

Vědecký výbor výživy zvířat

Hygienické aspekty pastevního chovu drůbeže (*Gallus gallus f. domestica*)

II. Bakteriologické parametry

Doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.
Mgr. Ladislav Čermák, Ph.D.

Praha, duben 2017



SOUHRN

Volný výběh představuje důležitý aspekt v pastevním chovu drůbeže, zatím však máme omezené znalosti o tom, jak různý způsob ustájení a chovného systému ovlivňuje růstovou výkonnost a osídlování patogeny, které běžně kontaminují potraviny. Hlavním cílem této studie bylo zhodnotit vliv různých způsobů ustájení (především stálý pevný přístřešek oproti menšímu mobilnímu, s nebo bez přístupu k venkovní pastvě) a chov různých genotypů brojlerů či nosnic. Hlavním sledovaným faktorem byla přítomnost a změny počtu bakterií ve střevním traktu kuřat včetně těch patogenních jako jsou *Campylobacter* sp. a *Salmonella* sp. Studie zahrnovala tři dílčí pokusy. Výsledky ukázaly rozdíly ve střevní mikrobiotě: Pokusy I a II potvrdily snížení počtů koliformních bakterií ve slepém střevě pastevních kuřat, pokus III prokázal signifikantní zvýšení počtu prospěšných bakterií mléčného kvašení v ileu nosnic s volným přístupem k venkovní pastvě.

SUMMARY

Outdoor access stands for an important part of organic and free-range poultry production, yet limited information exists on the effect of various housing and production systems on growth performance and colonization of food-borne pathogens. Therefore, the primary purpose of the current study was to evaluate the influence of different housing systems (particularly fixed versus small, portable houses, with and without outdoor access to pasture) and usage of different genotypes of broilers and laying hens. The fundamental factor which was focused was a presence and quantitative changes in common gastrointestinal microbiota including pathogenic genera like *Campylobacter* sp. and *Salmonella* sp. The study comprised three pasturing experiments. The results showed differences in intestinal microbiota: Experiments I and II confirmed lowering counts of coliforms in pasture-reared broilers in caecum, experiment III proved a significant increase of beneficial lactic acid bacteria in laying hens' ileum with free access to pasture.

Obsah

1.	Úvod - pastva a welfare zvířat.....	4
2.	Teoretická část.....	4
2.1	Zdraví a aspekty welfare	4
2.2	Patogenní mikroorganismy	5
2.2.1	Salmonella sp.	5
2.2.2	Koliformní bakterie	6
2.2.3	Campylobacter sp.	7
2.2.4	Clostridium perfringens.....	8
2.2.5	Mycobacterium sp.	9
2.2.6	Listeria sp.	9
3.	Experimentální část	10
3.1	Pokus I: Sledování vlivu pastevního výkrmu a hustoty osádky kuřat na počty bakterií ve slepém střevě.....	10
3.1.1	Metodika pokusu I.....	10
3.1.2	Výsledky pokusu I.....	11
3.2	Pokus II: Sledování změn mikrobioty střev pastevních kuřat různých genotypů	12
3.2.1	Metodika pokusu II.....	12
3.2.2	Výsledky pokusu II.....	13
3.3	Pokus III: Sledování vlivu pevného a travnatého výběhu na mikrobiotu střev u nosnic.....	23
3.3.1	Metodika pokusu III	23
3.3.2	Výsledky pokusu III	24
4	Shrnutí a diskuze	28
5	Závěr.....	29
6	Literatura	30

1. Úvod - pastva a welfare zvířat

Anglické slovo welfare se volně překládá jako blaho, blahobyt nebo prospěch. Přes svůj cizí původ už v našem zemědělství zdomácnělo a ve slovníku českých chovatelů znamená pohodu zvířat. Vstup ČR do Evropské unie znamenal pro většinu chovatelů snahu přizpůsobit chovy požadavkům právních norem Evropské unie a s tím spojené náklady na úpravu chovatelských zařízení.

Myšlenka pěti svobod získala širší pojetí, když je předefinovala britská Rada pro welfare hospodářských zvířat (Farm Animal Welfare Council, FAWC), která byla zřízena jako poradní orgán vlády pro otázky welfare zvířat v roce 1979. Z pohledu FAWC welfare zvířat zahrnuje jak fyzickou zdatnost, tak i pocit spokojenosti. Krátce řečeno, welfare zvířat znamená mnohem víc než pouhé vyloučení utrpení. Zákonná opatření vesměs opírají o koncept tzv. Pěti svobod (Farm Animal Welfare Council, 1991), kdy chovaná zvířata nesmí být vystavena hladu a žízni (1), nepohodlí (2), bolesti, zranění a nemocím (3), strachu a tísně (4) a měla by mít možnost vyjádřit normální chování (5). Úroveň uvedených podmínek je významným faktorem pro rentabilitu chovů, i když na druhou stranu ne vždy je možné v podmínkách velkochovů zajistit optimální prostředí. Přestože některé studie dokazují, že někdy snaha o zlepšení welfare může vést spíše ke komplikacím, lze prohlásit, že většina sledování prováděných v chovech drůbeže dokázala, že při zhoršení pohody zvířat stoupají výrobní náklady.

2. Teoretická část

2.1 *Zdraví a aspekty welfare*

V pastevním volném chovu je důležitá péče o zdraví drůbeže. Producent musí zajistit zvířatům adekvátní ustájení, prostor a dobrou výživu, aby minimalizoval stres a byla tak zachována správná funkce imunitního systému. Předpisy a nařízení Státní veterinární správy stanovují preventivní vakcinaci. Výše úhynu souvisí s velikostí chovu a celým systémem pastvy. Nedávná evropská studie poukázala na průměrný úhyn slepic v 39 dobře vedených volných chovech ve výši 14 % oproti 3 % v obohacených klecích (Elson and Croxall, 2006). Další studie prokázala, že mortalita drůbeže je vyšší ve volném chovu (15%) oproti chovu v klecích (4%; Phelps, 1991). Vysoká mortalita může být následkem mnoha rozličných faktorů, jako např. predace, zadušení, napadení endoparazity, a zvyšuje se s pobytem na volném prostoru.

Z nemocí v pastevních systémech jsou uváděny zejména *Pasteurella multocida*, syndrom poklesu snášky (způsobeno Adenovirem), *E. coli*, *Brachyspira* spp., *Histomonas meleagridis* (černá hlava).

Ptačí cholera, způsobená *P. multocida*, může být přenesena z volně žijících ptáků. Drůbež ve volných chovech je často napadena parazity, např. *Ascaridia galli*, *Heterakis gallinarum*, *Capilaria obsignata* nebo *Eimeria* spp. (Pagazaurtundua and Warriss, 2006). Ve srovnání s konvenčními chovy je vyšší výskyt zdravotních problémů v ekologických chovech, které jsou obecně citlivější k patogenům, jsou finančně náročnější a obtížněji se dá zajistit po všech stránkách vyrovnaná výživa.

Počasí také velmi ovlivňuje zdraví a pohodu drůbeže. Šíření nemocí je snazší pro venkovní ptáky během ročních období, kdy jsou za mokra a za deštivých podmínek aktivní komáři. Stojaté vody a louže po vydatných deštích mohou představovat zdravotní rizika u kuřat na pastvě, zejména na těžkých jílovitých půdách. Sanace a izolace jsou preventivní opatření pro omezení problémů s nákazou. Rotace je také klíčem k dobrému managementu pastvy. Ta umožňuje pastvině regenerovat se z pastvy a snižuje nadměrné nahromadění živin a patogenů, a ptáci jsou přesunuti s pohyblivou ohrádkou či výběhem na nové místo (Sossidou et al., 2011).

2.2 *Patogenní mikroorganismy*

2.2.1 *Salmonella* sp.

Bakterie rodu *Salmonella* jsou Gram-negativní tyčinky patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Patří mezi původce gastroenteritidy a tyfoidní horečky a patří mezi nejvýznamnější patogeny osidlující trávicí trakt drůbeže. Salmonely (stejně jako většina bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*) jsou fakultativně anaerobní a netvoří spory. Jsou až na výjimky pohyblivé díky 4 – 5 peritrichálním bičíkům, povrch těla kryjí fimbrie adhezivního typu. Jejich velikost se pohybuje v rozmezí 0,7 – 1,5 µm na šířku a přibližně 2 – 5 µm na délku. Teplotně jsou tyto bakterie poměrně odolné, přežívají dokonce mrazení. Obecně dokáží salmonely růst v rozmezí teplot 6 – 50 °C, ideálně však při 37 °C. Pod mikroskopem je můžeme pozorovat jako jednotlivé tyčinky, páry, ale i ve formě řetízků. Salmonely redukují nitráty na nitrity, fermentují glukózu a jsou oxidáza-negativní. Většinu případů salmonelózy lze označit za zoonózy, některé sérotypy (jako *S. typhi* a *S. paratyphi*) jsou charakteristické pouze pro lidský organismus.

Salmonella spp. se taxonomicky dělí do dvou druhů: *Salmonella enterica* se šesti poddruhy a *Salmonella bongori*, dříve považován za poddruh *S. enterica*. Zdrojem infekcí salmonelou jsou nejčastěji potraviny, zejména drůbeží maso a vejce.

Salmonely se běžně nachází v zažívacím traktu hmyzu, zvířat a člověka. Jsou vylučovány fekáliemi a kontaminují životní prostředí a potraviny. Častým rezervoárem salmonel jsou vejce, zvláště u sérotypu Enteritidis, kdy salmonely mohou kolonizovat ovaria u nosnic a tímto tzv. transovariálním přenosem se salmonely stávají součástí vejce ještě před jeho dalším formováním ve vejcovodu. Pěstované polní plodiny mohou být kontaminovány salmonelami během růstu, sklizně, uskladnění nebo transportu (Beuchat and Ryu, 1997; Davies and Hinton, 2000).

2.2.2 Koliformní bakterie

Pojem koliformní bakterie zahrnuje velkou skupinu Gram-negativních, pohyblivých nebo nepohyblivých bakterií z rodu *Enterobacteriaceae*, které mají tvar tyčinky a netvoří spóry. Mezi koliformní bakterie jsou řazeny rody *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella* a *Escherichia*.

Důležitou vlastností je fermentace laktózy při 35 – 37 °C za aerobních či fakultativně anaerobních podmínek v selektivním prostředí žlučových solí (či jiných povrchově aktivních látek s podobnými, růst inhibujícími vlastnostmi), při které vzniká kyselina (příp. aldehyd) a plyn. V rámci koliformních bakterií dále rozlišujeme fekální (nebo přesněji termotolerantní) koliformy, které jsou schopny růst a fermentovat laktózu i ve 44 °C. Schopnost fermentovat laktózu je závislá na přítomnosti enzymu beta-galaktosidázy a galaktosidu permeázy, které usnadňují vstup laktózy do buňky. Nevykazují cytochromoxidázovou aktivitu.

Koliformní bakterie a fekální koliformní bakterie jsou dlouhou dobu používány jako indikátory fekálního znečištění. Mohou být však nalezeny ve vodním prostředí, v půdě nebo vegetaci. Jsou ve velkých počtech běžně přítomny ve výkalech teplokrevných živočichů. Protože se tedy v rámci této skupiny (zejména mezi koliformními bakteriemi) vyskytuje řada druhů, které nemusí mít fekální původ, směřuje současný trend k přímému stanovení *Escherichia coli*, která je podle směrnic Světové zdravotnické organizace (WHO, 1993) považována za hlavní indikátor fekálního znečištění. Přítomnost termotolerantních koliformů téměř vždy indikuje fekální kontaminaci. Obvykle více než 95 % termotolerantních koliformů izolovaných z vody jsou identifikovány jako střevní *E. coli*. V laboratorních podmínkách jsou termotolerantní koliformy kultivovány na médiu obsahujícím laktózu.

Virulentní kmeny *E. coli* jsou odborníky považovány za jedny z hlavních patogenů v chovech drůbeže. Jejich působením se zvyšuje mortalita, brakace i veterinární náklady. Tento podmíněný patogen se běžně vyskytuje ve střevech ptáků a savců v počtu cca 10⁶ CFU/g zažitiny. Je detekován ve stovkách kmenů, z nichž je 10 až 15 % potencionálně patogenních. *E. coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní spora netvořící tyčinkovitá bakterie pohybující se pomocí bičíků. Je podmíněně patogenní (může, ale nemusí u člověka vyvolat onemocnění), běžně se vyskytuje ve střevním traktu lidí a vyšších obratlovců. Její teplotní optimum je 37 °C, je značně odolná, ve vlhkém prostředí (v pitné a odpadní vodě, ve výkalech aj.) relativně dlouho přetrvává vitální a používá se proto s jinými koliformními bakteriemi (tj. bakteriemi, které při teplotě 30 °C zkvašují laktózu za vzniku kyselin a plynu) jako indikátor fekálního znečištění vody a potravin, který signalizuje potenciální přítomnost střevních patogenů (salmonel, shigel aj.). *E. coli* je za normálních okolností běžnou součástí mikrobioty trávicího traktu. Existují však kmeny, které za určitých okolností mohou být patogenní pro zvířata a člověka (Hejliček and Vrtiak, 1982; Vařejka, 1989; Sherris, 1990). *E. coli* je nesporotvorná tyčinka pohybující se pomocí bičíku. Dosahuje délky 2 – 3 μm a šířky 0,6 μm.

Roste za teploty 8 – 48 °C, optimum je při 37 °C. Rozsah pH pro růst je 6 až 8. Některé druhy mohou tvořit slizovité obaly, jež jsou složeny z polysacharidů. Na svém povrchu nese dva typy fimbrií. Jak bičík, tak fimbrie jsou vysoce antigenní. Bakterie produkuje indol, neroste na citrátu a neprodukuje sirovodík. Je kataláza-pozitivní, oxidáza-negativní. Inkubační doba *E. coli* je 12 – 72 hodin s optimální růstovou teplotou je 30-37 °C. Na rozdíl od skupiny koliformních bakterií obecně, *E. coli* jsou téměř výlučně fekálního původu a jejich přítomnost je tak definitivním potvrzením fekálního znečištění.

