

VETERINÁRNÍ UNIVERZITA BRNO

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Oborová rada pro hygienu a technologii potravin

a

Koordinační místo pro vědeckou a technickou spolupráci s EFSA v ČR,
Ministerstvo zemědělství

a

Časopis MASO – odborný časopis pro obor zpracování masa

XXV. KONFERENCE MLADÝCH VĚDECKÝCH
PRACOVNÍKŮ S MEZINÁRODNÍ ÚČASTÍ

Sborník příspěvků

VETUNI Brno, 24. 5. 2023



Elektronický sborník byl vydán 24. 5. 2023

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

ISBN 978-80-7305-928-6



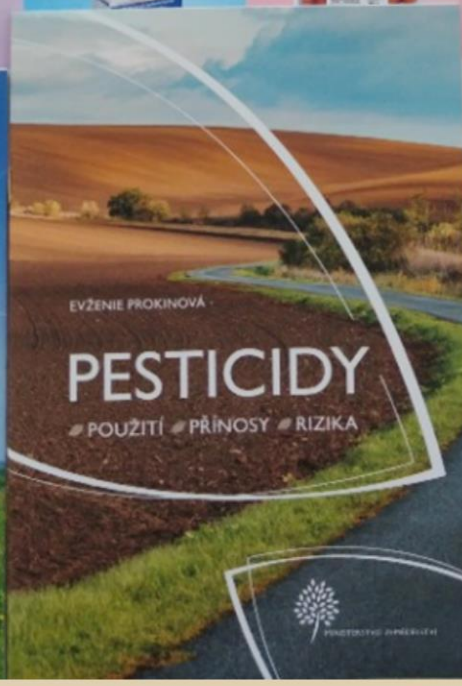
Za věcnou a jazykovou správnost příspěvků odpovídají jejich autoři.



OZNAČOVÁNÍ POTRAVIN
Infografiky



MODELNÍ TECHNOLOGIE V KOSMICKÉM VÝVOJĚ A ZEMĚDĚLSTVÍ



OBSAH

SEKCE 1: HYGIENA A TECHNOLOGIE POTRAVIN

Hodnocení rozpouštědel vhodných pro analýzu hmyzu Ramanovou spektroskopií Čaloudová, J., Pospiech, M.	5
Evaluation of the effect of the addition of acorn flour on the chemical properties of a chocolate matrix suitable for 3D printing Těšíková, K., Dordevic, D., Zemancová, J., Tremlová, B.	8
Comparative study of gravimetric and volumetric methods for observing the microbiological quality of air Khalid Nayab, A., Valík, L., Piecková, E.	11
The use of Raman spectroscopy to differentiate fruit tree honeys from rapeseed honeys Pleva, B., Pečová, M., Čaloudová, J., Pospiech, M.	14
Direct ELLA: qualitative method for insects determination Pečová, M., Bartlová, M., Pospiech, M.	18

SEKCE 2: CHOV ZVÍŘAT, VÝŽIVA ZVÍŘAT A BIOCHEMIE

Do této sekce nebyly přihlášeny žádné příspěvky

SEKCE 3: OCHRANA ZVÍŘAT, WELFARE A ETOLOGIE

Hodnocení stresu u psů v prostředí veterinární kliniky pomocí etologického pozorování – pilotní studie Pokorná, V., Voslářová, E., Bedáňová, I.	25
The occurrence of kidney damage in livestock from the perspective of animal health and welfare Válková, L., Voslářová, E., Becskei, Z., Večerek, V.	28
Stopover selection during Sahara Desert crossing in Western Marsh Harriers originating from Western and Northern Europe using the Normalised Difference Vegetation Index Krejčí, Š., Guirado, E., Škrábal, J., Literák, I.	31
Využitie infračervenej termografie pri hodnotení akútneho stresu u mláďat kozy bielej krátkosrstej Kotianová, L., Lakomá, T., Voslářová, E., Večerek, V.	34

Vliv délky praxe canisterapeutických psů na zvládnání stresu – pilotní studie	
Vacuška, D., Vacušková, Z., Voslářová, E., Večerek, V.	37
Využití enrichmentu v útulcích pro psy	
Vacušková, Z., Vacuška, D., Voslářová, E., Večerek, V.	40
Analysis of the main violations detected by the state veterinary administration in the area of cattle welfare	
Švestková, M.	43
SEKCE 4: VEŘEJNÉ A SOUDNÍ VETERINÁŘSTVÍ A TOXIKOLOGIE	
Detection of Hypoglycin A in Different plants of Acer Genus	
Novotná, T., Jahn, P., Šamonilová, E., Kabešová, M., Pospíšilová, S., Maršálek, P.	51
SEKCE 5: VETERINÁRNÍ EKOLOGIE A CHOROBY VOLNĚ ŽIJÍCÍCH ZVÍŘAT	
Komparativní genomika izolátů <i>Escherichia coli</i> ST131 humánního, veterinárního a environmentálního původu z České republiky	
Růžičková, M., Jamborová, I., Nohejl, T., Sukkar, I., Palkovičová, J., Papoušek, I., Cummins, M., Djordjevic, S., Dolejská, M.	55
Prevalence of endoparasitosis of invasive species (<i>Procyon lotor</i> and <i>Nyctereutes procyonoides</i>) in a Belgian wildlife rescue center and it's impact on native species	
Adam, Š., Piaček, V., Pikula, J.	59
Hemogregarina rodu <i>Hemolivia</i> infikující korytnačky <i>Rhinoclemmys pulcherrima manni</i>	
Živčicová, Ž., Kvíčerová, J., Šíroky, P.	62
Vliv ošetření vody CaviPlasmou na životnost kožovce rybího (<i>Ichthyophthirius multifiliis</i>)	
Toulová, I., Papežíková, I., Mikulíková, I., Palíková, M.	65
Comparison of selected hematological and blood chemistry parameters in four species of bats at the end of hibernation	
Kubickova, A., Linhart, P., Nemcova, M., Pikula, J., Sedlackova, J., Seidlova, V., Zukal, J., Bandouchova, H.	68
Monitoring <i>Encephalitozoon spp.</i> u zvířat ze zoologických zahrad v České republice. Jsou volně žijící hlodavci rezervoárem <i>Encephalitozoon spp.</i>?	
Tománková, N., Bártová, E., Žákovská, A., Budíková, M.	71
Vliv přídatku autochtonních probiotik (<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>) v krmivu na zdravotní stav pstruha duhového (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	
Lepková, Z., Palíková, M., Mikulíková, I., Papežíková, I., Bandouchová, H., Blahová, J.	74

Diverzita parazitů kmeňů Apikomplexa zelených skokanů	
Bondarenko, P., Živčicová, Ž., Mikulíček, P., Šíroky, P.	77
Vliv klimatologických faktorů na výskyt <i>Borrelia burdorferi sensu lato</i>, <i>Coxiella burnetii</i> a <i>Francisella tularensis</i> u volně žijících hlodavců	
Kozlíková, E., Bártová, E., Žáková, A.	79

SEKCE 1

Hygiena a technologie potravin

Hodnocení rozpouštědel vhodných pro analýzu hmyzu Ramanovou spektroskopií

Evaluation of solvents suitable for insect analysis by Raman spectroscopy

Jana Čaloudová, Matej Pospiech

Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

Summary

The main aim of the work was to demonstrate whether Raman spectroscopy can be used to detect different species of edible insects dissolved in selected solvents. Dried adults of the domestic cricket (*Acheta domesticus* L.), dried larvae of the superworm (*Zophobas morio* L.) and the mealworm (*Tenebrio molitor* L.) were chosen for analysis. The digested insects were extracted using 3 solvents – distilled water, N-hexane and ethanol in a 1: 4 ratio. Subsequently, the samples were analyzed by Raman spectroscopy. The selected solvents were shown to be suitable for the detection of edible insects by Raman spectroscopy. The solvents used reached statistically significantly lower intensity than the samples analyzed ($p < 0.05$). Based on the recording of the Raman spectra of the detected insect species, it was shown that distilled water was the most suitable solvent for insect extraction because the highest signal attenuation occurred, with the best peak resolution, even for the related insect species.

Keywords: edible insects; extraction; ethanol; N-hexane; distilled water; *Tenebrio molitor*; *Zophobas morio*; *Acheta domesticus*

Úvod

Vzhledem k nárůstu světové populace si jako společnost klademe otázku, jak zajistit dostatek kvalitní, bezpečné a nutričně vyvážené stravy pro lidi i krmení zvířat. Jednou z možných alternativ, která může zajistit alespoň částečné nahrazení stávajících živočišných proteinů, je chov a konzumace jedlého hmyzu. Hmyz je nazýván potravinou budoucnosti. Jedním z důvodů je jeho příznivé nutriční složení, zejména vysoký obsah bílkovin a kvalitního tuku, s příhodným zastoupením nenasycených a polynenasycených mastných kyselin, minerálních látek, vitaminů a bioaktivních peptidů. V porovnání s tradiční živočišnou produkcí může chov a konzumace jedlého hmyzu poskytovat také ekonomické a environmentální výhody (Tang et al., 2019). V posledních letech přibývá i v naší tržní síti potravin s deklarovaným obsahem hmyzí složky. V současné době nejsou legislativně dány detekční metody, které by sloužily ke spolehlivému stanovení přítomnosti jedlého hmyzu v potravině. Z tohoto důvodu je vhodné hledat metody, které budou vhodné k průkazu falšování potravin s obsahem hmyzu. Ramanova spektroskopie je velmi přesná, rychlá a neinvazivní metoda, která je v potravinářství využívána ke kontrole kvality, identifikaci složení či detekci falšování potravin. Využívá se jak pro základní výzkum, tak jako nástroj při objasňování strukturních nebo konformačních změn, ke kterým dochází během zpracování potravin (Li-Chan, 1996; Jin et al., 2015). Pro detekci hmyzu v potravinářství zatím nebyly publikovány studie, které by popisovaly nejvhodnější metody extrakce hmyzu k následným analýzám.

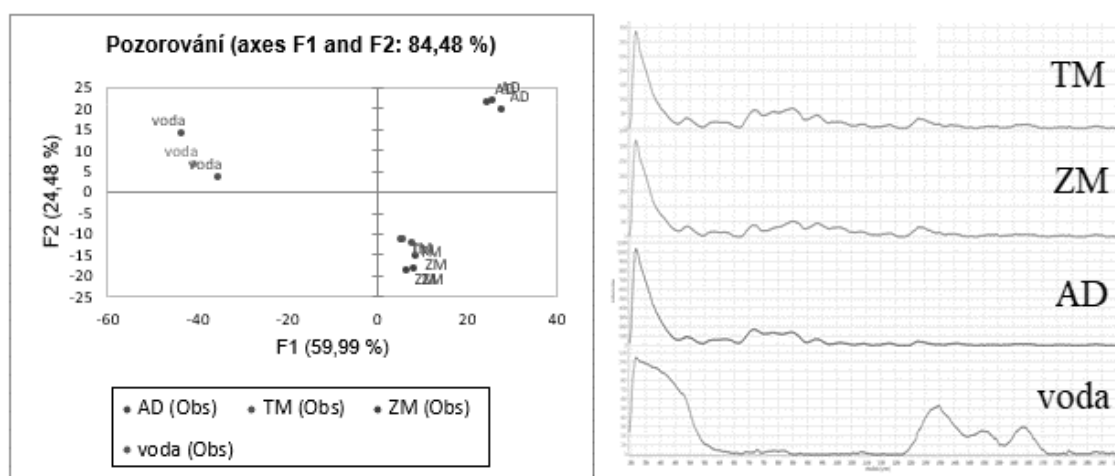
Materiál a metodika

Z tržní sítě byl zakoupen sušený hmyz – larvy potměníka brazilského (*Zophobas morio* L., ZM), larvy potměníka moučného (*Tenebrio molitor* L., TM) a dospělci cvrčka domácího (*Acheta domesticus*, AD). Sušený hmyz byl rozmixován ručním mixérem (Bosch, Německo) a následně extrahován s využitím 3 rozpouštědel – destilované vody, N-hexanu a ethanolu v poměru 1 : 4 (5 g rozmixovaného hmyzu : 25 ml rozpouštědla). Extrakce byla provedena v 15 ml centrifugačních zkumavkách vložených do ultrazvukové vodní lázně (Bandelin,

Německo) po dobu 15 min. Následně byl vzorek odstředěn v odstředivce Centric 322A (Domel, Slovinsko) při 3000 otáčkách po dobu 10 min. Poté byl z odstředěného vzorku odebrán supernatant, který byl přefiltrován přes injekční mikrofiltr CA 0,45 μm (Braun, Německo) do vialek. Takto připravený vzorek byl následně analyzován Ramanovým spektroskopem HR-TEC-X2-785 (StellarNet, Spojené státy americké) v rozsahu 100–1000 vlnočísle cm^{-1} . Použit byl laser (Ondax, Německo) o vlnové délce 785 nm s výkonem 91 mW. Každý z jednotlivých vzorků byl změřen 5krát. Data byla následně statisticky vyhodnocena pomocí programu Microsoft Office Excel a softwaru XLSTAT (Lumivero, Spojené státy americké) s využitím analýzy hlavních komponent (PCA).

Výsledky a diskuse

V rámci pokusu byly využity 2 druhy polárních rozpouštědel – destilovaná voda a ethanol a 1 nepolární rozpouštědlo – N-hexan. Ramanova spektroskopie poskytuje výsledky ve formě spektrální křivky v rozsahu měřicího analyzátoru. V rámci metody je sledován posun odezvy Ramanova spektroskopu od referenční hodnoty, ke kterému dochází vlivem vzájemných interakcí analyzovaných látek. Pro každé vlnočíslo je získána intenzita posunu, která je specifická pro určitou vlastnost analyzovaných látek, resp. jejich chemickou strukturu. Bylo potvrzeno, že díky Ramanově spektroskopii lze oddělit píky rozpouštědla od vlnočísle specifických pro detekovaný druh hmyzu. Použitá rozpouštědla dosahovala statisticky významně nižší intenzity než analyzované vzorky ($p < 0,05$). Na základě záznamu Ramanova spektra detekovaných druhů hmyzu bylo prokázáno, že nejvhodnějším rozpouštědlem pro extrakci hmyzu byla destilovaná voda, protože došlo k nejvyššímu útlumu signálu, za současné nejlepší rozlišitelnosti píků, a to i pro příbuzné druhy ZM a TM. Nejvýznamnější píky jsou vyobrazeny na záznamu Ramanova spektra na Obrázku č. 1. Nejvýrazněji se lišil vzorek AD, jehož intenzita dosahovala ve vlnočísle 317 až 10749,76. Na grafu PCA analýzy lze zřetelně pozorovat rozdělení vzorků do skupin na základě nově vzniklých korelačních faktorů. Bylo potvrzeno, že při využití destilované vody, jakožto rozpouštědla, došlo k jednoznačnému oddělení všech analyzovaných vzorků hmyzu od rozpouštědla (viz Obrázek č. 1). Vzorky larev potemníka moučného (TM) a brazilského (ZM) vykazovaly píky vlnočísle v podobné intenzitě, zejména v oblasti 317 cm^{-1} , což mohlo být způsobeno podobným chemickým složením v rámci jedné čeledi (Tenebrionidae). PCA analýza však odlišila jejich rozdíly.



Obrázek č. 1: PCA analýza hmyzu rozpuštěného v destilované vodě (vlevo) a záznam Ramanova spektra hmyzu rozpuštěného ve vodě (vpravo) (AD – dospělci cvrčka domácího (*Acheta domesticus* L.), TM – larvy potemníka moučného (*Tenebrio molitor* L.), ZM – larvy potemníka brazilského (*Zophobas morio* L.))

Organická rozpouštědla bývají často využívána při spektroskopických analýzách celé řady potravin živočišného původu. V případě našich vzorků rozpuštěných v ethanolu a N-hexanu došlo, v porovnání s destilovanou vodou, k méně výraznému odlišení spekter. PCA analýza prokázala rozdílné hodnoty rozpouštědel N-hexanu a ethylenu v rámci opakovaného měření, které byly pravděpodobně způsobeny odlišným nastavením přístroje při pozdějším měření. Pro získání přesnějších výsledků je proto nezbytné provést měření všech vzorků včetně referenčních rozpouštědel neprodleně po přípravě vzorků, což by mělo zamezit vzniku případných změn ovlivňujících výsledky měření. Volba vhodného rozpouštědla je závislá nejen na zvolené metodě detekce, ale i požadovaných výsledcích a charakteru vzorku. Studie Son et al. (2021) potvrzuje vhodnost využití rozpouštědla N-hexan v rámci detekce chitinu a chitosanu v larvách potměníka moučného pomocí dalších spektroskopických metod. V případě detekce živočišného tuku N-hexan doporučují také Boyacı et al. (2014), kteří využili toto rozpouštědlo v rámci přípravy vzorků analyzovaných za účelem rozlišení vzorků hovězího a koňského masa pomocí Ramanovy spektroskopie.

Závěr

Bylo prokázáno, že metodou Ramanovy spektroskopie lze na základě získaných spekter rozlišit detekované druhy hmyzu rozpuštěné v různých rozpouštědlech. Nejvhodnějším rozpouštědlem pro tuto metodu byla destilovaná voda, u které bylo pozorováno nejzřetelnější rozdělení píků signálu. Zvolená metodika by mohla být v budoucnu užitečná při odhalování falšování potravinářských výrobků s deklarovaným obsahem hmyzu. Pro zdokonalení metody by bylo vhodné zvýšit počet vzorků s různými druhy hmyzu za současného použití dalších rozpouštědel, a také ověření vlivu potravinové matrice na jejich průkaz.

Literatura

BOYACI, İ. H.; TEMİZ, H. T.; UYSAL, R. S.; VELIOĞLU, H. M.; YADEGARI, R. J.; RISHKAN, M. M. A novel method for discrimination of beef and horsemeat using Raman spectroscopy. *Food Chemistry*. 2014, vol. 148, s. 37–41.

JIN, H.; LU, Q.; CHEN, X.; DING, H.; GAO, H.; JIN, S. The use of Raman spectroscopy in food processes: A review. *Applied Spectroscopy Reviews*. 2015. vol. 51, no. 1, s.12–22.

Li-Chan, E. C. Y. 1996. The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, vol. 7, no. 11, s. 361–370.

TANG, C.; YANG, D.; LIAO, H.; SUN, H.; LIU, C.; WEI, L.; LI, F. Edible insects as a food source: a review. *Food Production, Processing and Nutrition*. 2019, vol. 1, no. 1, article nr. 8.

SON, Y-J.; HWANG, I-K.; NHO, C. W.; KIM, S. M.; KIM, S. H. Determination of Carbohydrate Composition in Mealworm (*Tenebrio molitor* L.) Larvae and Characterization of Mealworm Chitin and Chitosan. *Foods*. 2021, vol. 10, no. 3, article nr. 640.

Kontaktní adresa: Jana Čaloudová, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21289@vfu.cz

Evaluation of the effect of the addition of acorn flour on the chemical properties of a chocolate matrix suitable for 3D printing

¹Karolína Těšíková, ¹Dani Dordevic, ¹Johana Zemancová, ¹Bohuslava Tremlová

¹Department of Plant Origin Food Sciences,
Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno

Summary

The aim of this study was to evaluate the polyphenolic and flavonoid content and antioxidant activity of chocolate matrix with the addition of acorn flour suitable by 3D printing. The results of the content of total polyphenols (TPC) and flavonoids (TFC) show an insignificant increase of polyphenolic and flavonoid substances after the addition of acorn flour. Acorn flour alone showed the highest values of TPC and TFC. The antioxidant capacity of the samples was determined by the DPPH method. It was found that in most samples, after the addition of acorn flour, there was a slight increase in antioxidant capacities. The highest antioxidant capacity was determined for the sample containing 2% acorn flour. In the food sector, its popularity is growing, especially in the confectionery industry. The results of this work can contribute to the knowledge of the development of chocolate matrices for food 3D printing and the possibilities of using acorn flour.

Keywords: 3D food printing; acorn flour; antioxidant properties; confectionary

Introduction

Three-dimensional (3D) food printing is new technology allowed to freely design the shape, texture and personified nutritional composition of the objects (You et al., 2023). Nowadays there are many food materials, which were use to 3D printing. One of the studied printing materials is chocolate. 3D printing is particularly important in the confectionary industry due to the possibility of creating shapes that would be difficult to model. Chocolate is considered an ideal material for printing because of ability to be extruded and subsequently solidified. Physical and chemicals properties could be affected by the presence of other additives or materials (Kim et al., 2022).

Acorn flour presents an interesting nutritional and functional profile. It is rich in unsaturated fatty acids, minerals, fiber, vitamin A and E, chlorophylls, carotenoids, polyphenols (Martins et al., 2022) and it exhibits a high level of antioxidant activity. The large amounts of bioactive compounds also make the acorn flour a promising ingredient for fortification of products that are designed for people suffering from diet-related diseases (Gkountenoudi-Eskitzi et al., 2023). Due to these properties, acorn flour is a suitable material for improving the nutritional properties of food (Pasqualone et al., 2019).

Materials and methods

First, the appropriate amount of chocolate filling (Mycusini chocolate filling – dark; Print2Taste, Germany) was tempered. After tempering to 45 °C, an amount of acorn flour (purchased in the market network, Poland) corresponding to concentrations of 0.5; 1.0; 2.0 and 3.0% were mixed into the matrix. The chocolate matrix together with the flour was further tempered to 45 °C for 20 min. After that, the chocolate mixture was left at room temperature for 2 h and then stored at 7 °C.

For 3D printing, a mycusiny® 3D printer (Print2Taste, Germany), a 0.80 mm stainless steel nozzle (Print2Taste, Germany) and a Cylinder template (0.81×26.6×10 mm) from the list of templates from this manufacturer were used. Before 3D printing, the matrices were tempered for 30 min. at laboratory temperature. 3D printing took place at the temperature and speed set by the manufacturer. After printing, the matrices were stored at 7 °C.

0.1 g of the prepared chocolate matrix was weighed into a dark bottle and then 20 ml of a mixture of ethanol (99.8%):distilled water (1:1) was added. The samples were extracted for 30 minutes in an ultrasonic bath and filtered. The samples were stored at room temperature in the dark. The total content of polyphenols (TPC) was measured using the Folin-Ciocalteu method. 1 ml of extract, 5 ml of Folin Ciocalteu solution (diluted 1:10) and 4 ml of 7.5% Na₂CO₃ were added to a 25 ml volumetric flask. The samples were incubated in the dark for 30 minutes. Absorbance was measured at 765 nm against a blank (1 mL of sample was replaced with 1 mL of distilled water). The results were expressed as mg of gallic acid per gram of sample. For determination of the total content of flavonoid (TFC) were successively pipetted 0.5 ml of sample, 1.5 ml of distilled water and 0.2 ml of 5% NaNO₂ solution into the test tube and the mixture was incubated for 5 minutes. Next, 0.2 ml of 10% AlCl₃ solution was added and the mixture was incubated for 5 minutes. Then, 1.5 ml of 1M NaOH solution and 1 ml of distilled water were added and the mixture was incubated for 15 minutes. The absorbance at 510 nm was then measured against a blank. Results were calculated based on the calibration series from the epicatechin standard. The results were expressed as mg of epicatechin per gram of sample. For the determination of antioxidant activity by the DPPH method 1 mL of 0.1 mM DPPH solution was mixed with 3 mL of extract in a test tube. After 30 minutes of incubation in the dark, the absorbance was measured on a spectrophotometer at 517 nm.

$$\text{DPPH (\%)} = [(\text{AbsDPPH} - \text{AbsDPPH}) / \text{AbsDPPH}] \times 100$$

Results and Discussion

Table 1 shows the results of TPC, TFC and DPPH assay. Within the results of TPC can be observed increase in samples containing 1.0% and 3,0% acorn flour versus control sample ($p < 0.05$). The sample of acorn flour showed the highest value (56.499 ± 0.038) ($p < 0.05$). Chocolate matrix contains skimmed milk powder and whey powder. Materials containing milk products are considered a very complex matrix where strong catechin – protein interactions are well-known to occur (Komes et al., 2013). Result of TFC showed increasing value only for the sample containing 1.0% acorn flour. In compare with the results of TPC, TFC values were lower especially in sample of acorn flour.

Addition of acorn flour caused increasing antioxidant capacity (DPPH) of the samples (Table 1). However, the antioxidant capacity values of the control sample and sample of acorn flour were approximately the same. These results could indicate a synergistic effect of antioxidant substances in chocolate matrix and acorn flour ($p < 0.05$). The acorn flour is rich in tocopherols, carotenoids and vitamin A (Martins et al., 2022). According to Miadonye et al. (2023) the alfa-tocopherol and beta carotene cause a synergistic effect. The highest value of antioxidant capacity was measured for the sample with 2.0% of acorn flour ($p < 0.05$).

Table 1: Results of TPC; TFC and DPPH assay

Sample	TPC (mg gallic acid/g)	TFC (mg epicatechin /g)	DPPH (%)
Choco control	7.281 ± 0.045^a	2.719 ± 0.062^a	62.596 ± 0.133^a
Choco _{0.5} AF	6.708 ± 0.169^b	2.485 ± 0.210^b	$65.826 \pm 1.075^{b,c}$
Choco _{1.0} AF	7.952 ± 0.213^c	2.985 ± 0.208^c	65.025 ± 0.513^c
Choco _{2.0} AF	6.325 ± 0.165^d	2.076 ± 0.069^d	69.985 ± 0.285^d
Choco _{3.0} AF	8.075 ± 0.121^c	$2.560 \pm 0.019^{a,b}$	$66.856 \pm 0.500^{e,b}$
Acorn flour	56.499 ± 0.038^e	6.753 ± 0.051^e	62.596 ± 0.476^f

Conclusion

3D printing food enables production of objects with a define shapes and nutritional composition. A very suitable food matrix for 3D printing is chocolate, which is rich in a number of antioxidant substances. Its antioxidant and textural properties can be supported by the addition of acorn flour. The results of the content of total polyphenols (TPC) and flavonoids (TFC) show an insignificant increase of polyphenolic and flavonoid substances after the addition of acorn flour. Acorn flour alone showed the highest values of TPC and TFC. The antioxidant capacity of the samples was determined by the DPPH method. It was found that in most samples, after the addition of acorn flour, there was a slight increase in antioxidant capacities. The highest antioxidant capacity was determined for the sample containing 2% acorn flour. The results of this study can enrich the current development of chocolate matrices intended for 3D printing, and at the same time they can offer the possibility of using acorn flour as an alternative food product.

References

- GKOUNTENOUDI-ESKITZI, I., KOTSIYOU, K., IRAKLI, M. N., LAZARIDIS, A., BILIADERIS, C. G., LAZARIDOU, A. (2023). In vitro and in vivo glycemc responses and antioxidant potency of acorn and chickpea fortified gluten-free breads. *Food Research International*. 2023, vol. 166, 112579.
- KIM, S. M., WOO, J. H., KIM, H. W., PARK, H. J. Formulation and evaluation of cold-extruded chocolate ganache for three-dimensional food printing. *Journal of Food Engineering*. 2022, vol. 314, p.1-12.
- KOMES, D., BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A., ŠKRABAL, S., VOJVODIĆ, A., BUŠIĆ, A. The influence of dried fruits enrichment on sensory properties of bitter and milk chocolates and bioactive content of their extracts affected by different solvents. *LWT-Food science and Technology*. 2013, vol. 53, p. 360-369.
- MARTINS, R. B., GOUVINHAS, I., NUNES, M. C., FERREIRA, L. M., PERES, J. A., RAYMUNDO, A., BARROS, A. I. Acorn flour from holm oak (*Quercus rotundifolia*): Assessment of nutritional, phenolic, and technological profile. *Current Research in Food Science*. 2022, vol. 5, p. 2211-2218.
- MIADONYE, A., AMADU, M., PO'KEEFE, T. Spectroscopic Determination of the Synergistic Effect of Natural Antioxidants in Bio-Transformer Oils. *Results in Chemistry*. 2023, vol. 5, 100852.
- PASQUALONE, A., MAKHLOUF, F. Z., BARKAT, M., DIFONZO, G., SUMMO, C., SQUEO, G., CAPONIO, F. Effect of acorn flour on the physico-chemical and sensory properties of biscuits. *Heliyon*. 2019, vol. 5, e02242.
- YOU, S., HUANG, Q., LU, X. Development of fat-reduced 3D printed chocolate by substituting cocoa butter with water-in-oil emulsions. *Food Hydrocolloids*. 2023, vol. 135, 108114.

Contact adress: Karolína Těšíková, Ing., Department of Plant Origin Food Sciences, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, H22395@vfu.cz

Comparative study of gravimetric and volumetric methods for observing the microbiological quality of air

¹Ahmad Khalid Nayab, ¹Ľubomír Valík, ²Elena Piecková

¹ Faculty of Chemical and Food Technology, the Slovak University of Technology in Bratislava

² Faculty of Medicine, the Slovak Medical University in Bratislava

Summary

The volumetric method is standard practice for observing the microbiological quality of air, but the high costs of aeroscopes is an obstacle for small and medium-sized food enterprises for its universal application. Therefore, this paper aims to compare the microbiological quality control of air using volumetric and gravimetric methods for the purpose of the application of the latter as a less costly, but still reliable method. The gravimetric and volumetric methods were used to assess the microbiological quality of indoor air in the dairy industry. The gravimetric method was accomplished as per the index of microbiological air contamination (IMA), and the volumetric method, using an aeroscope. The numbers of microorganisms were enumerated in $\log \text{cfu.m}^{-2}$ per log time (s) for the gravimetric method and in $\log \text{cfu.m}^{-3}$ air for the volumetric method. Obtained data were compared using the statistical *t*-test and correlation test. Both gravimetric and volumetric methods produced quite similar results with a *p*-value of >0.05 and Pearson's correlation coefficient of >0.996 for all studied sampling sites, which shows a strong positive association between the two data sets. The obtained data suggest that the gravimetric method can give similar results to the volumetric method and it can be used to monitor the microbiological quality of industrial air as a good alternative. However, a comprehensive standardization of the gravimetric method is recommended prior to its application.

Keywords: Gravimetric method; aeroscope; food industry; airborne microorganisms

Introduction

Air, personnel, and surfaces represent significant sources of microbial contamination in food enterprises [1]. The microbiological quality of air influences human health directly through breathing or indirectly through contaminating food materials. Therefore constant objective monitoring of the environment [2], hygienic design of the food processing line [3], clean room clothing system [4], and proper air treatment and ventilation [1] must be accomplished to minimise airborne contamination in the food industry. The volumetric method is standard practice for observing the microbiological quality of air, however, the costs related to providing aeroscopes are a challenge for small and medium-sized food enterprises, which may result in compromises in proper microbiological quality control of the surrounding air of the food production and distribution areas, therefore more economically feasible methods are needed to be tested to address this challenge.

Each of the volumetric and gravimetric methods has advantages and drawbacks over the other one. The volumetric method's most significant advantage is its acceptability by official guidelines as a standard practice for measuring the microbiological quality of air. Furthermore, it collects samples quite rapidly and is less susceptible to air movement. The gravimetric method, on the other hand, has a major cost benefit over pricey aeroscopes. This method also has the advantages of the possibility of multisampling, not requiring regular calibrations, producing no noise while sampling, and being more easily available and affordable to small and medium-sized food enterprises. The most notable drawback of using the gravimetric method is the random sedimentation velocities of particles of varying masses, as well as the particles' susceptibility to airflow and air dynamics [5, 6].

