <http://www.birds.cornell.edu/clementschecklist/download/> (Accessed 14 October 2015).
- MEY, E. Beziehungen zwischen Larvenmorphologie und Systematik der Adulti bei den Vogel-Ischnozeren (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera). *Mitteilungen aus dem Zoologischen Museum in Berlin*. 1994, 70(1), 3–84.
- MEY, E. Zur Taxonomie, Verbreitung und parasitophyletischer Evidenz des *Philopterus*-Komplexes (Insecta, Phthiraptera, Ischnocera). *Ornithologischer Anzeiger*. 2004, 43, 149–203.
- NAJER, T., SYCHRA, O., HUNG N.M., CAPEK, M., PODZEMNY, P., LITERAK, I. New species and new records of chewing lice (Phthiraptera: Amblycera, Ischnocera) from bulbuls (Passeriformes: Pycnonotidae) in Vietnam. *Zootaxa*. 2012a, 3357, 37–48.
- NAJER, T., SYCHRA, O., LITERAK, I., PROCHAZKA, P., CAPEK, M., KOUBEK, P. Chewing lice (Phthiraptera) from wild birds in Senegal, with descriptions of three new species of the genera *Brueelia* and *Philopteroides*. *Acta Parasitologica*. 2012b, 57(1), 90–98.
- VALIM, M.P. & PALMA, R.L. Three new species of the genus *Philopteroides* Mey, 2004 (Phthiraptera, Ischnocera, Philopteridae) from New Zealand. *ZooKeys*. 2013, 297, 71–89.
- VALIM, M.P. & SILVEIRA, L.F. A new species and five new records of chewing lice (Insecta: Phthiraptera: Ischnocera) from an isolated population of the solitary tinamou *Tinamus solitarius* (Aves: Tinamiformes). *Zootaxa*. 2014, 3838, 127–142.

Contact address: Tomáš Najer, DVM, Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic, tomas.najer@gmail.com.

Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in Three Tick Species in the South Moravia, Czech Republic

Rybářová Markéta

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

Summary

Anaplasma phagocytophilum is zoonotic gram-negative bacteria, which harbour neutrophiles and can cause human granulocytic anaplasmosis. In Europe, it is transmitted mainly by *Ixodes ricinus*. Aim of this study was to detect prevalence of this pathogen in ticks in the South Moravia region in southeastern part of the Czech Republic. We examined 827 *I. ricinus*, 500 *Dermacentor reticulatus* and 40 *Haemaphysalis concinna* ticks by nested PCR. We confirmed presence of 16S rDNA (460 bp) of *A. phagocytophilum* in 3.5 % (n=827), 3.6 % (n=500), and 25 % (n=40) of *I. ricinus*, *D. reticulatus*, and *H. concinna*, respectively. All amplicons were 100% identical with corresponding sequences of *A. phagocytophilum* DNA in GenBank. Despite absence of clinical case in the Czech Republic, human granulocytic anaplasmosis should be considered in patients with non-specific febrile disease and a history of tick bite.

Keywords: *Anaplasma phagocytophilum*; *Ixodes ricinus*; *Haemaphysalis concinna*; *Dermacentor reticulatus*

Introduction

Anaplasma phagocytophilum is gram-negative intracellular bacteria which infects neutrophiles and can cause febrile disease in human and animals (Bakken and Dumler, 2015). In Europe, it is mainly transmitted by *Ixodes ricinus* (Stuen et al., 2013). Because there are just few studies about prevalence in other tick species, the aim of our study was focused on three hard tick species *I. ricinus*, *Dermacentor reticulatus* and *Haemaphysalis concinna* present in the region of South Moravia. All of them can feed on human hosts and transmit various tick-borne pathogens. We did not find any study focused on presence of *A. phagocytophilum* in *H. concinna*.

Material and Methods

We have collected 827, 500, and 40 *I. ricinus*, *D. reticulatus*, and *H. concinna*, respectively by flagging during 2009-2011 on 43 sampling sites in region of South Moravia, southeastern part of the Czech Republic. Presence of *A. phagocytophilum* DNA was detected by nested PCR, developed to amplify approx. 460 bp long part of 16S rDNA (Majláthová et al., 2011). Visualization of PCR products was done in 1.5% agarose gel with ethidium bromide. All positive PCR products were purified with Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan) according to the manufacturer protocol and sequenced in Macrogen (Amsterdam, Netherlands). Obtained sequences were edited in Mega6 (Tamura et al., 2013) and compared to GenBank database with BLAST algorithm (Altschul et al., 1990).

Results

We found *A. phagocytophilum* in 3.5 %, 3.6 %, and 25% of *I. ricinus*, *D. reticulatus*, and *H. concinna*, respectively on 16 sampling sites (Table 1). As shown in table two tick species was infected simultaneously on three sampling sites.