Průběh infekcí *E. coli* odpovídá virulenci příslušného kmene a vnímavosti hostitele. Známe několik faktorů, které mohou mít souvislost s virulencí *E. coli* u drůbeže. Nebyl však zjištěn žádný jednotlivý faktor virulence, pomocí něhož by bylo možné odlišit izolované kmeny patogenní od nepatogenních. Průběh infekce a závažnost klinických příznaků mohou být dále ovlivněny faktory, které působí na vnímavost hostitele. K těmto činitelům patří například vystavení jinému infekčnímu agens, vlivy životního prostředí, stav imunitního systému, plemeno nebo linie ptáků. Klinické příznaky jsou nespecifické a liší se podle věku ptáka, délky trvání infekce, postižených orgánů a souběžně probíhajících infekcí. Mortalita z důvodu akutní sepse se objevuje často u mladých jedinců, a to hlavně mezi 4. a 8. týdnem věku. Ptáci, kteří přežijí tuto fázi nemoci, se vyznačují celkově špatným zdravotním stavem doprovázeným často postižením srdce, jater a ostatních vnitřních orgánů. Přenos *Escherichia coli* je možný několika způsoby: vertikálně, například vzduchem a horizontálně, např. krmivem, vodou nebo kontaktem mezi zvířaty. Faktory jako stres, nadměrná vlhkost či sekundární infekce situaci jen zhoršují (Doktorová, 2001).

2.2.3 *Campylobacter sp.*

Kampylobaktery jsou spirální, tenké nebo jen zakřivené G⁻ nesporulující tyčky široké 0,2-0,8 µm a dlouhé 0,5 - 6,0 µm. Rod *Campylobacter* náleží do čeledi *Campylobacteriaceae*, aktuálně jej tvoří 18 druhů gramnegativních bakterií s 6 poddruhy a 2 biovary. Ve starých kulturách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formu. K těmto morfologickým změnám dochází pravděpodobně v důsledku enzymové degradace peptidoglykanové vrstvy. Na jednom nebo obou koncích buňky je umístěn bičík, který umožňuje vývrtkový pohyb bakterie. Kampylobaktery jsou oxidáza pozitivní, netvoří z tryptofanu indol, redukují nitráty, ale nefermentují sacharidy. Jsou termofilní, pohyblivé polárně umístěnými bičíky, podmíněně patogenní. Tvar bakteriální buňky a pohyblivost usnadňují průnik vrstvou hlenu ve střevu hostitele. Vyskytují se v trávicím traktu člověka i téměř u všech domácích a velkého počtu divoce žijících zvířat. Pro dospělou drůbež jsou většinou nepatogenní, přesto je drůbež považována za primárního rezervoárového hostitele. *Campylobacter sp.* je hlavním původcem průjmových onemocnění u lidí (Dirksen and Flagg, 1988), ty bývají následkem požití kontaminovaného jídla nebo vody. Přítomnost kampylobakterů není spojená s přítomností indikátorových mikroorganismů pro čištění odpadních vody, což ukazuje na to, že hlavními přenašeči

v přírodě jsou volně žijící nebo domácí zvířata (Carter et al., 1987). Svými nároky na prostředí jsou odlišné od jiných patogenních bakterií spojovaných s alimentárními infekcemi. Jsou mikroaerofilní, rostoucí nejlépe v atmosféře složené z přibližně 85 % N₂, 10 % CO₂ a 5 % O₂. Kampylobaktery jsou extrémně citlivé na vyschnutí, jsou ale schopné delší dobu přežít v povrchových vodách, trusu a podestýlce. Infekčnost si zachovávají ve vodě po 4 týdny při 4 °C, v mléce 3 týdny při 4 °C a po 24 hod při 25 °C. V trusu zůstávají životaschopné po 3 týdny při 4 °C. Při teplotě -9 nebo -12 °C přetrvávají na povrchu opracovaných kuřat 10 dní a po 182 dní při teplotě -20 °C. Lyofilizovaná kultura přežívá po mnoho let (Silva et al., 2011).

Hlavním rezervoárem *Campylobacter* spp. je zažívací trakt hospodářských zvířat (*C. jejuni* a *C. coli*), domácích mazlíčků (*C. upsaliensis*), ptáků i člověka. Z prostředí střevní mikrobioty se patogen dostává do prostředí porážky. Ve střevním obsahu brojlerů se nachází v průměru 10⁶ – 10⁷ CFU/g kampylobakterů a převládá výskyt druhů *C. jejuni* a *C. coli*. Kolonizace střeva probíhá díky pohyblivosti bakterií (chemotaxe) a produkci adhezivních proteinů. Přežití uvnitř vakuol epiteliálních buněk bakteriím usnadňuje produkce katalázy a superoxid-dismutázy, která inaktivuje volné kyslíkové radikály. Významné pro přežití a patogenitu je schopnost získávat železo z transferinu a laktoferinu obsažených v séru a sliznicích hostitele. Hlavním produkovaným toxinem je CDT (cytolethal distending toxin). Tento toxin narušuje epiteliální klky, čímž je dočasně narušena absorpční funkce střeva a vzniká průjem. CDT je termolabilní (70 °C) a trypsin senzitivní (Silva et al., 2011).

V Evropské unii se roční počet případů pohybuje od roku 2009 nad hranici 200 tisíc. V České republice byl prudký nárůst kampylobakterií zaznamenán od konce 90. let minulého století až do roku 2005. Počet hlášených onemocnění způsobených bakterií rodu *Campylobacter* se v ČR pohyboval mezi lety 2001 – 2010 v rozmezí 20 063 – 30 268 nemocných osob za rok (Epidat, SZÚ). Prevencí výskytu *Campylobacter* spp. je důkladné tepelné opracování potravin, zamezení křížové kontaminace v průběhu zpracování a skladování potravin, dodržování nejen sanitace a desinfekce v průběhu produkce a zpracování potravin, ale i osobní hygieny osob zpracovávajících potraviny. Kampylobaktery se rychle šíří v rámci intenzivních chovů drůbeže během několika dnů a bývají zřídka zjištěny před druhým až třetím týdnem věku (Newell and Fearnley, 2003). Šíření organismu zvyšuje koprofagie a přenos z jedince na jedince fekálně-orální cestou (Newell and Fearnley, 2003). V případě pastvy ve volném výběhu je velmi složité zabránit vysoké úrovni kontaminace *C. jejuni* a *C. coli* (Van Overbeke et al., 2006).

2.2.4 *Clostridium perfringens*

C. perfringens je relativně velká, nepohyblivá, Gram-pozitivní, sporulující, striktně anaerobní tyčinka z čeledi *Bacillaceae*, která na agaru tvoří velké, pravidelné, okrouhlé, lehce lesklé kolonie. Bakterie roste za teploty 15 až 50 °C, s optimem mezi 37 °C a 45 °C pro většinu kmenů. Schopnost tvořit termorezistentní endospory a široké teplotní rozmezí, ve kterém je mikroorganismus schopný růst jsou

vlastnosti, které mu umožňují se množit a přežít v rozličném prostředí. Endospory jsou často širší než vegetativní organismy, ve kterých vznikají, přičemž buňky mají charakteristické tvary včetně nebo klostridiové formy. Klostridie jsou v přírodě hojně rozšířena právě díky schopnosti tvořit odolné endospory. *C. perfringens* je prakticky všudypřítomná bakterie, je možné ji nalézt v půdě, vodě, mléce, prachu, mořském sedimentu, odpadní vodě, stejně jako ve střevě lidí a zvířat a tělech hmyzu. Vyskytuje se hlavně v půdě, vodních usazeninách a v gastrointestinálním traktu zvířat. *C. perfringens* má několik vlastností, které významně přispívají k jeho schopnosti způsobit alimentární onemocnění. Jednak se *C. perfringens* všudypřítomně šíří přirozeným prostředím, takže existuje mnoho příležitostí ke kontaminaci potravin. Dalším důvodem je jeho schopnost vytvářet termorezistentní spory, umožňující přežívání v různých prostředích, včetně nedostatečně uvařeného masa a nesprávných sterilizačních technik. *C. perfringens* má také schopnost rychlého růstu v potravinách a množství může dosáhnout takového počtu bakterií, které je schopnost způsobit alimentární otravu. Poslední důležitou vlastností *C. perfringens* je produkce ve střevech aktivního enterotoxinu (CPE), který je odpovědný za symptomy typické pro gastrointestinální alimentární otravu. *C. perfringens* je původcem například plynatě sněti a velmi vzácného onemocnění u lidí, nekrotické enteritidy (způsobuje ji typ C). Tato bakterie je také původcem mnoha chorob zvířat, jako jsou enterotoxémie a nekrotická enteritida u ptáků včetně drůbeže.

2.2.5 *Mycobacterium sp.*

Mykobakterie jsou mírně zakřivené tyčinky 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, někdy mají tendenci k větvení. Velmi obtížně se barví podle Grama, obvykle se jeví jako slabě gramnegativní. Charakteristický pro ně je pomalý růst v podmínkách *in vitro*. Typovým druhem je *Mycobacterium tuberculosis*, původce tuberkulózy (Holt et al., 1994). V přírodě jsou rezervoárem tuberkulózy divoce žijící zvířata, v Evropě hlavně jezevec (*Meles meles*). Tato zvířata vylučují infekční agens výkaly a močí a teoreticky tak mohou znečistit pastviny pro skot (Hinton, 2000).

2.2.6 *Listeria sp.*

Zástupci rodu *Listeria* jsou pravidelné tyčinky o velikosti 0,4-0,5 x 0,5-2 µm. Jsou grampozitivní, pohyblivé a fakultativně anaerobní. Optimální kultivační teplota je 20-25 °C. Listerie jsou široce rozšířeny ve vnějším prostředí, vyskytují se pravidelně např. v kazící se zelenině. Typovým druhem je *Listeria monocytogenes*, který působí celková septická onemocnění, většinou u imunitně oslabených lidí (Holt et al., 1994). Vyskytuje se celosvětově, v přírodě jsou rezervoárem listerií hlodavci, kteří se na podzim stahují do zemědělských objektů, kde infikují krmiva, listeriózy mívají proto v našich podmínkách sezónní výskyt (Hejlíček and Vrtiak, 1982).

Experimentální část

3.1 ***Pokus I: Sledování vlivu pastevního výkrmu a hustoty osádky kuřat na počty bakterií ve slepém střevě***

3.1.1 Metodika pokusu I

Do pokusu I byli použiti jednodenní pomalu rostoucí kohoutci Hubbard JA757 v počtu 225 kusů. Kuřata byla rozdělena do 3 skupin po 90, 45 a 90 jedincích. Do 4 týdnů věku, tj. 28 dní, byla ustájena v boxech na podestýlce v pokusné stáji drůbeže, kde byl simulován denní režim v délce trvání 16 h. Od 29. dne věku byly 2. a 3. skupina o 45, resp. 90 kusech ustájeny v mobilních ohrádkách na pastvě v areálu farmy Netluky. První skupina 90 kohoutků zůstala v pokusné stáji na podestýlce jako kontrolní skupina. Krmné směsi BR1, BR2, BR3 podle vlastní receptury byly získány z výrobní krmných směsí Sehnoutek a synové s.r.o. (tabulka 1). Kuřata byla do věku 28 dní krmena směsí BR1 (starter), od 29.-42. dne věku byla krmena směsí BR2 (grower) *ad libitum* a od 43. dne věku do 56 dní věku byla krmena směsí BR3 (finisher). Mobilní ohrádky byly na pastvině přesouvány dvakrát denně za účelem zajištění čerstvé pastvy. Dominujícími travinami na pastvině byly jílek vytrvalý *Lolium perenne* (odrůda Merlinda), kostřava luční *Festuca pratensis* (odrůda Kolumbus), jetel luční *Trifolium pratense* (odrůda Violetta) a mezidruhový hybrid kostřavy a jílků *Festulolium* (odrůda Felina). Poslední den pokusu bylo z každé skupiny poraženo 18 kohoutků, byla jim odebrána slepá střeva. Z nich bylo získáno po 1 g vzorku tráveniny, která byla následně homogenizována, a bylo provedeno desítkové ředění za účelem dosažení optimální koncentrace pro následný výsev na selektivní agarové půdy (tabulka 2). Počty bakterií byly stanovovány jako log CFU na gram tráveniny. Sledovány byly počty koliformních bakterií, celkových anaerobů, bakterií mléčného kvašení, kampylobakterů a salmonel. Statistické vyhodnocení bylo provedeno s pomocí SAS verze 9.3 (2011) s použitím one-way ANOVA a Scheffého metody jako následného *post hoc* testu.