The main objectives of this research were to compare the gravimetric method with the volumetric method in terms of the monitoring of the microbiological quality of industrial air and evaluate the possibility of application of the gravimetric as an alternative and reliable method to the volumetric method for objective assessment of the microbiological air quality in the situations where aeroscopes are unavailable or prohibitively expensive.

Material and methods

Sampling

Two different methods of air sampling, active and passive, were applied for monitoring industrial air quality in various sampling sites in a dairy company. The aeroscope model A-AIR-010 HVP (Agea, Prague, Czech Republic) was employed for 9 minutes (the longest possible operation time at one run) in the volumetric method or agar plates were exposed to air for a duration of a time interval of 5 to 30 minutes in the gravimetric method according to the index of microbial air contamination (IMA) standard [5], respectively. Subsequently, Petri dishes containing nutrient agar (NA) were incubated for 48 h at 30 °C to observe total plate count (TPC) microbial numbers.

Comparison of the results

Since the results of the gravimetric method are reported in log colony-forming units per unit of agar plate surface opposite log time (expressed in seconds) and the results of the volumetric method are presented in log colony-forming units per unit of air volume, we were not able to directly compare these two data sets. Therefore, first we evaluated linear correlation between log colony-forming units per unit of agar plate surface and log time and then we calculated the slopes of these linear correlation for all investigated sampling site. Later, we computed the ratios between the slopes of the lines (gravimetric method) and log colony-forming units per cubic meter of air (volumetric method) for various sampling sites and compared them using the t-test and Pearson's correlation test.

Results and discussion

After elapse of the incubation time, the numbers of the colony-forming unit (CFU) were counted and presented in $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-2}$ of agar plate surface in gravimetric method and in $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ of air volume in volumetric method. Linear correlation between log $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-2}$ agar plate surface from log time (s) was constructed for all studied sampling sites and slopes of these lines were recorded for further analysis. Likewise log $\text{CFU}\cdot\text{m}^{-3}$ air volume was calculated for the same sampling sites and recorded for further analysis. Ratios between the data sets showed a p-value of >0.210 which is more than the significance level of $\alpha = 0.05$ and a Pearson's correlation coefficient of >0.996 for all studied sampling sites which shows a strong positive association among the two data sets (Table 1).

Conclusions

Aeroscopes are costly and do not allow multisampling; therefore, more economically feasible, yet technically reliable approaches are necessary for small and medium-sized food enterprises. The results of this study indicate that the gravimetric method produces results that are very comparable to the volumetric method, with a Pearson's correlation coefficient of >0.996 and a p-value of >0.210 when utilising the t-test and the correlation test, which shows strong positive association among the data sets. According to our findings, the gravimetric method can be used as an alternative to the precise volumetric method because it produces reliable results; however, more research in different experimental settings, and thus standardisation of this method, as well as further development of the IMA standard, are needed before the gravimetric method can be used universally.

Table 1. Proportional comparison of results obtained by gravimetric and volumetric methods

Sampling sites	Methods		Correlation coefficient	p-value
	Gravimetric	Volumetric		
Cottage cheese production area				
A: COT / FER	0.690	0.730	0.996	0.235
B: COT / YOG	0.931	0.926		
C: A / B	0.741	0.788		
Fermentation hall				
A: FER / COT	1.449	1.369	0.996	0.210
B: FER / YOG	1.348	1.268		
C: A / B	1.075	1.080		
Yoghurt filling area				
A: YOG / COT	1.075	1.080	0.999	0.828
B: YOG / FER	0.742	0.788		
C: A / B	1.449	1.371		

COT – Cottage cheese production area, FER – Fermentation hall, YOG – Yoghurt filling area

Acknowledgements

This research was funded by the Slovak Research and Development Agency and the Scientific Grant Agency of the Ministry of Education, Science, Research and Sports of the Slovak Republic and the Slovak Academy of Sciences, grant numbers APVV-190031 and VEGA 1/0515/21.

Literature

- MASOTTI, F.; VALLONE, L.; RANZINI, S.; SILVETTI, T.; MORANDI, S.; BRASCA, M. Effectiveness of air disinfection by ozonation or hydrogen peroxide aerosolization in dairy environments. *Food Control*, 97, 2019, pp.32-38. DOI: 10.1016/j.foodcont.2018.10.022.
- PIECKOVÁ, E.; VALÍK, Ľ.; GÖRNER, F. Mikroskopické vláknité huby v jogurtoch (Microscopic filamentous fungi in yogurts). *Bulletin potravinárskeho výskumu (Bulletin of Food Research)*, 41, 2002, pp.291-301. ISSN: 0231-9950. In Slovak.
- FAILLE, C.; CUNAUULT, C.; DUBOIS, T.; BÉNÉZECH, T. Hygienic design of food processing lines to mitigate the risk of bacterial food contamination with respect to environmental concerns. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 46, 2018, pp.65-73. DOI: 10.1016/j.ifset.2017.10.002.
- ROMANO, F.; GUSTÉN, J.; JOPPOLO, C.; LJUNGQVIST, B.; REINMÜLLER, B. Some aspects on the sampling efficiency of microbial impaction air samplers. *Particology*, 20, 2015, pp.110-113. DOI: 10.1016/j.partic.2014.11.008.
- PASQUARELLA, C.; PITZURRA, O.; SAVINO, A. The index of microbial air contamination. *Journal of Hospital Infection*, 46, 2000, pp.241–256. DOI: 10.1053/jhin.2000.0820.
- MIETTINEN, H. Chapter 45 - Air Sampling. In: H. Lelieveld, J. Holah and D. Gabrić, ed., *Handbook of Hygiene Control in the Food Industry*, 2nd ed. Elsevier Ltd., 2016, pp.697-709. DOI: 10.1016/B978-0-08-100155-4.00045-5.

Contact address: Department of Nutrition and Food Quality Assessment, Institute of Food Sciences and Nutrition, Faculty of Chemical and Food Technology, the Slovak University of Technology in Bratislava, Radlinského 9, 812 37 Bratislava, Slovakia, lubomir.valik@stuba.sk

The use of Raman spectroscopy to differentiate fruit tree honeys from rapeseed honeys

¹Boris Pleva, ¹Martina Pečová, ¹Jana Čaloudová, ¹Matej Pospiech

¹Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, Veterinary University Brno

Summary

In this work were evaluated samples of monofloral, rape and fruit tree honey. 172 monofloral honeys were evaluated and each of these samples was 32 times measured. Raman spectroscopy with subsequent statistical evaluation was used for measurement and subsequent evaluation. Raman spectroscopy was chosen as an alternative method of physicochemical analysis and melissoapalynological analysis.

Keywords: monofloral honey; fruit tree honey; rape honey; Raman spectroscopy, wavenumbers

Introduction

Honey contains pollen grains and other microscopic particles handled by the bees from the targetted plants. Honey composition reflected the vegetation types that form the honey matrix and is useful to the determination of its botanical and geographical origin. The number of pollen grains in honey is influenced by plant morphology and physiology, the action of foraging bees, contamination in the hive and during the uncapping and processing. Honey analysis is a responsible method for authenticating honey origins and characteristic, it also helps to determine and control the botanical origin of honey (Corvucci, 2015). Honey adulteration issues represent an important concern at distinct societal levels as producers, consumers, state authorities, because honey represents one of the most adulterated food commodities in the world. Adulterations can be more or less subtle and as a consequence, these practices can be easy or very difficult to detect (Berghian-Grosan, 2023, Beganovic, 2019). One of the subtlest of adulteration is represented by the detection of honey mixture, when honey is incorrectly labelled as monofloral (Frausto-Reyes, 2017). In the last years the rapid development of handheld and portable devices based on Raman technologies makes them available for various applications and allows the development of applications for food and beverages investigations too. Moreover their association with chemometric methods conducted to the develop of reliable classifications models and thus highlighted their potential in this field. Regarding the honey matrix, Raman and infrared spectroscopies have been largely applied for its investigation (Berghian-Grosan, 2023). Thus, studies employing the Raman data for honey analysis, origin assessment and adulteration evaluation were reported in the literature over the years (Corvucci, 2015, Megdas, 2021).

Material and methodology

Honey from all over the Czech Republic was used for the analysis. Two groups of floral honeys were selected for analysis, 139 rape honeys and 33 fruit tree honeys. Each of the samples was measured 32 times. The refractometric dry matter was determined for all samples and individually standardized to the required value. Standardization was based on the amount of water in the sample, measured with a PAL digital refractometer (Antago, JPN). A refraction of $65^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$ brix was required for all samples. Sample preparation was carried out by stirring the determined amount of distilled water at a weight of 10 g. The honey samples were dissolved in an ultrasonic bath (Bandelin, GEN), then tempered to room temperature and remeasured to check the desired refraction. All samples were processed in duplicate to confirm the accuracy of the preparation and subsequent measurements. The standardized samples were measured with a Raman spectroscope HR-TEC-X2-785 (StellarNet, USA) in the range of 300-2000 wavenumber cm^{-1} . A laser Ondax, (DE) with a wavelength of 785 nm and a power of 91 mW

was used. Each for the individual samples was measured 8 times. The data were evaluated using a parametric paired Student's t-test.

Results and discussion

Differences in the Raman spectrum recording were confirmed among the evaluated monofloral honeys (Table 1). The table confirms the intensity difference for the wave numbers responsible for the specific vibrations. One of the most sophisticated honey adulterations is the mixture of rare honey with those that are available in higher quantities (Rahman, 2017). The spectral range contains the vibrational modes of different bonds of proteins, organic acids and carbohydrates. However, having the sugars as major constituents, the bands are mainly associated to those molecules vibrations. It is worth noting that most of the Raman peaks are assigned to the carbohydrates vibrations, although some of them can be associated with the glucose and fructose moieties (Molnar, 2020). The significant vibrational spectra are listed in Table 1. The specific peaks represent the content of individual carbohydrates. Glucose: 317, 416, 437, 703, 772, 817, 862, 1061 cm^{-1} , fructose 317, 416, 515, 620, 915, 977, 1061, 1456 cm^{-1} , maltose 584, 915, 1061, 1124, 1370 cm^{-1} , sucrose – 584, 1061, 1124, 1262, 1365 cm^{-1} and other carbohydrates in honey (Zimmermann, 2015, Dell'Anna, 2009). According to the ANOVA test, fruit trees honey are very well distinguishable from rapeseed flower honey at the 95% significance level. The Raman spectroscopy method is a suitable method to verify authenticity based on the specific carbohydrate content. PCA analysis confirms the ability to distinguish rapeseed honey from fruit tree honeys (Figure 1). PCA analysis is also used to improve the results of melissopalynological analysis. Since PCA is based on evaluation and comparison of variances, it is important to verify that variance values are comparable. Eventual data pretreatment should be considered. Also the other methods can involve a large number of parameters and data treatments are performed by various statistical methods as principal component analysis (PCA), such as analysis of variance, canonical analysis, with the purpose of selecting the factors for discriminating the studied varieties (Corvucci, 2015, Gallego, 2013). The data were processed by parametric test ANOVA with post hoc test Tukey (HSD) and PCA statistical test (XLstat, USA).

Table 1: Comparison of vibrational spectra of fruit trees and rapeseed honeys

Wavenumber (cm^{-1})	Vibration	Rapeseed	Fruit trees
1456	C-H ^b lipids and cellulose	2247,4*	2939,7*
1365	N-H ^b a C-N ^a amides III	2247,4*	709,2*
1262	N-H ^b a C-N ^a amides III	2844,9*	1570,6*
1124	C-O a C-C ^a	4265,7*	2203*
1061	C-O a C-C ^a	5066,1*	2835,4*
977	C-H & C-O-H ^b	816,6*	309,4*
915	C-H & C-O-H ^b	2243,7*	1434,5*
862	C-H ^b	3223*	2653,6*
817	C-H ^a	3325,8*	2755,1*
772	C-H ^b	1210,7*	1664,1*
703	C-O, C-C-O, O-C-O ^a	2657,3*	4238,4*
620	cyclical ^a	6266,6*	7732,1*
584	skeletal ^a	5138760*	7522,1*
515	N-H ^a proteins	8686,556*	10017,695*
416	C-H ^a lipids a cellulose	9224,748*	11767,087*
317	Vibration of carbohydrates and proteins	9156,105*	18590,07*

Legend: ^a change in bond length, ^b change in valence angle, * significant difference between rapeseed honey and fruit tree honey significance level $p < 0.05$

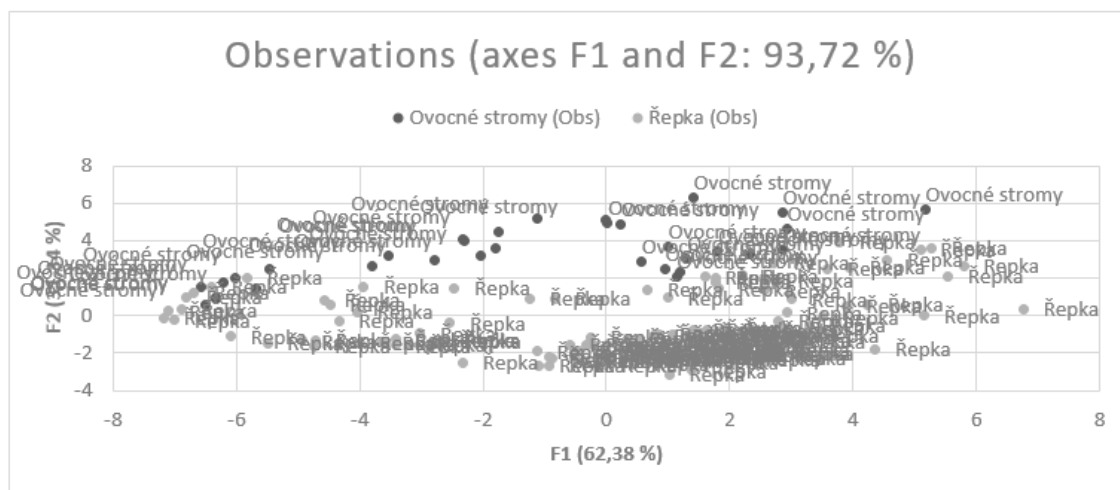


Figure 1: Comparison of PCA spektra of rapeseed and fruit tree honeys

Conclusion

In this work it is evident that the use of Raman spectroscopy method is an appropriate choice to distinguish the origin of rapeseed honey from fruit tree honeys. The result shows that this method works with up to 95% accuracy of the results for all of the spectra. The difference is due to the specific composition of the carbohydrates and other accompanying substances.

Acknowledgement

This work was supported by the applied research programme of the ministry of agriculture for the period 2017–2025, ZEMĚ, no. QK 1920344.

Reference

- BERGHIAN-GROSAN, C.; HATEGAN, R.A.; DAVID, M.; MEGDAS, A.D. Untargeted metabolomic analysis of honey mixtures: Discrimination opportunities based on ATR-FTIR data and machine learning algorithms. *Microchemical Journal*, 2023, 188, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2023.108458>
- BEGANOVIC, A.; HAWTHORNE, L.M.; BACH, K.; HUC, C.W. Critical review on the utilization of handheld and portable Raman spectrometry in meat science. *Foods*, 2019, 8, 49, DOI: <https://doi.org/10.3390/foods8020049>.
- FRAUSTO-REYES, C.; CASILAS-PENEULAS, R.; QUINTANAR-STEPHANO, R.L.; MACIAS-LOPEZ, E.; BUJDUD-PEREZ, J.M.; MEDINA-RAMIREZ, I. Spectroscopic study of honey from *Apis mellifera* from different regions in Mexico. *Spectrochim. Acta a Mol. Biolomol. Spectrosc.*, 2017, 178, 212-217, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2017.02.009>
- MAGDAS, D.A.; GUYON, F.; BERGHAIN-GROSAN, C.; MOLNAR, M. Challenges and a step forward in honey classification based on Raman spectroscopy. *Food control*, 2021, 123, 107769-107778, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107769>
- ZIMMERMANN, B.; Tkal_cec, Z., Me_sic, A., & Kohler, A., Characterizing aeroallergens by infrared spectroscopy of fungal spores and pollen. *PLoS One*, 2015, 10(4), 124-240, DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0124240>
- DELL'ANNA, R.; LAZZERI, P.; FRISANCO, M.; MONTI, F.; MALVEZZI C. F.; GOTTARDINI, E., et al., Pollen discrimination and classification by Fourier transform infrared (FT-IR) microspectroscopy

and machine learning. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2009, 394, 1443-1452, DOI: 10.1007/s00216-009-2794-9

RAHMAN, M.M.; ALAM, M.N.; FATIMA, N.; SHAHJALAL, H.M.; GAN, S.H.; IBRAHIM KHALIL, M.I.Md. Chemical composition and biological properties of aromatic compounds in honey. An overview, *J. food Biochem*, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1111/jfbc.12405>

CORVUCCI, F.; NOBILI, L.; MELUCCI, D.; GRILLENZONI, F.V. The discrimination of honey origin using melissopalynology and Raman spectroscopy techniques coupled with multivariate analysis. *Food Chemistry*, 2015, 169, 297-304, DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.07.122>

MOLNAR, M.C.; BERGHIAN-GROSAN, C.; MAGDAS, D.A. An optimized green preparation method for the successful application of Raman spectroscopy in honey studies. 2020, 208 DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120432>

GALLEGO, P.A.; FERNANDEZ, H.P. Food protected designation of origin. *Comprehensive analytical chemistry*, 2013, 60, ISBN: 978-0-444-59562-1

Contact address: Boris Pleva, Mgr., Department of hygiene and technology of food of plant origin, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20342@vfu.cz

Direct ELLA: qualitative method for insects determination

¹ Pečová Martina, ¹ Bartlová Marie, ¹ Pospiech Matej

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

Summary

The polysaccharide chitin and its subunits are found in large quantities in insects and participate in the construction of the entire exoskeleton. One of the ways to verify the presence of insects in food and thereby ensure their safety is to detect this polysaccharide, more precisely N-acetyl-D-glucosamine. Only lectin has the ability to bind specific polysaccharides, therefore this work was focused on optimizing the ELLA (enzyme-linked-lectin assay) method. Chitosan and an extract of the house cricket (*Acheta Domesticus*) were used as a model sample. The limit of detection ($LOD_{\lambda} = 0.3532$) was determined for this method. Chitosan samples at concentrations of 0.01 and 0.005 g/ml and cricket extract samples were confirmed as positive by the ELLA method.

Keywords: enzyme-linked lectin assay; WGA lectin; food allergen; 96-wells plate

Introduction

Glycans are much more complex than other macromolecules in terms of information and chemical structure, and it seems possible to obtain characteristic biological data from them. However, the method of presentation is different from known methods, which consist in DNA-protein binding. Identification of glycans is usually carried out by means of proteins called lectins, which are able to specifically bind oligosaccharide structures (Loris 2002; Thompson et al. 2011). Lectins are a very diverse group of animal, plant or bacterial origin and have even been isolated from fungi. The different groups of lectins are not similar in the structure and their binding sites also show no general formation. However, Loris (2002) describes some similarities that occur between plant and animal lectins.

Countless laboratory methods are used to food safety evaluation. Among them are those that work on the principle of antigen-antibody binding, performed on 96-well plates, known as ELISA. One of the options to apply a similar principle to foods containing insects is to focus on specific carbohydrate components. The biopolymer chitin, which consists of poly(N-acetyl- β -D-glucosamine) units, is specific for insects. Deacetylation of chitin produces a derivative of chitosan, as a result of which not only structural but also physicochemical changes occur (Wu et al. 2014). Finke (2007) estimates that the chitin content of the house cricket (*Acheta domesticus*) is 21.5 mg/kg. A content several-fold higher has been demonstrated, for example, in the larvae of the blackworm (*Tenebrio molitor*) (Hahn et al. 2018). Chitin quantification is quite problematic and the result is determined by conversion from total protein and fiber.

Materials and Methods

Chitosan (Carl ROTH, Germany), solution, was used to model the detection of insects using the ELLAs method. Chitosan was dissolved in 0.05M HCl solutions and in PBS buffer (pH 7.2) with a final concentration of 10 mg/ml for each buffer/sample. The house cricket was extracted into distilled water (2.5:10 w/v) diluted with PBS buffer, labeled see Table 1 and also used for the following analysis. The samples thus prepared were incubated in a 96-well plate (Nunc-Immuno, MaxiSorp; VWR International, CZ) in an amount of 50 μ l per well for 24 hours at 4°C. A negative control, PBS, was applied to 12 wells to control the background signal. Further steps were performed according to the methodology of Thompson et al. (2011) with minor modifications. After incubation, the sample was removed from the wells and 150 μ l of carbo free solution (Vector Laboratories, USA) was used to block non-specific binding for 2 hours. This was followed by washing with BST-Tween buffer (Sigma-Aldrich, USA) and application

of biotinylated lectin (WGA)(Vector Laboratories, USA) at a concentration of 1:1000 (lectin:BST-Tween; v/v) in an amount of 50 μ l to each well.

Table 1: Samples of cricked used for ELLA method

Sample	Cricket content
A	25 %
B	12.5 %
C	6.25 %

After an hour's incubation, the wells were washed with BST-Tween. The next step consisted in applying 50 μ l of horseradish peroxidase-conjugated enzyme (ABC kit)(Vector Laboratories, USA). After an hour's incubation, the wells were washed with BST-Tween twice. After the addition of 100 μ l of TMB substrate (Vector Laboratories, USA), the initially bound ABC catalyzes oxidation to produce a color change. The color response was detected after 10 minutes with a Tecan reader (Tecan, Austria) at 650 nm. The reaction was stopped by application of 10% sulfuric acid and measured with a reader at 450 nm.

The measured values were then statistically evaluated. Due to the small amount of data, the ANOVA post hoc Tukey-HSD test (Addinsoft, USA) was used.

Results and Discussion

Chitin occurs naturally in an ordered crystalline structure in two forms (α , β forms). However, both forms are insoluble in usual solvents, which complicates not only the technological use but also the determination of physico-chemical parameters (Rinaudo 2006). Chitosan for biochemistry was used in this work, which, according to the manufacturer's data, is produced by partial deacetylation of chitin and the degree of deacetylation is $\geq 85\%$ ($DA \geq 85$). Through deacetylation, the N-acetamido bonds are removed (Tsigos et al. 2000). This causes a change in structure, as well as a change in solubility. Chitosan is soluble in weak acid solutions and in some cases at neutral pH also in water. Such a molecule subsequently has a positive charge ($-NH^{3+}$ groups) and acquires the ability to adhere to various surfaces (Wu et al. 2014). From these characteristics it follows that chitosan can be obtained in the form of a solution and subsequently immobilized on a 96-well plate. It was dissolved in weak acid but also in PBS buffer. From the results, the limit of detection was determined ($LOD_{\lambda} = 0.3532$) and the concentrations of chitosan in both solutions were evaluated as positive. At the level of significance $p \leq 0.05$, the difference between the solutions used for dissolving chitosan was determined, see Table 2. The house cricket samples were also confirmed as positive, in all three tested concentrations.

Table 2: Absorbance of chitosan samples in different concentrations

Sample concentration	Solution	Absorbance
0.01	PBS	1.8937 ± 0.0703^a
0.01	HCl	1.2138 ± 0.0471^b
0.005	PBS	1.8218 ± 0.1271^a
0.005	HCl+PBS (1:1 w/w)	1.1751 ± 0.1699^b

Table 3: Absorbance of house cricket samples at different concentrations

Sample	Absorbance
A	0.6102 ± 0.0306
B	0.6172 ± 0.0465
C	0.5901 ± 0.0474

A:cricket content 25 %; B:cricket content 12.5 %; C:cricket content 6.25 %

Binding interactions and specific binding are often discussed in relation to ELISA methods, which are also used for the detection of allergens in food. The use of lectins has so far focused more on the field of histochemistry (Bartlová et al. 2021). Lectins are not known to be used for the identification of food ingredients using the 96-well method. Thompson et al. (2011) used the method to monitor the interaction of lectin with glycoprotein and the background response of the blocking agents used. In order to achieve applicability to food, it will be necessary to further optimize the method and determine the sensitivity and specificity of the developing tests.

Conclusion

The ELLA method demonstrated the presence of N-acetyl-D-glucosamine in chitosan in model solutions, as well as the presence of N-acetyl-D-glucosamine in chitin in house cricket extracts. The evidence was confirmed on the basis of the specific binding of WGA (wheat germ agglutinin) lectin with N-acetyl-D-glucosamine, which is a structural component of the insect cuticle.

Acknowledgement

This research was supported by IGA VETUNI č. 217/2023/FVHE and MZe NAZV Země 2017-2025 QK23020101.

References

- BARTLOVÁ, Marie, Matej POSPIECH, Zdeňka JAVŮRKOVÁ a Bohuslava TREMLOVÁ, 2021. Detection of carrageenan in cheese using lectin histochemistry. *Applied Sciences (Switzerland)*. **11**(15), 1–15. ISSN 20763417. Dostupné z: doi:10.3390/app11156903
- FINKE, Mark D., 2007. Estimate of chitin in raw whole insects. *Zoo Biology*. **26**(2), 105–115. ISSN 07333188. Dostupné z: doi:10.1002/zoo.20123
- HAHN, Thomas, Aileen ROTH, Eva FEBEL, Malgorzata FIJALKOWSKA, Eric SCHMITT, Tarique ARSIWALLA a Susanne ZIBEK, 2018. New methods for high-accuracy insect chitin measurement. *Journal of the Science of Food and Agriculture* [online]. **98**(13), 5069–5073. ISSN 10970010. Dostupné z: doi:10.1002/jsfa.9044
- LORIS, Remy, 2002. Principles of structures of animal and plant lectins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **1572**(2–3), 198–208. ISSN 0304-4165. Dostupné z: doi:10.1016/S0304-4165(02)00309-4
- RINAUDO, Marguerite, 2006. *Chitin and chitosan: Properties and applications*. ISSN 00796700. Dostupné z: doi:10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001
- THOMPSON, Roisin, Aileen CREAVIN, Michael O'CONNELL, Brendan O'CONNOR a Paul CLARKE, 2011. Optimization of the enzyme-linked lectin assay for enhanced glycoprotein and glycoconjugate analysis. *Analytical Biochemistry*. **413**(2), 114–122. ISSN 0003-2697. Dostupné z: doi:10.1016/J.AB.2011.02.013

TSIGOS, Iason, Aggeliki MARTINOÚ, Dimitris KAFETZOPOULOS a Vassilis BOURIOTIS, 2000. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. **18**(7), 305–312. ISSN 0167-7799. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7799(00)01462-1

WU, Qing Xi, Dong Qiang LIN a Shan Jing YAO, 2014. *Design of chitosan and its water soluble derivatives-based drug carriers with polyelectrolyte complexes*. B.m.: MDPI AG. ISSN 16603397. Dostupné z: doi:10.3390/md12126236

Kontaktní adresa: Martina Pečová, Mgr., Ústav hygieny a technologie potravin rostlinného původu, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, pecovam@vfu.cz

SEKCE 2

Chov zvířat, výživa zvířat a biochemie

Do této sekce nebyly přihlášeny žádné příspěvky.

SEKCE 3

Ochrana zvířat, welfare a etologie

Hodnocení stresu u psů v prostředí veterinární kliniky pomocí etologického pozorování – pilotní studie

Stress assessment in dogs at the veterinary clinic using ethological observation – a pilot study

¹Pokorná Veronika, ¹Voslářová Eva, ¹Bedáňová Iveta

¹Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

Summary:

The aim of the study was to find out, based on ethological observations, whether dogs experience stress and how the level of stress varies during their stay at the veterinary clinic. Ethological observations were conducted first in the waiting room, then in the veterinary office before, during and after the examination and vaccination. The results showed that stress behaviours were observed during all phases, however, the significantly ($p < 0,05$) highest level of stress (the highest frequency of stress behaviours) was recorded during the veterinary examination itself.

Keywords: behaviour; companion animals; ethogram; vaccination; examination

Úvod

Je známo, že zájmová zvířata, která musí podstoupit veterinární ošetření z důvodu prevence či poranění, jsou vystavena různé míře stresu, ať už vlivem neznámého prostředí, manipulace, předchozí negativní zkušenosti a dalších faktorů. Mnoho psů, koček a dalších zájmových zvířat v prostředí veterinární kliniky vykazuje behaviorální prvky chování, které jsou známkou stresu (Väisänen et al., 2005; Döring et al., 2009; Mariti et al., 2015; Nibblett et al., 2015; Dawson et al., 2018; Tateo et al., 2021).

Pro hodnocení chování u psů a koček na veterinární klinice se častěji využívá kvalitativního hodnocení, kdy je zaznamenávána přítomnost či nepřítomnost určitého prvku chování. V souvislosti s hodnocením stresu patří mezi často sledované prvky chování mimo jiné třes těla, zvýšené olizování pysků, zrychlené dýchání, pozice ocasu pod tělem či nadměrný pohyb (Väisänen et al., 2005; Broom and Fraser, 2007; Döring et al., 2009; Mariti et al., 2015; Nibblett et al., 2015).

Cílem studie bylo na základě etologického pozorování zjistit, zda u psů dochází ke stresu a jak se míra stresu liší v jednotlivých fázích vyšetření od příchodu do čekárny až po skončení ošetření a odchod z ordinace.

Materiál a metodika

Do analýzy bylo zařazeno celkem 20 psů různého pohlaví, plemene a velikosti ve věku od 3 měsíců do 11 let, kteří navštívili veterinární kliniku z důvodu pravidelné vakcinace a u kterých byl na základě přímého pozorování zaznamenán výskyt vybraných prvků chování. Etologické pozorování bylo realizováno ve 4 fázích – čekárna, ordinace před, během a po ošetření. U každého psa v každé fázi pozorování byl sledován výskyt či absence celkem 21 prvků chování indikujících stres. Pozorování každého psa probíhalo od příchodu do čekárny, během čekání v čekárně, dále po vstupu do ordinace před zahájením vyšetření, poté během klinického vyšetření zakončeného vakcinací až po skončení ošetření a odchod ven z ordinace. Ke statistickému zhodnocení významnosti rozdílů mezi pozorovanými četnostmi výskytu chování byl použit chí-kvadrát test s Yatesovou korekcí v rámci metodiky 2x2 kontingenčních

tabulek v programu UNISTAT 6.5 for Excel (Unistat Ltd., London, UK). Hodnota $p < 0,05$ byla stanovena jako statisticky významná a hodnota $p < 0,01$ byla stanovena jako statisticky vysoce významná.

Výsledky a diskuze

Tabulka č. 1 uvádí četnost výskytu sledovaných prvků chování u psů ($n = 20$) v jednotlivých fázích pozorování.