All obtained sequences were 100% identical with *A. phagocytophilum* DNA in GenBank records (accession numbers CP006618 and KU513794) (E-value 0.0).

Table 1. Positive localities.

Locality	Latitude	Longitude	<i>I. ricinus</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>H. concinna</i>
Drnholec	48.862778	16.499444	1/140		1/4
Hodonín	48.833056	17.113333	3/89		
Lanžhot	48.688333	16.989444	1/45		
Lednice	48.818889	16.806389		1 / 9	9/32
Mikulčice	48.799167	17.093056	3/75	14/238	
Moravská Nová Ves	48.779722	17.068611		3/74	
Mušlov	48.800278	16.7125	1/4		
Nosislav	49.019167	16.639722	3/20		
Nové Mlýny	48.855	16.731389	4/6		
Pasohlávky	48.898056	16.529722	1/14		
Pouzďřany	48.95	16.6175	4/108		
Přibice	48.951667	16.573611	1/6		
Strážnice	48.910556	17.311944	2/29		
Uherský Ostroh	48.994722	17.389722	2/8		
Vlasatice	48.934444	16.503056	1/14		
Vranovice	48.9575	16.61	4/40		
Sum of ticks:			31	18	10

Discussion

Revealed prevalence in *I. ricinus* corresponded to the study in the Czech Republic by Venclíková et al. (2016) She has detected recently this bacteria in 5.6 % of flagged *I. ricinus* (n = 54), while our study showed 3.5% prevalence in same tick species. Dvořáková Heroldová and Dvořáčková (2014) documented anti-*A. phagocytophilum* antibodies in 11 % of human patients (n = 314) with suspected Lyme disease. We did not find any study about *A. phagocytophilum* in *D. reticulatus* or *H. concinna* in Czech Republic or Europe. *D. reticulatus* capability of transmission *A. marginale* was proved already (Zivkovic et al., 2007), but its capability to transmit *A. phagocytophilum* remains unknown. Distinctly higher prevalence of *A. phagocytophilum* in *H. concinna* is probably caused by limited amount of collected ticks.

Conclusion

We found *A. phagocytophilum* in three species of hard ticks in South Moravia. Despite absence of reported clinical case in the Czech Republic, human granulocytic anaplasmosis should be considered in patients with non-specific febrile symptoms and a history of tick bite. Presence of *A. phagocytophilum* in *H. concinna* does not prove its capability to transmit it but we cannot exclude this eventuality without further research.

Acknowledgement

The author would like to acknowledge Michaela Honsová and Lenka Pokorná who participated on the laboratory work. Study was supported by Health Research Council (project no. 16-33934A).

References

ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MYERS, E. W. and LIPMAN, D. J., Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. 1990, vol. 215, no. 3, p. 403–410.

- BAKKEN, J. S. and DUMLER, J. S., Human Granulocytic Anaplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2015, vol. 29, no. 2, p. 341–355.
- DVOŘÁKOVÁ HEROLDOVÁ, M. and DVOŘÁČKOVÁ, M., [Seroprevalence of *Anaplasma phagocytophilum* in patients with suspected Lyme borreliosis]. *Epidemiologie, Mikrobiologie, Imunologie: Časopis Společnosti Pro Epidemiologii a Mikrobiologii České Lékařské Společnosti J.E. Purkyně*. 2014, vol. 63, no. 4, p. 297–302.
- MAJLÁTHOVÁ, V., MAJLÁTH, I., VÍCHOVÁ, B., GUL'OVÁ, I., DERDÁKOVÁ, M., SESZTÁKOVÁ, E. and PET'KO, B., Polymerase chain reaction confirmation of *Babesia canis canis* and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs suspected of babesiosis in Slovakia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.). 2011, vol. 11, no. 11, p. 1447–1451.
- STUEN, S., GRANQUIST, E. G. and SILAGHI, C., *Anaplasma phagocytophilum*—a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013, vol. 3, art. 31.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. and KUMAR, S., MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2013, vol. 30, no. 12, p. 2725–2729.
- VENCLÍKOVÁ, K., MENDEL, J., BETÁŠOVÁ, L., BLAŽEJOVÁ, H., JEDLIČKOVÁ, P., STRAKOVÁ, P., HUBÁLEK, Z. and RUDOLF, I., Neglected tick-borne pathogens in the Czech Republic, 2011–2014. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016, vol. 7, no. 1, p. 107–112.
- ZIVKOVIC, Z., NIJHOF, A. M., FUENTE, J., KOCAN, K. M. and JONGEJAN, F., Experimental transmission of *Anaplasma marginale* by male *Dermacentor reticulatus*. *BMC Veterinary Research*. 2007, vol. 3, no. 1, p. 32.

Contact address: Markéta Rybářová DVM, Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE UVPS Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Czech Republic, rybarovam@vfu.cz.

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	XVIII. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	127
Vydání:	1.
Rok vydání:	2016
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-772-5