Tabulka 1. Složení krmných směsí

Komponenta (%)	BR1	BR2	BR3
Sojový extr. šrot	36	24,8	21,5
Kukuřice	27,75	21,00	21,00
Pšenice	29	42	48,67
Pšeničné otruby	-	5,0	3,96
Řepkový olej	3	3	1,8
Chlorid sodný	0,3	0,3	0,3
Dihydrogenfosforečnan vápenatý	1,3	1,1	0,75
Vápenec mletý	1,7	1,85	1,25
Aminovitan BR1-BR3	0,5	0,5	0,5
L-Lys HCl	0,13	0,21	0,1
DL-methionin	0,29	0,21	0,17
L-threonin	0,03	0,03	-

Tabulka 2. Seznam živných půd, doplňků a kultivačních podmínek (dodavatel Oxoid CZ, s.r.o., Brno)

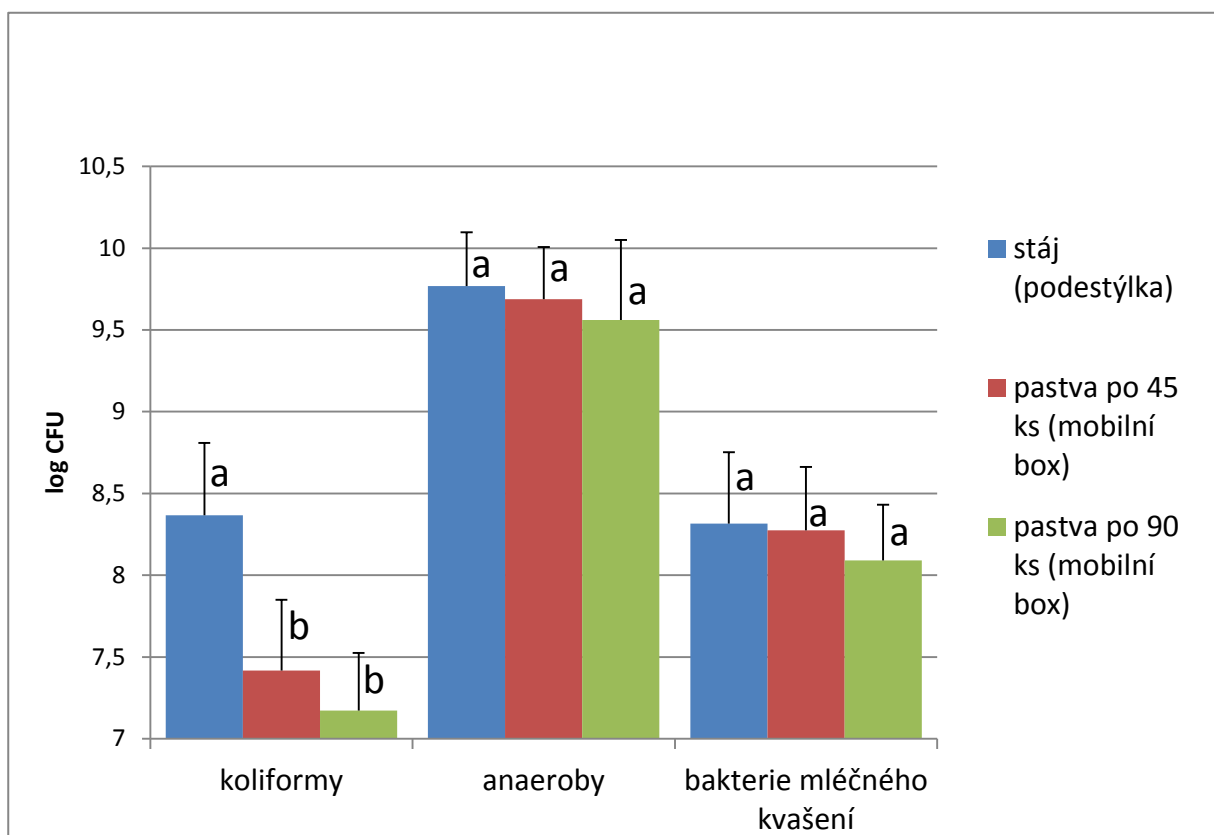
Bakteriální skupina	Agary + doplňky	Technika výsevu	Kultivační podmínky
koliformy	MacConkey agar No.3. (CM0115)	roztěr	aerobně, 37 °C, 24 h
<i>Salmonella</i> spp.	X.L.D. agar (CM0469)	roztěr	aerobně, 37 °C, 24 h
<i>Campylobacter</i> spp.	Campylobacter agar base CM0689 + Preston campylobacter selective supplement (SR 117) + Laked horse blood (SR0048)	roztěr	mikroaerofilně, 37 °C, 48 h
obecné anaeroby	Wilkins-Chalgren anaerobe agar (CM0619)	roztěr	anaerobně, 37 °C, 48 h
bakt. mléčného kvašení	M.R.S. agar (CM0361)	přelití	anaerobně, 37 °C, 48 h

3.1.2 Výsledky pokusu I

Metodou přímé kultivace byly ve slepých střevech kohoutků stanoveny počty koliformních bakterií, celkových anaerobů, bakterií mléčného kvašení a kampylobakterů. Salmonely nebyly nalezeny. Koliformy dosahovaly počtů v rozmezí 10^7 - 10^8 CFU na gram vzorku, celkové anaeroby přibližně 10^8 - 10^9 a bakterie mléčného kvašení kolem 10^8 na gram vzorku (obr. 1). Statisticky významný rozdíl byl pozorován u koliformních bakterií. V porovnání s počty koliformů u kuřat

ustájených na podestýlce byly počty koliformních bakterií u obou pastevních skupin významně sníženy ($P = 0,0001$). U anaerobů a bakterií mléčného kvašení nebyl žádný rozdíl patrný ($P > 0,05$). Kampilobaktery byly nalezeny pouze u kohoutků z pastvy v rozmezí 10^4 - 10^5 na gram, a to vždy jen u 5 z 18 kuřat v každé skupině.

Obr. 1. Počet bakterií (log CFU/g) ve slepém střevě kohoutků v závislosti na způsobu chovu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



3.2 *Pokus II: Sledování změn mikrobioty střev pastevních kuřat různých genotypů*

3.2.1 *Metodika pokusu II*

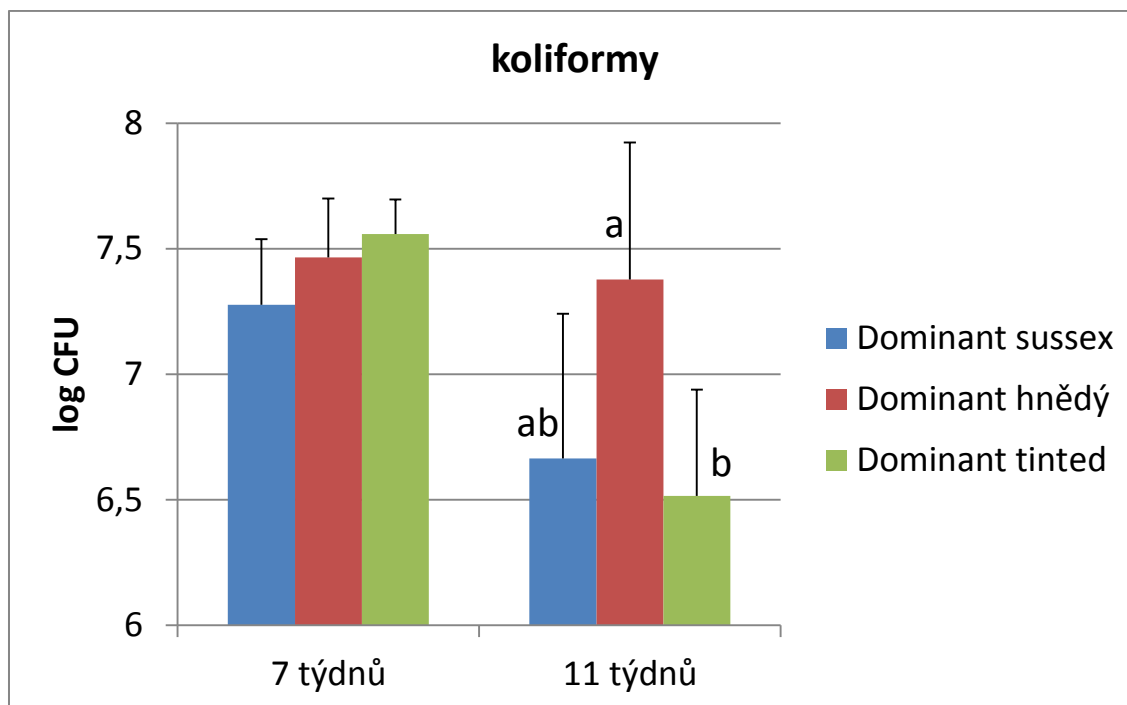
Do pokusu II byli použiti jednodenní, pomalu rostoucí kohoutci Dominant v počtu 300 kusů. Kuřata byla dle genotypu rozdělena do 3 skupin po 100 ks dle hybridu (Dominant sussex, Dominant hnědý, Dominant tinted). Do 7 týdnů věku, tj. 49 dní, byla ustájena v boxech na podestýlce v pokusné stáji drůbeže. Od 50. dne věku byla ustájena v mobilních ohrádkách na pastvě v areálu farmy Netluky. Krmné směsi BR1, BR2, BR3 dle vlastní receptury byly získány z výroby krmných směsí Sehnoutek a synové s.r.o. Kuřata byla do věku 28 dní krmena směsí BR1 (starter), od 29.-70. dne věku byla krmena směsí BR2 (grower) *ad libitum* a od 71. dne věku do 77 dní věku byla krmena směsí BR3

(finisher). Počty bakterií byly stanovovány jako log CFU na gram tráveniny. Sledovány byly počty koliformních bakterií, celkových anaerobů, bakterií mléčného kvašení, kampylobakterů a salmonel ve slepých střevech a přední části ilea. Použitá živná média a podmínky kultivací byly shodné s pokusem I a jsou uvedeny výše v tabulce 2. Porovnávány byly počty bakterií mezi jednotlivými genotypy na začátku a ke konci pastvy a také počty bakterií pro každý genotyp na začátku a ke konci pastvy. Statistické vyhodnocení bylo provedeno s pomocí SAS verze 9.3 (2011) s použitím one-way ANOVA a Scheffého metody jako následného *post hoc* testu.

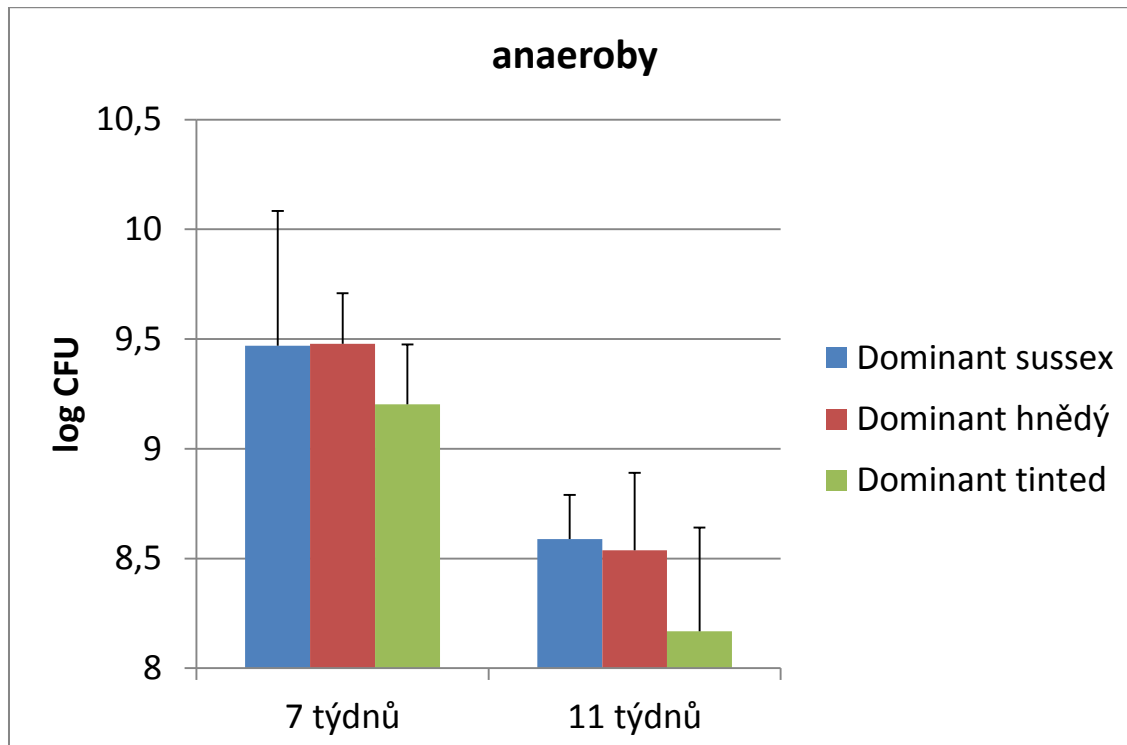
3.2.2 Výsledky pokusu II

Před pastvou mezi genotypy nebyly v tenkém střevě zjištěny žádné rozdíly, po pastvě měl genotyp Dominant hnědý o řád více koliformů než Dominant tinted ($P = 0,0423$; obr. 2), počty anaerobů a bakterií mléčného kvašení nevykazovaly žádný rozdíl mezi genotypy ($P > 0,05$; obr. 3 a 4). Sussex měl cca o řád víc kampylobakterů než ostatní genotypy ($P = 0,0077$; obr. 5). Koliformy následkem pastvy signifikantně poklesly o řád u genotypu Dominant tinted ($P = 0,0004$; obr. 6). Anaeroby se signifikantně snížily u všech genotypů (obr. 7) – Dominant hnědý ($P = 0,0006$), sussex ($P = 0,0124$) a tinted ($P = 0,0017$). Počet bakterií mléčného kvašení vzrostl u genotypu D. hnědý o 0,6 řádu ($P = 0,0003$) a u genotypu sussex skoro o jeden řád ($P = 0,0001$; obr. 8). Počty kampylobakterů se signifikantně snížily téměř o řád u genotypu tinted ($P = 0,0020$; obr. 9).