Tabulka č. 1: Výsledky etologického pozorování psů ($n = 20$) ve veterinární ordinaci

Typ chování	Četnost výskytu daného chování			
	Čekárna	Ordinace před vyšetřením	Ordinace během vyšetření a vakcinace	Ordinace po ukončení ošetření
Zvýšené olizování pysků	10	5	15	5
Zvedání tlapek	0	0	2	0
Zívání	1	0	0	1
Třes těla	7	6	12	2
Močení	0	0	0	0
Přikrčení	1	0	1	0
Piloerectie	0	0	0	0
Vokalizace - kňučení	5	4	4	7
Zrychlené dýchání	6	4	4	7
Škrábání (někoho)	0	0	0	1
Odmítání chůze/vzpírání	3	3	0	1
Tzv. velrybí oči	2	1	6	1
Drbání	2	2	1	1
Pozice ocasu – pod tělem	6	5	5	4
Hypersalivace	0	0	0	0
Točení v kruhu	0	0	0	0
Snaha se schovat	2	2	10	1
Sklopené uši	4	3	7	3
Snaha odejít pryč	3	2	3	6
Skákání na majitele	4	2	8	2
Nadměrný pohyb	1	1	0	2
CELKEM	57^b	40^{c,d}	78^a	44^{b,d}

^{a-d} odlišný index označuje statisticky významný ($p < 0,05$) rozdíl mezi četnostmi v řádku

Byl zjištěn statisticky významný rozdíl v celkové četnosti výskytu sledovaných prvků chování mezi různými fázemi pozorování, tj. různými fázemi pobytu psů na veterinární klinice. V ordinaci během vyšetření byl zjištěn vyšší ($p < 0,05$) výskyt prvků chování indikujících přítomnost stresu než u psů v čekárně i v ordinaci před samotným vyšetřením. U psů pozorovaných v ordinaci po vyšetření výskyt prvků chování indikujících přítomnost stresu statisticky vysoce významně ($p < 0,01$) klesl ve srovnání s pozorováním během vyšetření. Výsledky tedy ukazují, že během návštěvy veterinární kliniky dochází u psů k nárůstu stresu v souvislosti s podstoupením vyšetření, což je v souladu s dalšími studiemi zabývajícími se

hodnocením stresu v prostředí veterinární kliniky (Väisänen et al., 2005; Döring et al., 2009; Travain et al., 2015). Nejčastěji pozorovaným prvkem chování ve všech fázích pozorování bylo zvýšené olizování pysků. Obdobně Väisänen et al. (2005) při hodnocení stresu v prostředí veterinární kliniky zjistili, že u většiny psů dochází k zvýšenému olizování pysků. Druhým nejčastějším typem pozorovaného stresového chování byl třes těla, který se vyskytl u 60 % psů (12/20), což jsou výsledky téměř shodné s výsledky zahraniční studie (Döring et al., 2009), kde během vyšetření na veterinární klinice vykazovalo třes těla 61,5 % psů (83/135).

Závěr

Výsledky ukazují, že u psů na veterinární klinice dochází ke stresu, a to již v čekárně, kde byly také pozorovány prvky chování indikující stres. Vlastní vyšetření a vakcinace v ordinaci pak vedly k významnému zvýšení stresové zátěže dokumentované nárůstem stresového chování. Pozitivní je, že již krátce po ukončení ošetření se výskyt prvků chování indikující stres významně snížil. Vyšetření a vakcinace představují pouze krátkodobou stresovou zátěž, lze předpokládat, že u náročnějších zákroků spojených s větší mírou diskomfortu, příp. bolestí bude také vyšší stresová zátěž. S ohledem na negativní dopad stresu na zdraví je žádoucí usilovat o snížení vnímaného stresu.

Literatura

BROOM, D.M.; FRASER, A.F. Domestic animal behaviour and welfare. 4th edition. Oxfordshire: CAB International, 2007. ISBN 9781855932879.

DAWSON, L.C., DEWEY, C.E., STONE, E.A., GUERIN, M.T., NIEL, L. A survey of animal welfare experts and practicing veterinarians to identify and explore key factors thought to influence canine and feline welfare in relation to veterinary care. *Animal Welfare*. 2016, vol. 25, s. 125–134.

DÖRING, D., ROSCHER, A., SCHEIPL, F., KÜCHENHOFF, H., ERHARD, M.H. Fear-related behaviour of dogs in veterinary practice. *The Veterinay Journal*. 2009, vol. 182, s. 38–43.

MARITI, C., RASPANTI, E., ZILOCCHI, M., CARLONE, B., GAZZANO, A., VETERINARIE, S., PISA, U., PIAGE, V. The assessment of dog welfare in the waiting room of a veterinary clinic. *Animal Welfare*. 2015, vol. 24, no. 3, s. 299–305.

NIBBLETT, B.M., KETZIS, J.K., GRIGG, E.K. Comparison of stress exhibited by cats examined in a clinic versus a home setting. *Applied Animal Behaviour Science*. 2015, vol. 173, s. 68–75.

TATEO, A., ZAPPATERRA, M., COVELLA, A., PADALINO, B. Factors influencing stress and fear-related behaviour of cats during veterinary examinations, *Italian Journal of Animal Science*. 2021, vol. 20, no. 1, s. 46–58.

TRAVAIN, T., COLOMBO, E.S., HEINZL, E.U.L., BELLUCCI, D., PRATO PREVIDE, E., VALSECCHI, P. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) – A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior Clinical Applications and Research*. 2015, vol. 10, s. 17–23.

VÄISÄNEN, M.A., VALROS, A.E., HAKAOJAM, E., RAEKALLIO, M., VAINIO, O. Pre-operative stress in dogs – a preliminary investigation of behavior and heart rate variability in healthy hospitalized dogs. *Veterinary Anaesthesia and Analgesia*. 2005, vol. 32, s. 158–167.

Kontaktní adresa: Veronika Pokorná, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21280@vfu.cz

The occurrence of kidney damage in livestock from the perspective of animal health and welfare

¹Válková Lenka, ¹Voslářová Eva, ²Becskei Zsolt, ¹Večerek Vladimír

¹Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic

²Department of Animal Breeding and Genetics, Faculty of Veterinary Medicine, University of Belgrade, Serbia

Summary

The occurrence of kidney damage in livestock was monitored in the Czech slaughterhouses in the period from 2010 to 2021. Results of post mortem veterinary inspection carried out by official veterinarians at the slaughterhouses were collected in the national database and analyzed retrospectively. The occurrence of kidney damage was lower ($P < 0.05$) in fattened animals than in adult animals. Furthermore, the occurrence of kidney damage was lower ($P < 0.05$) in fattened animals than in culled young. Findings of chronic kidney damage were more frequent than findings of acute ($P < 0.01$) and parasitic ($P < 0.01$) origin in all monitored species and categories of animals.

Keywords: farm animal; slaughterhouse; state veterinarian; post mortem inspection

Introduction

The kidneys are metabolic organs in the animal organism, which participate with its excretory function in the metabolic balance of the organism (Skotnicka et al., 2007). The occurrence of pathoanatomical findings on the kidneys of slaughtered animals was reported in some studies analyzing the causes of confiscation of carcasses of farm animals or pathoanatomical findings detected during a postmortem veterinary inspection at slaughterhouses in general (e.g. Lis, 2005; Machold et al., 2007; Januskeviciene et al., 2010; Ceccarelli et al., 2018; Tabaran et al., 2018). However, most studies focused only on a specific species or a selected slaughterhouse. There is a lack of studies comparing the occurrence of pathoanatomical findings in more species or categories of farm animals under the same conditions and in the same period.

The aim of the study was to assess an occurrence of kidney damage in individual species and categories of farm animals slaughtered at slaughterhouses in the Czech Republic.

Material and methods

In order to assess the occurrence of kidney damage, results of post mortem veterinary inspection carried out by official veterinarians at the slaughterhouses were collected and analyzed retrospectively. The subjects of the analysis were all bovine, porcine, ovine and caprine animals reared on the Czech farms and slaughtered at slaughterhouses in the Czech Republic in the period from 2010 to 2021. For each species and category, the number of healthy kidneys and the number of damaged kidneys, distinguishing damage of chronic, acute and parasitic origin, were evaluated.

Based on the occurrence of kidney damage, the level of kidney health was compared between individual categories of cattle (cows, heifers, fattening bulls and calves culled from the farms), pigs (sows, finisher pigs and piglets culled from the farms), sheep (ewes and lambs) and goats (does and kids). Furthermore, comparisons were made between the occurrence of kidney damage in young and fattened animals (heifers, fattening bulls, finisher pigs, lambs, kids), adult animals (cows, sows, ewes, does) and young animals culled from the farms for inadequate condition or health (calves culled from the farms, piglets culled from the farms).

The Chi-square test was used to statistically compare the frequencies of kidney damage findings.

Results and discussion

The occurrence of kidney damage in cattle, pigs, sheep and goats slaughtered at slaughterhouses in the Czech Republic is shown in Table 1.

Table 1: Occurrence of kidney damage in animals slaughtered at slaughterhouses in the Czech Republic in the period from 2010 to 2021

Origin of damage	Animal species / category (number of slaughtered animals)										
	Cows (1348393)	Heifers (315406)	Bulls (1214298)	Calves (120238)	Sows (683912)	Finisher pigs (29628524)	Piglets (152088)	Ewes (26026)	Lambs (132553)	Does (1680)	Kids (7690)
	Occurrence of kidney damage (%)										
Acute	4.00 ^e	1.11 ^d	0.44 ^e	3.96 ^e	5.65 ^b	0.24 ^f	6.92 ^a	0.03 ^g	0.01 ^f	0.00 ^{g,f}	0.00 ^{g,f}
Chronic	36.43 ^a	14.25 ^c	10.00 ^f	12.97 ^e	22.78 ^b	14.17 ^c	13.26 ^d	2.95 ^g	0.42 ^h	2.68 ^g	0.21 ⁱ
Parasitic	0.03 ^a	0.01 ^{b,d}	0.01 ^b	0.00 ^c	0.02 ^a	0.01 ^b	0.03 ^a	0.03 ^{a,d}	0.00 ^c	0.00 ^{a,b,c}	0.00 ^{a,b,c}
All	40.46 ^a	15.38 ^c	10.46 ^g	16.93 ^d	28.45 ^b	14.42 ^f	20.21 ^c	3.01 ^h	0.42 ⁱ	2.68 ^h	0.21 ^j

^{a-j} values in rows with different letters of superscripts are significantly different at $P < 0.05$

The occurrence of kidney damage was significantly ($P < 0.05$) lower in fattened animals than in adult animals. This finding documents the fact that young fattened animals have a better kidney condition than mature animals. Kidney changes related to aging were documented in several animal models (Bowman and Abdel-Rahman, 2018).

When comparing fattened animals with young animals culled from the farms, the occurrence of kidney damage was significantly ($P < 0.05$) lower in fattened animals than in culled young. Obviously, animals kept on farms for fattening have better kidney condition than the young culled from the farm for poor fitness and/or health.

Among adult animals, the lowest occurrence of kidney damage was found in goats and sheep, followed by sows, while it was highest in cows. The results prove that the lowest metabolic load leading to kidney damage is in goats and sheep that are fed to a significant extent by natural grazing. Selective feeding is a natural behaviour of sheep and goats based on their dietary needs and the nutritional properties of available feed (Berthel et al., 2022).

Among fattened animals, the occurrence of kidney damage was lowest in kids, followed by lambs and bulls while it was highest in finisher pigs. Similar explanation can be given since also in kids and lambs nutritional needs are covered by natural grazing and thus, the animals can positively regulate their metabolism (Berthel et al., 2022) and consequently, the impact on kidney damage is very small. In contrast, commercial feed mixtures do not cover nutritional demands of finisher pigs and the imbalances are manifested by the subsequent damage to the kidneys. The frequency of kidney damage in slaughtered pigs was also pointed out by Spiekermeier et al. (2017) and Scheinert et al. (2016).

A comparison of the occurrence of findings of chronic, acute and parasitic kidney damage in cattle, pigs, sheep and goats detected at slaughterhouses shows that in all species and categories of slaughtered animals, findings of chronic damage were most frequent, followed by that of acute damage and the least frequent were findings of parasitic damage. The occurrence of findings of chronic kidney damage was statistically significantly more frequent than the occurrence of findings of acute ($P < 0.01$) and parasitic ($P < 0.01$) damage in all observed categories of animals. The occurrence of findings of acute kidney damage was statistically

significantly more frequent ($P < 0.01$) than the occurrence of findings of parasitic kidney damage in most monitored categories, with the exception of does and kids, in which no findings of acute or parasitic kidney damage were detected, and with the exception of ewes ($P = 0.703$) and lambs ($P = 0.058$), in which findings of acute and parasitic kidney damage were detected only rarely.

Conclusion

From the perspective of the occurrence of kidney damage as a major consequence of the imbalance between the metabolic needs of the organism and the nutrition provided to the animals, there are deficiencies of a significant level. Optimization of the nutrition of individual categories of animals is needed to reduce the occurrence of kidney damage detected at slaughterhouses.

Acknowledgements

This study was supported by ITA VETUNI (Project No. 2021ITA22).

References

- BERTHEL, R.; SIMMLER, M.; DOHME-MEIER, F.; KEIL, N. Dairy sheep and goats prefer the single components over the mixed ration. *Frontiers in Veterinary Science*. 2022, vol. 9, article nr. 1017669.
- BOWMAN, B.T.; ABDEL-RAHMAN, E.M. Models of aging kidney: Implications on kidney health and disease. In: Ram, J.L.; Conn, P.M. (Eds.): *Conn's Handbook of Models for Human Aging*. Academic Press, London, 2018, pp. 863–871.
- CECCARELLI, M.; LEPRINI, E.; SECHI, P.; IULIETTO, M.F.; GRISPOLDI, L.; GORETTI, E.; CENCI-GOGA, B.T. Analysis of the causes of the seizure and destruction of carcasses and organs in a slaughterhouse in central Italy in the 2010-2016 period. *Italian Journal of Food Safety*. 2018, vol. 7, no. 1, article nr. 6899.
- JANUSKEVICIENE, G.; PAULASKAS, V.; DAILIDAVICIENE, J.; JUOZAITIENE, V. Analysis of pathologic lesions in the livestock and poultry slaughtered in the meat establishments of Lithuania. *Veterinarija ir Zootechnika*. 2010, vol. 52, no. 74, s. 33–42.
- LIS, H. Results of veterinary inspection of slaughter animals and meat in Poland in 2003. *Medycyna Weterynaryjna*. 2005, vol. 61, no. 10, s. 1160–1161.
- MACHOLD, U.; TROEGER, K.; MOJE, M. Organic versus conventional livestock production systems. *Fleischwirtschaft*. 2007, vol. 87, no. 2, s. 89–93.
- SCHEINERT, J.; MULLER, K.; MEILER, H.; SCHOON, H.A. The pig kidney in the 21st century - which diagnoses could be made in the abattoir and how should they be interpreted? *Journal of Food Safety and Food Quality-Archiv Fur Lebensmittelhygiene*. 2016, vol. 67, no. 3, s. 64–71.
- SKOTNICKA, E.; MUSZCZYNSKI, Z.; DUDZINSKA, W.; SUSKA, M. A review of the renal system and diurnal variations of renal activity in livestock. *Irish Veterinary Journal*. 2007, vol. 60, no. 3, s. 161–168.
- SPIEKERMEIER, I.; FREITAG, M.; BAUMGARTNER, W. Interstitial nephritis in pigs. *Tieraerztliche Praxis Ausgabe Grosstiere Nutztiere*. 2017, vol. 45, no. 5, s. 350–356.
- TABARAN, A.; DAN, S.D.; REGET, O.; TABARAN, A.F.; MIHAIU, M. Slaughterhouse survey on the frequency of pathologies found in bovine post-mortem inspections. *Bulletin UASVM Veterinary Medicine*. 2018, vol. 75, no. 2, s. 251–255.

Contact address: Lenka Válková, MVDr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20334@vfu.cz

Stopover selection during Sahara Desert crossing in Western Marsh Harriers originating from Western and Northern Europe using the Normalised Difference Vegetation Index

¹Šimon Krejčí, ²Emilio Guirado, ¹Jan Škrábal, ^{1,3}Ivan Literák

¹Department of Biology and Wildlife Diseases, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1, 61242 Brno, Czech Republic

²Instituto Multidisciplinar para el Estudio del Medio 'Ramón Margalef', Universidad de Alicante, Alicante, Spain

³CEITEC VFU Brno, University of Veterinary Sciences Brno, Palackého tř. 1, 61242 Brno, Czech Republic

Summary

Migratory birds are forced to overcome various obstacles during their migration. As usual, birds need to use stopovers for energy replenishment. For stopovers, areas with available vegetation can be crucially important. One of many challenging environmental obstacles for migratory Western Marsh Harriers (*Circus aeruginosus*) is the crossing of the Sahara Desert. We investigated Sahara-crossing behaviour of migratory Western Marsh Harriers originating from Northern Europe (Sweden) and Western Europe (Belgium and The Netherlands) using GPS/GSM telemetry. We described main crossing routes through Sahara Desert and investigated stopovers in hyper-arid and arid zones. We calculated Normalised Difference Vegetation Index with satellite data, which is a proxy of the net primary productivity of vegetation for the stopover positions and randomly generated positions to investigate if Western Marsh Harriers prefer areas with higher vegetation availability. Our findings highlight the importance of the scarce green areas in the Western Marsh Harrier trans-desert migration.

Keywords: *Circus* sp., Migration, Raptor

Introduction

During seasonal migration birds have to overcome long distance travels thousands of kilometres long, seas or oceans, areas with harsh atmospheric conditions and other biotic and abiotic obstacles. As the spring and autumn migrations are energy demanding, birds on migration must interrupt migratory flights with periods spent on ground, commonly referred as stopovers. Stopovers have multiple functions regarding specific demands of the individuals, such as energy accumulation, physiological recovery and avoidance adverse environmental conditions (Ferguson-Lees and Christie 2001; Schmaljohann et al. 2022).

The Western Marsh Harrier (*Circus aeruginosus*) is a medium-size raptor which inhabits wetlands and open habitats throughout Europe and Asia, including agricultural landscapes, in which an increase of occurrence has been noticed in last years (Cardador and Mañosa 2011; Svensson et al. 2010). Harriers originating from Southern Europe around Mediterranean are mostly sedentary, however birds originating from Central, Western and Northern Europe are chiefly migratory, overcoming long-distance migrations to sub-Saharan Africa (Agostini and Panuccio 2010; Strandberg et al. 2008). In effort to address the lack of data aiming on stopover use through Saharan Desert, we investigated Sahara-crossing behaviour on Western Marsh Harriers originating from Northern and Western Europe with investigation of used and available stopover sites using the Normalised Difference Vegetation Index (NDVI), which is a proxy of net primary productivity of vegetation (Rasmussen, 1998).

Material and Methods

We processed telemetry data of Western Marsh Harriers originating from two populations (P1 and P2). P1 represents harriers tagged in the Northern Europe consisting of birds tagged in Sweden from 2007 to 2011. Data for these birds were accessed from Movebank (ID 49910951). P2 consists of Western Marsh Harriers tagged in Belgium and The Netherlands. Data from these birds are available on the Movebank (ID 922263102 and 604806671) and these birds were tagged from 2012 to 2017. For analysis were used data of 5 and 6 harriers from P1 and P2 respectively. Individual consequence trajectories of autumn and spring migrations through

Sahara Desert were created in ArcGIS Pro to obtain an overview of trans-Saharan flyways in both populations. In P1 we obtained 9 autumnal and 8 spring individual migrations through Sahara Desert. For P2 we obtained 16 autumnal and 16 spring individual migrations. For NDVI analysis we used only stopover positions, which we defined as positions when the logger recorded movement < 5 km/h. As the loggers from P1 did not include velocity values, we calculated mean velocity from time and distance between consequence positions. For the NDVI annotation, only stopover positions recorded in the Northern Africa in arid and hyper-arid areas (Trabucco and Zomer, 2018) were selected. Stopover positions were divided into four groups, separately for arid and hyper-arid zones and for autumn and spring migration. In P1 we obtained 1519, 136, 174 and 124 stopover positions during autumn arid, spring arid, autumn hyper-arid and spring hyper-arid migration respectively. In P2 we obtained 4593, 1964, 1102 and 3188 stopover positions during autumn arid, spring arid, autumn hyper-arid and spring hyper-arid migration respectively. We calculated NDVI with the Terra Moderate Resolution Imaging Spectrometer (MODIS) satellite data with resolution of 250 m, using Google Earth Engine software. For each stopover position we calculated mean NDVI between March and May in spring stopovers and between September and November in autumn stopovers of the respective year. Afterwards we generated random positions in the vicinity of stopover positions from 10 – 100 km radius, with condition that random points must be in the same aridity zone as the telemetry obtained positions and NDVI was calculated for these positions. Lastly, we used R statistics software for calculation of Wilcoxon Rank Sum Test for testing, if birds prefer to use areas with higher NDVI, as proxy of net primary productivity of vegetation, in stopover sites. We separately compared spring and autumn migrations through arid and hyper-arid areas.

Results

Marsh harriers from P1 significantly preferred ($P < 0.01$) areas for stopover with higher NDVI during autumn migration through arid areas of Sahara. Spring migration in arid and hyper-arid and autumn migration through hyper-arid areas had no difference between stopover and random positions. For P2 we found significant preference ($P < 0.01$) for stopover sites with higher NDVI during spring migration through arid zones, hyper-arid zones and for autumn migration through arid zones. In autumn migration through hyper-arid zones, we found no difference between stopover and random positions. The comparison between stopover and random positions is presented in Table 1 with mean values of NDVI for both stopover and random positions.

Table 1: Mean values of NDVI of stopover and random positions for P1 and P2 with statistical significance.

Population	Migration	Area	Stopover	Random	Significance
P1	Autumn	Arid	0.278±0.149	0.165±0.073	++*
		Hyper-arid	0.095±0.017	0.095±0.022	0**
	Spring	Arid	0.148±0.050	0.144±0.032	0
		Hyper-arid	0.096±0.017	0.095±0.018	0
P2	Autumn	Arid	0.200±0.067	0.152±0.066	++
		Hyper-arid	0.092±0.018	0.091±0.017	0
	Spring	Arid	0.152±0.049	0.132±0.043	++
		Hyper-arid	0.106±0.021	0.096±0.017	++

* ++ indicates significance $p < 0.01$

** 0 indicates no significance.

Discussion

Supported by no observation of negative preference, using NDVI as proxy of vegetation productivity, analysis in P1 proved use of areas with more vegetation for autumn stopovers in arid areas. For P2 we found preference for stopovers with more vegetation in spring in both arid and hyper-arid areas and in autumn in arid areas. This presents the importance of vegetation for stopovers in Western Marsh Harriers and highlights the importance of the availability of scarce green areas, where protection of such areas could enhance the success rate of trans-Saharan migration.

Atmospheric conditions, such as wind drift or seasonal winds are important factors, that can vary the migration routes (Klaassen et al. 2010). Our findings suggest, that need of vegetation for stopovers could also cause migratory variations, as the birds must actively adjust their route to find scarce vegetation for stopover use.

Acknowledgements

We thank Roine Strandberg and Tanja Milotic for sharing telemetry data for analysis. This work was supported by the University of Veterinary Sciences Brno (grant IGA 204/2023/FVHE).

References

- AGOSTINI N., PANUCCIO M. Western Marsh Harrier (*Circus aeruginosus*) Migration Through the Mediterranean Sea: A Review. *Journal of Raptor Research* 2010 vol. 44(2), p. 136-142.
- AGOSTINI N., PROMMER M., VÁCZI M., PANUCCIO M. Repeated large scale loop migrations of an adult European Honey Buzzard. *Avocetta* 2019 vol. 43(1), p. 13-21.
- CARDADOR L., MAÑOSA S. Foraging Habitat Use and Selection of Western Marsh Harriers (*Circus aeruginosus*) in Intensive Agricultural Landscapes. *Journal of Raptor Research* 2011 vol. 45(2), p. 168-173.
- FERGUSON-LEES J., CHRISTIE D. A. Raptors of the World. Houghton Mifflin Harcourt, Massachusetts, USA, 2001.
- KLAASSEN R.H.G., STRANDBERG R., HAKE M., OLOFSSON P., TØTTRUP A.P., ALERSTAM T. Loop Migration in adult marsh harriers *Circus aeruginosus*, as revealed by satellite telemetry. *Journal of Avian Biology* 2010 vol. 41, p. 200-207.
- RASMUSSEN M.S. Developing simple, operational, consistent NDVI-vegetation models by applying environmental and climatic information: Part I. Assessment of net primary production. *International Journal of Remote Sensing* 1998 vol. 19, p. 97-117.
- SCHMALJOHANN H., EIKENAAR C., SAPIR N. Understanding the ecological and evolutionary function of stopover in migrating birds. *Biological Reviews* 2022 vol. 97, p. 1231-1252.
- STRANDBERG R., KLAASEN R.H.G., HAKE M., OLOFSSON P., THORUP K., ALERSTAM T. Complex Timing of Marsh Harrier *Circus aeruginosus* Migration Due to Pre- and Post-Migratory Movements. *Ardea* 2008 vol. 96, p. 159-171.
- SVENSSON L., MULLARNEY, K., ZETTERSTRÖM D. Collins Bird Guide: The Most Complete Guide to the Birds of Britain and Europe. HarperCollins, New York, 2010.
- TRABUCCO A., ZOMER R.J. *Global Aridity Index and Potential Evapo-Transpiration (ET0) Climate Database v2* [Online]. CGIAR Consortium for Spatial Information, 2018, Available at: <https://cgiarcsi.community>.

Contact address: Krejčí Šimon, Mgr., Department of Biology and Wildlife Diseases, FVHE VETUNI, Palackého tř.1946/1, 612 42 Brno, krejcis@vfu.cz

Využitie infračervenej termografie pri hodnotení akútneho stresu u mláďat kozy bielej krátkosrstej

Infrared thermography as a tool for assessing acute stress in white shorthaired goat kids

Kotianová Lucia, Lakomá Tereza, Voslášková Eva, Večerek Vladimír

Ústav ochrany a welfare zvierat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno, Česká republika

Summary

Infrared thermography has the potential to become a valuable non-invasive contactless method of acute stress assessment in farm animals, nevertheless, there is a need for more studies looking into using of thermal imaging in small ruminants. This study aimed to compare the effect of a short-term isolation on 2-week old goat kids and 2-month old goat kids using infrared thermography. The results show that the surface temperature of the right eye increased ($p < 0.05$) in the group of younger goat kids after 30 minutes of isolation. The surface temperature of the right eye also increased ($p < 0.01$) in the group of older goat kids after 30 minutes of isolation. No difference ($p > 0.05$) in the surface temperature was found when comparing the two age groups after 30 minutes of separation from their mothers.

Keywords: *welfare; farm animals; dairy goats*

Úvod

U kôz v mliečnej produkcii je jedným z faktorov ovplyvňujúcich welfare mláďat izolácia od matiek, ktorá môže byť buď spojená s časným odstavom alebo krátkodobá, napríklad následkom zmeny denného režimu spojeného s dojením matiek (Von Walter et al., 2021). Hodnotenie akútneho stresu spojeného s bežnými úkonmi v rámci farmového spôsobu chovu u hospodárskych zvierat sa v súčasnosti vykonáva vo vysokej miere za využitia invazívnych metód, ktoré zvyčajne zahŕňajú napríklad odber krvi alebo metód neinvazívnych, napríklad pomocou odberu slín za účelom stanovenia hladiny glukokortikoidov, pričom v oboch prípadoch je možný výskyt nežiadúcich vplyvov akými sú manipulácia či fixácia krátko pred samotným odberom (Romero et al., 2015). Princíp hodnotenia akútnej stresovej reakcie pomocou termokamery spočíva v zobrazení zmien povrchovej teploty, ktoré nastávajú ako dôsledok určitých metabolických a fyziologických procesov spustených následkom stresovej reakcie (McManus et al., 2016; Stewart et al., 2005). U malých prežúvavcov je vhodným miestom pre detekciu teploty pomocou termokamery vnútorný kútik oka (Bartolomé et al., 2019). Cieľom práce bolo porovnanie vplyvu krátkodobej izolácie na kozľatá dvoch vekových kategórií pomocou infračervenej termografie ako inovatívneho nástroja pre neinvazívne hodnotenie akútneho stresu u kôz plemena biela krátkosrstá.

Materiál a metodika

V rámci hodnotenia akútneho stresu u kozliat plemena biela krátkosrstá koza s využitím infračervenej termografie bolo hodnotených 12 jedincov v dvoch vekových kategóriách. Prvá veková kategória bola tvorená kozľatami vo veku približne 14 dní (mladšie kozľatá) o počte 6 kusov, druhá veková kategória bola tvorená kozľatami vo veku približne 2 mesiace (staršie kozľatá) o počte taktiež 6 kusov. Jednalo sa o zvieratá odchovávané na farme s primárne mliečnou produkciou, riadacej sa pravidlami ekologického hospodárstva. Kozľatá boli ustajnené s matkami v skupinách o počte priemerne 20 jedincov, s možnosťou vizuálneho, olfaktorického i akustického kontaktu s ostatnými skupinami kôz s mláďatami. Kozy tvorili stabilné skupiny, bez výskytu rohatých jedincov, so stanoveným harmonogramom dojenia

dvakrát denne a to v ranných a poobedných hodinách, kedy boli mláďatá ponechávané bez vizuálneho, akustického i olfaktorického kontaktu s matkami približne 10 minút. Teplota v prostredí stajne dosahovala 12 °C, s relatívnou vlhkosťou vzduchu 60 %. Obe skupiny kozliat boli skúmané samostatne, avšak s aplikáciou rovnakého postupu merania. Všetkých 12 kozliat bolo najskôr pred odvedením matiek nasnímaných termokamerou (východisková hodnota) zo vzdialenosti približne 1 meter, bez fyzického kontaktu s pozorovaným jedincom. Kozľatám bola pomocou fotoaparátu nasnímaná ušná známka pre identifikáciu. Následne došlo k odvedeniu matiek na miesto určené k dojeniu, kde boli matky ponechané po dobu 30 minút, nakoľko im bolo vykonávané okrem samotného dojenia ešte rutinné vyšetrenie vemena a kontrolné vyšetrenie paznechtov. Po 30 minútach došlo k opakovanému zberu dát pomocou termokamery u rovnakých jedincov. Termografické snímkovanie prebiehalo pomocou zariadenia testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Nemecko) s parametrami obrazu 640 x 480 pixelov, senzitivitou < 0,04 °C a rozmedzím teplôt -30 až 100 °C. Emisivita bola stanovená na hodnotu 0,97. Fotografie boli zozbierané v stabilných podmienkach, zo vzdialenosti 1 meter a odčítanie prebiehalo z oblasti oka, pri zachovaní pravého uhla. Boli vyhotovené vždy minimálne dva snímky pravého oka, z ktorých následne bola odčítaná maximálna hodnota povrchovej teploty vo vybranej oblasti, s využitím programu IRSoft (Testo SE & Co. KGaA, Nemecko). Nakoniec došlo ku spracovaniu dát z termogramov v programe UNISTAT 6.5 pre Excel (Unistat Ltd., London, UK). Pre porovnanie rozdielov povrchových teplôt očí u kozliat pred izoláciou a po 30 minútach izolácie od matiek bol využitý Shapiro-Wilkov test normality a následne párový t-test. Vekové kategórie kozliat boli následne porovnané medzi sebou za využitia nepárového t-testu.

Výsledky a diskusia

Namerané hodnoty povrchovej teploty oblasti pravého oka u kozliat v oboch kategóriách v rámci jednotlivých meraní sú vyobrazené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1: Porovnanie povrchovej teploty pravého oka kozliat v rámci mladšej a staršej vekovej kategórie (východisková teplota pred izoláciou a meranie po 30 min izolácie).