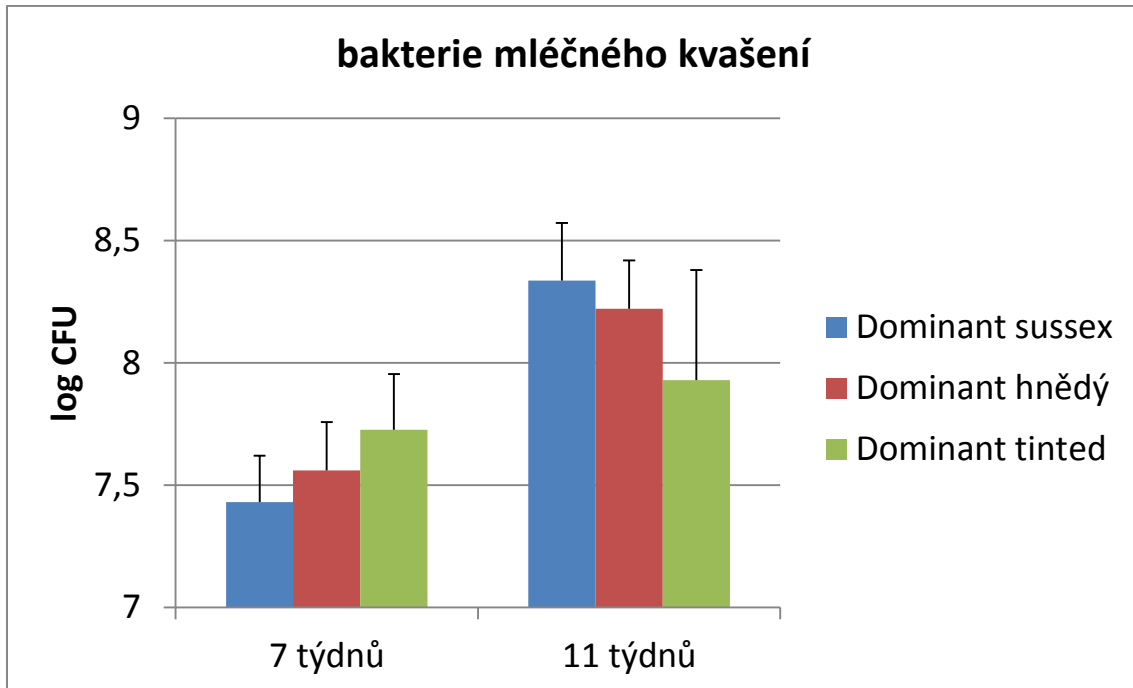
Obr. 2.: Počet koliformů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v závislosti na genotypu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



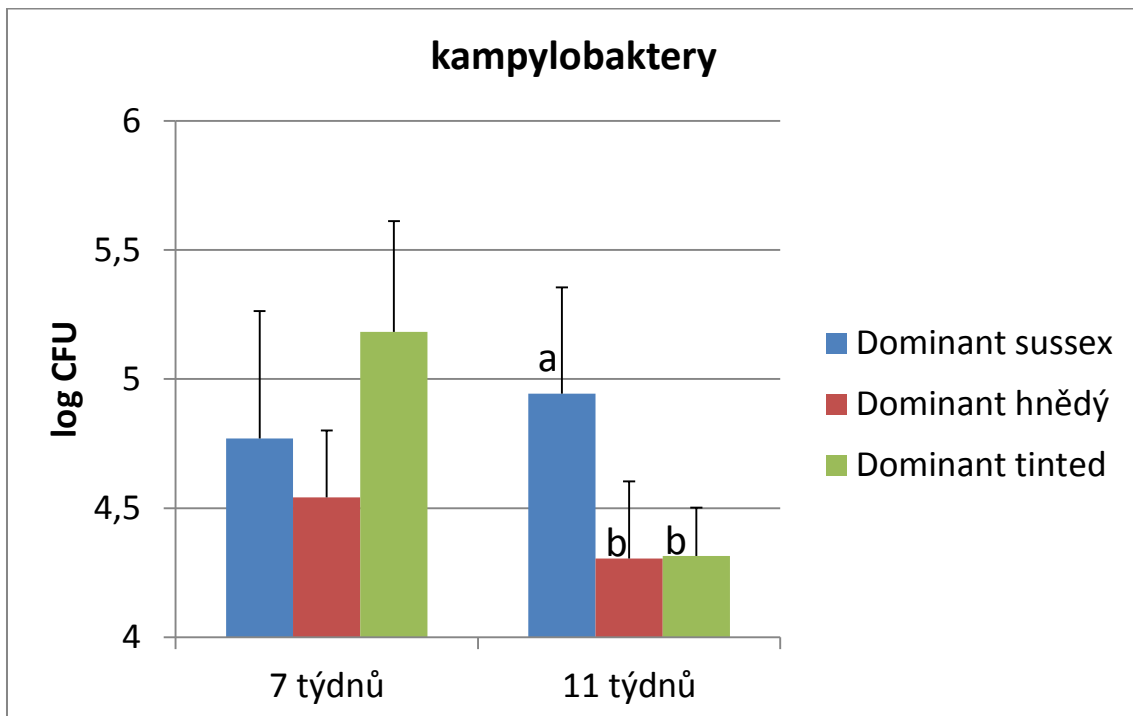
Obr. 3. Počet anaerobů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v závislosti na genotypu



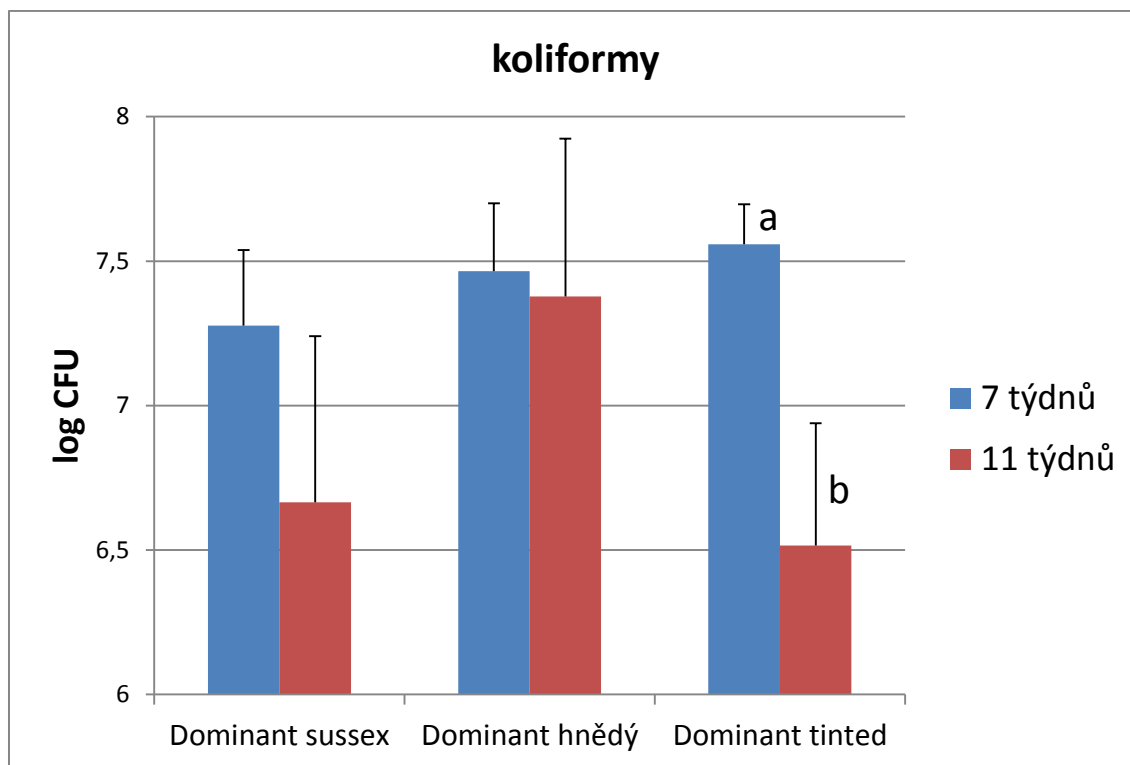
Obr. 4. Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v závislosti na genotypu



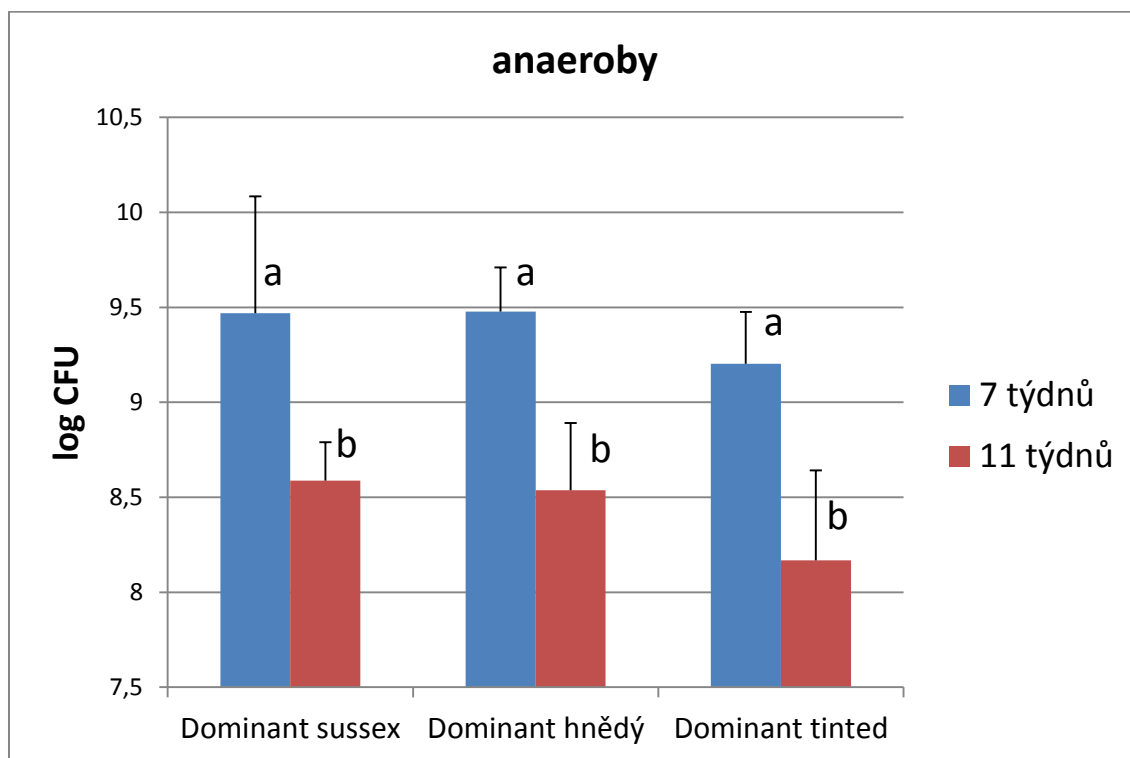
Obr. 5. Počet kampylobakterů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v závislosti na genotypu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



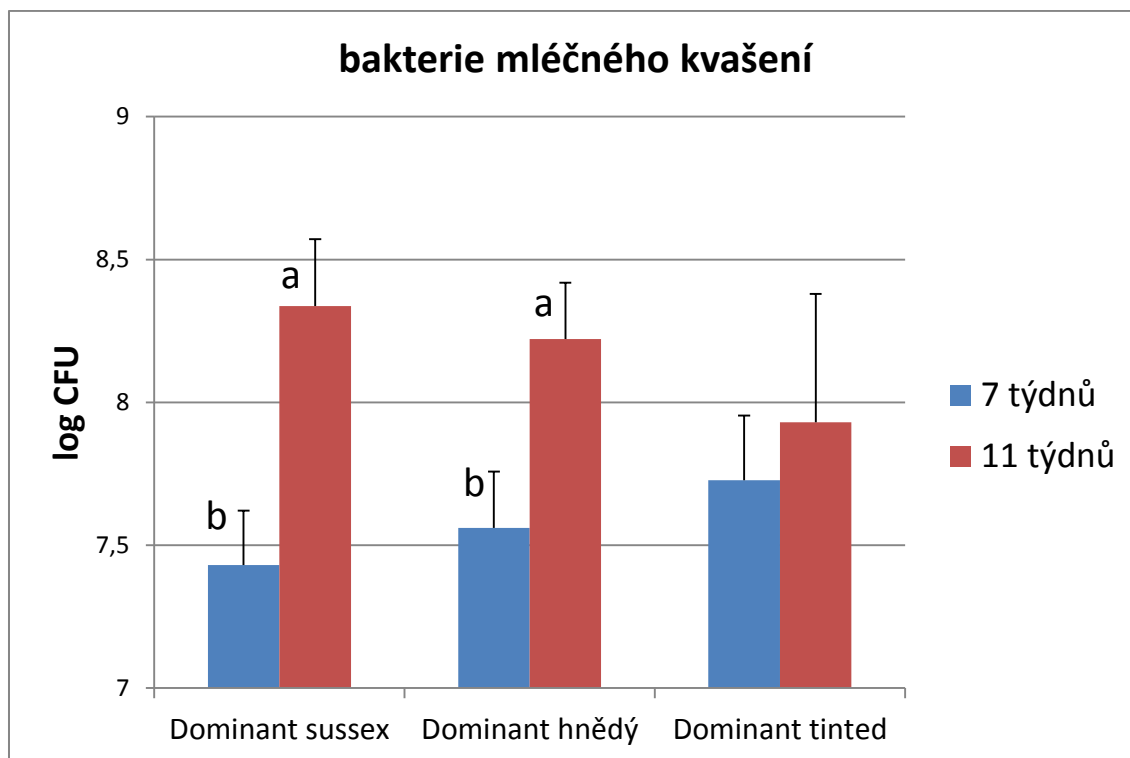
Obr. 6. Počet koliformů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



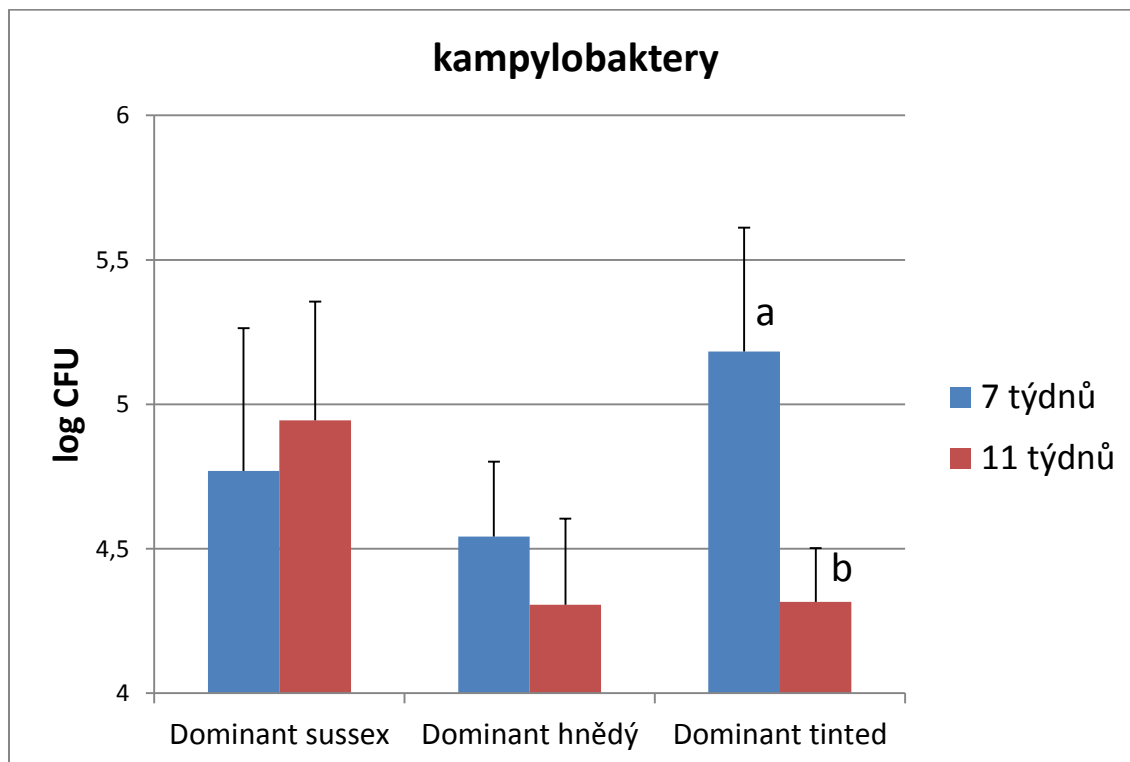
Obr. 7. Počet anaerobů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



Obr. 8. Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)

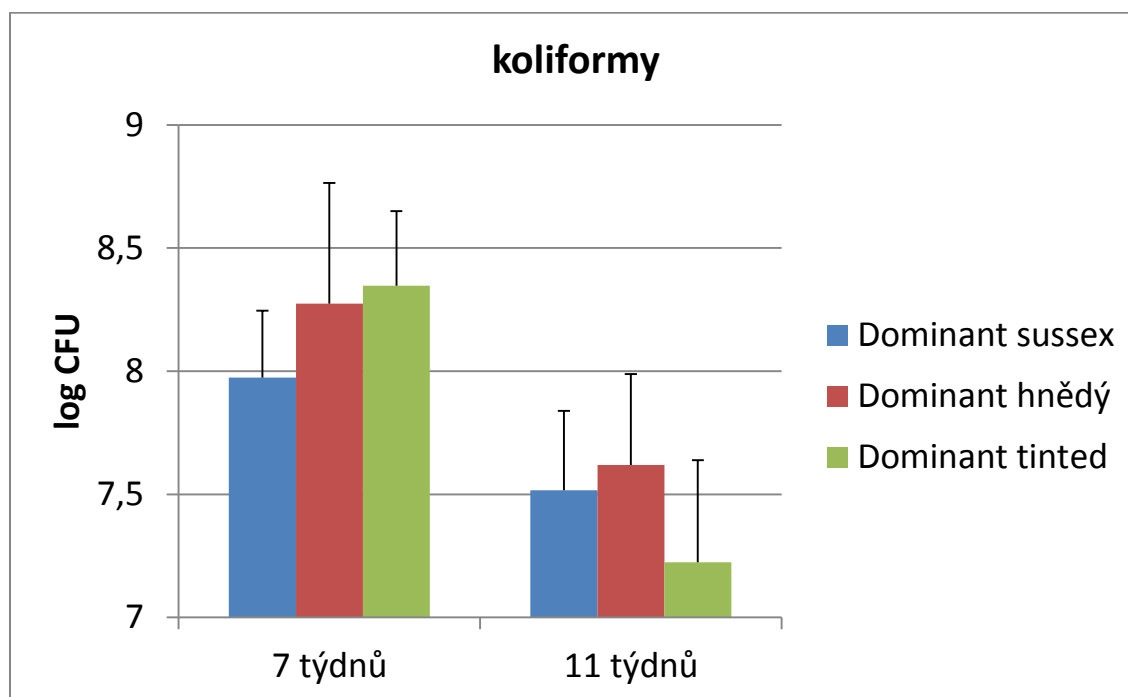


Obr. 9. Počet kampylobakterů (log CFU) v tenkém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)

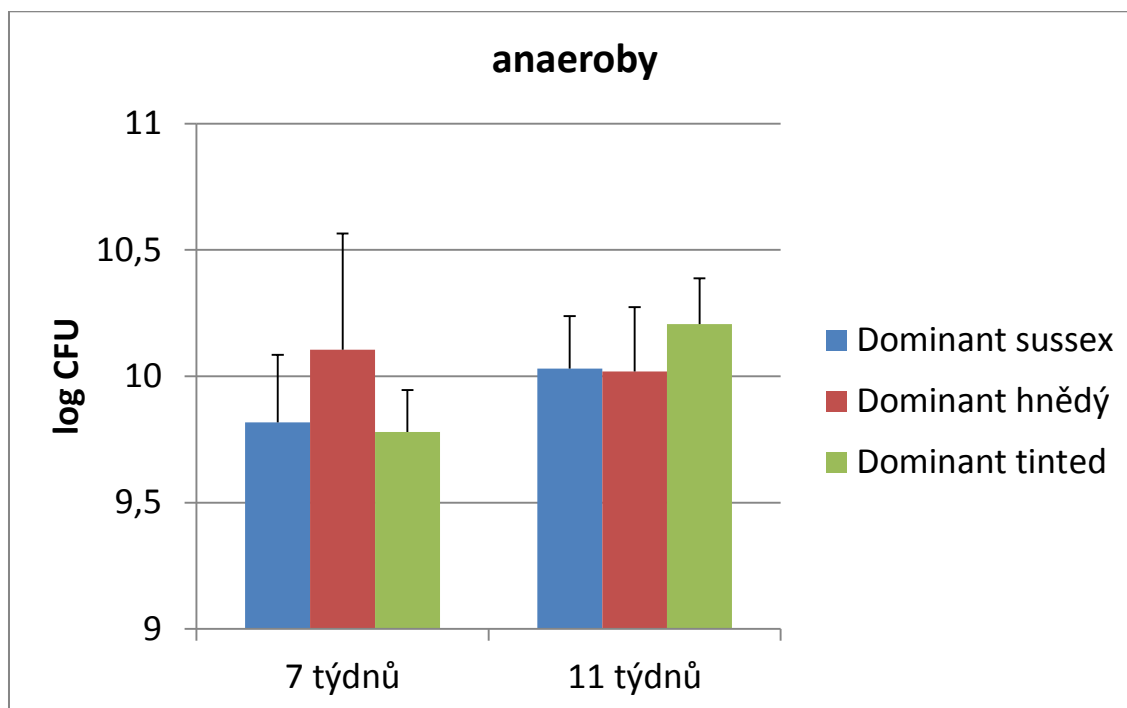


V případě slepého střeva se po pastvě se kromě kampylobakterů počty bakterií mezi genotypy nelišily ($P > 0,05$; obr. 10, 11, 12). Před pastvou byl statisticky významný rozdíl v počtu kampylobakterů mezi genotypy Dominant tinted a hnědý ($P = 0,0318$; obr. 13). Následkem pastvy se signifikantně snížil počet koliformních bakterií u všech genotypů (D. hnědý $P = 0,0382$; sussex $P = 0,0355$; tinted $P = 0,0006$; obr. 14). Počet anaerobů u genotypu D. tinted se pastvou signifikantně zvýšil o 0,4 řádu ($P = 0,0030$; obr. 15), u dalších genotypů byly počty nezměněné. K navýšení počtu bakterií mléčného kvašení o 0,3-0,4 řádu došlo u genotypů sussex ($P = 0,0478$) a tinted ($P = 0,0118$; obr. 16). Počty kampylobakterů se signifikantně snížily téměř o řád u genotypu tinted ($P = 0,0020$; obr. 17).

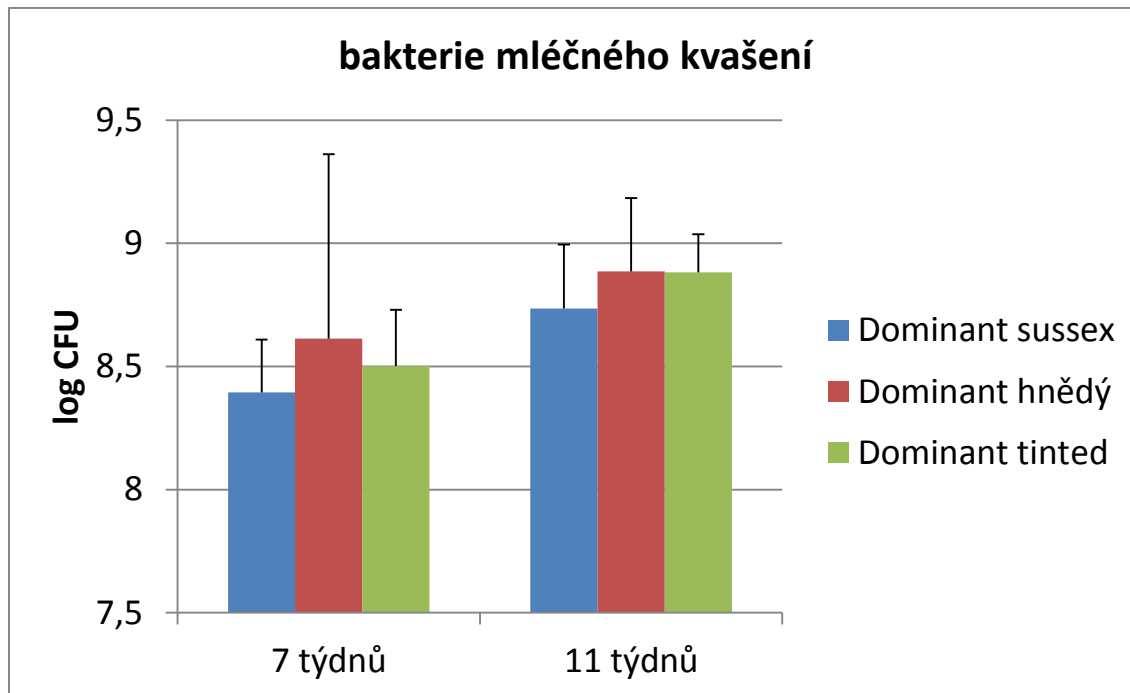
Obr. 10. Počet koliformů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v závislosti na genotypu



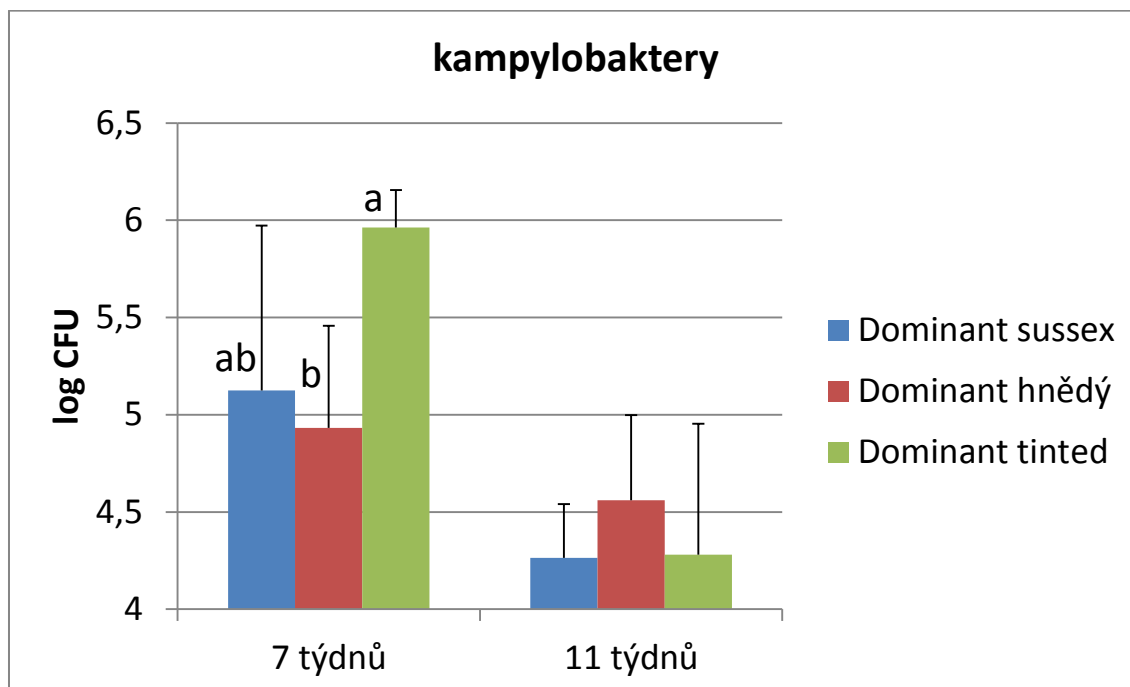
Obr. 11. Počet anaerobů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v závislosti na genotypu



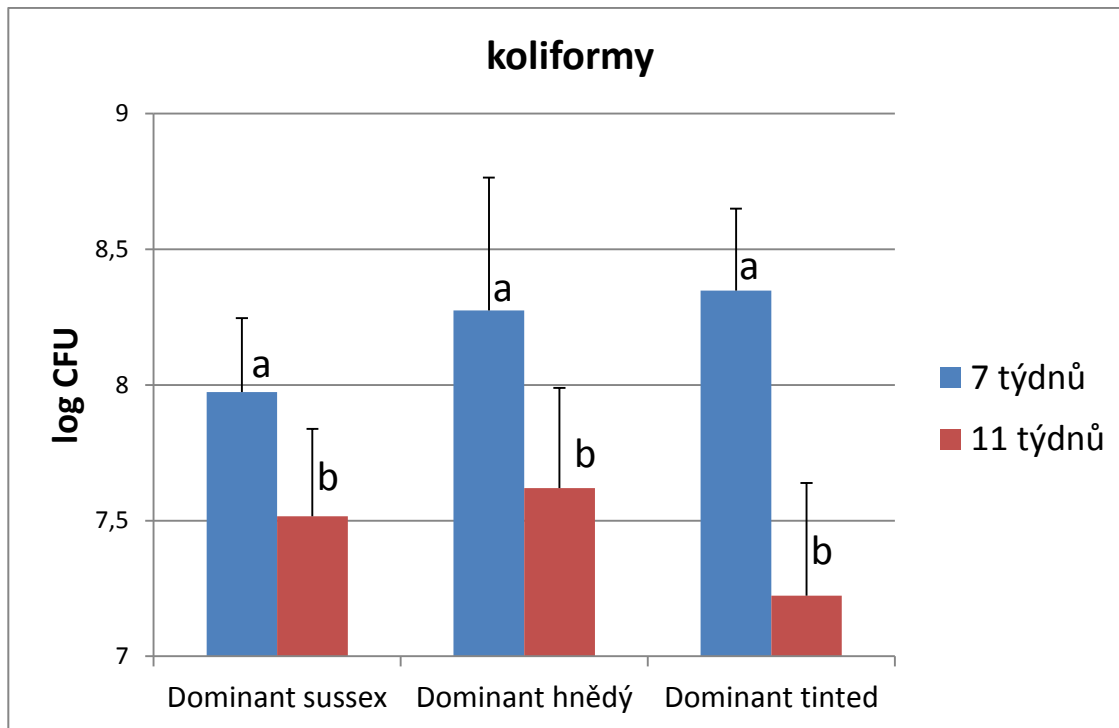
Obr. 12. Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v závislosti na genotypu