Skupina	Východisková hodnota	Meranie po 30 minútach izolácie od matiek
Mladšie kozľatá	37,38 °C ^{a,x}	37,86 °C ^{b,x}
Staršie kozľatá	37,82 °C ^{a,y}	38,13 °C ^{b,x}

^{a,b} Hodnoty s rozdielnym indexom v rámci jedného riadku indikujú štatisticky významný ($p < 0,05$) rozdiel.

^{x,y} Hodnoty s rozdielnym indexom v rámci jedného stĺpca indikujú štatisticky významný ($p > 0,05$) rozdiel.

Na základe nameraných hodnôt bolo zistené, že mladšie kozľatá vykazovali po 30 minútach izolácie od matiek významne vyššie ($p < 0,05$) hodnoty povrchovej teploty oblasti oka, ako pred izoláciou od matiek (východisková hodnota). U starších kozliat došlo k štatisticky vysoko významnému zvýšeniu povrchovej teploty ($p < 0,01$) po 30 minútach izolácie od matiek, v porovnaní s bazálnou hodnotou. Staršie kozľatá taktiež vykazovali v rámci porovnania východiskových hodnôt s mladšími kozľatami štatisticky vysoko významný rozdiel v povrchových teplotách oka ($p < 0,01$), avšak pri porovnaní oboch skupín po 30 minútach izolácie od matiek nebol zaznamenaný štatisticky významný rozdiel ($p > 0,05$) teplôt v oblasti pravého oka. Von Walter et al. (2021) hodnotili krátkodobú separáciu kozliat od matiek

za pomoci behaviorální analýzy v kombináci s meráním srdečního tepu, přičem u mladší kategorie, vo věku dvou týžďňov, došlo k nejvyšší namerané hodnotě srdečního tepu v 6–8 minúte separácie od matiek, avšak na rozdiel od našich výsledkov, v porovnaní dvojmesačných kozliat s dvojtýžďňovými boli zaznamenané štatisticky významne vyššie ($p < 0,05$) hodnoty srdečního tepu u mladší kategorie. Taktiež Siebert et al. (2011) využívali pri hodnotení izolačného stresu u kozliat metódu behaviorální analýzy, pričom popísali ako jeden z dôkazov izolačného stresu intenzitu a dĺžku vokalizácie kozliat. Tölü et al. (2017) porovnávali výskyt vokalizácie s hodnotením hladiny stresových hormónov z krvnej plazmy a potvrdili vhodnosť využitia tohto parametru v rámci testov sociálnej izolácie u kôz. Von Walter et al. (2021) vo svojej práci popisujú, že frekvencia a dĺžka vokalizácie dosahovala štatisticky významne vyššiu ($p < 0,05$) mieru u kozliat vo věku dvoch mesiacov, v porovnaní s kozľatami vo věku dvoch týžďňov, čo potvrdzuje taktiež zistenia v našej práci.

Záver

Nami získané výsledky potvrdzujú využiteľnosť infračervenej termografie pri hodnotení krátkodobého izolačného stresu u kozliat s ohľadom na to, že naše zistenia korešpondujú so zisteniami publikovanými autormi, ktorí využívali pri hodnotení stresu zaužívané metódy, a taktiež poukazujú na efekt izolácie od matky u rôznych vekových skupín kozliat.

Pod'akovanie

Štúdia bola finančne podporená projektom ITA VETUNI (projekt č. 2023ITA21).

Literatúra

BARTOLOMÉ, E., AZCONA, F., CANETE-ARANDA, M., PERDOMO-GONZÁLEZ, D.I., RIBES-PONS, J., TERÁN, E.M. Testing eye temperature assessed with infrared thermography to evaluate stress in meat goats raised in a semi-intensive farming system: a pilot study. *Archives Animal Breeding*, 2019. 62(1): 199-204.

MC MANUS, C., TANURE, B.C., PERIPOLLI, V., SEIXAS, L., FISHER, V., GABBI, M.A., MENEGASSI, O.R.S., STUMPF, T.M., KOLLING, J.G., DIAS, E., BATISTA, J., COSTA JR, G. Infrared thermography in animal production: an overview. *Computers and Electronics in Agriculture*, 2016, 123: 10-16.

ROMERO, G., RESPETO, I., MUELAS, R., BUESO-RÓDENAS, J., ROCA, A., DÍAZ, J.R. Within-day variation and effect of acute stress on plasma and milk cortisol in lactating goats. *Journal of Dairy Science*, 2015, 98(2): 832-839.

SIEBERT, K., LANGBEIM, J., SCHÖN, P. C., TUCHSCHERER, A., PUPPE, B. Degree of Social Isolation Affects Behavioural and Vocal Response Patterns in Dwarf Goats (*Capra Hircus*). *Applied Animal Behaviour Science*, 2011, 131(1-2): 53-62.

STEWART, M., WEBSTER, J. R. SCHAEFER, A. L., COOK, N. J., SCOTT, S. L. Infrared thermography as a non-invasive tool to study animal welfare. *Animal Welfare*, 2005, 14: 319–325.

TÖLÜ, C., GÖKTÜRK, S., SAVAS, T. Effects of housing environment on social isolation response, weaning stress, and immune reaction in goat kids. *Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences*, 2017, 41(5): 635-642.

VON WALTER, L.W., FORKMAN, B., HOGBERG, M., HYDBRING SANDBERG, E. The Effect of Mother Goat Presence during Rearing on Kids' Response to Isolation and to an Arena Test. *Animals*, 2021, 11(2): 575.

Kontaktná adresa: Kotianová Lucia, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21279@vfu.cz

Vliv délky praxe canisterapeutických psů na zvládání stresu – pilotní studie

The effect of the length of practice of therapy dogs on coping with stress - a pilot study

Vacuška Dominik, Vacušková Zdeňka, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Summary

Canine therapy interventions might be stressful for therapy dogs. There are many factors that influence stress levels in dogs including age of the dog and its experience with the therapeutic practice. Our preliminary research results confirm this hypothesis. By measuring changes in surface temperature with a thermal-imaging camera, the acute stress response was evaluated in two dogs of the same breed performing the same therapy work under the same conditions. The surface temperature of the inner corner of the eye of the younger female increased ($p = 0.0195$) during the therapeutic intervention, on the contrary, no change ($p > 0.05$) was found in the older more experienced female. A significant difference ($p = 0.0209$) was also found when comparing the surface temperatures of both females during their therapeutic work. In the younger one, the temperature was higher compared to the temperature measured in the older and more experienced female.

Keywords: *infrared thermography; animal-assisted interventions; dog; age*

Úvod

Organizací, které se zabývají canisterapií, a tedy interakcí mezi člověkem a zvířetem, celosvětově přibývá. Poskytované služby ve formě činností za pomoci zvířat či terapií za pomoci zvířat se nadále globálně rozšiřují (Palley et al., 2010). Psi jsou díky své relativní trénovatelnosti, předvídatelnému chování a dostupnosti běžně využíváni jako terapeutická zvířata v mnoha různých typech terapeutických intervencí (Glenk, 2017). Výzkumů dopadu canisterapeutických intervencí na využívaná zvířata nebylo dosud provedeno mnoho, a to i přes značný stresový potenciál (McCullough et al., 2018). Jednou z potenciálních neinvazivních metod ke zkoumání stresových reakcí u psů je využití termografie, tedy měření změn povrchové teploty zvířat (Travain et al., 2015). Během akutní stresové reakce dochází vlivem vazodilatace cév ke zvýšení povrchové teploty (Alvarado et al., 2022). Hlavní výhodou hodnocení stresu pomocí zaznamenávání zvířetem vyzařovaného infračerveného záření termokamerou spočívá právě v bezkontaktním způsobu měření. Díky tomu lze eliminovat vliv manipulace se zvířetem na měřené hodnoty. Měření však mohou ovlivnit jiné faktory, mezi které patří zejména teplota prostředí, přímé zdroje tepla, proudění vzduchu či vlhkost (Travain and Valsecchi, 2021). Změny povrchové teploty pak lze nejlépe snímat zejména v oblasti oka nebo ucha (Zanghi, 2016). Hodnocení stresu psů je žádoucí doplnit o behaviorální kontext. Bez něj bývá totiž obtížné vyvodit závěr, zda zvýšené hodnoty indikují distres nebo eustres (Edgar et al., 2012). Chováním spojeným se stresem bývá zvýšená lokomotorická aktivita, zdvihání tlapek, snížení těla, olizování, zívání, uhýbání pohledem či takzvané velrybí oko (Beerda et al., 2000). Předchozí výzkumy prokázaly, že vliv na behaviorální projevy stresu u psů má věk a zkušenosti využívaných psů (King et al., 2011) a také nové prostředí či nově vzniklé situace (Ng et al., 2014). Trénování psi využívaní v praxi pro canisterapii často nevykazují během opakovaných intervencí významné známky stresu (Glenk et al., 2014). Stresová odpověď každého psa tedy závisí na kombinaci individuálního vnímání stimulu a dalších individuálních faktorů, včetně genetické výbavy, povahy a dřívějších zkušeností (Haubenhofner and Kirchengast, 2007). Hladinu akutního stresu mohou ovlivňovat i jiné faktory. Jako takové bývají uváděny stísněné prostory, vysoká teplota prostředí a také nevyzpytatelné chování malých dětí (Marinelli et al., 2009). Popisován je také vliv únavy pracujícího jedince a také takzvaný syndrom vyhoření

terapeutického psa (Iannuzzi and Rowan, 1991). Cílem studie bylo zhodnotit vliv stáří a délky pracovní praxe na změny povrchové teploty a behaviorální projevy jako ukazatelů akutního stresu canisterapeutických psů během jejich terapeutické praxe.

Materiál a metodika

Měření povrchové teploty na vnitřním koutku oka bylo provedeno u dvou fen plemene zlatý retrívr po aklimatizaci zvířat v prostředí. Obě feny vykonávají canisterapeutickou praxi, mladší z fen ve stáří 3 roky má praxi půl roku, starší fena ve věku 9 let vykonává činnost již 7 let. Měření bylo provedeno u obou fen během běžné praxe v domově seniorů ve stejnou dobu ve stejné místnosti při interakci s totožnou osobou. V pokojích domova seniorů byla udržovaná teplota 25,2 °C při současné vlhkosti 47,7 %. Každá z fen byla opakovaně snímána termokamerou testo 890-2 (Testo SE & Co. KGaA, Německo) s nastavenou emisivitou 0,97 v pokoji pacienta před interakcí s pacientem na lůžku a následně také během ní. Pro kompletnější posouzení úrovně a zvládnutí stresu bylo měření teploty doplněno pozorováním behaviorálních projevů obou fen. Na místě byly v průběhu intervence pořízeny videozáznamy, ze kterých byly následně pomocí etologického softwaru zaznamenány a hodnoceny četnosti jednotlivých prvků chování zahrnující rovněž konejšivé signály psů. Naměřené teploty a četnosti prvků chování byly následně statisticky vyhodnoceny v programu Unistat for Excel s využitím Studentova t-testu, respektive X^2 testu.

Výsledky a diskuze

Průměrná naměřená povrchová teplota vnitřního koutku oka před interakcí s pacientem byla 36,83 °C u mladší z fen a 37,5 °C u starší feny. Mezi zmíněnými hodnotami nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ($p > 0,05$). Během interakce psů s pacientem na lůžku byla u mladší feny naměřena průměrná hodnota 38,28 °C, u starší 37,8 °C. Zvýšení teploty u psů může být zapříčiněno mnoha faktory zahrnujícími teplotu v prostoru lůžka či začátek přímé interakce s pacientem (Ng et al., 2014; Travain and Valsecchi, 2021). Avšak zatímco u mladší feny byl nárůst povrchové teploty statisticky významný ($p = 0,0195$), v případě zkušenější feny k významnému zvýšení teploty nedošlo ($p = 0,4296$). Dle těchto rozdílů zaznamenaných v totožné situaci a za stejných podmínek a působících faktorů lze předpokládat, že důležitou roli zastává právě schopnost zvířat vypořádat se s danou stresovou situací. Rozdílný věk a zkušenosti obou fen by tak mohly mít na zvládnutí stresu nezanedbatelný vliv (King et al., 2011). Je však nutné mít na paměti také vliv individuálních faktorů, jakým je například povaha každé feny (Haubenhofner and Kirchengast, 2007). Na rozdíl od nevýznamného rozdílu povrchových teplot fen před intervencí byl v hodnotách zjištěných během výkonu práce na lůžku mezi mladší a starší fenou rozdíl statisticky významný ($p = 0,0209$). Může tedy hrát roli vyšší míra zkušeností a návyku na konkrétní situace prováděné v canisterapeutické praxi u starší a zkušenější z fen (King et al., 2011; Ng et al., 2014). Vyšší naměřená povrchová teplota u méně zkušené feny současně korespondovala s častějšími behaviorálními projevy stresu. Fena s delší praxí nevykazovala stresové prvky chování v takové míře, je tedy možné, že po opakování intervencí jsou výskyty takového chování méně časté (Glenk et al., 2014). Na rozdíl od výsledků měření teploty však nebyl výskyt prvků chování radících se mezi projevy stresu v porovnání se zkušenější fenou statisticky významný ($p > 0,05$).

Závěr

Canisterapeutickou praxi lze považovat za činnost se stresovým potenciálem pro pracovní psy. První výsledky naší studie naznačují, že významnou roli ve zvládnutí stresu u psů využívaných v canisterapii mohou hrát věk a délka praxe. Lze předpokládat, že vhodný trénink a návyk na terapeutické činnosti vede k redukci stresu u canisterapeutických psů.

Literatura

ALVARADO, A. C., BURNES, J. M., MEDINA, P. M., AVALOS, I. H., OLIVA, A. D., GARCÍA, K. L., PRADO, J. G., ROJAS, D. M. Thermal and circulatory changes in diverse body regions in dogs and cats evaluated by infrared thermography. *Animals*, 2022, 12: 789.

BEERDA, B., SCHILDER, M. B. H., VAN HOOFF, J. A. R. A. M., DE VRIES, H. W., MOL, J. A. Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs. *Animal Welfare*, 2000, 9: 49-62.

EDGAR, J. L., NICOL, C. J., CLARK, C. C. A., PAUL, E. S. Measuring empathic responses in animals. *Applied Animal Behaviour Science*, 2012, 138: 182-193.

GLENK, L. M., KOTHGASSNER, O. D., STETINA, B. U., PALME, R., KEPPLINGER, B., BARAN, H. Salivary cortisol and behavior in therapy dogs during animal-assisted interventions: A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 2014, 9: 98-106.

GLENK, L. M. Current perspectives on therapy dog welfare in animal-assisted interventions. *Animals*, 2017, 7: 7.

HAUBENHOFER, D. K., KIRCHENGAST, S. Dog handlers' and dogs' emotional and cortisol secretion responses associated with animal-assisted therapy sessions. *Society & Animals*, 2007, 15: 127-150.

IANNUZZI, D., ROWAN, A. N. Ethical issues in animal-assisted therapy programs. *Anthrozoos*, 1991, 4: 154.

KING, C., WATTERS, J., MUNGRE, S. Effect of a time-out session with working animal-assisted therapy dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 2011, 6: 232-238.

MARINELLI, L., NORMANDO, S., SILIPRANDI, C., SALVADORETTI, M., MONGILLO, P. Dog assisted interventions in a specialized centre and potential concerns for animal welfare. *Veterinary Research Communications*, 2009, 33: 93-95.

MCCULLOUGH, A., JENKINS, M. A., REUHRDANZ, A., GILMER, M. J., OLSON, J., PAWAR, A., HOLLEY, L., SIERRA-RIVERA, S., LINDER, D. E., PICHETTE, D., GROSSMAN, N. J., HELLMAN, C., GUÉRIN, N. A., O'HAIRE, M. E. Physiological and behavioral effects of animal-assisted interventions on therapy dogs in pediatric oncology settings. *Applied Animal Behaviour Science*, 2018, 200: 86-95.

NG, Z. Y., PIERCE, B. J., OTTO, C. M., BUECHNER-MAXWELL, V. A., SIRACUSA, C., WERRE, S. R. The effect of dog-human interaction on cortisol and behavior in registered animal-assisted activity dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 2014, 159: 69-81.

PALLEY, L. S., O'ROURKE, P. P., NIEMI, S. Mainstreaming animal-assisted therapy. *ILAR Journal*, 2010, 51: 199-207.

TRAVAIN, T., COLOMBO, E. S., HEINZL, E., BELLUCCI, D., PREVIDE, E. P., VALSECCHI, P. Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (*Canis familiaris*) – A pilot study. *Journal of Veterinary Behavior*, 2015, 10: 17-23.

TRAVAIN, T., VALSECCHI, P. Infrared thermography in the study of animals' emotional responses: Critical review. *Animals*, 2021, 11: 2510.

ZANGHI, B. M. Eye and ear temperature using infrared thermography are related to rectal temperature in dogs at rest or with exercise. *Frontiers in Veterinary Science*, 2016, 3: 111.

Kontaktní adresa: Vacuška Dominik, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22345@vfu.cz

Využití enrichmentu v útulcích pro psy

Use of enrichment in dog shelters

Vacušková Zdeňka, Vacuška Dominik, Voslářová Eva, Večerek Vladimír

Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita Brno

Summary

Being in a shelter is often stressful for dogs. It can lead to increased levels of their excitability, cause behavioral problems and result in an impaired welfare of shelter dogs. Enrichment can be used to improve the quality of their life. To achieve that, enrichment must be designed to meet the ethological and psychological needs of the animals. Only then it would stimulate natural behavior, improve animal well-being and prevent the development of stereotyped behavior. However, enrichment must also be suitable for a specific shelter environment and housing method. This review focuses on the use of enrichment in dog shelters, as well as its impact on the animals.

Keywords: *welfare; environmental enrichment; behavior; dogs*

Úvod

Pobyt v útulku je pro psy často stresující, což může vést ke zvýšené úrovni jejich vzrušivosti a může mít za následek snížení welfare psů umístěných v útulku a zapříčinit tak problémy s chováním. Pro zlepšení kvality jejich života může být využito, stejně jako v jiných chovech zvířat, obohacení prostředí neboli enrichment. Enrichment musí být navržen tak, aby vyhovoval etologickým a psychologickým potřebám zvířat. Díky tomu stimuluje přirozené chování, zlepšuje pohodu zvířat a zabraňuje rozvoji stereotypního chování, zároveň však musí být vhodný pro konkrétní prostředí a způsob chovu.

Cílem tohoto přehledového článku bylo popsat možnosti využití enrichmentu v útlcích pro psy a také jejich dopad na zvířata.

Environmentální enrichment v útlcích pro psy

Environmentální enrichment neboli obohacení prostředí lze obecně popsat jako techniku určenou ke zvýšení kvality života zvířat poskytováním dodatečných a dočasných environmentálních podnětů k podpoře psychické a fyzické pohody (Hunt et al., 2022). Obohacení prostředí tedy může být účinným způsobem, jak zlepšit pohodu zvířat zmírněním účinků stresu způsobeného podmínkami v útulku (Tuozzi et al., 2021). Ve většině útlků jsou psi umístěni v oddělených kotcích, což jim neposkytuje téměř žádnou interakci s lidmi a jinými psy (Perry et al., 2020). Kromě toho jsou psi negativně ovlivňováni stresory, kterým jsou v útulku vystaveni. Jedná se, mimo jiné, o hluk, neznámé osoby, nepředvídatelnost a narušení rutiny (Epstein et al., 2021). Bylo zjištěno, že psi v útlcích mají vyšší hladiny kortizolu, stresového hormonu, než psi žijící v domácnostech (Gunter et al., 2019). Existují také další metody hodnocení pohody zvířat, jednou z využívaných metod je pozorování chování zvířat. Chování může být ukazatelem preferencí daného zvířete, může indikovat emoční stavy a zaměstnanci útulku mohou na základě chování určit úroveň stresu zvířete (Dare and Strasser, 2023).

Obohacení prostředí v útlcích pro zvířata lze zajistit různými způsoby. Obohacování životního prostředí lze rozdělit na tzv. živé a neživé obohacení (Dare and Strasser, 2023). Do živého obohacení řadíme kontakt s lidmi a ostatními zvířaty. Neživé obohacení zahrnuje např. změnu fyzického prostředí poskytnutím předmětů na hraní, nebo smyslové obohacení poskytnutím sluchové a čichové stimulace (Wells, 2004a). Dare and Strasser (2023) upozorňují na možnost

rozdělení kategorií enrichmentu na základě toho, zda předmět zvíře uklidňuje nebo naopak vzrušuje. Uklidňující obohacení by potom bylo účinnější u reaktivních psů často vykazujících negativní chování (skákání, vokalizace). Obohacení zapříčínující vzrušivost psa by naopak bylo prospěšnější u bojácných psů vyhledávajících úkryt.

Wells (2004b) uvádí, že životní podmínky psů umístěných v útulku mohou být mírně zlepšeny přidáním hraček do kotců, nicméně hračky je potřeba měnit, aby se podpořilo explorační chování zvířat a snížilo se navyknutí zvířete na hračku. Dle Sampaio et al. (2019) vede obohacování prostředí pomocí her a hraček ke snížení známek deprese a stereotypního chování u psů v útulcích, a tím ke zlepšení kvality života těchto zvířat. Amaya et al. (2020) ve studii o čichovém a sluchovém obohacení pomocí hudby, feromonových difuzérů a levandulí dospěli k podobným výsledkům. Bylo zjištěno, že využití feromonů psy uklidňuje, snižuje se jejich vokalizace a více času věnují odpočinku. Klasická hudba u psů snižovala stresem vyvolané behaviorální reakce. Muzikoterapie nicméně může pozitivně ovlivňovat i imunitní funkce a metabolismus (Yamasaki et al., 2012). Bylo prokázáno, že expozice klasické hudbě zvyšuje imunitní funkce a protinádorové reakce u myší a potkanů využívaných v laboratoři (Nunez et al., 2002) a imunitu a vývojovou stabilitu u nosnic (Davila et al., 2011). Dalším důležitým aspektem zkvalitňování života psů z útulku je lidský kontakt. Interakce s lidmi je důležitou součástí psí prosperity a spousta psů preferuje společnost lidí před ostatními psy (McGowan et al., 2018) a může vést ke kladnějším interakcím s budoucími majiteli, což může dopomoci úspěšné adopci (Marston and Bennett, 2003). Bostonská pobočka Massachusetts Society for the Prevention of Cruelty to Animals testovala program „Safewalk“, ve kterém vyškolila dobrovolníky v tom, jak mají psy venčit a pracovat na poslušnosti. Bylo zjištěno, že program pozitivně ovlivnil adopce především psů typu bull, kteří za normálních okolností hledají domov obtížněji (Bright and Hadden, 2017). Herron et al. (2014) ve své studii uvádějí zlepšení chování psů, kteří byli vystaveni komplexnímu obohacení prostředí – dvakrát denně trénink chování a hračka naplněná potravou. U psů zaznamenali uvolněnější držení těla, méně vokalizace a celkově klidnější chování psů.

Kromě pozitivního dopadu enrichmentu na samotná zvířata bylo prokázáno, že programy obohacování zahrnující trénink chování (poslušnost) zlepšují osvojitelnost psů (Luescher and Medlock, 2009). Tento pozitivní aspekt je v prostředí útulku nezbytný, neboť dlouhé pobyty v útulku byly korelovány se zhoršením chování a tím také potenciálně se zhoršeným welfare jedince (Wells et al., 2002). Také snížení vokalizace by mohlo mít kladný dopad na osvojování psů z útulku, neboť vokalizace byla jedním z behaviorálních problémů (společně s hyperaktivitou, nevhodným žvýkáním a vylučováním) uváděných majiteli jako důvod umístění psa do útulku (Marston and Bennett, 2003).

Závěr

Z výše uvedeného textu vyplývá, že využití obohacení prostředí v útulcích pro psy může vést nejen ke zkvalitnění života zvířat, ale může také pozitivně ovlivnit jejich chování a tím pomoci k úspěšné adopci.

Literatura

AMAYA, V., PATERSON, M., PHILLIPS, C. Effects of olfactory and auditory enrichment on behaviour in shelter dogs. *Animals*, 2020, vol. 10, s. 581-601.

BRIGHT, T.M., HADDEN, L. Safewalk: Improving enrichment and adoption rates for shelter dogs by changing human behavior. *Journal of Applied Animal Welfare Science*, 2017, vol. 20, no. 1, s. 95-105.

DAVILA, S.G., CAMPO, J.L., GIL, M.G., PRIETO, M.T., TORRES, O. Effects of auditory and physical enrichment on 3 measurements of fear and stress (tonic immobility duration, heterophil to

lymphocyte ratio and fluctuating asymmetry) in several breeds of layer chicks. *Poultry Science*, 2011, vol. 90, no. 11, s. 2459-2466.

DARE, P., STRASSER, R. Ruff morning? The use of environmental enrichment during an acute stressor in kennelled shelter dogs. *Animals*, 2023, vol. 19, no. 9.

EPSTEIN, J., DOWLING-GUYER, S., MCCOBB, E., GLOTZER, C., DODMAN, N.H. Addressing stress in dogs in shelter through a novel visual and auditory enrichment device. *Applied Animal Behaviour Science*, 2021, vol. 236.

GUNTER, L.M., FEUERBACHER, E.N., GILCHRIST, R.J., WYNNE, C.D.L. Evaluating the effects of a temporary fostering program on shelter dog welfare. *PeerJ*, 2019, vol. 7.

HERRON, M.E., KIRBY-MADDEN, T.M., LORD, L.K. Effects of environmental enrichment on the behavior of shelter dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2014, vol. 244, s. 687-692.

HUNT, R.L., WHITESIDE, H., PRANKEL, S. Effects of environmental enrichment of dog behaviour: Pilot study. *Animals*, 2022, vol. 12, no. 2.

LUESCHER, A.U., MEDLOCK, R.T. The effects of training and environmental alterations on adoption success of shelter dogs. *Applied Animal Behaviour Science* 2009, vol. 117, no. 1, s. 63-68.

MARSTON, L.C., BENNETT, P.C. Reforging the bond towards successful canine adoption. *Applied Animal Behaviour Science*, 2003, vol. 83, s. 227-245.

MCGOWAN, R.T.S., BOLTE, C., BARNETT, H.R., PEREZ-CAMARGO, G., MARTIN, F. Can you spare 15 min? The measurable positive impact of a 15-min petting session on shelter dog well-being. *Applied Animal Behaviour Science*, 2018, vol. 203, s. 42-54.

NUNEZ, M.J., MANA, P., LINARES, D., RIVEIRO, M.P., BALBOA, J., SUAREZ-QUINTANILLA, J., MARACCHI, M., MENDEZ, M.R., LOPEZ, J.M., FREIRE-GARABAL, M. Music, immunity and cancer. *Life Sciences*, 2002, vol. 71, no. 9, s. 1047-1057.

PERRY, P.J., SCARLETT, J.M., HOUP, K.A., ERB, H.N. A comparison of four environmental enrichments on adaptability of shelter dogs. *Journal of Veterinary Behavior*, 2020, vol. 35, s. 1-7.

SAMPAIO, R., MARTINS, Y.N.F., BARBOSA, F.M.S., FRANCO, C.I.Q., KOBAYASHI, M., TALIERI, I.C. Behavioral assessment of shelter dogs submitted to different methods of environmental enrichment. *Ciencia Rural* 2019, vol. 49, no. 1.

TUOZZI, A., ARHANT, CH., ANDERLE, K., BACKES, J., CORDS, C., MAGIERSKI, V., RAULT, J.L., WINDSCHNURER, I. Effects of human presence and voice on the behaviour of shelter dogs and cats: A preliminary study. *Animals*, 2021, vol. 11, no. 2.

WELLS, D.L., GRAHAM, L., HEPPEL, P.G. The influence of length of time in a rescue shelter on the behaviour of kennelled dogs. *Animal Welfare*, 2002, vol. 11, s. 317-325.

WELLS, D.L. A review of environmental enrichment for kennelled dogs, *Canis familiaris*. *Applied Animal Behaviour Science*, 2004a, vol. 85, s. 307-317.

WELLS, D.L. The influence of toys on the behaviour and welfare of kennelled dogs. *Animal Welfare*, 2004b, vol. 13, no. 3, s. 367-373.

YAMASAKI, A., BOOKER, A., KAPUR, V., TILT, A., NIESS, H., LILLEMÖE, K.D., WARSHAW, A.L., CONRAD, C. The impact of music on metabolism. *Nutrition*, 2012, vol. 28, s. 1075-1080.

Kontakní adresa: Vacušková Zdeňka, Mgr., Ústav ochrany a welfare zvířat a veřejného veterinárního lékařství, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22346@vfu.cz

ANALYSIS OF THE MAIN VIOLATIONS DETECTED BY THE STATE VETERINARY ADMINISTRATION IN THE AREA OF CATTLE WELFARE

¹Michaela Švestková

¹ Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Czech Republic

Summary

In the Czech Republic, cattle are the most common individually registered livestock. Increased demands on cattle performance must be supported by ensuring appropriate breeding conditions that directly affect animal welfare. The aim of this paper is to identify the main shortcomings found in the field of cattle welfare in the years 2016 – 2020 and to evaluate the trend of registered violations during the observed period. For the purposes of the analysis, data from the Central Veterinary Administration of the State Veterinary Administration were used, containing data from control records of violated control points from the period 2016 – 2020. For this paper, control points were divided into two main groups and nine subgroups according to focus. Based on the results, the most statistically significant ($P < 0.05$) violations were found in the area of administration and labeling of animals (484), provision of treatment (360), spatial conditions (256), nutrition and water intake (216) and animal hygiene conditions (211). The difference in the frequency of violations between the main control point groups “obligations of the breeder” (888) and “breeding conditions” (820) was not statistically significant ($P > 0.05$). The evaluation of the trend of violated control points did not show an increase or decrease in detected defects during the observed period.

Key words: inspection; animal protection; breeding; farm

Introduction

Most European Union (EU) legislation for the protection of farm animals is based on the minimum requirements for the conditions in which animals live, are transported or slaughtered. A good level of welfare is assumed to be achieved if these requirements are met. The fulfillment of the obligations of breeders within the framework of the prescribed European legislation for the protection of farm animals in farms is overseen by official inspections of individual EU member states (Veissier et al., 2021). In the Czech Republic, primarily the Ministry of Agriculture (MoA) and the State Veterinary Administration (SVA) deal with animal protection. Supervision over compliance with the obligations imposed on breeders is carried out by SVA through inspectors of regional veterinary administrations (RVA) (Ministry of Agriculture, 2023).

The aim of this paper is the identification of the main shortcomings in the field of cattle welfare, which were found on the basis of official controls of the SVA in the Czech Republic in the years 2016 – 2020. Another aim is to compile development trends in the frequency of violations during the observed period.

Materials and Methods

In order to analyze the main deficiencies detected during the partial welfare inspections of cattle in the years 2016 – 2020 in the Czech Republic, data from the results of these inspections obtained from the Central Veterinary Administration of the SVA were used. The inspections were carried out on “breeder's farm” type establishments in the presence of the breeder and an RVA inspector. A total of 40 specific control points (CPs) were examined (Table 1), which were used to assess environmental conditions, care, nutrition, staff and administration. For the purpose of this paper, the CPs were divided into two main groups and nine subgroups according

to the focus of each CP. The database contains records of a total of 131,899 CPs inspected, which include data on the year, number and specific CP violated.

The obtained data were processed in Microsoft Excel 2019. The chi-square test was used for statistical evaluation, also in Microsoft Excel 2019 to compare the frequencies of violated CPs within the main groups, subgroups and individual CPs, at a significance level of $P < 0.05$. Spearman's correlation coefficient (rSp) was used to evaluate the trend in the frequencies of violated CPs in the observed period of 2016 – 2020 within the main CP groups, in RStudio, at a significance level of $P < 0.05$.

Table 1: Control points for cattle welfare assessment - distribution.

main groups	subgroups	numerical designation	control points
breeding conditions	nutrition and water intake	1	feed and other substances
		2	feed, water and other substances
		3	feed, water and other substances - fresh water
		4	feed, water and other substances - calf - hemoglobin - iron
		5	feed, water and other substances - calf - colostrum
		6	feed, water and other substances - calf - constant access to feed
		7	feed, water and other substances - calf - fiber
	spatial conditions	8	buildings and stables - objects and housing
		9	buildings and stables - objects and housing - paddock
		10	spatial conditions
		11	spatial conditions - fattening cattle - breeding with horns x without horns
		12	freedom of movement
		13	freedom of movement - calf - muzzle
		14	freedom of movement - calf - binding
	equipment requirements	15	automatic / mechanical devices
		16	automatic / mechanical devices - spare source
		17	buildings and stables - interior equipment
		18	buildings and stables - interior equipment - cows and heifers - birth aids
		19	buildings and stables - interior equipment - cows and heifers milk production - milking
		20	buildings and stables - floors
		21	manipulable material
animal hygiene conditions	22	buildings and stables - animal hygiene	
	23	buildings and stables - animal hygiene - noise	
	24	lighting	
	25	buildings and stables - disinfection	
	26	buildings and stables - waste and sanitation	
prohibited methods of breeding	27	other actions leading to suffering	
	28	promoting abuse	
obligations of the breeder	administration and labeling of animals	29	notification of activity
		30	approval and registration
		31	record keeping
		32	registration of animals

	33	labeling animals
visitation	34	inspection - daily check, clinical condition of animals, isolation
provision of treatment	35	personnel
	36	breeding method - animal care
	37	breeding method - breeding
	38	breeding method - prevention and vaccination
	39	breeding method - animal movements
unauthorized interventions	40	unauthorized interventions

Results and Discussion

In the evaluation of the CP subgroups (Fig. 1), the highest frequency of violations was found to be statistically significant ($P < 0.05$) for “administration and labeling of animals” (484). This is followed by the subgroups “provision of treatment” (360), “spatial conditions” (256), “feeding and water intake” (216) and “animal hygiene conditions” (211). For the other subgroups, fewer than 109 violations of the CP were found. According to research by Escobar and Demeritt (2017), the same results were also achieved in England under cross-compliance checks. Here, the most frequent violations were detected in record keeping. The breeders interviewed by them considered record keeping burdensome and substantially disconnected from normal breeding practices related to animal care and the pursuit of animal welfare.

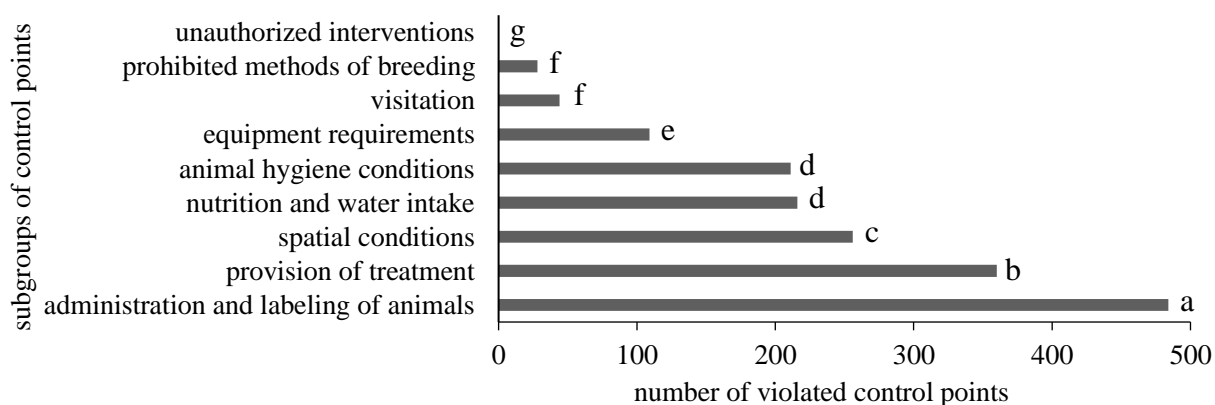


Fig. 1: Number of violations by subgroups of control points in 2016 – 2020. ^{a-g} values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

A comparison of the frequency of violations within the main CP groups revealed 888 violations in the group “obligations of the breeder” and 820 violations in the group “breeding conditions”. There was no statistically significant difference between the groups ($P > 0.05$).

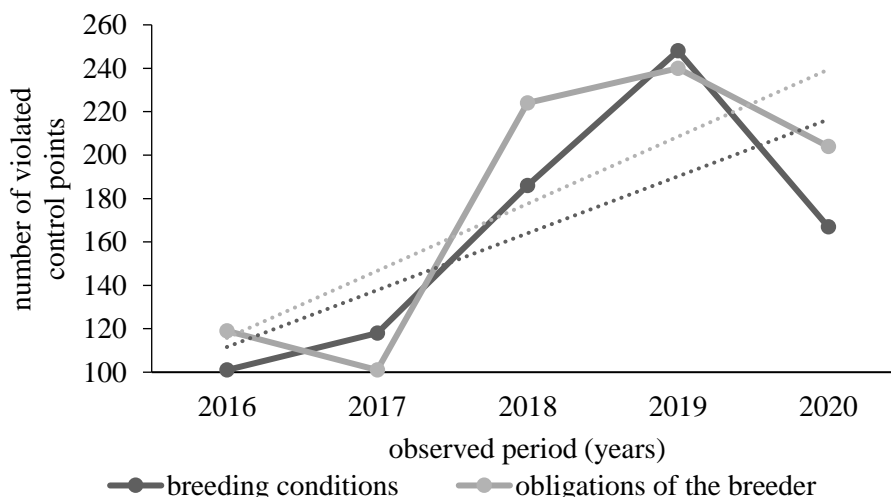


Fig. 2: Developmental trends in the frequency of violations of the main groups of control points during the years 2016 – 2020.

Fig. 2 shows an indication of an increasing trend in the number of violations for both main CP groups in the observed period of 2016 – 2020, but this increase was not statistically significant in either group (“breeding conditions” $rSp = 0.700$; $P = 0.233$; “obligations of the breeder” $rSp = 0.600$; $P = 0.350$). The results of the evaluation of the trend in the frequency of violations within CP subgroups also showed no increasing or decreasing trend (Table 2), the number of violations did not change during the observed period ($P > 0.05$). A positive finding is that despite the increased EU legal requirements and therefore the tightening of official controls (Immink et al., 2013; Vanhonacker and Verbeke, 2014; Gocsik et al., 2015), there was no increase in detected defects in the farms.

Table 2: Evaluation of the trend of the frequency of violations for subgroups of control points in the years 2016 – 2020 using the Spearman correlation coefficient (rSp).

subgroups of control points	rSp	P
nutrition and water intake	0.6669	0.2189
spatial conditions	0.5643	0.3217
equipment requirements	0.7000	0.2333
animal hygiene conditions	0.9000	0.0833
prohibited methods of breeding	0	1.0000
administration and labeling of animals	0.8000	0.1333
visitation	0.3000	0.6833
provision of treatment	0.6000	0.3500
unauthorized interventions	0	-

The number of violations of the individual CPs is shown in Fig. 3. Statistically significant ($P < 0.05$) highest number of violations was found for the CPs “breeding method - animal care” (223) and “feed, water and other substances” (204). According to research by Åkerfeldt et al. (2021) proper animal care is essential to maintain herd health and keep production at the required level. For example, the most common and important diseases observed in organic dairy cows are mastitis, infertility, metabolic disorders and lameness. In recent years, the incidence of some diseases and other problems related to the requirements for high cattle production in intensive farms has been increasing. This is due to the physiological and behavioral inability of the animals to adapt to the conditions of intensive breeding (Orihuela, 2021). Faucitano et al.

(2022) state that the welfare level of cattle has a direct impact on their performance, and therefore on the resulting production.

Cozzi et al. (2009) further clarify that, in the context of nutrition, poor cattle welfare is mainly caused by overcrowding, inadequate feed distribution and insufficient space in the manger. In addition, animals reared in intensive fattening for the purpose of rapid growth predispose to the development of metabolic and joint diseases (Compiani et al., 2014).

Other CPs with high frequencies of violations were “labeling animals” (184) and “registration of animals” (182), followed by “buildings and housing - animal hygiene” (135), “buildings and stables - objects and housing” (120) and “breeding method - prevention and vaccination” (108). For other CPs, the numbers of violations were less than 98. Macitelli et al. (2020) states that the main requirements for cattle housing are clean, high and dry spaces. Excessive mud is a problem that creates chronic stress and thus affects health, feed conversion and weight gain.

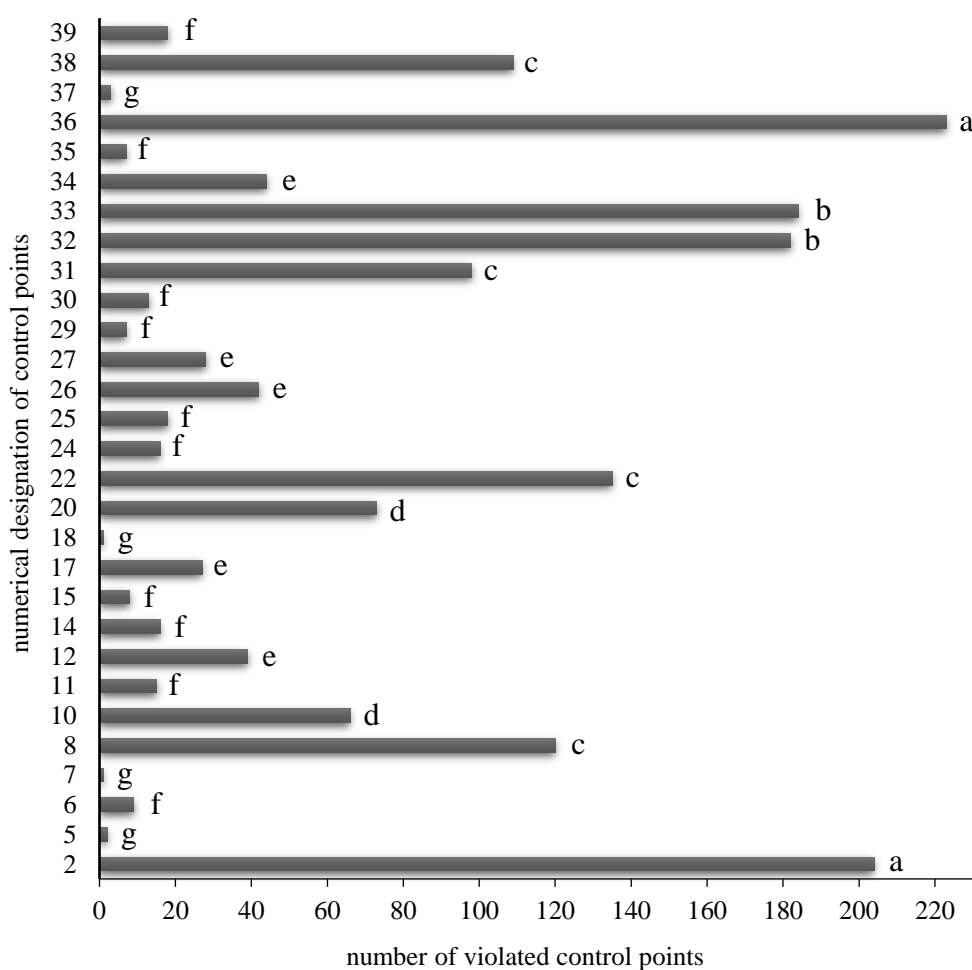


Fig. 3: Number of violations of individual control points in 2016 – 2020 (numerical designation of control points according to table 1).

^{a-g} values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$)

Conclusion

Based on the results of this paper, the most frequent violations in the area of cattle welfare within the administration were found, namely in the registration of animals and their labeling according to the legislation in force, as well as the provision of proper care for animals, in particular compliance with prevention and vaccination and the provision of breeding conditions

in terms of housing, nutrition and animal hygiene. The results of the evaluation of trends in the frequency of violations during the years 2016 – 2020 can be considered positive, as no upward trend in the number of detected defects was detected, despite the continuously tightening legislative requirements for the welfare of farm animals.

Compliance with cattle welfare obligations should be a priority for breeders and at the same time an integral part of the entire breeding management due to its direct impact on performance, overall production and therefore profitability of the breeding operation.

Acknowledgements

I would like to thank Mr. Mgr. et Ing. Zdeněk Truhlář, Dr. h. c. from the Central Veterinary Administration of the State Veterinary Administration for his consent to provide the results of the control activities of the SVA CR and also to Mrs. Ing. Lenka Richtrová for her cooperation in generating the database. At the same time, I would also like to thank my Institute of Animal Protection and Welfare and Public Veterinary Medicine for its support in the effort to obtain these data.

References

- ÅKERFELDT, M.P.; GUNNARSSON, S.; BERNES, G.; BLANCO-PENEDO, I. Health and welfare in organic livestock production systems – and systematic mapping of current knowledge. *Organic Agriculture* [online]. 2021, **11**(1), 105-132 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1879-4238. Available from: doi:10.1007/s13165-020-00334-y
- COMPIANI, R.; ROSSI, C.; BALDI, G.; DESROCHERS, A. Dealing with lameness in Italian beef cattle rearing. *Large Anim. Rev.*, 2014, **20**: 239-247.
- COZZI, G.; BRSCIC, M.; GOTTARDO, F. Main critical factors affecting the welfare of beef cattle and veal calves raised under intensive rearing systems in Italy: a review. *Italian Journal of Animal Science* [online]. 2016, **8**(sup1), 67-80 [cit. 2023-04-30]. ISSN 1828-051X. Available from: doi:10.4081/ijas.2009.s1.67
- ESCOBAR, M.P.; DEMERITT, D. Paperwork and the decoupling of audit and animal welfare: The challenges of materiality for better regulation. *Environment and Planning C: Politics and Space* [online]. 2017, **35**(1), 169-190 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2399-6544. Available from: doi:10.1177/0263774X16646771
- FAUCITANO, L.; MARTELLI, G.; NANNONI, E.; MANTECA X. Fundamentals of animal welfare in meat animals and consumers attitudes to animal welfare. *New Aspects of Meat Quality* [online]. 2022, pp. 667-703 [cit. 2023-05-02]. ISBN 9780323858793. Available from: doi:10.1016/B978-0-323-85879-3.00021-0
- GOCSIK, É.; OUDE LANSINK, A.G.J.M.; VOERMANS, G.; SAATKAMP, H.W. Economic feasibility of animal welfare improvements in Dutch intensive livestock production: A comparison between broiler, laying hen, and fattening pigs sectors. *Livestock Science* [online]. 2015, **182**, 38-53 [cit. 2023-05-02]. ISSN 18711413. Available from: doi:10.1016/j.livsci.2015.10.015
- IMMINK, V.M.; REINDERS, M.J.; VAN TULDER, R.J.M.; VAN TRIJP, J.C.M. The livestock sector and its stakeholders in the search to meet the animal welfare requirements of society. *Journal on Chain and Network Science* [online]. 2013, **13**(2), 151-160 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1569-1829. Available from: doi:10.3920/JCNS2013.1005
- MACITELLI, F.; BRAGA, J.S.; GELLATLY, D.; PARANHOS DA COSTA, M.J.R. Reduced space in outdoor feedlot impacts beef cattle welfare. *Animals* [online]. 2020, **14**(12), 2588-2597 [cit. 2023-04-30]. ISSN 17517311. Available from: doi:10.1017/S1751731120001652
- ORIHUELA, A. Review: Management of livestock behavior to improve welfare and production. *Animals* [online]. 2021, **15** [cit. 2023-04-28]. ISSN 17517311. Available from: doi:10.1016/j.animal.2021.100290

Animal protection system in the Czech Republic. Animal Protection [online]. Prague: Ministry of Agriculture, 2023 [cit. 2023-04-28]. Available from: <http://www.eagri.cz/public/web/mze/ochrana-zvirat/system-ochrany-zvirat-v-cr/>

VANHONACKER, F.; VERBEKE, W. Public and Consumer Police for Higher Welfare Food Products: Challenges and Opportunities. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics* [online]. 2014, **27**(1), 153-171 [cit. 2023-05-02]. ISSN 1187-7863. Available from: doi:10.1007/s10806-013-9479-2

VEISSIER, I.; MIELE, M.; MOUNIER, L. Animal welfare official inspections: farmers and inspectors shared concerns. *Animals* [online]. 2021, **15**(1) [cit. 2023-05-02]. ISSN 17517311. Available from: doi:10.1016/j.animal.2020.100038

Contact address: Michaela Švestková, Ing., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20341@vfu.cz

SEKCE 4

Veřejné a soudní veterinářství a toxikologie

Detection of Hypoglycin A in Different plants of Acer Genus

Tereza Novotná¹, Petr Jahn², Eva Šamonilová², Michaela Kabešová¹, Sabina Pospíšilová¹, Petr Maršálek¹

¹Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno

²Equine Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary Sciences Brno

Summary

Hypoglycin A (HGA) is an amino acid occurring in the Sapindaceae family of plants, especially in *Acer* genus. In recent years poisonings of grazing animals by HGA have been increasing. *Acer* genus includes more than 120 species, but for now only two of them, sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) and Boxelder maple (*Acer negundo*) have been reported as sources of the intoxication. The aim of this study was to determine HGA by ultra high performance liquid chromatography – heated electrospray ionization - tandem mass spectrometry (LC/MS) in other species of *Acer* genus grown as ornamental trees in European gardens and parks. In five of ten analysed species HGA was detected. It was found in Japanese maple (*Acer palmatum*), sugar maple (*Acer saccharum*), trident maple (*Acer buergerianum*), paperbark maple (*Acer griseum*) and Himalayan maple (*Acer oblongum*). Although poisoning by these trees has not been described so far, with the increasing numbers of animals kept in urban areas the risk of intoxication by ornamental trees exists.

Keywords: Hypoglycin A; *Acer*; ornamental trees

Introduction

Hypoglycin A (HGA) (L-methylencyclopropylalanine) is a non-proteinogenic amino acid with unknown biological functions occurring in the *Sapindaceae* family of plants. Among them are some *Acer* genus plants whose ingestion is connected with a disease called atypical myopathy (AM) or seasonal pasture myopathy (SPM). The disease was also described in Père David's deer (*Elaphurus Davidianus*) (Bunert et al., 2018), two-humped camel (*Camelus bactrianus*) (Hirz et al., 2021) and gnu (*Connochaetes taurinus taurinus*) kept in European zoological gardens (Renaud et al., 2022). To date, all cases of AM/SPM have been associated with sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) and boxelder maple (*Acer negundo*). The substance was also detected in some other maple species, but without reported poisoning (Fowden and Pratt, 1973). In field maple (*Acer campestre*) and Norway maple (*Acer platanoides*), the trees common in Central Europe, HGA was not found (Fowden and Pratt, 1973; Westermann et al., 2016; González Medina et al., 2018; Votion et al., 2019; El-Khatib et al., 2022). The aim of this study was screening for presence of HGA in other species of *Acer* genus which are grown as ornamental trees. All these maples occur in Europe as a host species predominantly in gardens and parks, but due to the expansion of horse breeding in cities and occurrence of these trees in zoological gardens there is a risk of animal poisoning by some of these species growing nearby (Renaud et al., 2022).

Material and Methods

Plant material of certain *Acer* genus plants was collected, total of 10 species were analysed for HGA (Table 1). The samples were put into resealable plastic bags, labeled and stored at -20°C until analysis. The determination of HGA was conducted using ultra high performance liquid chromatography – heated electrospray ionization - tandem mass spectrometry (LC/MS). A whole plant material of each sample was mechanically ground and homogenized using feed homogenizer (30 s, 3000 rpm). After homogenization, sample was accurately weighed (0.5 g) into the conical flask, methanol was added (25 mL) and sample was extracted using laboratory

shaker (60 min, 160 rpm). After extraction, sample was filtered through a paper filter (15 µm, 15s KA-1 filter paper; Pulp & Paper Mills Pernštejn, Czech Republic), then through a 0.22 µm nylon filter (Millipore, USA) and used for LC/MS analysis.

Table 1. Collected samples of plant material

		samaras	leaves
Sugar maple	<i>(Acer saccharum)</i>	3	
Japanese maple	<i>(Acer palmatum)</i>	4	5
Fullmoon maple	<i>(Acer japonicum)</i>	1	
Tatarian maple	<i>(Acer tataricum)</i>	6	3
Red maple	<i>(Acer rubrum)</i>	3	1
Trident maple	<i>(Acer buergerianum)</i>	4	
Himalayan maple	<i>(Acer oblongum)</i>	1	
Chinese maple	<i>(Acer pseudosieboldianum)</i>	1	
Paperbark maple	<i>(Acer griseum)</i>	1	
Manchurian striped maple	<i>(Acer tegmentosum)</i>	1	

Results and Discussion

In five of ten tree species analysed, HGA was present (Table 2). It was detected in samaras of Japanese maple, sugar maple, trident maple, paperbark maple and Himalayan maple. It was also found in leaves of Japanese maple. We can confirm that HGA is not present in samaras and leaves of red maple, Tatarian maple and Manchurian striped maple, as previous studies report (Fowden and Pratt, 1973; Westermann et al., 2016; El-Khatib et al., 2022). HGA was also not detected in samaras of Chinese maple. To the best of our knowledge, this is the first analysis of HGA in this species. In fullmoon maple samaras, HGA was not detected, although it was found in this species before (Fowden and Pratt, 1973). Because we had only limited number of samples available, it is possible that there was HGA present under limit of detection. For now, this species should be considered potentially harmful.

Table 2: Hypoglycin A in ornamental maples

species	scientific name	samaras	leaves
Red maple	<i>(Acer rubrum)</i>	0/3	0/1
Japanese maple	<i>(Acer palmatum)</i>	1/4 (3.67)	3/5 (3.48 – 11.8)
Fullmoon maple	<i>(Acer japonicum)</i>	0/1	
Manchurian striped maple	<i>(Acer tegmentosum)</i>	0/1	
Trident maple	<i>(Acer buergerianum)</i>	2/4 (2.07; 3.02)	
Sugar maple	<i>(Acer saccharum)</i>	3/3 (72.7 – 135)	
Chinese maple	<i>(Acer pseudosieboldianum)</i>	0/1	
Tatarian maple	<i>(Acer tataricum)</i>	0/6	0/3
Himalayan maple	<i>(Acer oblongum)</i>	1/1 (63.8)	
Paperbark maple	<i>(Acer griseum)</i>	1/1 (2.21)	

Conclusion

Except of sycamore maple and boxelder maple, HGA was found in other *Acer* species, namely sugar maple, Japanese maple, trident maple, paperbark maple and Himalayan maple. Although poisoning of animals by these maples has not been reported, they can pose a risk for animals grazing in their vicinity, especially in those kept in urban areas.

Acknowledgement

This work was funded by IGA VETUNI Brno 204/2021/FVHE.

Literature

BUNERT, Carolin, Sandra LANGER, Dominique M VOTION, François BOEMER, Anja MÜLLER, Kerstin TERNES a Annette LIESEGANG, 2018. Atypical myopathy in Père David's deer (*Elaphurus davidianus*) associated with ingestion of hypoglycin A. *Journal of Animal Science*. 96(8), 3537-3547. ISSN 0021-8812. Available at: doi:10.1093/jas/sky200

EL-KHATIB, Ahmed H., Anna Maria ENGEL a Stefan WEIGEL, 2022. Co-Occurrence of Hypoglycin A and Hypoglycin B in Sycamore and Box Elder Maple Proved by LC-MS/MS and LC-HR-MS. *Toxins*. 14(9). ISSN 2072-6651. Available at: doi:10.3390/toxins14090608

FOWDEN, Leslie a Helen M. PRATT, 1973. Cyclopropylamino acids of the genus *Acer*: Distribution and biosynthesis. *Phytochemistry*. 12(7), 1677-1681. ISSN 00319422. Available at: doi:10.1016/0031-9422(73)80387-5

GONZÁLEZ MEDINA, Sonia, Carolyne HYDE, Imogen LOVERA, Richard J. PIERCY a David A. LIGHTFOOT, 2018. Detection of equine atypical myopathy-associated hypoglycin A in plant material: Optimisation and validation of a novel LC-MS based method without derivatisation. *PLOS ONE*. 13(7). ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0199521

HIRZ, Manuela, Henrike A. GREGERSEN, Johannes SANDER, Dominique M. VOTION, Anne SCHÄNZER, Kernt KÖHLER a Christiane HERDEN, 2021. Atypical myopathy in 2 Bactrian camels. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 33(5), 961-965. ISSN 1040-6387. Available at: doi:10.1177/10406387211020721

RENAUD, Benoît, Caroline-Julia KRUSE, Anne-Christine FRANÇOIS, et al., 2022. *Acer pseudoplatanus*: A Potential Risk of Poisoning for Several Herbivore Species. *Toxins*. 14(8). ISSN 2072-6651. Available at: doi:10.3390/toxins14080512

VOTION, Dominique M, Jean Adelite HABYARIMANA, Marie-Louise SCIPPO, Eric A RICHARD, Christel MARCILLAUD-PITEL, Michel ERPICUM a Pascal GUSTIN, 2019. Potential new sources of hypoglycin A poisoning for equids kept at pasture in spring: a field pilot study. *Veterinary Record*. 184(24), 740-740. ISSN 00424900. Dostupné z: doi:10.1136/vr.104424

WESTERMANN, C.M., R. VAN LEEUWEN, L.W.D. VAN RAAMSDONK a H.G.J. MOL, 2016. Hypoglycin A Concentrations in Maple Tree Species in the Netherlands and the Occurrence of Atypical Myopathy in Horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 30(3), 880-884. ISSN 0891-6640. Available at: doi:10.1111/jvim.13927

Contact address: Tereza Novotná, MVDr., Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Czech Republic, H20332@vfu.cz

SEKCE 5

Veterinární ekologie a choroby volně žijících zvířat

Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli* ST131 humánního, veterinárního a environmentálního původu z České republiky

Comparative genomics of *Escherichia coli* ST131 isolates of human, veterinary and environmental origin from the Czech Republic

^{1,2}Růžičková Michaela, ²Jamborová Ivana, ^{1,2}Nohejl Tomáš, ²Sukkar Iva, ²Palkovičová Jana, ¹Papoušek Ivo, ³Cummins Max, ³Djordjevic Steven, ^{1,2,4,5}Dolejšká Monika

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

²CEITEC, Veterinární univerzita, Brno

³Australian Institute for Microbiology and Infection, University of Technology Sydney, Australia

⁴Ústav laboratorní medicíny, Fakultní nemocnice Brno

⁵Biomedicínské centrum, Karlova univerzita, Plzeň

Summary

Escherichia coli of sequence type ST131 is a multi-drug resistant clonal lineage of high epidemiological relevance. The aim of this study was to explore the genetic structure of a large collection of isolates originating from various sources and perform the phylogenetic analysis to evaluate their relationships. We performed a whole-genome sequencing of 898 ST131 isolates from humans, environment, wildlife, food animals and companion animals obtained in the Czech Republic during years 2005-2021. Isolates were assigned to STs and the content of antibiotic resistance genes, virulence factors and plasmid replicons was assessed. Phylogenetic analysis, in combination with characterization of *fimH* and *bla*_{CTX-M} genes, enabled categorization into clades A, B, C0, C1 and C2. Overall, we detected 72.4% of isolates carrying a variant of *bla*_{CTX-M} responsible for resistance to beta-lactam antibiotics. Most isolates belonged to clade C (804/898) with C1 (262/898) and C2 (528/898) showing high clonality. Forty-nine isolates belonged to clade A and those from humans and water samples were associated with plasmids similar to pUTI89 (F29:A-B10) found in pathogenic bacteria from urinary tract infections. Presence of diverse F-type plasmids was detected throughout all isolates irrespective of clade association.

Keywords: *Escherichia coli*; ST131; antibiotic resistance; F-type plasmids; whole-genome sequencing

Úvod

Rezistence bakterií k antibiotikům představuje globální problém nejen v humánní a veterinární medicíně, ale také u volně žijících zvířat a v prostředí. Gramnegativní bakterie včetně *Escherichia coli* tvoří velkou skupinu rezistentních bakterií kolonizujících různá prostředí. Jedním z nejrozšířenějších sekvenčních typů (ST) *E. coli* je multirezistentní ST131, který je zodpovědný za velké množství nozokomiálních nákaz jako jsou například infekce močových cest nebo krevního řečiště, a stejně tak za infekce u drůbeže či volně žijících ptáků [1]. Izoláty *E. coli* ST131 se podle své fylogenetické příbuznosti a přítomnosti variant genu *fimH* obvykle dělí do pěti skupin (A, B, C0, C1 a C2), přičemž skupiny C1 a C2 jsou nejrozšířenější a vyskytuje se u nich navíc i chromozomálně kódovaná rezistence k fluorochinolonom. U všech skupin byly také popsány F-plazmidy nesoucí další geny rezistence a virulence, které se mohou šířit nejen mezi kmeny jednoho druhu, ale také mezidruhově [2].