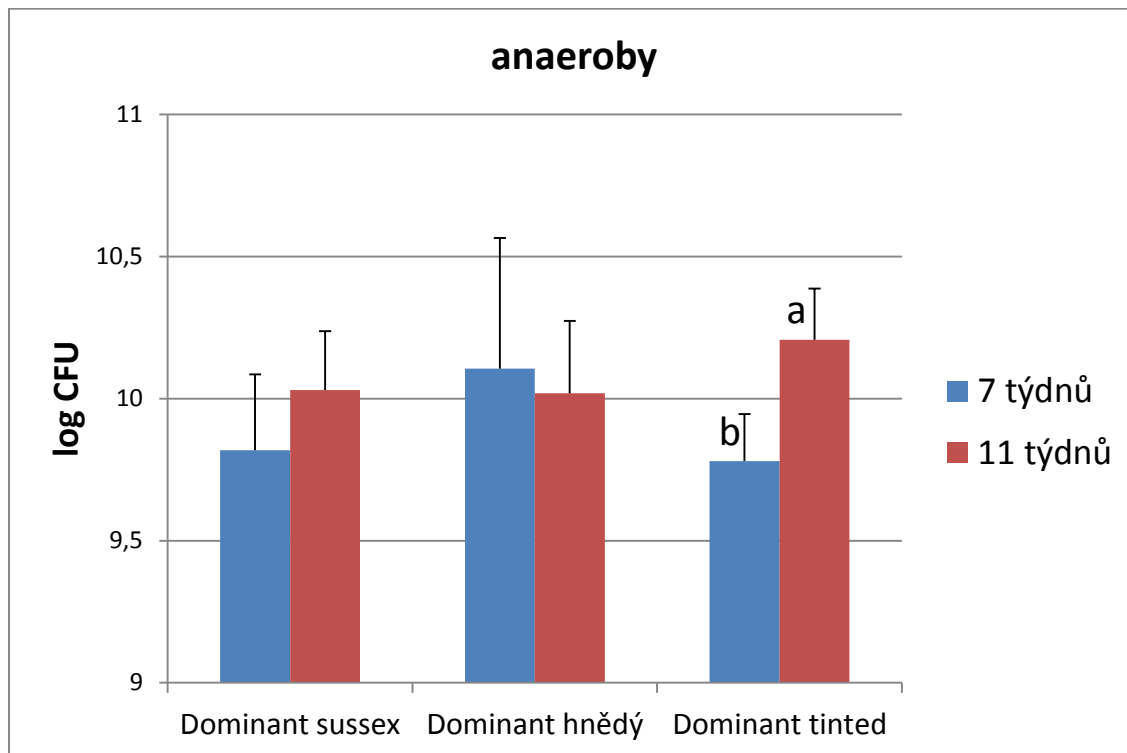
Obr. 13. Počet kampylobakterů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v závislosti na genotypu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



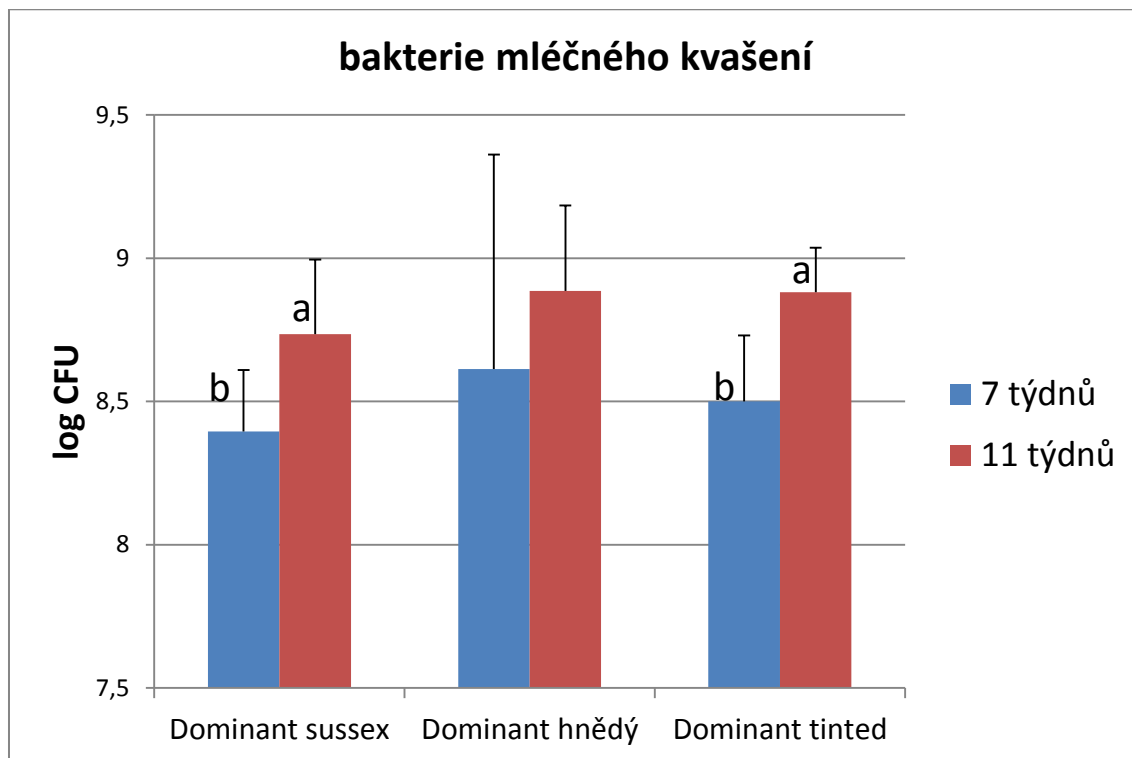
Obr. 14. Počet koliformů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



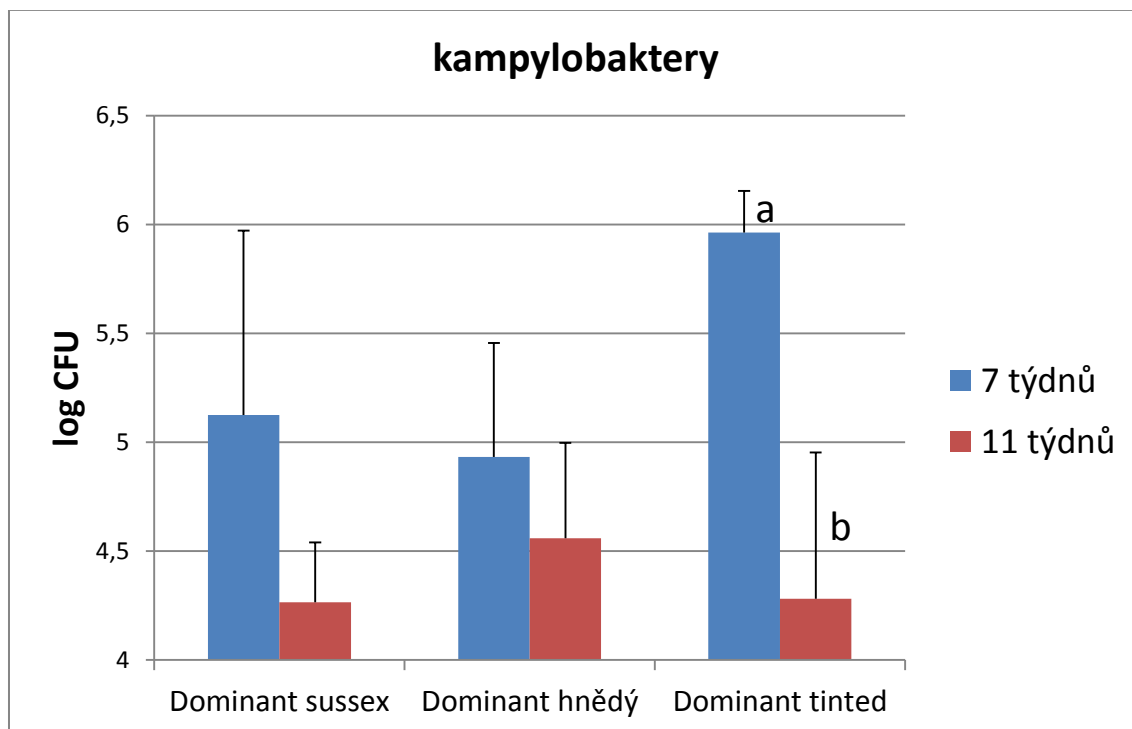
Obr. 15. Počet anaerobů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



Obr. 16.: Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



Obr. 17. Počet kampylobakterů (log CFU) ve slepém střevě kohoutků v 7. a 11. týdnu (přechod na pastvu a 4 týdny na pastvě) (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



3.3 ***Pokus III: Sledování vlivu pastevního výkrmu na mikrobiotu střev nosnic***

3.3.1 ***Metodika pokusu III***

Do pokusu III bylo použito 180 nosnic genotypu Hisex hnědý ve věku 20 týdnů. Kuřice byly rozděleny do tří skupin po 60 kusech lišících se způsobem ustájení. První dvě skupiny byly ustájeny na podestýlce s výběhem v areálu pro účelové hospodářství VÚŽV v Praze Uhříněvsi. Nosnice v první skupině měly volný přístup na travní porost po celou dobu pokusu, a to v době od 6 do 20 h. Druhá skupina měla ve stejné době přístup pouze do pevného výběhu. Třetí skupina byla umístěna v provozních podmínkách v obohacených klecových systémech v Podniku pro výrobu vajec v Kosičkách, s.r.o. Nosnice ve všech systémech ustájení byly od 21. do 37. týdne věku krmeny komerční krmnou směsí N1K start plus a poté od 38. do 45. týdne věku komerční krmnou směsí N1K start (složení směsí v tabulce 3). Světelný den u skupiny 1 a 2 trval v souladu s ročním obdobím a kurník nebyl uměle osvětlován. Světelný den ve třetí skupině odpovídal standardním podmínkám pro chov nosnic v provozu podniku.

Počty bakterií byly stanovovány jako log CFU na gram tráveniny. Sledovány byly počty koliformních bakterií, celkových anaerobů, bakterií mléčného kvašení, kampylobakterů a salmonel ve slepých střevech a přední části ilea ve 24. týdnu před rozdělením do skupin a ve 45. týdnu po ukončení pokusu. Použitá živná média a podmínky kultivací se shodovaly s pokusem I a jsou uvedeny výše v tabulce 2. Statistické vyhodnocení bylo provedeno s pomocí SAS verze 9.3 (2011) s použitím one-way ANOVA a Scheffého metody jako následného *post hoc* testu.

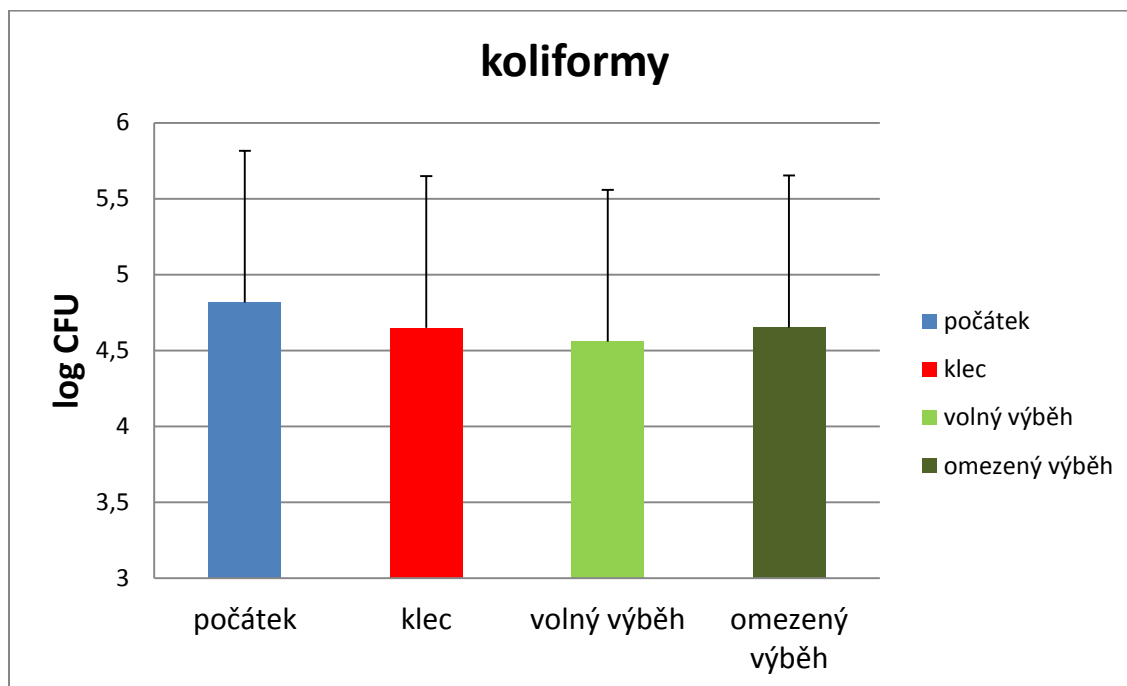
Tabulka 3. Složení krmných směsí (dodavatel Cerea a.s., Pardubice)

Složka (jednotka)	N1K start plus	N1K start
Metabolizovatelná energie (MJ/kg)	11,158	9,725
Sušina (g/kg)	887,27	879,51
Dusíkaté látky (N x 6,25) (g/kg)	144,43	163,7
Vláknina (g/kg)	36,62	41,13
Vápník (g/kg)	35,378	38,12
Fosfor (g/kg)	4,945	4,864