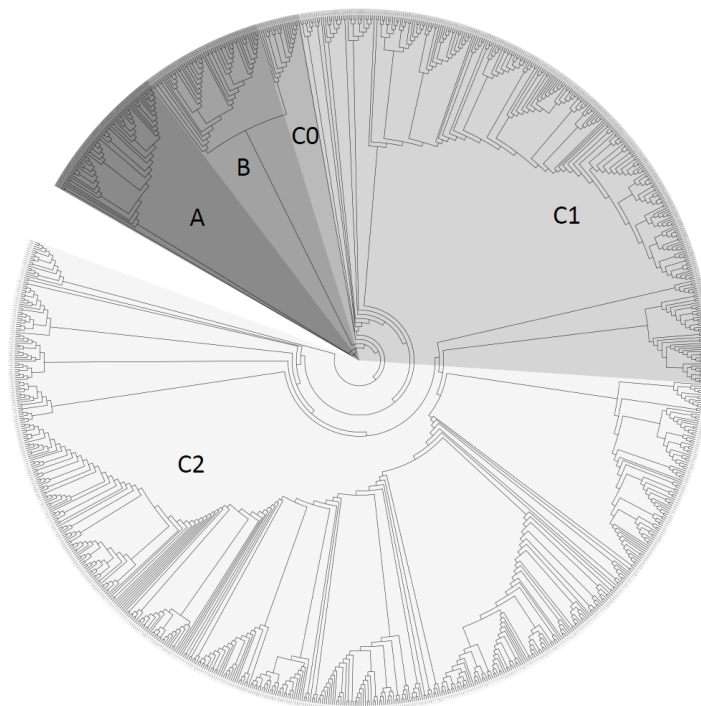
Materiál a metody

V rámci studie byly charakterizovány a porovnány bakterie rezistentní k antibiotikům běžně využívaným v klinické praxi. Izoláty se sekvenčním typem 131 byly vybrány z velké sbírky obsahující 11 000 izolátů za pomoci PCR screeningu O25 varianty a specifických jednonukleotidových polymorfismů v genech *mdh*, *gyrB* a *parB* v rámci předchozích výzkumů. Z odběrů z České republiky bylo získáno celkem 898 izolátů, z nichž je 713 izolátů humánního původu, 139 izolátů pochází z prostředí (odpadní vody, vodní toky) a 46 izolátů z volně žijících

a hospodářských zvířat. Ze všech 898 izolátů bylo 138 selektováno na půdě s ciprofloxacinem (0,05 µg/ml), 137 na půdě s cefotaximem (2 µg/ml) a 6 na půdě s meropenemem (0,125 µg/ml). Zbývajících 674 izolátů bylo izolováno na půdě bez antibiotik. Izoláty byly pro účely charakterizace rezistentního fenotypu otestovány na citlivost k antibiotikům stanovením minimální inhibiční koncentrace [3]. Dále byly izoláty podrobeny PCR screeningu na přítomnost vybraných genů rezistence vůči beta-laktamům, fluorochinolonům a karbapenemům. Všechny 898 izolátů bylo podrobeno analýze pomocí celogenomového sekvenování na platformě NovaSeq 6000 (Illumina), po kterém následovala rozsáhlá komparativní genomika. Získané sekvence byly poskládány v programu SPAdes. Pomocí nástroje MLST [4] byl potvrzen ST testovaných izolátů. Sekvenční data izolátů byla charakterizována algoritmy PlasmidFinder, ResFinder a VirulenceFinder ve webovém nástroji Center for genomic epidemiology (<https://www.genomicepidemiology.org>), který nám napomohl identifikovat přítomné plazmidy, geny kódující rezistenci k antibiotikům a virulenční faktory. V softwaru RStudio [5] byly provedeny fylogenetické analýzy včetně vytvoření fylogenetických stromů a heatmap dle jednonukleotidových polymorfismů (SNP; *single nucleotide polymorphism*).

Výsledky

Naše sbírka 898 izolátů *E. coli* byla rozdělena do skupin (Obrázek 1) podle fylogenetické příbuznosti a přítomnosti variant genu *fimH* pro produkci fimbrií a genu *bla_{CTX-M}* kódujícího produkci širokospektrých beta-laktamáz. Nejvíce izolátů spadalo do skupiny C (804/898) s typickým výskytem *fimH30*. Ta se poté ještě rozdělila na skupinu C2 (528/898) asociovanou s genem *bla_{CTX-M-15}*, skupinu C1 (262/898) s charakteristickým genem *bla_{CTX-M-27}* a variabilnější skupinu C0 (14/898). Celá skupina C v hojném počtu obsahovala izoláty s bodovými mutacemi v chromozomálních genech *parC* a *gyrA* zodpovědnými za rezistenci k fluorochinolonům. V menším počtu byla poté zastoupena skupina A (49/898) charakterizovaná variantami *fimH41* a *bla_{CTX-M-15}* a skupina B (45/898) s variantami *fimH22* a *bla_{CTX-M-14}*. Ve skupině C1 byla pozorována vysoká míra klonální příbuznosti mezi izoláty pocházejícími z lidí, volně žijících ptáků a odpadních vod (rozdíl SNP 0-50). Tento trend jsme mohli sledovat také ve skupině C2, a to mezi izoláty z lidí a odpadních vod.



Obrázek 1. Fylogenetický strom zobrazující rozdělení izolátů do jednotlivých skupin. Napříč celou sbírkou byla bez ohledu na zdroj izolátu detekována přítomnost rozličných F-plazmidů. Plazmidy příbuzné pUTI89 (F29:A-:B10), které nesou *cjrABC-senB* úsek přispívající k virulenci patogenních bakterií izolovaných z infekcí močových cest, byly asociovány s izoláty ze skupiny A pocházejícími ze vzorků od lidí a z vod. Izoláty skupiny B pak často nesly ColV plazmidy rozličných sekvenčních typů a pocházely zejména z humánních vzorků a vzorků z volně žijících ptáků a drůbeže. Z 898 izolátů odebraných během studie jich 74 % neslo geny pro produkci širokospektrých beta-laktamáz, v letech 2005-2007 jich však bylo jen 31 %.

Diskuze

V rámci studie jsme mohli pozorovat rozšíření jednotlivých fylogenetických skupin *E. coli* ST131 napříč různými zdroji a prostředími. V souladu s předchozími výzkumy [6] byly i v naší sbírce nejpočetněji zastoupenými skupinami vysoce klonální podskupiny C1 a C2. Výsledky potvrzují nejen souvislost mezi fylogenetickými skupinami a vybranými geny rezistence, ale také sdružení těchto genů s plazmidy, čímž poukazují na vznik evolučně výhodnějších epidemiologicky důležitých kmenů. Naopak zdánlivě neexistující asociace jednotlivých skupin se zdroji naznačuje cirkulaci ST131 kmenů a plazmidů napříč různými prostředími nezávisle na sobě. Výsledky dále ukazují výrazné zvýšení prevalence kmenů nesoucích geny rezistence v čase.

Závěr

Studie nabízí pohled na sbírku převážně klonálních izolátů *E. coli* ST131 pocházejících z různých zdrojů, prostředí a období, a to zejména v rámci fylogenetických skupin C1 a C2. Většina izolátů byla asociována s rozličnými epidemiologicky významnými F-plazmidy rozšířenými mezi různými typy hostitelů a prostředí. Tato zjištění podtrhují důležitost výzkumů zaměřených na dříve nepopsané části světa a dále posilují tvrzení ohledně globální hrozby, kterou rezistentní bakterie představují.

Poděkování

Studie byla finančně podpořena projektem IGA VETUNI 209/2023/FVHE a grantem Agentury pro zdravotnický výzkum České republiky NU22-09-00645.

Literatura

- [1] NICOLAS-CHANOINE, MH., et al. *Escherichia coli* ST131, an intriguing clonal group. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014, vol. 27, no. 3, s. 543-74.
- [2] NICOLAS-CHANOINE, MH., et al. The ST131 *Escherichia coli* H22 subclone from human intestinal microbiota: Comparison of genomic and phenotypic traits with those of the globally successful H30 subclone. *BMC Microbiology*. 2017, no. 17, s. 71.
- [3] ANDREWS, JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, no. 48, s. 5-16.
- [4] LARSEN, MV., et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, no. 50, s. 1355-61.
- [5] RACINE, JS. RStudio: A Platform-Independent IDE for R and Sweave. *Journal of Applied Economics*. 2012, no. 27, s. 167-172.
- [6] LI, D., et al. Genomic comparisons of *Escherichia coli* ST131 from Australia. *Microbial Genomics*. 2021, no. 12, s. 000721.

Kontaktní adresa: Michaela Růžičková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21274@vfu.cz

Prevalence of endoparasitosis of invasive species (*Procyon lotor* and *Nyctereutes procyonoides*) in a Belgian wildlife rescue center and its impact on native species

¹Adam Šimon, ¹Piaček Vladimír, ¹Pikula Jiří

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

Summary

This study examined the prevalence of endoparasitosis in two invasive species, *Procyon lotor* and *Nyctereutes procyonoides* at a Belgian wildlife rescue center. A total of 43 samples were collected from the two species and examined for the presence of endoparasites. Results showed that both species had a high prevalence of endoparasitosis. *Procyon lotor* has a higher prevalence than *Nyctereutes procyonoides*. The results of this study suggest that the presence of invasive species can have a significant impact on the health of native species, and that further research is needed to understand the full extent of this impact.

Keywords: invasive species; *Procyon lotor*; *Nyctereutes procyonoides*; endoparasitosis; *Baylisascaris procyoni*; *Taenia* spp.; *Trichuris vulpis*; *Giardia duodenalis*; *Capillariidae*; *Eimeria* sp.; *Toxocara canis*; *Dipylidium caninum*

Introduction

Raccoons are one of the most common invasive species in Belgium, with an estimated population of over 10,000 individuals. They are omnivorous mammals that are native to North and Central America. Raccoon dogs are much less numerous than raccoons, with an estimated population of around 2,000 individuals. They are a species of canid that is native to East Asia.

The prevalence of endoparasitism was investigated for both species. The results showed that *Procyon lotor* had a higher prevalence of endoparasitism than *Nyctereutes procyonoides*. This high prevalence of endoparasitosis could have a negative impact on the health and wellbeing of native species and other animals in the rescue center. Further research is needed to understand the full impact of endoparasitism on native species and other animals in the rescue center.

Material and methods

Between September 1 and October 15, 2022, faeces samples were collected from 42 legally-caught individuals of two species (28 raccoons, 14 raccoon dogs) housed in a rescue station in Belgium. Animals were collected from all over territory of Belgium and border areas of the Netherlands. Samples were immediately preserved in ethylene tubes and stored at 4°C in a refrigerator, and examined within 48 hours of collection.

For examination and identification of endoparasites: a The tamaVet Multi 2 TD quick test commercial kit was used to detect *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium parvum* antigens. Furthermore, the flotation method was employed to identify larvae and eggs.

Each sample was examined using a Levenhuk 720B optical microscope at X40, X100, X400, and X1000 magnifications, in the form of a native sample and subsequently after Diff-Quick staining.

Results and discussion

19 samples were positive tested (67.86%) in raccoons. The most prevalent parasite in raccoon (*Procyon lotor*) faeces was the ascarid *B. procyonis* (25.0%), followed by *Capillariidae* and *Eimeria sp.* both (14.29%), *Cryptosporidium sp.* (3.57%) and *Ancylostomatidae* (7.14%). One raccoon been coinfectd by *B. procyonis* and *Eimeria sp.* 11 samples, which represent 39.29 % were tested negative by flotation method and rapid tests for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium sp.*

8 samples were possitive tested (57.15%) in raccoon dogs. The most prevalent parasite in raccoon dog (*Nyctereutes procyonoide*) faeces was *Trichuris vulpis* (21.43%) followed by *Toxocara canis* (14.29%), *Taenia sp.* (14.29%), and *Dipylidium caninum* (7.14%). 4 samples which represent 28.57 % were tested negative by flotation method and rapid tests for *Giardia duodenalis* and *Cryptosporidium sp.*

Parasitological results from faeces collected are summarized in Table 1 and Table 2 .

In 2013 a study was published (Al-Sabi, Chriél, Jensen, Enemark, 2013), which monitored the prevalence of endoparasites in raccoon dog (*Nyctereutes procyonoide*) in the territory of Denmark. Prevalence of endoparasites in *Nyctereutes procyonoides*: *Toxocara canis* (1.1%), *Taenia spp.* (2.0%), *Dipylidium caninum* (5.1%), *Echinococcus multilocularis* (0.3%), *Uncinaria stenocephala* (48.5%).

In 2023 a study was published (Lombardo, Diano, Brocherel, Palmerini, Giovannini et.) which monitored the prevalence of edoparasitises in raccoons (*Procyon lotor*) in the territory of Italy. Prevalence of endoparasites in the *Procyon lotor*: *Eimeria sp.* (3.2%), *Cryptosporidium* (3.2%), *Baylisascaris procyonis* (38.7%), *Capillariidae* (9.6%), *Anylostomatidae* (3.2%), *Dipylidium caninum* (5.1%).

Table 1. Prevalence of endoparasitosis in raccoon dogs on the territory of Beglium

Parasites	Technique	Prevalence	%
<i>Toxocara canis</i>	Flotation	2	14.29
<i>Trichuris vulpis</i>	Flotation	3	21.43
<i>Taenia sp.</i>	Flotation	2	14.29
<i>Dipylidium caninum</i>	Flotation	1	7.14
Negative	-	6	4285

Table 2. Prevalence of endoparasitosis in raccoons on the territory of Beglium

Parasites	Technique	Prevalence	%
<i>Eimeria sp.</i>	Flotation	4	14.29
<i>Cryptosporidium sp.</i>	Quick test	1	3.57
<i>Baylisascaris procyonis</i>	Flotation	7	25.00
<i>Capillariidae</i>	Flotation	4	14.29
<i>Ancylostomatidae</i>	Flotation	2	7.14
<i>Giardia duodenalis</i>	Quick test	1	3.57

Negative	-	11	39.29
----------	---	----	-------

Conclusion

Detected parasites: *T.vulpis*, *Taenia.sp.*, *Toxocara canis*, *Baylisascaris procyonis*, *Capillariidae* and others. They are commonly found endoparasites in raccoon (*Procyon lotor*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoide*) populations. These invasive species are a high risk of transmission of parasitosis to our original species, domestic animals, but also the high prevalence of *Baylisascaris procyonis* can be a great risk for humans as it is a serious zoonosis. Therefore, it is necessary to continue monitoring the spread of invasive species and their parasites.

Literature

HALÁN, M.; et al. Atlas parazitov. Univerzita veterinárneho lekárstva a farmácie v Košiciach. 2022, ISBN 9788080776862.

Zabala, M.A.; Fuente, A.; Blasco, J.A. Endoparasites of the raccoon (*Procyon lotor*) and raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) in Europe: a review, *Veterinary Parasitology*, Volume 166, Issues 1-2, 2009.

Al-Sabi, M.N.; Chriél, M.; Jense, T.H.; Enemark, H.L. Endoparasites of the raccoon dog (*Nyctereutes procyonoides*) and the red fox (*Vulpes vulpes*) in Denmark 2009–2012 – A comparative study, *International Journal for parasitology*. 2013. 144-151

Lombardo, A.; Diano, M.; Brocherel,G.; Palmerini L.; Giovannini, S. et al. Detection of Endoparasites in Non-Native Raccoons from Central Italy. *Journal: Vet. Sci.*, **2023** Volume: 10, Number: 171

El-Hoss, A. S., Baqer, A. M., Ammar, E. S., El-Gebaly, A. A., & Soliman, I. M. (2020). Prevalence of gastrointestinal parasites in raccoons captured in urban areas of Menoufia Governorate, Egypt. *Parasitology Research*, 119(4), 1581-1586.

Contact address: Adam Šimon, MVDr., Ústav ekologie a chorob zoolivních zvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H20321@vfu.cz

Hemogregarina rodu *Hemolivia* infikující korytnačky *Rhinoclemmys pulcherrima manni*

Haemogregarine of the genus *Hemolivia* infecting painted wood turtle *Rhinoclemmys pulcherimma manni*

¹Žaneta Živčicová, ²Jana Kvíčerová, ¹Pavel Široký

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

²Katedra parazitologie, Přírodovědecká fakulta, Jihočeská univerzita, České Budějovice

Summary

The genus *Hemolivia* (Karyolysidae) comprises tick-transmitted haemogregarines of ectothermic vertebrates, such as lizards, chelonians, and toads. Only five species of *Hemolivia* have been described so far. This study contributes to the knowledge on diversity of these parasites. A set of thirty Central American wood turtles (*Rhinoclemmys pulcherrima manni*) originating from Nicaragua were screened for the presence of blood parasites. All samples were analyzed using the combination of molecular and microscopic methods. Blood smears were used to examine *Hemolivia* spp. infection under the light microscopy. Eleven out of 30 smears (39.6 %) were positive for *Hemolivia*. Phylogenetic relationships of these parasites were reconstructed based on the 18S rRNA gene. We applied three sets of primers targeting this gene, including HEPF300/HEPR900, HEMO1/HEMO2, and EF/ER. In total, 10 out of 30 turtles (33%) contained DNA of *Hemolivia*. Phylogenetic analyses revealed the presence of two distinct haplotypes of parasites, both placed in the *Hemolivia* clade.

Keywords: Apicomplexa, *Hemolivia* sp., parasites, *Rhinoclemmys pulcherimma manni*, diversity

Úvod

Do rodu *Hemolivia* patria kliešťami prenášané parazity, ktoré napádajú ektotermné stavovce. Definitívnym hositeľom a zároveň aj vektorom sú kliešte z čeľade Ixodidae. Od ostatných rodov hemogregarín sa líšia ich biológiou a ľahko rozpoznateľnou morfológiou gamontov. Sporogónia je rozdelená do dvoch fáz, prvá pozostáva z tvorby oocýst so sporokinétami a v druhej sa formujú sporozoity. Merogónia prebieha vnútri erytrocytov. Gamonti hemolivií sa zvyčajne nachádzajú v periférnej krvi ich hositeľov. V tejto fáze sa dajú ľahko rozoznať podľa ich typického elipsovitého tvaru a modro zafarbeného jadra v polárnej pozícii (Kvíčerová et al. 2014). Doteraz bolo opísaných šesť druhov tohto rodu. Typovým druhom je *Hemolivia stellata*, ktorá bola prvýkrát opísaná z ropuchy *Rhinella marina* a jaštera *Ameiva ameiva* z neotropickej oblasti (Lainson et al. 2007). *Hemolivia mariae* sa vyskytuje v Austrálii, kde napáda scinky *Tiliqua rugosa* a *Egernia stockesii* (Smallridge and Paperna 2000). Z korytnačích hositeľov boli opísané tri druhy. *Hemolivia mauritanica* infikuje korytnačky rodu *Testudo* v Palearktiskej oblasti, *Hemolivia parvula* napáda Africké korytnačky *Kinixys zombensis* a *Stigmochelys pardalis*. Poslednou hemoliviou parazitujúcou na korytnačkách je *Hemolivia cruciata* napádajúca vietnamské korytnačky *Cuora galbinifrons* (Zechmeisterová et al. 2022). Posledným druhom hemolivie je *Hemolivia argantis*, ktorá bola popísaná z kliešťa *Argantis brumpti*, ale iný hositeľ je zatiaľ neznámy (Karadijan et al. 2015). Cieľom bolo preskúmať diverzitu parazitov rodu *Hemolivia* u korytnačiek *Rhinoclemmys pulcherimma manni* pochádzajúcich z Nikaraguy. Na identifikáciu parazitov sme použili kombináciu morfológických a molekulárnych analýz.

Materiál a Metódy

Vzorky sme získali počas veterinárneho skrínungu v Českej republike v marci 2013 a pochádzali z 30 korytnačiek *Rhinoclemmys pulcherimma manni* z Nicaraguy. Vzorky krvi boli odobrané punkciou dorzálnaj kaudálnej žily pomocou inzulínových ihliel. Krvné nátery sme nechali vyschnúť a následne sme ich fixovali absolútnym metanolom po dobu 10 minút a zafarbili Giemsovým farbivom (podľa Široký et al. 2007). Takto zafarbené sklíčka sme potom prezerali pod svetelným mikroskopom Olympus BX53 so 100-násobným zväčšením. Morfometrické parametre boli merané v softvéri QuickPhoto Micro 3.2. Bola zaznamenaná maximálna dĺžka a šírka parazita a ich jadrá. Genómová DNA bola extrahovaná pomocou komerčného kitu NucleoSpin Tissue podľa priloženého protokolu. Na detekciu parazitov boli použité tri páry primerov, ktoré amplifikujú časť génu 18S rRNA. Boli to konkrétne primery HEPF300/HEPR900, EF/ER a HEMO1/HEMO2. PCR produkty boli prečistené pomocou kitu Gel/PCR DNA Fragment Extraction. Purifikované PCR produkty boli následne zaslané na sekvenovanie.

Výsledky

Z 30 vyšetrených krvných náterov bolo pozitívnych 11 na prítomnosť hemolivií (prevalencia 39,6%). Vo vnútri erytrocytov sme pozorovali gamonty, ktoré boli morfológicky veľmi podobné, iba s malými rozdielmi. Z 30 molekulárne vyšetrených vzoriek sme zistili prítomnosť parazita v 10 (prevalencia 33,3%). Pozitívne PCR vzorky boli odoslané na sekvenovanie a získané sekvencie boli porovnané s databázou GenBanku pomocou služby BLAST. Analýza sekvencií potvrdila prítomnosť parazita z rodu *Hemolivia*. Ďalšie fylogenetické analýzy sekvencií objavila dva blízko príbuzné haplotypy tohto rodu.

Diskusia

Hemolivia, ako rod hemogregarín, bola po prvý krát definovaná autormi Petit et al. v roku 1990. Zatiaľ bolo ale popísaných len päť druhov nájdených v stavovcoch a jeden nájdený v kliešťovi (Karadijan et al. 2015). Opis nových druhov tohto rodu môže byť pomerne zložitý, práve kvôli ich typickej morfológii gamontov. Krvné štádiá môžu byť pomerne uniformné. Až na pár výnimiek má všetkých päť druhov má oválny tvar gamontov umiestnených v parazitofornej vakuole s jadrom situovaným v polárnej pozícii (Kvičerová et al. 2014, Zechmeisterová et al. 2022). Určitú variabilitu nájdeme vo veľkosti parazitov alebo vo veľkosti ich jadier, prípadne v odlišnosti vnútorných polôh gamontov, ako je to u druhu *Hemolivia cruciata*. Jej gamonty sa môžu vnútri prekrížiť, čím vznikne štruktúra v tvare "X" (Zechmeisterová et al. 2022). Naše fylogenetické analýzy odhalili dva blízko príbuzné haplotypy parazitov z rodu *Hemolivia*. Genetická vzdialenosť oboch haplotypov by podporovala dva rôzne závery. Prvým záverom je, že by sa jednalo o značnú vnútrodruhovou variabilitu a druhým, že sa jedná o veľmi blízko príbuzné dva druhy. V rámci nášho konzervatívneho prístupu ku taxonómii, sme sa priklonili k prvej variante a považujeme oba izoláty za konšpecifické.

Záver

V našej štúdiu sme detekovali 10 pozitívnych vzoriek na prítomnosť parazitov z rodu *Hemolivia*. Celkom preskúmaných bolo 30 vzoriek z nikaragujských korytnačiek *R. pulcherimma manni*. Sekvenáciou a následnými fylogenetickými analýzami sme odhalili v týchto vzorkách dva blízko príbuzné haplotypy.

Literatúra

KARADIJIAN, G.; CHAVETTE, J.-M.; LANDAU I.; Systematic revision of the adeleid haemogregarines, with creation of *Bartazoon* n. g., reassignment of *Hepatozoon argantis* Garnham, 1954 to *Hemolivia*, and molecular data on *Hemolivia stellata*. *Parasite*. 2015, 22:31

KVÍČEROVÁ, J.; HYPŠA, V.; DVOŘÁKOVÁ N.; MIKULÍČEK, P.; JANDZÍK, D.; GARDNER, M.G.; JAVANBAKHT, H.; TIAR, G.; ŠIROKÝ, P. *Hemolivia* and *Hepatozoon*: Haemogregarines with Tangled Evolutionary Relationships. *Protist*. 2014, 165:688-700

LAINSON, R.; DE SOUZA, M.C.; FRANCO, C.M. Natural and experimental infection of the lizard *Ameiva ameiva* with *Hemolivia stellata* (Adeleina: Haemogregarinidae) of the toad *Bufo marinus*. *Parasite*. 2007 14:323–328

SMALLRIDGE, C.; PAPERNA, I. Ultrastructure of *Hemolivia mariae* gamonts in the blood of the lizard *Tiliqua rugosa* and their development to oocyst stage in the tick *Amblyomma limbatum*. *Parasitol Res*. 2000, 86: 563-569

ŠIROKÝ, P.; KAMLER, M.; FRYE F.L.; FICTUM P.; MODRÝ, D. Endogenous development of *Hemolivia mauritanica* (Apicomplexa: Adeleina: Haemogregarinidae) in the marginated tortoise *Testudo marginata* (Reptilia: Testudinidae): evidence from experimental invecton. *Folia parasitol*. 2007, 54:13-18

ZECHMEISTEROVÁ K.; PŘIBYL, M.; MANH NGUYEN, H.; NOSKOVÁ, E.; ŠIROKÝ, P. Haemogregarines of the genera *Haemogregarina*, *Hemolivia*, and *Hepatozoon* infecting Vietnamese freshwater turtles, with additional notes on primer specificity and primer-template mismatches affecting diagnostic success. *Protist*. 2022. 173(4):125884

Kontaktní adresa: Žaneta Živčicová, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21278@vfu.cz

Vliv ošetření vody CaviPlasmou na životnost kožovce rybího (*Ichthyophthirius multifiliis*)

Influence of water treatment with CaviPlasma device on *Ichthyophthirius multifiliis*

¹Toulová Ivona, ^{1,2}Papežiková Ivana, ^{1,2}Mikulíková Ivana, ^{1,2}Palíková Miroslava

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

²Agronomická fakulta, Mendelova univerzita v Brně

Summary:

Ichthyophthirius multifiliis is an ectoparasite of most freshwater fish species. The disease caused by this parasite is called White spot disease. Especially in warm seasons, *I. multifiliis* can cause significant mortality of fish. We tested the effectiveness of CaviPlasma device against *I. multifiliis* stages present in water. The experiment was conducted on juvenile wels catfish (*Silurus glanis*). We treated infective water with the CaviPlasma device either for 1 min 20 s or for 7 min. Untreated water with stages of *I. multifiliis* was used to infect the positive control, tap water (without *I. multifiliis*) was used for the negative control. The experiment was finished after development of clinical symptoms in the positive control. Blood was sampled for determination of red and white blood cell counts and respiratory burst assessment, the presence of *I. multifiliis* was evaluated in skin and gill smears. *Ichthyophthirius multifiliis* was found only in the positive control. We can conclude that CaviPlasma treatment resulted in devitalization of *I. multifiliis* stages present in the water.

Keywords: *Ichthyophthirius multifiliis*, water treatment, CaviPlasma

Úvod

Ichthyophthirius multifiliis je ektoparazit sladkovodních druhů ryb. Onemocnění zapříčiněné tímto parazitem se nazývá ichtyoftirióza, česky známá pod názvem kožovcovitost nebo „krupička“. Jeho životní cyklus je ovlivněn teplotou vody. V teplé vodě proběhne cyklus rychleji než ve studené, a tedy v teplých obdobích může docházet k rychlému rozvoji onemocnění doprovázenému zvýšenými úhyny v chovech ryb (Matthews 2005, Palíková 2019). Během tohoto experimentu jsme testovali účinnost nového zařízení sloužícího k ošetření vody obsahující stádia *I. multifiliis*. Toto zařízení kombinuje dva fyzikální efekty (nízkoenergetický plazmatický výboj a hydrodynamickou kavitaci) a nazývá se CaviPlasma. CaviPlasma má potenciál budoucího využití k dekontaminaci vod a ničení mikroorganismů (např. bakterií a sinic) (Maršálek et al. 2019).

Materiál a metodika

Experiment byl proveden s juvenilními stádii sumce velkého (*Silurus glanis*). Ryby byly rozděleny do osmi akvárií po deseti kusech, následovala týdenní aklimatizační fáze. Experiment zahrnoval čtyři skupiny ryb a byl proveden v duplikátu. Pokus byl zahájen přilitím ošetřené/neošetřené vody (dle skupiny) v množství odpovídajícímu 10 % celkového objemu vody. Zahájení pokusu předcházelo ošetření infikované vody CaviPlasmou. Do 6 nádob s vodou byly přidány stěry kůže z infikovaného pstruha duhového a voda z Petriho misek, na nichž byl *I. multifiliis* kultivován *in vitro*. Ověření přítomnosti *I. multifiliis* ve stěrech i ve vodě z Petriho misek bylo provedeno mikroskopicky. Dvě nádoby ze 6 takto připravených byly ponechány na infikování pozitivní kontrolní skupiny. Zbylé 4 nádoby byly převezeny na ošetření CaviPlasmou. Skupině A (negativní kontrola, nádrže 1, 2) byla přilita do akvária čistá odstátá kohoutková voda, tj. bez stádií *I. multifiliis*. Skupině B (nádrže 3, 4) byla přilita voda obsahující stádia *I. multifiliis*, po ošetření přístrojem trvajícím 1 min 20 s. Skupině C (nádrže 5, 6) byla

přilita voda obsahující stádia *I. multifiliis* po ošetření trvajícím 7 min. Skupině D (pozitivní kontrola, nádrže 7, 8) byla přilita neošetřená voda obsahující stádia *I. multifiliis*. Po rozvoji onemocnění u ryb v pozitivní kontrole (bílé tečky na kůži), bylo přistoupeno k odběrům. Rybám byla odebrána krev a poté byly ryby usmrčeny. Dále byly provedeny stěry z kůže a žaber ryb pro mikroskopické vyšetření a byl jim odebrán jeden žaberní oblouk a jedna prsní ploutev na zhotovení histologického preparátu. Ryby byly zváženy a změřeny. Mikroskopicky byly zjištěny a zaznamenány počty *I. multifiliis*. Ve stěrech z kůže byly určeny počty *I. multifiliis* udané v zorném poli mikroskopu při zvětšení 40× a ve stěrech ze žaber byly počítány absolutní počty parazitů. Z krve byly stanoveny počty červených a bílých krvinek a chemiluminiscenčně změřeno oxidativní vzplanutí periferních fagocytů.

Výsledky a diskuze

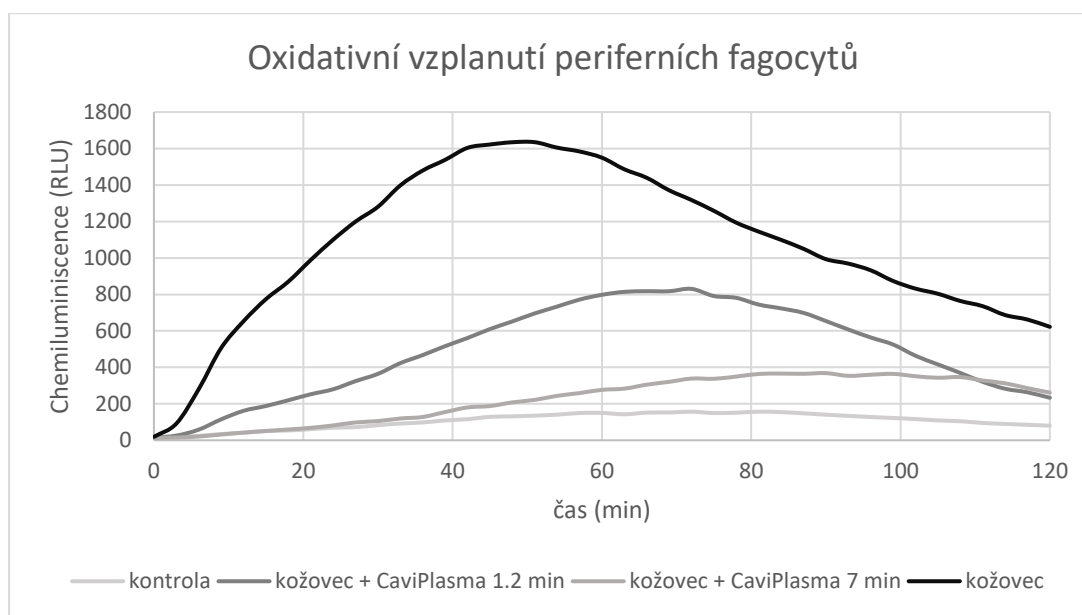
Přítomnost *I. multifiliis* byla zaznamenána pouze u ryb patřících do pozitivní kontroly (skupina D) a to u všech vyšetřovaných kusů. Intenzita infekce na kůži byla 20–70 ks v zorném poli mikroskopu při zvětšení 40× a průměrná hodnota počtů *I. multifiliis* ze žaber byla 30 kusů jedinců u skupiny D. Průměrné hodnoty stanovených počtů červených a bílých krvinek u jednotlivých skupin jsou uvedeny v tabulce č. 1. Nebyl zaznamenán statisticky významný rozdíl v počtech červených krvinek. V důsledku onemocnění došlo ke statisticky významnému poklesu počtu bílých krvinek (negativní kontrola vs. pozitivní kontrola). Statisticky významný rozdíl byl zjištěn také mezi skupinami B a D (CaviPlasma 1 min 20 s vs. pozitivní kontrola). Ichtyoftirioza měla statisticky významný vliv na oxidativní vzplanutí periferních fagocytů v pozitivní kontrole oproti negativní kontrole viz. graf.č. 1.

Tabulka č. 1: Průměrné hodnoty počtů červených [T.l⁻¹] a bílých [G.l⁻¹] krvinek a směrodatné odchylky (SD)

	ERY [T.l ⁻¹]	LEU [G.l ⁻¹]
	Průměr ± SD	Průměr ± SD
A (negativní kontrola)	1,88 ± 0,27	73,75 ± 16,60 ^A
B (CaviPlasma 1 min 20 s)	1,62 ± 0,28	72,88 ± 13,52 ^A
C (CaviPlasma 7 min)	1,81 ± 0,24	62,75 ± 24,43
D (Pozitivní kontrola)	1,51 ± 0,45	41,75 ± 14,06 ^B

Indexy značí statisticky významný rozdíl na úrovni $p < 0,01$.

Graf č. 1: Oxidativní vzplanutí periferních fagocytů u jednotlivých skupin – kinetika chemiluminiscence



Závěr

K nakažení ryb kožovcem nedošlo u skupin, kde byla přidána infekční voda ošetřená CaviPlasmou. Lze tedy konstatovat, že byl prokázán významný vliv na přežívání *I. multifiliis* ve vodě při použití zařízení CaviPlasma. Při tomto experimentu byla testována účinnost CaviPlasmy na stádia *I. multifiliis* vyskytující se pouze ve vodním prostředí, nikoli na stádia přítomná na hostiteli. V další fázi by bylo vhodné pokračovat experimentem, ve kterém by k nakaženým rybám byla přidána ošetřená voda CaviPlasmou, a ověřit, zda má devitalizující účinky i na tato stádia parazita.

Poděkování

Financováno grantem IGA VETUNI 220/2022/FVHE

Literatura

MARŠÁLEK, Blahoslav; MARŠÁLKOVÁ, Eliška; ODEHNALOVÁ, Klára; POCHYLÝ, František; RUDOLF, Pavel; ŠTAHEL, Pavel; RAHEL, Josef; ČECH, Jan; FIALOVÁ, Simona; ZEZULKA, Štěpán. *Removal of Microcystis aeruginosa through the combined effect of plasma discharge and hydrodynamic cavitation*. Water, 2019, 12(1) 8. <https://doi.org/10.3390/w12010008>

MATTHEWS, R. A. *Ichthyophthirius multifiliis* Fouquet and ichthyophthiriosis in freshwater teleosts. Advances in parasitology, 2005, 59: 159-241. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)59003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)59003-1)

PALÍKOVÁ, Miroslava. Nemoci a chorobné stavy ryb. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta rybářství a ochrany vod, 2019. ISBN 978-80-7514-085-2

Kontaktní adresa: Ivona Toulová Mgr., Ústav ekologie a chorob zoovířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21277@vfu.cz

Comparison of selected hematological and blood chemistry parameters in four species of bats at the end of hibernation

**¹Aneta Kubickova, ²Petr Linhart, ¹Monika Nemcova, ¹Jiri Pikula, ¹Jana Sedlackova,
¹Veronika Seidlova, ^{3,4}Jan Zukal, ¹Hana Bandouchova**

¹Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees, University of Veterinary Sciences, Brno

²Department of Animal Protection and Welfare and Veterinary Public Health, University of Veterinary Sciences, Brno

³Institute of Vertebrate Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic, Brno

⁴Department of Botany and Zoology, Masaryk University, Brno

Summary

Insectivorous bats are a group of mammals characterized by their unique physiology. In addition to active flight, these small insectivores have a specific ability to survive the winter, when food is not available, in a state of hibernation. Hibernation is a physiological state; however, it has a significant effect on vital functions and also on some blood parameters. Information regarding blood parameters in insectivorous bats is very limited, and there is also a lack of comparison of the range of these values in different species of bats. Therefore, we decided to compare selected blood parameters in four species of insectivorous bats (*Myotis myotis*, *Myotis blythii*, *Nyctalus noctula* and *Rhinolophus ferrumequinum*). A total of 83 individuals were included in the study. Values were compared between males and females and between individual species. More pronounced differences were found between species, while there was no difference between males and females for most parameters.

Keywords: Chiroptera, hematology, biochemistry, torpor

Introduction

Insectivorous bats are a unique group of mammals that play important roles in ecosystems as predators of insects. These small flying mammals have evolved highly specialized echolocation abilities that allow them to navigate and locate their prey and they also have a high metabolic rate, so they need to consume large quantities of insects to meet their energy needs (Kunz et al. 2011). In temperate zone, bats need to overcome the winter when the food is scarce. Very specific physiological adaptation – hibernation – helps them to survive adverse conditions. During hibernation, bats experience extreme metabolic changes that allow them to conserve energy and survive for long periods of time without eating. Their metabolic rate slows down significantly, and their body temperature drops to near-freezing levels. Hibernation also affects hematology and blood chemistry parameters (Bouma et al. 2010). Hematology and blood biochemistry reference values are an important tool for individual assessment of health status. For most species of bats, these values are not yet known, although they would be very useful and could be used both within the framework of the examination of individual animals and within the framework of the protection of the entire species (Maas et al. 2013). The aim of this study was to compare the values of selected blood parameters obtained from bats belonging to four different species.

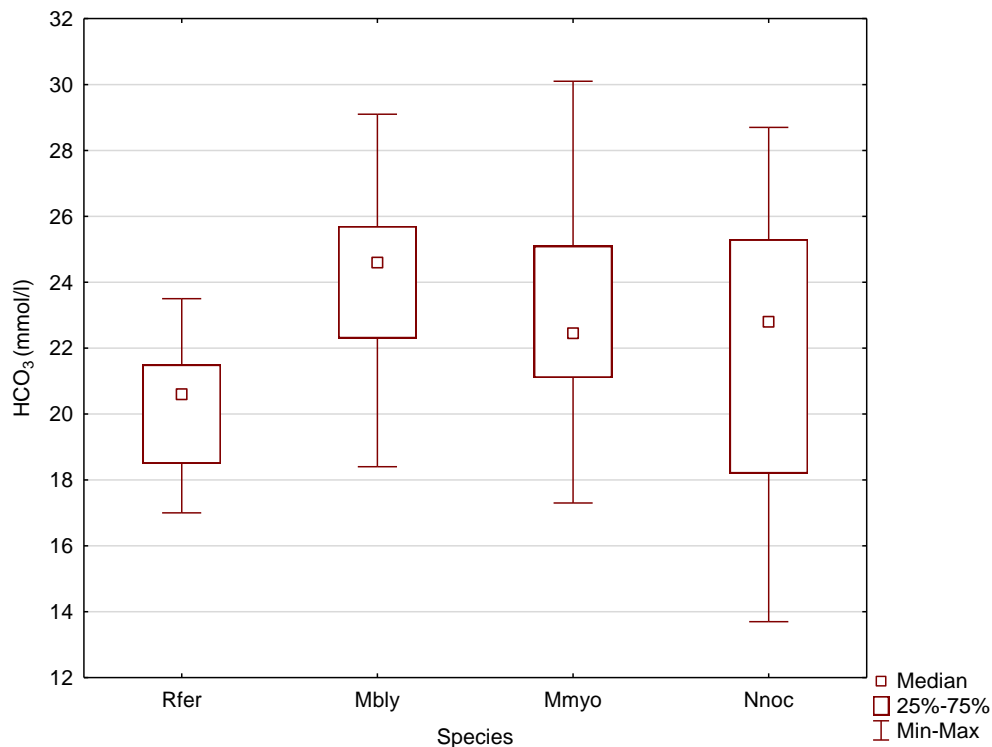
Material and methods

At the end of hibernation, we took a blood sample from 20 Greater mouse-eared bats (*Myotis myotis*) and 23 Noctule bats (*Nyctalus noctula*) from the Czech Republic and 20 Lesser mouse-eared bats (*Myotis blythii*) and 20 Greater horse-shoe bats (*Rhinolophus ferrumequinum*) from Armenia (n=20). The captures were carried out by the staff of the Institute of Vertebrate Biology of the Academy of Sciences of the Czech Republic (permit AOPK CR no. 01662/MK/2012 S/00775/MK/2012, no. 866/JS/2012, No. 645 / 13.08 / 2015, 153 / 11.07 / 2016, WPN-I-6205.10.2015.AI and resolution No. 14/2018). A blood sample was taken from the saphenous vein of the bats, and the sampling site was treated with tissue glue to prevent unwanted blood loss. Prior to release, bats were rehydrated and energized by oral administration of a glucose solution. Blood parameters were processed directly in the field with a VetScan iSTAT 1 mobile

analyzer (Abaxis, USA). The following parameters were measured: Na⁺, K⁺, Cl, tCO₂, pCO₂, HCO₃⁻, pH, acid-base balance parameters, urea, glucose, hemoglobin and hematocrit. The obtained results were analyzed using the Statistica for Windows.

Results

As part of the analysis of the results of blood parameter measurements, the normality of the data was verified. Normally distributed data were evaluated using ANOVA. Non-normally distributed data were assessed using Kruskal-Wallis ANOVA. Interspecies differences were found for almost all parameters (potassium, $p < 0.001$; pH, $p = 0.002$; pCO₂, $p < 0.001$; BE, $p = 0.0253$; glucose, $p = 0.002$; tCO₂, $p < 0.001$; urea, $p < 0.001$; HCO₃, $p = 0.008$; hematocrit, $p = 0.003$; hemoglobin, $p = 0.003$). When comparing values for males and females within the species, differences were found only for sodium in the Greater horse-shoe bat ($p = 0.003$) and for urea ($p = 0.008$) and AnGap ($p = 0.03$) in Noctule bats.



Graph 1: Differences in bicarbonate values in blood sampled at the end of hibernation from four bat species (Rfer - Greater horse-shoe bat (*Rhinolophus ferrumequinum*), Mbly - Lesser mouse-eared bat (*Myotis blythii*), Mmyo - Greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*), Nnoc - Noctule bat (*Nyctalus noctula*), $p = 0.008$)

Discussion

Hibernation is a crucial survival mechanism for bats, especially those living in temperate regions where food is scarce during the winter months. By reducing their energy needs and conserving resources, hibernating bats can survive until spring when food becomes more plentiful. On the other hand, hibernation affects a whole range of metabolic processes and this is subsequently reflected in the values of blood parameters (Bouma et al. 2010). In order to assess the health status of an individual using blood analysis, it is necessary to know the range of normal values. However, it is not easy to obtain reference values from bats, as they are small animals that are subject to strict protection (Bandouchova et al. 2020). The aim of the study was to compare the values of blood parameters between four species of bats captured at the end of hibernation and to find out if there are differences between species. Contrary to our expectation, we found that the measured values of most parameters differ between species. On

the other hand, for most parameters, there was no statistically significant difference between males and females within the species. Therefore, it will probably not be necessary to distinguish whether it is a male or a female when subsequently establishing post-hibernation blood reference values. Differences between species, on the other hand, indicate that if reference values are established for one species, it will not be possible to simply use these reference values for other bat species. Hematology and blood chemistry reference values in wildlife are important tools for monitoring the health and well-being of animals in the wild. These values can be used to establish a baseline for the normal range of values for various blood parameters in different species, genders, and age groups. By regularly monitoring these values in a population of animals over time, wildlife researchers and conservationists can detect changes or abnormalities that may indicate disease, environmental stressors, or other health issues. Overall, hematology and blood chemistry reference values are important tools for understanding the health of wildlife populations and can inform conservation efforts to protect and preserve these animals and their habitats (Maas et al 2013). Hibernation is an amazing adaptation that allows small mammals, including bats, to survive harsh environmental conditions. Hibernating bats provide a fascinating subject for scientific study and conservation efforts to protect and preserve these important animals and their habitats.

Acknowledgement

The study was financially supported by the 2023ITA25 project.

Literature

- BANDOUCHOVA H, ZUKAL J, LINHART P, BERKOVA H, BRICHTA J, KOVACOVA V, KUBICKOVA A, ABDELSALAM EEE, BARTONIČKA T, ZAJÍČKOVÁ R, PIKULA J. Low seasonal variation in greater mouse-eared bat (*Myotis myotis*) blood parameters. *PLoS One*. 2020, vol. 15, no. 7, e0234784.
- BOUMA, H.R.; STRIJKSTRA, A.M.; BOEREMA, A.S.; DEELMAN, L.E.; EPEMA, A.H.; HUT, R.A.; KROESE, F.G.; HENNING, R.H. Blood cell dynamics during hibernation in the European Ground Squirrel. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2010, vol. 136, s. 319-323.
- FRANCO, M.; CONTRERAS, C.; NESPOLO, R.F. Profound changes in blood parameters during torpor in a South American marsupial. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 2013, vol. 166, no. 2, s. 338–342.
- KUNZ, T. H.; DE TORREZ, E. B.; BAUER, D.; LOBOVA, T.; FLEMING, T. H. Ecosystem services provided by bats. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2011, 1223, s. 1-38.
- MAAS, M.; KEET, D.F.; NIELEN, M. Hematologic and serum chemistry reference intervals for free-ranging lions (*Panthera leo*). *Research in Veterinary Science*. 2013, vol. 95, no. 1, s. 266-268.

Contact address: Aneta Kubičková, Mgr., Department of Ecology and Diseases of Zoo Animals, Game, Fish and Bees, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H18376@vfu.cz

Monitoring *Encephalitozoon spp.* u zvířat ze zoologických zahrad v České republice. Jsou volně žijící hlodavci rezervoárem *Encephalitozoon spp.*?

Monitoring of *Encephalitozoon spp.* in animals from zoos in the Czech Republic. Are wild rodents a reservoir of *Encephalitozoon spp.*?

¹Tománková Nikola, ¹Bártová Eva, ^{2,3}Žáková Alena, ⁴Budíková Marie

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

²Ústav experimentální biologie, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

³Ústav biologie, Pedagogická fakulta, Masarykova univerzita, Brno

⁴Ústav matematiky a statistiky, Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita, Brno

Summary

Wild small mammals play an important role in maintaining and spreading of infectious agents in wild animals but also in captive animals. The aim of this study was to determine the presence of antibodies against *Encephalitozoon cuniculi* in the blood sera of animals from Czech zoos and monitor *Encephalitozoon spp.* in rodents trapped in zoo Brno. Antibodies to *E. cuniculi* were detected in sera of 8 zoo animals (3.3%) with a titer of 40 in 7 animals (3%) including 2 animals from the Bovidae family, 2 animals from the Canidae family and 3 animals from the Equidae family and a titer of 640 in the leopard. *Encephalitozoon spp.* was detected by PCR in 20% (22/108) of rodents trapped in zoo Brno with Yellow-necked Field Mouse (*Apodemus flavicollis*) the most infected animal. The results of our study showed that wild small mammals in zoo could serve as reservoirs of infectious agents and thus present risk of infection for zoo animals.

Key words: *Encephalitozoonosis*; rodents; zoonosis; zoo animals, wild small mammals

Úvod

Encephalitozoon je obligátní intracelulární parazit, který patří do kmene *Microsporidia* a v prostředí přežívá ve formě infekčních spor. *Encephalitozoon cuniculi* je původcem encefalitozoonózy, což je chronické a latentní onemocnění, které obvykle probíhá bez klinických příznaků. Nicméně v některých případech může onemocnění končit encefalitidou, šedým zákalem, selháním ledvin, které může být letální (Valenčáková et al., 2004). *E. cuniculi* byl detekován u zajívců, hlodavců, přežvýkavců, masožravců, primátů a lidí (Matysiaka et al., 2019). Volně žijící drobní savci (hlodavci) sehrávají důležitou roli jako rezervoáry původců zoonotických infekcí u volně žijících zvířat, ale i zvířat chovaných v zajetí. Zoologické zahrady jsou instituce s velkou koncentrací a rozmanitostí zvířat, která se shromažďují na relativně malé ploše, čímž dochází ke zvýšenému riziku propuknutí chorob včetně zoonóz. Cílem této studie byl monitoring mikrosporidie *Encephalitozoon spp.* u zoo zvířat z několika českých zoologických zahrad a zároveň u volně žijících drobných savců odchycených v areálu zoo.

Materiály a metody

Vzorky sér (n=241) od zoo zvířat byly odebrány v letech 1991 – 2011 v sedmi zoologických zahradách v České republice: Praha (n=135), Dvůr Králové nad Labem (n=68), Liberec (n=14), Ústí nad Labem (n=6), Jihlava (n=2), Brno (n=1) a Plzeň (n=1). Krevní séra byla od zvířat 8 čeledí: *Ursidae* (n=1), *Suidae* (n=1), *Cervidae* (n=2), *Camelidae* (n=4), *Canidae* (n=6), *Felidae* (n=13), *Equidae* (n=24) a *Bovidae* (n=190). K detekci protilátek proti *E. cuniculi* byl použit nepřímý imunofluorescenční test (Megacor Diagnostic, Hörbranz, Rakousko). Vzorky s titry ≥ 40 byly označeny jako pozitivní.

Odchyt volně žijících drobných savců probíhal v zoo Brno v letech 2016 – 2018 pomocí živolovných pastí a pružinových pastí uvnitř pavilonů (exotické ptactvo, tapíři a terária), v

technické místnosti i v areálu zoo. Celkem bylo odchyceno 117 jedinců zahrnující 6 druhů: myšice lesní (*Apodemus flavicollis*) (n=44), myš domácí (*Mus musculus*) (n=40), myšice křovinná (*A. sylvaticus*) (n=20), potkan domácí (*Rattus norvegicus* var. *alba*) (n=6), norník rudý (*Myodes glareolus*) (n=4) a rejsek obecný (*Sorex araneus*) (n=3). Při pitvě byly odebrány vzorky tkání (mozek a játra) pro další vyšetření. Odchyt a pitva volně žijících drobných savců byly prováděny dle projektu č. 32-2016. DNA *Encephalitozoon* spp. byla detekována v jaterní tkáni pomocí nested PCR s použitím dvou sad primerů MSP1, MSP2A a MSP3, MSP4A (Katzwinkel-Wladarsch et al., 1996).

Analýza výsledků byla provedena pomocí Pearsonova Chi-kvadrát testu v kontingenční tabulce pomocí STATISTICA Cz 12 (StatSoft, Inc., 2013). Pouze pro tabulky 2 x 2 byl použit Fisherův exaktní test, pokud nebyly splněny podmínky dobré aproximace. Byla testována nulová hypotéza, že prevalence parazitární infekce se neliší u zvířecího druhu, pohlaví, věku a roku odchytu. Rozdíly byly považovány za statisticky významné, když p-hodnota byla $\leq 0,05$. Data ukázala normální distribuci na základě Shapiro–Wilkova a Kolmogorova–Smirnovova testu.

Výsledky

Protilátky proti *Encephalitozoon* spp. byly pomocí IFAT zjištěny u 3,3 % (8/241) zoo zvířat, a to u 1 % (2/197) u sudokopytníků, 12,5 % (3/24) u lichokopytníků, 15 % (3/20) u šelem. Konkrétně byli pozitivní tyto druhy: buvol africký (*Syncerus caffer caffer*) 8,3 % (1/12), antilopa koňská (*Hippotragus equinus*) 3,7 % (1/27), zebra Hartmannova (*Equus zebra hartmannae*) 28,6 % (2/7), kůň Převalský (*Equus ferus przewalskii*) 11,1 % (1/9), vlk hřivnatý (*Chrysocyon brachyurus*) (1/3), pes hyenovitý (*Lycaon pictus*) (1/3) a panter (*Panthera pardus*) (1/2).

Encephalitozoon spp. byl detekován pomocí PCR u 20 % (22/108) volně žijících drobných savců odchycených v zoo Brno. Nejvyšší pozitivita byla u myšice lesní 25 % (9/36), dále u myši domácí 23 % (9/40), myšice křovinné 15 % (3/20) a norníka rudého (1/3), další druhy byly negativní.

Diskuze

Protilátky proti *E. cuniculi* byly detekovány u 3,3 % zoo zvířat, což je mnohem nižší než v jiné podobné studii, kde protilátky proti *E. cuniculi* byly detekovány např. u 46 % buvolů v Egyptě (Abu-Akkada et al., 2015). Různá prevalence může být způsobena odlišnou geografii a jejich klimatem, protože *Encephalitozoon* přežívá různě při různých teplotách. Ve studii, kdy voda měla 10 °C, byly spory *E. inneris* a *E. hellem* stále infekční po 12 měsících, ale při 25 °C byly spory *E. inneris* a *E. hellem* infekční pouze 3 měsíce a *E. cuniculi* 3 týdny (Palmer a kol., 2003). Výsledky získané u hlodavců odchycených v zoo Brno byly podobné s 15 % pozitivitou získanou pomocí PCR u volně žijících drobných savců (*Murinae* a *Arvicolinae*) z Polska, České republiky a Slovenska (Perec-Matysiak et al., 2019). Naproti tomu *Encephalitozoon* spp. byl pomocí PCR detekován jen u 6 % volně žijících malých savců v Rakousku (Führer et al., 2010). Seroprevalence protilátek proti *Encephalitozoon* spp. se u volně žijících drobných savců liší. Byly detekovány u 5,3 % volně žijících hlodavců z Velké Británie (Meredith et al. 2015), 13 % potkanů ze Švýcarska (Müller-Doblies et al., 2002), 13% volně žijících drobných savců z Islandu (Hersteinsson et al., 1993) a 36 % volně žijících potkanů z Egypta (Akkada et al., 2015). Infekce *E. cuniculi* probíhá u zoo zvířat často bez klinických příznaků a seroprevalence nebývá příliš vysoká. Zdroj infekce představují volně žijící drobní savci, proto je potřeba dodržovat preventivní opatření jako minimalizace či zamezení kontaktu zoo zvířat s volně žijícími hlodavci a dodržování hygienických opatření zahrnující i pravidelnou deratizaci.

Poděkování

Děkujeme Mgr. Vendule Sychrové ze Zoo Brno za organizaci odchytu hlodavců, MVDr. Stanislavu Mazánkovi za poskytnuté informace a Bc. Veronice Trávníčkové a Veronice Hochmanové za pomoc s odchycením hlodavců. Tato studie byla finančně podpořena interním grantem ITA VETUNI (2023ITA22).

Literatura

ABU-AKKADA, S.S.; ASHMAWY, K.I.; DWEIR, A.W. First detection of an ignored parasite, *Encephalitozoon cuniculi*, in different animal hosts in Egypt. *Parasitology Research*. 2015, vol. 114, s. 843–850.

FÜHRER, HP.; BLÖSCHL, 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.

HERSTEINSSON, P.; GUNNARSSON, E.; HJARTARDOTTIR, S.; SKIRNISSON, K. Prevalence of *Encephalitozoon cuniculi* antibodies in terrestrial mammals in Iceland, 1986 to 1989. *Journal of Wildlife Diseases*. 1993, vol. 29, s. 341–344.

KATZWINKEL-WLADARSCH, S.; LIEB, M.; HEISE, W.; LOSCHERL, T.; RINDER, H. Direct amplification and species determination of microsporidian DNA from stool specimens. *Tropical Medicine and International Health*. 1996, vol. 3, s. 373–378.

MATYSIAKA, A.P.; LEŚNIAŃSKA, K.; GAWLIK, K.B.; ČONDLOVÁ, Š.; SAK, B.; KVÁČ, M.; RAJSKÝ, D.; HILDEBRAND, J. The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European Journal of Protistology*. 2019, vol. 69, s. 14–19

MEREDITH, A. L.; CLEAVELAND, S. C.; BROWN, J.; MAHAJAN, A.; SHAW, D. J. Seroprevalence of *Encephalitozoon cuniculi* in wild rodents, foxes and domestic cats in three sites in the United Kingdom. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2013, vol. 62, s. 2

MÜLLER-DOBLIES, U.U.; HERZOG, K.; TANNER, I.; MATHIS, A.; DEPLAZES, P. First isolation and characterisation of *Encephalitozoon cuniculi* from a free-ranging rat (*Rattus norvegicus*). *Veterinary Parasitology*. 2002, vol. 107, s. 279–285.

PALMER, R.; LI, X.; TROUT, J.M.; FAYER, R. Infectivity of microsporidia spores stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*. 2003, vol. 89, no. 1, s. 185–188.

PEREC-MATYSIAK, A.; LESNIAŃSKA, K.; BUNKOWSKA-GAWLIK, K.; ČONDLOVÁ, Š.; SAK, B.; KVÁČ, M.; RAJSKÝ, D.; HILDEBRAND, J. The opportunistic pathogen *Encephalitozoon cuniculi* in wild living Murinae and Arvicolinae in Central Europe. *European Journal of Protistology*. 2019, vol. 69, s. 14–19.

STATSOFT INC. STATISTICA (data analysis software system), 2013, version 12. www.statsoft.com.

VALENČÁKOVÁ, A.; BÁLENT, P.; LEŠNÍK, F. Encefalitozoonóza zvierat. *Veterinářství*. 2004, vol. 54, s. 377–389.

Kontaktní adresa: Nikola Tománková, MVDr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21288@vfu.cz

Vliv přídatku autochtonních probiotik (*Lactiplantibacillus plantarum*) v krmivu na zdravotní stav pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*)

Influence of probiotic (*Lactiplantibacillus plantarum*) additive in feed on health status of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

¹ Zuzana Lepková, ¹ Miroslava Palíková, ¹ Ivana Mikulíková, ¹ Ivana Papežíková, ¹ Hana Band'ouchová, ¹ Jana Blahová

¹Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární univerzita, Brno

Summary

Our experiment lasted 7 weeks and the fish were divided into 3 groups. The first group (control) was fed by probiotic non-supplemented food, the second group was fed with probiotic supplemented food and the third (pulse-fed) group was 4 weeks on probiotic supplemented diet followed by 3 weeks of non-probiotic diet. A statistically significant difference was found in the composition of the intestinal bacterial community associated with the mucosa in both probiotic provided groups of fish. In the continuously fed group, there was an increase in the hemoglobin and hematocrit values and a decrease in the chloride concentration in the blood plasma. In the pulse-fed group, we observed a decrease in plasmatic magnesium and calcium ions. Further studies are recommended to assess the effects of *L. plantarum* on rainbow trout response against pathogens.

Keywords: *Lactiplantibacillus plantarum*; *Oncorhynchus mykiss*; probiotics

Úvod

Jedním z největších problémů moderní akvakultury jsou infekční onemocnění způsobená bakteriemi. K léčbě většiny těchto bakteriálních onemocnění užíváme antibiotickou terapii. Užívání antibiotik má však mnoho negativních vlivů na životní prostředí, zdraví ryb a člověka a mimo jiné může být příčinou vzniku antibiotické rezistence (Lara-Flores, 2011; Heuer et al., 2009). Abychom zabránili všem těmto negativním vlivům, snažíme se dnes využívat nové, preventivní metody k zabránění vzniku onemocnění, jako je přídatek probiotik do rybiho krmiva (Palíková et al., 2015). Probiotika jsou mikroorganismy, které mají pozitivní vliv na zdraví svého hostitele (Gatesoupe, 1999; Silvi, 2008). Jednou ze zkoumaných skupin probiotik jsou bakterie rodu *Lactiplantibacillus* (Balcazar et al., 2009). Pro naši studii jsme použili pstruži autochtonní kmen *Lactiplantinobacillus plantarum* (dříve *Lactobacillus plantarum*).

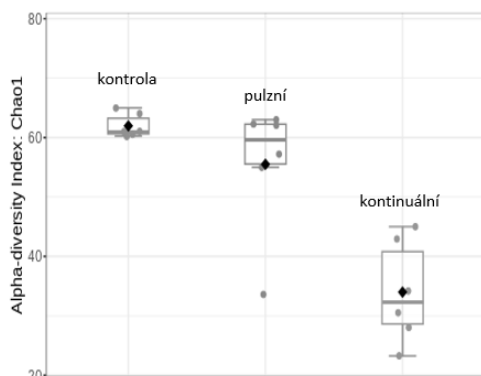
Materiál a metody

Devět set ks pstruha duhového bylo rozděleno do 3 skupin: skupina 1 byla krmena krmivem s probiotickým doplňkem (*L. plantarum*), skupina 2 byla krmena v pulzním režimu krmení (4 týdny s probiotickým doplňkem, poté 3 týdny krmivem bez probiotik) a skupina 3 (kontrola) byla krmena krmivem bez probiotik. Experiment trval 7 týdnů. V průběhu celého experimentu byly pravidelně měřeny základní fyzikální a chemické parametry vody: pH, teplota, obsah kyslíku a amoniaku. Po 7 týdnech byly odebrány vzorky krve na hematologické, biochemické a imunologické vyšetření. Ryby byly humaně utraceny. Ze střevního obsahu ryb izolována DNA a byla provedena metagenomická analýza složení střevního mikrobiomu.

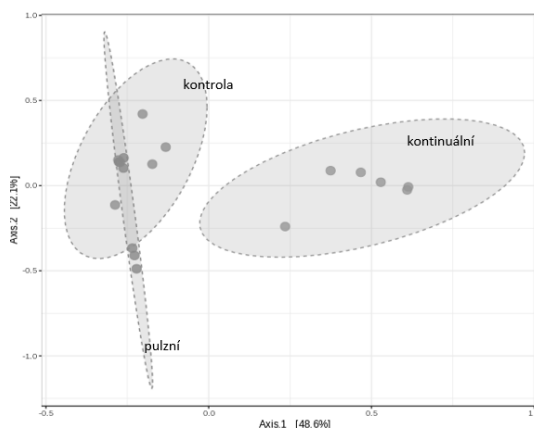
Výsledky

V grafech 1 a 2 vidíme rozdíl ve složení bakteriálních kmenů střevního obsahu vyjádřený jako analýza alfa a beta diverzity mezi skupinami. U kontinuálně krmené skupiny bylo zjištěno vyšší zastoupení bakterií rodu *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Fusobacterium* a dalších. U taxonů Clostridiales, Streptococcaceae a *Peptostreptococcus* pozorujeme snížený výskyt. Při přerušení

suplementace probiotiky jsme pozorovali postupný návrat k původnímu složení střevní mikroflóry.



Graf 1. Analýza alfa diverzity střevního obsahu (Chao 1 index)



Graf 2. Analýza beta-diverzity střevního obsahu (PCoA)

Hematologické a biochemické parametry jsou uvedeny v tabulce č.1. U kontinuálně krmené skupiny došlo k významnému zvýšení hodnot hemoglobinu a hematokritu. V rámci sledovaných parametrů krevní plasmy pozorujeme u této skupiny významný pokles Cl^- . Pulzně krmená skupina vykazuje významný pokles koncentrace Ca a Mg. Ostatní sledované parametry nevykazovaly statisticky významné rozdíly.