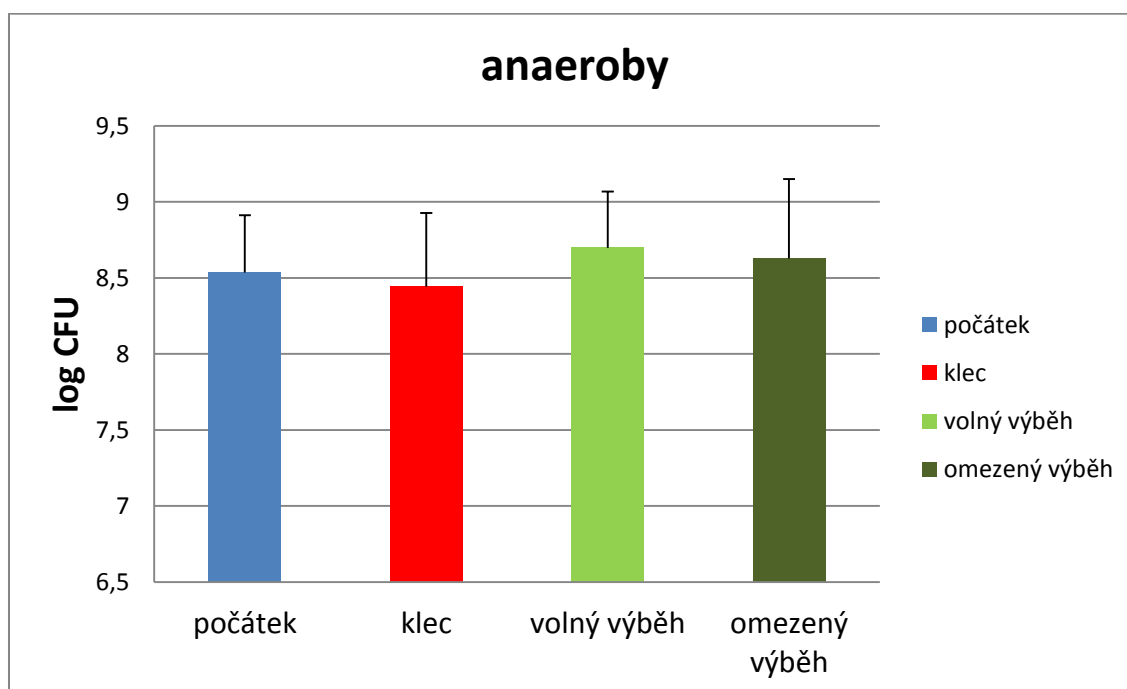
3.3.2 Výsledky pokusu III

V tenkém střevě nebyla zjištěna průkazná změna pro koliformy, anaeroby a kampylobaktery (obr. 18, 19, 21), zato byl zjištěn signifikantní nárůst počtu bakterií mléčného kvašení o jeden řád ve skupině s volným vstupem na pastvu oproti počátku pokusu ve 24. týdnu ($P = 0,0051$; obr. 20).

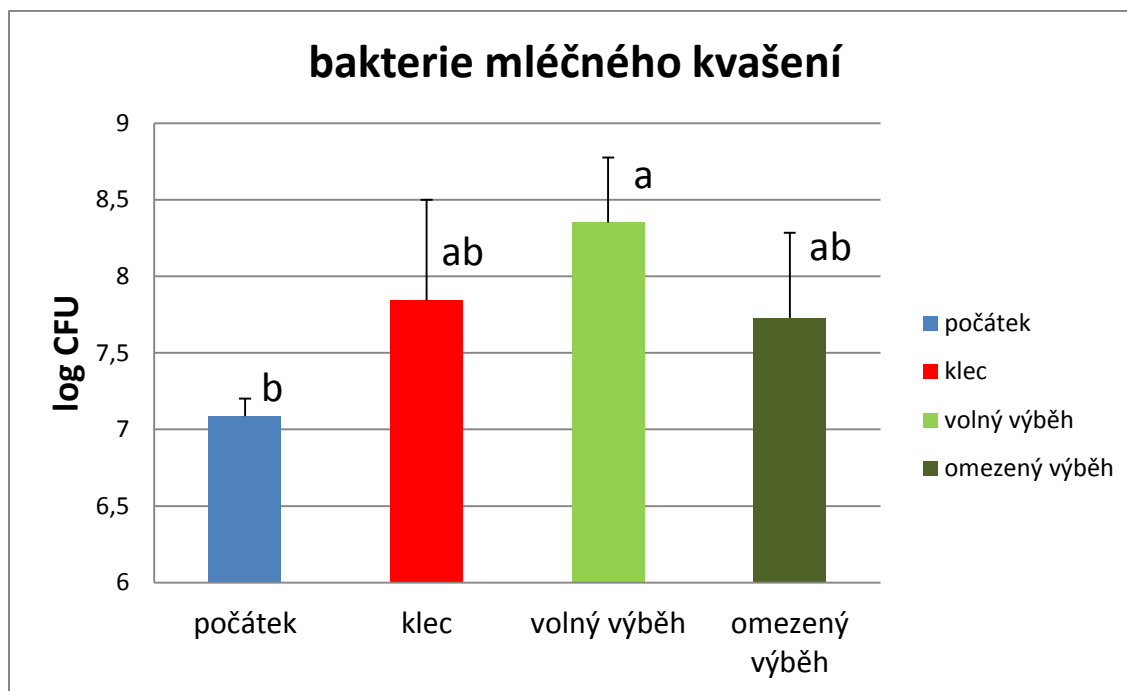
Obr. 18. Počet koliformů (log CFU) v tenkém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu



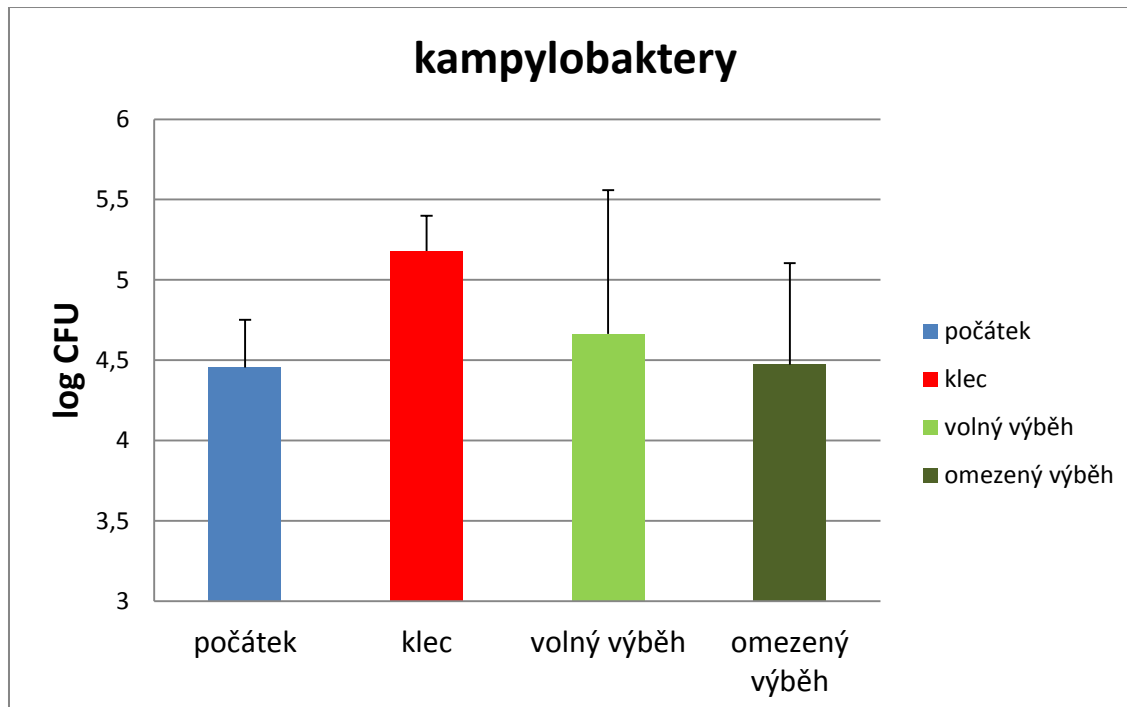
Obr. 19. Počet anaerobů (log CFU) v tenkém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu



Obr. 20. Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) v tenkém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)

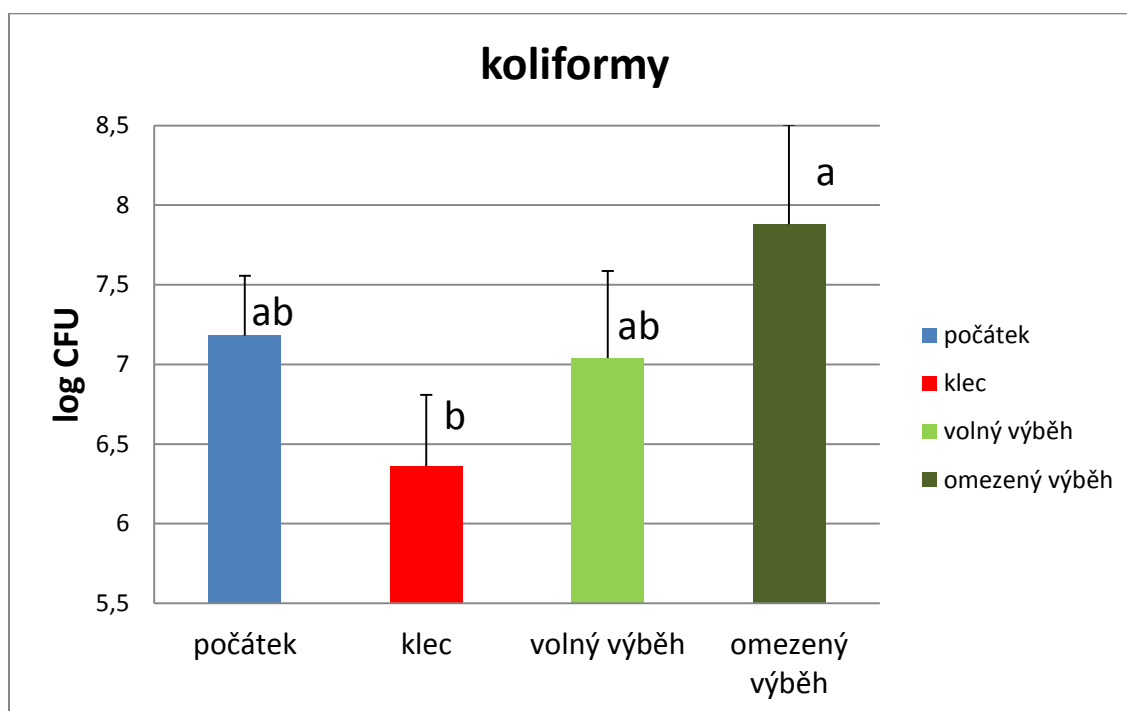


Obr. 21. Počet kampylobakterů (log CFU) v tenkém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu

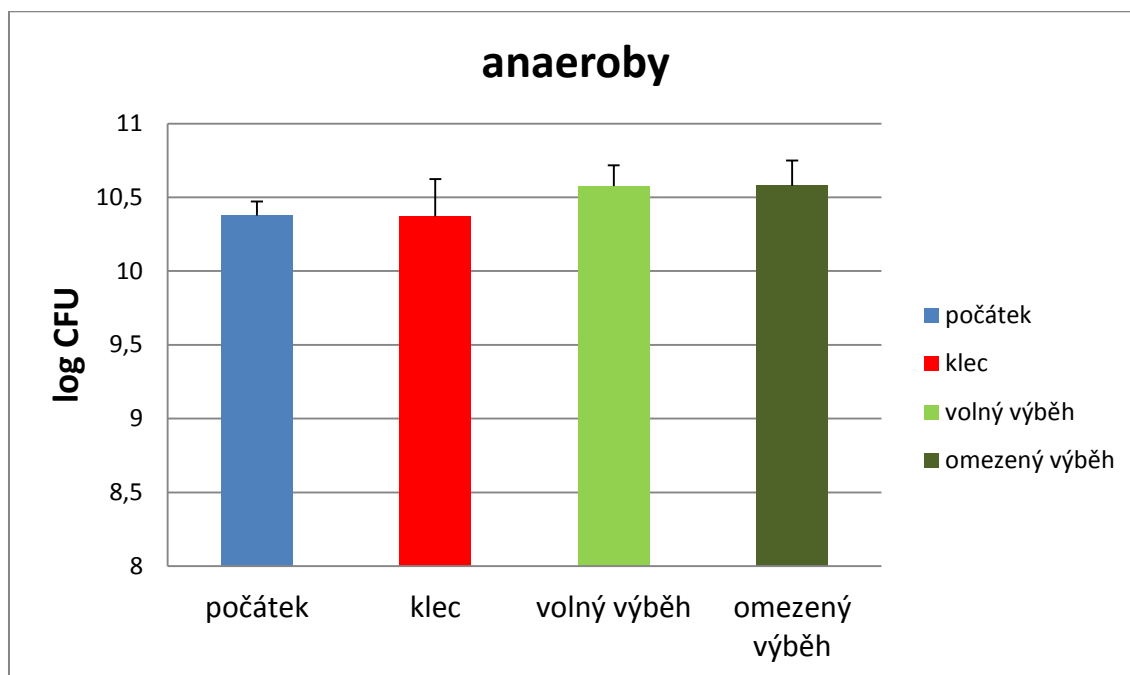


Ve slepém střevě byl jediným signifikantním rozdílem počet koliformních bakterií ($P = 0,0015$), skupina v obohacených klecích se vyznačovala o jeden a půl řádu nižším počtem než skupina s omezeným pevným výběhem (obr. 22). V případě anaerobů, bakterií mléčného kvašení a kampylobakterů nebyly v počtech bakterií zjištěny průkazné rozdíly ($P > 0,05$; obr. 23, 24, 25).

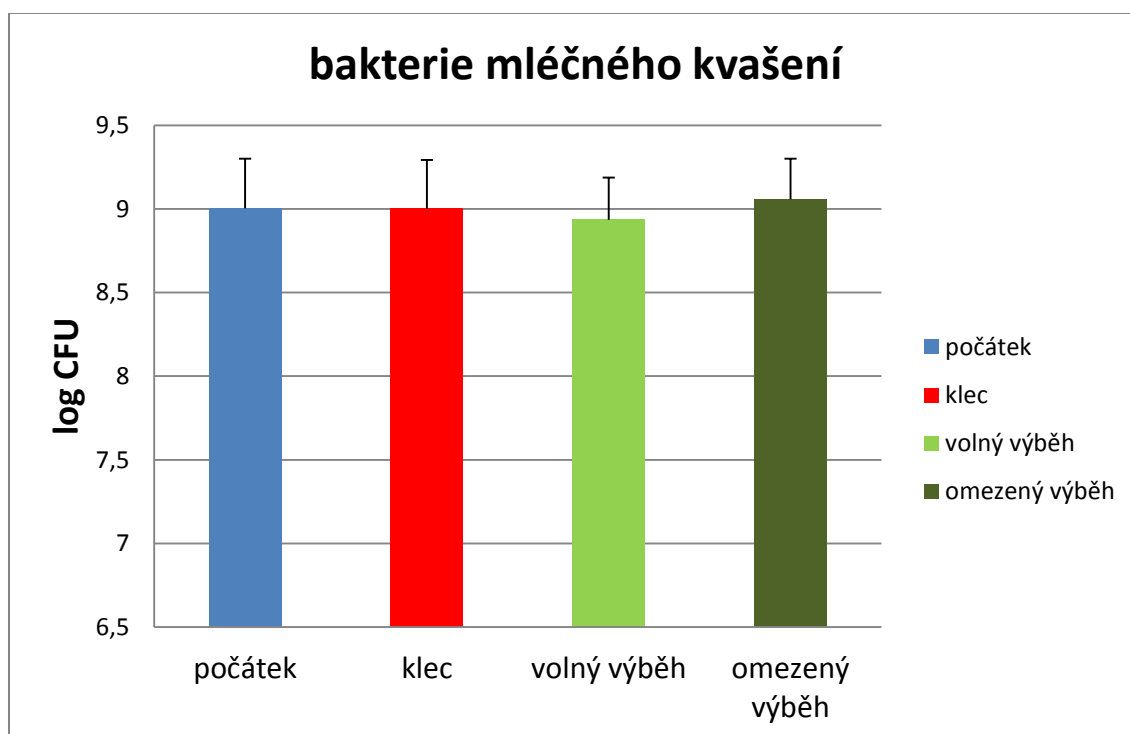
Obr. 22. Počet koliformů (log CFU) ve slepém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu (indexy ilustrují signifikantní rozdíly mezi skupinami)



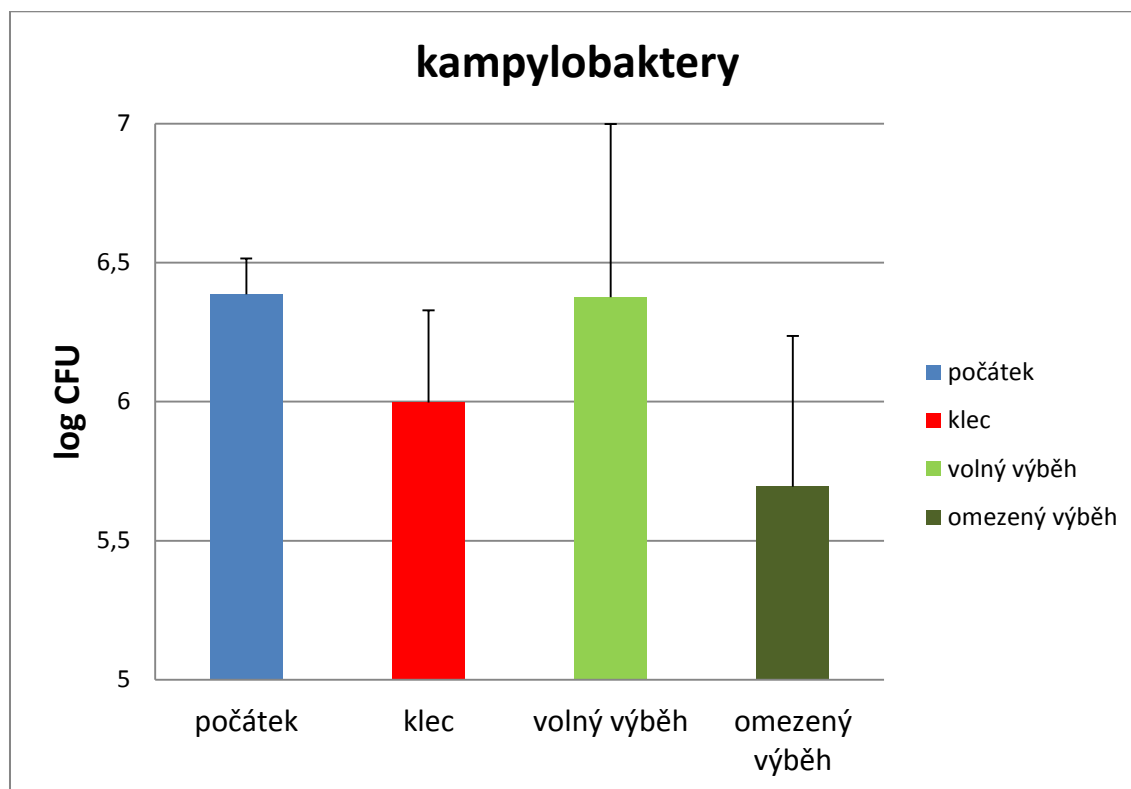
Obr. 23. Počet anaerobů (log CFU) ve slepém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu



Obr. 24. Počet bakterií mléčného kvašení (log CFU) ve slepém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu



Obr. 25. Počet kamylobakterů (log CFU) ve slepém střevě nosnic v závislosti na způsobu chovu



U žádného zvířete nebyly zjištěny salmonely. Na rozdíl od pokusů I a II nebyla prokázána souvislost snížení počtu koliformních bakterií s pastevním výkrmem.

4 Shrnutí a diskuze

V této studii byl pozorován vliv pastevního výkrmu na mikrobiotu slepých střev kohoutků. U prvního pokusu byl významný rozdíl v počtech koliformních bakterií, což bylo potvrzeno i v pokusu II. Ve shodě s našimi výsledky si Losa a Köhler (2001) a Tucker (2002) všimli snížení počtu koliformů v kuřatech krměných esenciálními oleji, které se mohou vyskytovat ve spásané vegetaci. V pokusu III byl po jeho skončení zjištěn prokazatelně nižší počet koliformních bakterií ve slepém střevě nosnic z omezeného výběhu oproti nosnicím v obohacených klecích. S možným vysvětlením tohoto jevu přišli Cross et al. (2007), že vyšší čísla koliformů mohou být způsobena například přítomností antibakteriálních látek ve spásaných rostlinách, které selektivně potlačují grampozitivní bakterie. Obecně lze říci, že nižší počty anaerobů u pastevních kuřat souvisí s nižším příjmem méně výživově hodnotných materiálů, které slouží jako substrát pro střevní mikrobiotu (Bjerrum et al., 2006). Tucker

(2002) zjistil souvislost mezi příjmem rostlinných esenciálních olejů v potravě se zvýšením počtu laktobacilů až na 10^9 CFU/g. Casagrande Proietti et al. (2009) provedli biochemickou charakterizaci střevní mikrobioty a nezjistil žádné větší rozdíly mezi kuřaty z pastvy a z konvenčního chovu. Kaplan and Hutkins (2000) přišli s teorií, že vláknina ve stravě je přednostně využívána bakteriemi rodu *Lactobacillus*, což vede k produkci kyseliny mléčné a mastných kyselin s krátkým řetězcem, a právě tyto látky dokáží inhibovat salmonelu. Dále může vláknina vést k udržování normální mikrobiální populace v zažívacím traktu ptáků (Woodward et al., 2005; Dunkley et al., 2007). Jelikož kampylobaktery patří mezi běžné komenzální mikroorganismy u kuřat, většina studií potvrzuje přítomnost kampylobakterů u drůbeže nezávisle na tom, z jakého typu chovu pocházejí (Han et al., 2009; Hanning et al., 2010). V pokusu I byly kampylobaktery zjištěny pouze u pastevních kuřat. To se dá vysvětlit tím, že ptáci na pastvě se mohou snadno dostat do styku s divokými ptáky, kteří jsou velmi známými přenašeči kampylobakterů.

Jelikož je stále ještě minimálně 80 % bakterií v určitých nikách tradičně nekultivovatelných (Schabereiter-Gurtner et al., 2001), proto je případné použití moderních molekulárně-biologických metod pro stanovení střevní mikrobiální diverzity žádoucí a někdy i nezbytné.

5 Závěr

Experimentální část studie prokázala, že pastevní výkrm do jisté míry ovlivňuje střevní mikrobiotu. První dva pokusy shodně odhalily vliv pastvy na snížení koliformních bakterií ve slepých střevech kohoutků. U nosnic z pokusu III došlo naopak k jejich zvýšení. Nejvyšší měrou na pastevní výkrm reagoval genotyp Dominant tinted, došlo k významným změnám v počtech bakterií v tenkém i slepém střevě. Výsledky navíc indikují možnost, že pastva podporuje nárůst prospěšných bakterií mléčného kvašení, což jednoznačně potvrdil pokus III, nebo alespoň nesnižuje jejich počty.

6 Literatura

- Beuchat L.R., Ryu J.H. (1997): Produce handling and processing practices. *Emerging Infectious Diseases*, 3: 459–465.
- Bjerrum L., Engberg R.M., Leser T.D., Jensen B.B., Finster K., Pedersen K. (2006): Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry Science*, 85: 1151–1164.
- Carter A.M., Pacha R.E., Clarke G.W., Williams E.A. (1987): Seasonal occurrence of *Campylobacter* spp. in surface waters and their correlation with standard indicator bacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 53: 523–526.
- Casagrande Proietti P., Dal Bosco A., Hilbert F., Franciosini M.P., Castellini C. (2009): Evaluation of intestinal bacterial flora of conventional and organic broilers using culture-based methods. *Italian Journal of Animal Science*, 8: 51–63.
- Cross D.E., Mcdevitt R.M., Hillman, K., Acamovic T. (2007): The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. *British Poultry Science*, 48: 496–506.
- Davies R.H., Hinton M.H. (2000): Salmonella in animal feed. In: Wray C., Wray A. (Eds.): *Salmonella in Domestic Animals*. CAB International, Oxford, England, pp. 285–300.
- Dirksen J., Flagg P. (1988): Pathogenic organisms in dairy products; cause, effects and control. *Food Science and Technology Today*, 2: 41–43.
- Doktorová J. (2001): Jak se bránit infekci *Escherichia coli* u drůbeže. *Náš chov*, online (<http://naschov.cz/jak-se-branit-infekci-escherichia-coli-u-drubeze/>)
- Dunkley K.D., McReynolds J.L., Hume M.E., Dunkley C.S., Callaway T.R., Kubena L.F., Nisbet D.J., Ricke S.C. (2007): Molting in Salmonella Enteritidis-challenged laying hens fed alfalfa crumbles. II. Fermentation and microbial ecology response. *Poultry Science*, 86: 2101–2109.
- Sossidou E.N., Dal Bosco A., Elson H.A., Fontes C.M.G.A. (2011): Pasture-based systems for poultry production: implications and perspectives. *World's Poultry Science Journal*, Vol. 67: 47–58.
- Elson H.A., Croxall R.A. (2006) European study on the comparative welfare of laying hens in cage and non-cage systems. *European Poultry Science*, 70: 194–198

- FARM ANIMAL WELFARE COUNCIL (1991): Report on the Welfare of Laying Hens in Colony Systems. MAFF Publications, London.
- Han F.S., Lestari I., Pu S., Ge B. (2009): Prevalence and antimicrobial resistance among *Campylobacter* spp. in Louisiana retail chickens after the enrofloxacin ban. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6: 163–171.
- Hanning I., Biswas D., Herrera P., Roesler M., Ricke S.C. (2010): Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* isolated from pasture flock poultry. *Journal of Food Science*, 75: M496–M502.
- Hejlíček K., Vrtiak J.O. (1982): Speciální epizootologie 1. SZN Praha, 320 s.
- Hinton M.H. (2000): Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *The Veterinary Journal*, 159: 124.
- Holt J.G., Krieg N.G., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 787 s.
- Kaplan H., Hutkins R.W. (2000): Fermentation of fructooligosaccharides by lactic acid bacteria and bifidobacteria. *Applied Environmental Microbiology*, 66: 2682–2684.
- Losa R., Köhler B. (2001): Prevention of colonisation of *Clostridium perfringens* in broiler intestine by essential oils. *Proceedings of the 13th European Symposium of Poultry Nutrition*, Blankenberge, Belgium, pp. 133–134.
- Newell D.G., Fearnley C. (2003): Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 4343–4351.
- Pagazaurtundua A., Warriss P.D. (2006): Levels of foot pad dermatitis in broiler chickens reared in 5 different systems. *British Poultry Science* 47: 529-532
- Phelps A. (1991) Alternative systems to cages need time, say researchers. *Feedstuffs*, 19: 21.
- Sherris J.C. (1990): *Medical Microbiology*, Prentice-Hall International Inc., Toronto, 991 s.
- Schabereiter-Gurtner C., Maca S., Rolleke S., Nigl K., Lukas J., Hirschl A., Lubitz W., Barisani-Asenbauer T. (2001): 16S rDNA-based identification of bacteria from conjunctival swabs by PCR and DGGE fingerprinting. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42: 1164–1171.

- Silva J., Leite D., Fernandes M., Mena C., Gibbs P. A., Teixeira P. (2011): *Campylobacter* spp. as a foodborne pathogen: a review. *Frontiers in microbiology*, 2.
- Van Overbeke I., Duchateau L., De Zutter L., Albers G., Ducatelle R. (2006): A comparison survey of organic and conventional broiler chickens for infectious agents affecting health and food safety. *Avian Disease*, 50: 196–200.
- Vařejka F., Mráz O., Smola J. (1989): *Speciální veterinární mikrobiologie*. SZN, Praha, 264 s.
- Woodward C.L., Kwon Y.M., Kubena L.F., Byrd J.A., Moore R.W., Nisbet D.J., Ricke S.C. (2005): Reduction of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis colonization and invasion by an alfalfa diet during molt in Leghorn hens. *Poultry Science*, 84: 185–193.