Tabulka 1: Hematologické parametry pstruha duhového vykazující statisticky významné rozdíly

	kontrola n=30	kontinuální n=30	pulzní n=30
Hb [g.L^{-1}]	79,01±8,59 ^a	84,22±6,59 ^b	82,21±6,30 ^{ab}
Ht [L.L^{-1}]	0,40±0,03 ^a	0,42±0,04 ^b	0,42±0,07 ^{ab}
Cl^- [mmol.L^{-1}]	118,94±3,49 ^a	116,22±3,24 ^b	119,17±3,58 ^a
Mg [mmol.L^{-1}]	1,02±0,08 ^a	1,06±0,12 ^{ab}	1,10±0,11 ^b
Ca [mmol.L^{-1}]	2,88±0,09 ^a	2,90±0,19 ^a	2,98±0,27 ^b

Diskuse

Z výsledků hematologického a biochemického vyšetření krve vyplývá, že statisticky významně bylo ovlivněno 5 krevních parametrů (Ht, Hb, Cl^- , Mg a Ca). Zvýšení hodnot hematokritu a hemoglobinu kladně ovlivňuje transportní kapacitu krve pro kyslík. Složení střevního mikrobiomu může přímo i nepřímo ovlivnit metabolismus minerálních látek, a tím i jejich koncentraci v plasmě.

Porovnání testovaných skupin ryb ukazuje vliv přídatku probiotik (*Lactiplantibacillus*) na složení střevního mikrobiomu. Rozdíl pozorujeme jak v počtu bakteriálních taxonů mezi kontrolou a testovanými skupinami, ale i mezi kontrolní a pulzní skupinou. Po přerušení suplementace je vidět tendence k návratu původního složení střevního mikrobiomu.

Závěr

Provedená studie ukazuje, že přidavek probiotického kmene bakterií *L. plantarum* má vliv na složení střevního mikrobiomu pstruha duhového (*Oncorhynchus mykiss*). Efekt podání probiotik je významnější při kontinuálním podání probioticky obohaceného krmiva. Následně

by bylo vhodné provést experimentální challenge, která by ověřila, zda přidavek těchto probiotik zvyšuje odolnost pstruha duhového vůči patogenům.

Poděkování

Tento projekt byl financován Interní Grantovou Agenturou Veterinární univerzity Brno (projekt no.221/2022/FVHE) a PROFISH CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000869.

Literatura

Balcázar, J. L., Vendrell, D., DeBlas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Múzquiz, J. L. et al. Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 2009, 17: 153-157.

Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. *Aquaculture* 180: 147-165.

Heuer, E.O., Kruse, H., Grave, K., Collignon, P., Karunasagar, I., Angulo, F.J., 2009. Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clin. Infect. Dis.* 49, 1248–1253.

Lara-Flores, M., 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. *Int. Res.J. Microbiol.* 2, 471–478.

Palíková, M., Marková, Z., Navrátil, S., Mareš, J., Papežíková, I. Zdravotní problematika lososovitých ryb v recirkulačních systémech dánského typu v podmínkách České republiky. *Veterinářství*, 2015, 65: 636-642.

Silvi S, Nardi M, Sulpizio R, Orpianesi C, Caggiano M, et al. (2008) Effect of the addition of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* on the gut microbiota composition and contribution to the wellbeing of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.). *Microb Ecol Health Dis* 20: 53-59.

Kontaktní adresa:

Zuzana Lepková MVDr., Ústav chorob ekologie a chorob zoozvířat, zvěře, ryb a včel, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21285@vfu.cz

Diverzita parazitov kmeňa Apikomplexa zelených skokanov

Blood Apicomplexa of the water frogs of the *Pelophylax esculentus* complex

Pavla Bondarenko¹, Žaneta Živčicová¹, Peter Mikulíček², Pavel Široký¹

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

² Katedra zoológie Prírodovedecká fakulta Univerzita Komenského v Bratislave

Summary

The *Pelophylax esculentus* complex refers to a group of hybridizing frogs that includes the *Pelophylax esculentus* and its parental species, *P. lessonae* and *P. ridibundus*. These three species can interbreed and produce viable offspring, leading to a complex network of hybrid populations throughout most of Europe. These frogs are known as hosts for many species of intracellular and extracellular parasites.

Keywords: Amphibia; *Pelophylax*; Apicomplexa; blood parasites

Úvod

V komplexe stredoeurópskych vodných skokanov, *Pelophylax esculentus* (Linnaeus, 1758), je hybridogenetický hybrid medzi *Pelophylax lessonae* (Camerano, 1882) a *Pelophylax ridibundus* (Pallas, 1771). Tieto tri druhy sa môžu krížiť a produkovať životaschopné potomstvo, čo vedie ku komplexnej sieti hybridných populácií vo väčšine Európy. Zelený skokany sú hostiteľmi veľkej rozmanitosti parazity (Gaibova. H.D. 2010). Zelený skokany sú hostiteľmi veľkej rozmanitosti parazity (Gaibova. H.D. 2010). Kmeň Apicomplexa predstavujú jednu z najväčších skupín parazitických protistov so 6 000 až 7 000 opísanými a pravdepodobne tisíckami nepopísaných druhov (Volf P. 2017). V krvi vodných skokanov a iných obojživelníkov boli zistení zástupcovia kmeňa Apicomplexa rodov *Dactylosoma* (Labbé, 1894), *Hepatozoon* Miller, 1908, *Lankesterella* Labbé, 1899 a *Schellackia* (Reichenow, 1919).

Materiál a metodika

Celkovo bolo preskúmaných 455 zelených skokanov rodu *Pelophylax* patriacich k trom taxónom (*P. lessonae* - 31, *P. ridibundus* - 228 a *P. esculentus* - 196), z toho 364 zo Slovenska, 84 z Maďarska. a 7 z Nemecka. Vzorky boli odobraté v rokoch 2013 až 2017. Analyzovali sme krvné nátery na prítomnosť krvných parazitov. Krvné nátery boli farbené podľa Giemsa a Romanovského (riedenie 1:10 destilovanou vodou s pH 7, farbenie po dobu 15 min). Nafarbené preparáty boli nakoniec natrvalo zafixované zaliacím médiom Entellan. Preparáty boli vyšetrené svetelným mikroskopom Olympus BX53. Molekulárnou amplifikáciou génu 18S rRNA sme spracovali 108 vzoriek na detekciu parazitov kmeňa Apicomplexa. Vybrali sme 63 pozitívnych vzoriek a poslali ich na sekvenovanie. Analýza sekvencií bola urobená v programe Geneious 9.1.5 Jedna vzorka mala zlu kvalitu sekvencie.

Výsledky a Diskuse

Zo 455 vzoriek analyzovaných mikroskopickým vyšetrením bolo 108 pozitívnych, čo predstavuje prevalenciu 23,7 % (*P. lessonae* – 29,03 %, 9/31; *P. ridibundus* – 24,12 %, 55/228; *P. esculentus* – 22,44 % 44/196). Vybrali sme 63 pozitívnych vzoriek a poslali ich na sekvenovanie. Našli sme štyri rody parazitov: *Hepatozoon*, *Dactylosoma*, *Lankesterella* a *Eimeria*.

Rod *Hepatozoon* bol zistený u *P. ridibundus* 62,85 % (22/35) a u *P. esculentus* 36 % (9/25). Prevalencia rodu *Hepatozoon* je jednoznačne najvyššia (49,20 %), pretože sa vyskytoval v 31 zelených skokanoch z celkového počtu 63 blastovaných jedincov. Rod *Hepatozoon* bol opísaný

už v každé skupině terestrických stavovců. Vektorom sú väčšinou dvojkrídlovce, najmä komáre rodu *Culex*.

Druh *Dactylosoma ranarum* sa našiel u *P. esculentus* 60 % (15/25), u *P. ridibundus* 31,42 % (11/35) a u *P. lessonae* 66,66 % (2/3). Záznamy o rode *Dactylosoma*, ktoré parazitujú na žabách, sú početné z Afriky (Netherlands et al. 2015). Možným vektorom sú dvojkrídlovce alebo pijavice.

Najvzácnejšie rody boli *Lankesterella* a *Eimeria*. Dve sekvencie priradil BLAST k rodu *Lankesterella*, druh *Lankesterella kabeeni* sa u *P. ridibundus* v dvoch vzorkách zo Slovenska a Maďarska. Vzorka zo Slovenska mala percentuálnej identity 89.36% z lokality Šulianske jazero, vzorka z Maďarska mala percentuálnej identity 95.81% z lokality Földsziget. Rod *Eimeria* bol nájdený v jednej vzorke *P. esculentus* zo Slovenska mala percentuálnej identity 97.00%. *Eimeria* patrí medzi kokciédie, ktoré typicky napádajú bunky epitelu čreva, znamená v vzorke došlo ku kontaminácii.

Záver

Krvné parazity kmeňa Apicomplexa boli zistené u zelených skokanov (rod *Pelophylax*) odchytených na území Slovenska, Maďarska a Nemecka. Pre splnenie tohto cieľa boli krvné nátery vyšetrené mikroskopicky a následne boli pozitívne vzorky vyšetrené molekulárnymi analýzami (marker 18S rDNA). *Hepatozoon sp.* je najfrektovanejšie sa vyskytujúci intracelulárny krvný parazit kmeňa Apicomplexa u zelených skokanov. Naša štúdia poukazuje, že nie je žiadny relatívny rozdiel vo výskyte krvných parazitov kmeňa Apicomplexa medzi *P. esculentus* a *P. ridibundus*. Kvôli nízkemu počtu vzoriek, sme *P. lessonae* sme vylúčili z našich analýz.

Literatura

DESSER S. S., SIDDALL M. E., BARTA J. R. Ultrastructural observations on the developmental stages of *Lankesterella minima* (Apicomplexa) in experimentally infected *Rana catesbeiana* tadpoles. *The Journal of Parasitology*. 1990, vol. 76, no. 1, s. 97-103

GAIBOVA, D., MAMEDOVA, S.O. Blood parasites of the Eurasian marsh frog *Pelophylax ridibundus* from the fresh waters of Azerbaijan. *The Journal of V.N.Karazin Kharkiv National University. Series: biology*. 2010, vol. 920, no. 12, s.54 – 60

NETHERLANDS E.C., COOK C.A., KRUGER D.J.D. Biodiversity of frog haemoparasites from subtropical northern KwaZulu-Natal, South Africa. *Parasites and Wildlife*. 2015, vol.4, s. 135–14

UPTON S. J. & OPPERT C. J. Description of the oocysts of *Eimeria arnyi* n. sp. (Apicomplexa: Eimeriidae) from the eastern ringneck snake *Diadophis punctatus arnyi* (Serpentes: Colubridae). *Systematic Parasitology*. 1991, vol. 20, s. 195-197.

VOLF P., HORÁK P., ČEPIČKA I., FLEGR J., LUKEŠ J., MIKEŠ L., SVOBODOVÁ M., VÁVRA J., VOTOÝPKA J. *Paraziti a jejich biologie*. 2007, Triton, Praha. 318 pp.

ŽIČKUS, T. The First Data on the Fauna and Distribution of Blood Parasites of Amphibians in Lithuania. *Acta Zoologica Lituanica*. 2012, vol. 12, s. 197–202.

Kontaktní adresa: Pavla Bondarenko, Ing., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H21272@vfu.cz

Vliv klimatologických faktorů na výskyt *Borrelia burdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii* a *Francisella tularensis* u volně žijících hlodavců

The influence of climatological factors on the occurrence of *Borrelia burdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* in free living rodents

¹Edita Kozlíková, ¹Eva Bártová, ²Alena Žáková

¹Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, Veterinární univerzita Brno, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, Česká republika

²Oddělení fyziologie a imunologie živočichů, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno, CZ

Summary

Free-living rodents are important carriers and reservoirs of zoonotic diseases. Climatological factors can also influence the process of spreading the infection among animal population. As part of this study, 679 wild small mammals were trapped between 2010-2014 in 3 localities in the Czech Republic. Antibodies to *Borrelia burdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis* were detected by the ELISA method. Climatological data were obtained from the archive of historical climate and weather measurements of the Czech Hydrometeorological Institute from the stations that were closest to the monitored locations. Antibodies to *B. burdorferi s. l.*, *C. burnetii* and *F. tularensis* were detected in 12.4% (84/679), 9.7% (55/568) and 4.6% (26/568) rodents. It was found that climatological factors affect the prevalence of studied agents of vector-borne diseases mainly indirectly, as they influence the activity of the vectors (ticks), the size of rodent population and others as the amount of food resources and activity of animals.

Keywords: Tick-borne diseases; zoonosis; prediction models; ELISA

Úvod

Volně žijící drobní savci, převážně hlodavci, se podílí na šíření minimálně 84 původců zoonotických onemocnění a to močí, trusem nebo kontaktem s kůží. Hlodavci zároveň slouží jako rezervoárová zvířata původců infekčních onemocnění, která jsou přenášena pomocí krev sajících vektorů, jako jsou klíšťata nebo komáři (Luis et al., 2013; Islam et al., 2021). Autoři novějších studií zaměřujících se na hlodavce upozorňují, že je nutné lépe monitorovat infekce a vyhodnocovat rizikové faktory, které přispívají k šíření infekcí (Islam et al., 2020; Islam et al., 2021). Mnoho původců zoonotických onemocnění je citlivých na změny prostředí, jako je teplota, vlhkost nebo množství srážek. Aby bylo možné lépe předvídat zvýšení výskytu infekčních onemocnění, je nutné zjistit případné míry závislosti infekce na klimatologických faktorech (Harwell et al., 2002). V rámci této studie byly detekovány protilátky proti *Borrelia burdorferi sensu lato*, *Coxiella burnetii* a *Francisella tularensis* u hlodavců odchycených ve třech různých lokalitách s cílem vytvořit predikční model pomocí, kterého by se dal předvídat vliv klimatologických faktorů na výskyt sledovaných infekčních patogenů u drobných volně žijících savců.

Materiál a metody

Na 3 lokalitách v ČR (Studénka, Mohelno a Moravský kras) bylo v letech 2010 – 2014 odchyceno celkem 691 jedinců druhů *Apodemus flavicollis* (n=457), *A. agrarius* (n=34), *A. sylvaticus* (n=31), *Clethrionomys glareolus* (n=151) a *Microtus arvalis* (n=6). Ve Studénce se podařilo odchytit 236 jedinců, v Moravském krasu 399 a v okolí Mohelna 56. *B. burdorferi sensu lato* byla vyšetřována po celou dobu odchyty (n=679), *C. burnetii* a *F. tularensis* byly vyšetřovány od roku 2012 (n= 568). Protilátky proti *B. burdorferi sensu lato*, *C. burnetii* a *F. tularensis* byly detekovány ve výplachu srdce hlodavců pomocí metody ELISA. Výsledky

byly vyhodnoceny pomocí ELISA readeru a statistického programu STATISTICA 12. Pro zjištění klimatologických faktorů v době odchyty hlodavců byla získána data z internetového archivu historického měření klimatu a počasí Českého hydrometeorologického ústavu. Data pocházela ze 3 meteorologických stanic v lokacích odchyty (Brno – Tuřany, Velké Meziříčí a Mošnov). Následně byl použit software SPSS Statistics 23, který vytvořil predikční modely a určil, které klimatologické faktory mají vliv na výskyt sledovaných patogenů.

Výsledky

Protilátky proti *B. burdorferi s. l.*, *C. burnetii* a *F. tularensis* byly zjištěny u 12,4 % (84/679), 9,7 % (55/568) a 4,6 % (26/568) odchycených savců. Vyšší prevalence protilátek proti *B. burdorferi s. l.* u hlodavců byla ovlivněna nižším počtem mrazových dnů (dny, kdy minimální teplota vzduchu klesla pod 0 °C). Naopak na snížení prevalence měl vliv snížený tlak vodní páry a nižší teplota na podzim před odchycením. Prevalence *C. burnetii* se zvyšovala s vyšším počtem letních dnů (den s maximální teplotou vzduchu alespoň 25 °C) a nižším počtem ledových dní v roce před odchycením. Prevalence *F. tularensis* byla ovlivněna množstvím denních srážek, při kterých naprší alespoň 1 mm v odchycetém měsíci (pozitivní vliv, pokud bylo 11 a více dní srážek, negativní vliv, pokud bylo takových dní méně než 5). Vyšší pravděpodobnost výskytu *F. tularensis* byla ovlivněna i teplotou na podzim roku předcházejícímu odchycení, pokud byly teploty na podzim vyšší než průměr, tak se prevalence zvyšovala.

Diskuze

Prevalence protilátek proti *B. burdorferi sensu lato* u vyšetřovaných volně žijících savců nejpravděpodobněji závisí na aktivitě vektoru (klíštěte), která je ovlivněna vlhkostí a teplotou vzduchu. Klíšťata preferují spíše vyšší vlhkost ve spojitosti s vyššími teplotami. Nízký tlak vodní páry snižuje jejich aktivitu při hledání hostitelů, velikost populace i přežití vajíček (Gatewood et al., 2009). Snížená aktivita klíšťat koreluje s nižší prevalencí protilátek proti Bbsl. Tím si lze vysvětlit nižší prevalenci u savců odchycených po podzimu, ve kterém byla pozorována podprůměrná teplota vzduchu a nízký tlak vodní páry. Mrazové dny mají vliv na aktivitu a přežívání klíšťat. Čím nižší teploty a čím déle trvají, tím méně klíšťat přežije a tím je nižší prevalence protilátek (Herrmann et Gern, 2013). Prevalence protilátek proti *C. burnetii* byla pozitivně ovlivněna počtem letních dnů, což může být způsobeno vlivem teploty na aktivitu a velikost populace klíšťat na daném území. Pokud je zároveň i mírná zima, dojde k vyššímu přežití klíšťat a tím zvýšení incidence (Gatewood et al., 2009). *F. tularensis* má optimální teplotu růstu 24–39 °C, proto vyšší teplota zvyšuje prevalenci bakterie v populaci a zároveň je při vyšších teplotách zjištěna její vyšší virulence (Horzempa et al., 2008). Výskyt *F. tularensis* u hlodavců pozitivně koreluje s přítomností vodních ploch a řek. V oblastech s vodní plochou bývá vyšší výskyt tularemie, onemocnění způsobené *F. tularensis*. Vlhké prostředí tak pravděpodobně pozitivně ovlivňuje cirkulaci bakterií mezi zvířaty (Desvars et al., 2015).

Závěr

V rámci této studie bylo zjištěno, které klimatologické faktory ovlivňují míru výskytu vybraných infekčních agens u drobných savců ve sledovaných lokalitách. Většina těchto faktorů působí nepřímo, tj. ovlivňuje hlavně aktivitu vektorů a stavy populací drobných savců. Pokud jsou v zimě silné mrazy trvajících delší dobu, dochází ke snížení populace vektorů i rezervoárových zvířat a tím lze očekávat nižší prevalenci sledovaných patogenů v následném roce. Naopak pokud je mírná zima, větší část populace hlodavců a vektorů přežije zimu, což vede ke zvýšení velikosti jejich populace, zároveň je v následném roce dostatek potravy, což pozitivně přispívá k vyšší prevalenci sledovaných onemocnění.

Literatura

DESVARIS, A.; FURBERG, M.; HJERTQVIST, M.; VIDMAN, L.; SJÖSTEDT, A.; RYDÉN, P.; JOHANSSON, A. Epidemiology and ecology of tularemia in Sweden; 1984-2012. *Emerging Infectious Diseases*. 2015, vol. 21, p. 32-39. doi.org/10.3201/eid2101.140916/.

GATEWOOD, A. G.; LIEBMAN, K. A.; VOUREC'H, G.; BUNIKIS, J.; HAMER, S. A.; CORTINAS, R.; MELTON, F.; CISLO, P.; KITRON, U.; TSAO, J.; BARBOUR, A. G.; FISH, D.; DIUK-WASSER, M. A. Climate and tick seasonality are predictors of *Borrelia burgdorferi* genotype distribution. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, vol. 75, no. 8, p. 2476-2483. doi.org/10.1128/AEM.02633-08.

HARWELL, C. D.; MITCHELL, Ch. E.; WARD, J. R.; ALTIZER, S.; DOBSON, A. P.; OSTFELD, R. S.; SAMUEL, M. D. Climate warming and disease risk for terrestrial and marine biota; *Science*. 2002, vol. 296, p. 2158-62. doi.org/10.1126/science.1063699.

HERRMANN, C.; GERN, L. Survival of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) nymphs under cold conditions is negatively influenced by frequent temperature variations. *Ticks and Tick-Borne Diseases*. 2013, vol. 4, p. 445-51. doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.05.002.

HORZEMPA, J.; CARLSON, Jr. P. E.; O'DEE, D. M.; SHANKS, R.; NAU, G. J. Global transcriptional response to mammalian temperature provides new insight into *Francisella tularensis* pathogenesis. *BMC Microbiology*. 2008, vol. 8, p. 172. doi.org/10.1186/1471-2180-8-172.

ISLAM, M. M.; FARAG, E.; HASSAN, M. M.; BANSAL, D.; AWAIIDY, S. A.; ABUBAKAR, A.; AL ROMAIHI, H.; MKHIZE-KWITSHANA, Z. Helminth parasites among rodents in the Middle East countries: A systematic review and meta-analysis. *Animals*. 2020, vol. 10(12), 2342.

ISLAM, M. M.; FARAG, E.; MAHMOUDI, A.; HASSAN, M. M.; MOSTAFAVI, E.; ENAN, K. A.; AL-ROMAIHI, H.; ATTA, M.; EL HUSSEIN, A. R. M.; MKHIZE-KWITSHANA, Z. Rodent-Related Zoonotic Pathogens at the Human–Animal–Environment Interface in Qatar: A Systematic Review and Meta-Analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2021, vol. 18, 5928. doi.org/10.3390/ijerph18115928.

LUIS, A. D.; HAYMAN, D. T. S.; O'SHEA, T. J.; CRYAN, P. M.; GILBERT, A. T.; PULLIAM, J. R. C.; MILLS, J. N.; TIMONIN, M. E.; WILLIS, C. K. R.; CUNNINGHAM, A. A.; FOOKS, A. R.; RUPPRECHT, C. E.; WOOD, J. L.; WEBB, C. T.; A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2013, vol. 280. doi.org/10.1098/rspb.2012.2753

Kontaktní adresa: Edita Kozlíková, Mgr., Ústav biologie a chorob volně žijících zvířat, FVHE VETUNI, Palackého tř. 1946/1, 612 42 Brno, H22338@vfu.cz

Errata

Plant by-products as valuable raw materials to produce homemade soaps.

Leila Zayed, Dani Dordevic, Bohuslava Tremlova

Department of Plant Origin Food Sciences, Faculty of Veterinary Hygiene and Ecology, University of Veterinary Sciences Brno, Palackeho tr. 1946/1, 612 42, Brno, Czech Republic

Summary

This study aimed to analyze the possibility of used fried oil utilization, fortified with orange peels and spent coffee grounds byproducts in the preparation of homemade soaps from the physiochemical properties' perspective. Soaps were produced from heated rapeseed oil afterward the orange peels and coffee ground byproducts were added on. Physiochemical analysis of the experimentally produced soap samples included the following measurements: pH, moisture and total alkalai parameters.

Keywords: waste management; waste utilization; Homemade soaps fortification

Introduction

The world's growing population is increasing, and this leads to increased consumption and wastes the population, (Ganivet, 2020b). During the past decades, the growth of oil consumption is increasing. which is affecting negatively the environment (Singh-Ackbarali et al., 2017), fried oils are one of the by-products that affect especially the environment and the infrastructure costs like sewage cleaning when the particles of the oil will stick and stop the passages (Maniak et al., 2009). Recently, companies are pushed by legislators to consider the environmental and social impacts of their supply chain networks (Jaunich et al., 2020). Some studies have shown that there is great potential today to reuse fried oil as a coast effective raw material in the production of soaps, chemical building blocks in fuel, and other bio-lubricants (Mannu et al., 2020). Since there are studies that showed that the degradation of soap is four times faster than saturated fried oil (Antonić et al., 2020), as well as the amount of energy, is minimal that is required for recycling and production of new soaps (Maotsela et al., 2019). The literature findings were very positive regarding the quality of soap that was produced from fried oil. Based on these facts in this study, the physiochemical properties of fried oil soaps after fortification with other by-products will be explained, to estimate the potentiality of expansion of by-product utilization in homemade soaps. Literature research findings are very minimal concerning the fortification of fried oil-based soaps. The study aims to evaluate the quality of fortified homemade soaps produced from used fried oil and other byproducts such as Coffee grounds as well as orange peels using an eco-friendly utilization.

Methods and Materials

Preparation of soap samples

This has included studying pH, moisture, and total alkali. Different types of oils were used in the process of soap preparation, rapeseed, palm as well as sunflower. From Czech and Austrian origins. The French fries frying process serves as the simulation of the oil frying process in the restaurant. Batches of 100 g were fried in approximately 3.3 L of oil in the fryer FR 2035 (Concept, Chocen^ˇ, Czech Republic) for 5 min at the approximate average temperature of 175 °C. French fries (Hearty Food Co., Tesco, Praha, Czech Republic). Afterward, sampling found a place, to conduct soap production procedures, under the condition of Total Polar Matter, which was measured TPM meter testo 270 (Testo SE & Co. KGaA, Titisee- Neustadt, Germany).

The cold saponification method was used to produce soap samples. 130 g of filtered oil was mixed with 66.92 g of 26% (w/w) NaOH water solution with a help of a blender. The procedure of mixing took (3-5) minutes. As a next step, the mixture was fortified with other wastes like orange peels and coffee ground waste. Afterward, molds were prepared out of the mixture and left for 24 hours, then the filter was left for four weeks in the air.

Assessment of physiochemical parameters of soaps

1% of soap solution in distilled water to measure pH values from each sample using an Orion 4-star meter (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The moisture content was also examined each sample mass was measured before drying using an analytical scale ALS 250-4A (Kern, Frankfurt am Main, Germany), with the precision of 0.1 mg. As well as total alkali was also evaluated by conduction an acid base titration. The excess of acid (10g soap dissolved in ethanol and supplemented with 5 ml H₂SO₄ (aq)) has been titrated with NaOH using phenolphthalein indicator.

Statistics

The tables are presenting the results in mean and standard deviation values, of pH, total alkali and moisture parameters were presented in the results table. Statistical analysis were presented using one-way ANOVA to find the difference within the same sample group.

Results and discussion

The analysis conducted on the experimentally produced soaps are shown in Table 1.

Table 1. Results for pH, moisture, total alkali for produced soap samples

Samples	pH	Total Alkalai	Moisture
Kontorla	10,37±0,06	-0,65±0,03	5,43±0,34
Pom 1%	10,29±0,05	-0,77±0,00	4,98±0,26
Pom 2.5%	10,29±0,04	-0,99±0,01	5,62± 1,08
Pom 5%	10,25±0,02	-1,20±0,05	5,87±0,54
Kava 1%	10,38±0,03	-0,60±0,01	4,10±0,32
Kava 2.5%	10,32±0,03	-0,63±0,02	5,74±0,05
Kava 5%	10,36±0,01	-0,66±0,00	5,71±0,63

The values of pH Levels were similar in all tested samples, they varied between 10.29 and 10.38 and were close to the control group 10.37, with a p-value of 0.013. Moisture content analysis represented low amounts of moist in all samples and sample groups, the groups ranged between 3.84% between and 6.43% of moisture value and show no differences has been shown among the sample groups with a p-value of 0.01. That makes it safe to use, giving a high cleansing effect, and a good lathering property. The acquired results did not show significant difference between homemade soaps that were produced from used oils without additives and those with orange peels and coffee ground byproducts; these findings push the potentiality of home-made soap production using these specific by products. Antimicrobial activity and other physiochemical properties will be interesting to study in further research. No significance was shown on total alkali results since the values within the group were varying.

Conclusion

The pH moist values were not significantly affected after fortification of fried oil-based soaps with coffee ground and orange peels by products however it has affected the total alkali significance, that means that the prepared soaps are as good as the market soaps when it comes to adults use from pH and moisture perspectives. Further research is needed about other physiochemical parameters as well as comparison between the groups statistically also could lead into interesting findings.

References

- Antonić, B., D, D., Jancikova, S., Tremlová, B., & Kushkevych, I. (2020a). Physicochemical Characterization of Home-Made Soap from Waste-Used Frying Oils. *Processes*, 8(10), 1219. <https://doi.org/10.3390/pr8101219>
- Ganivet, E. (2020a). Growth in human population and consumption both need to be addressed to reach an ecologically sustainable future. *Environment, Development and Sustainability*, 22(6), 4979–4998. <https://doi.org/10.1007/s10668-019-00446-w>
- Jaunich, M. K., DeCarolis, J. F., Handfield, R. B., Kemahlioğlu-Ziya, E., Ranjithan, S. R., & Moheb-Alizadeh, H. (2020). Life-cycle modeling framework for electronic waste recovery and recycling processes. *Resources Conservation and Recycling*, 161, 104841. <https://doi.org/10.1016/j.resconrec.2020.104841>
- Maniak, B., Szmigielski, M., Piekarski, W., & Markowska, A. (2009a). Physicochemical changes of post-frying sunflower oil. *International Agrophysics*, 23(3), 243–248. http://www.old.international-agrophysics.org/artykuly/international_agrophysics/IntAgr_2009_23_3_243.pdf
- Mannu, A., Garroni, S., Porrás, J. C., & Mele, A. (2020). Available Technologies and Materials for Waste Cooking Oil Recycling. *Processes*, 8(3), 366. <https://doi.org/10.3390/pr8030366>
- Maotsela, T., Danha, G., & Muzenda, E. (2019a). Utilization of Waste Cooking Oil and Tallow for Production of Toilet “Bath” Soap. *Procedia Manufacturing*, 35, 541–545. <https://doi.org/10.1016/j.promfg.2019.07.008>
- Moheb-Alizadeh, H., Sadeghi, A. H., Fakhrabad, A. S., Jaunich, M. K., Kemahlioğlu-Ziya, E., & Handfield, R. B. (2023). Reverse Logistics Network Design to Estimate the Economic and Environmental Impacts of Take-back Legislation: A Case Study

for E-waste Management System in Washington State. *ArXiv (Cornell University)*. <https://doi.org/10.48550/arxiv.2301.09792>

Singh-Ackbarali, D., Maharaj, R., Mohamed, N., & Ramjattan-Harry, V. (2017). Potential of used frying oil in paving material: solution to environmental pollution problem. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(13), 12220–12226. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-8793-z>

Editace:	prof. MVDr. Lenka Vorlová, Ph.D. doc. MVDr. Bohumíra Janštová, Ph.D. doc. MVDr. Šárka Bursová, Ph.D. Mgr. Alena Zouharová, Ph.D.
Název:	XXV. konference mladých vědeckých pracovníků s mezinárodní účastí. Sborník příspěvků
Ústav:	Ústav hygieny a technologie potravin živočišného původu a gastronomie
Počet stran:	81
Vydání:	1.
Rok vydání:	2023
Vydavatel:	Veterinární univerzita Brno

ISBN 978-80-7305-928-6