

Vědecký výbor výživy zvířat

MIKROBIÁLNÍ RIZIKA KRMIV

Doc. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Praha, září 2004



Výzkumný ústav živočišné výroby
Přátelství 815, Praha - Uhřetěves,
PSČ: 104 01, www.vuzv.cz

OBSAH

1. ÚVOD	5
2. PATOGENNÍ VIRY A PRIONY V KRMIVECH	7
2.1. VIRY	7
2.1.1. VIRUS MORU PRASAT	9
2.1.2. AFRICKÝ MOR PRASAT	9
2.1.3. SLINTAVKA A KULHAVKA	10
2.1.4. PSEUDOMOR DRŮBEŽE	11
2.2. PRIONY	11
2.2.1. BOVINNÍ SPONGIOFORMNÍ ENCEFALOPATIE (BSE)	12
2.2.2. SKRAPIE	14
3. PATOGENNÍ BAKTERIE V KRMIVECH	14
3.1. SALMONELLA	14
3.1.1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY	14
3.1.2. DRUHY RODU SALMONELLA A JEJICH KLASIFIKACE	15
3.1.3. VÝSKYT	16
3.1.3.1. VÝSKYT SALMONEL V KRMIVECH	16
3.2. CAMPYLOBACTER	19
3.2.1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY	19
3.2.2. DRUHY RODU CAMPYLOBACTER	19
3.2.3. VÝSKYT	20
3.3. ESCHERICHIA COLI	20
3.3.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY	20
3.3.2. PATOGENNÍ ESCHERICHIA COLI	20
3.3.3. VÝSKYT VTEC U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A V KRMIVECH	21
3.3.3. OSTATNÍ NEBEZPEČNÉ BAKTERIE V KRMIVECH	22
3.3.3.1. MYCOBACTERIUM spp.	23
3.3.3.2 BACILLUS ANTHRACIS	23
3.3.3.3. LISTERIA MONOCYTOGENES	24

4. MIKROSKOPICKÉ HOUBY V KRMIVECH	24
5. PRVOCI A PARAZITI V KRMIVECH	25
5.1. TOXOPLASMA GONDII	25
5.2. TRICHINELLA SPIRALIS	25
6. ZONÓZY	25
7. TOXICKÉ PRODUKTY MIKROORGANISMŮ V KRMIVECH	27
7.1. BOTULOTOXIN	27
7.2. MYKOTOXINY	27
7.2.1. AFLATOXINY	28
7.2.2. CITRININ	29
7.2.3. FUMONISINY	29
7.2.4. OCHRATOXINY	30
7.2.5. TRICHOTHECENY	30
8. PREVENCE MIKROBIÁLNÍCH RIZIK KRMIV	30
8.1. METODY PRO ANALÝZU MIKROBIÁLNÍCH RIZIK KRMIV	30
8.2. ANALÝZA MIKROBIÁLNÍCH RIZIK V KRMIVECH	31
8.3. KONTROLA PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V KRMIVECH	33
8.3.1. TEPELNÉ OŠETŘENÍ	33
8.3.2. FERMENTACE	33
9. ZÁVĚRY	33
LITERATURA	34

SEZNAM ZKRATEK

- ATP – Adenosin-tri-fosfát
BSE – Bovine spongiform encephalopathy (nemoc šílených krav)
CCP – critical control point (součást HACCP)
CJD – Creutzfeldt-Jacob disease
CWD – Chronic wasting disease
DGGE – Denaturing gradient gel electrophoresis (metoda PCR pro detekci hlavních skupin mikroorganismů v přirozeném prostředí.
EK – Evropská komise
ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assays (imunochemická metoda pro detekci antigenů nebo protilátek)
ETEC – Enterotoxigenní *E. coli*
EIEC – Enteroinvazivní *E. coli*
EHEC – Enterohemorhagické *E. coli*
EPEC – Enteropatogenní *E. coli*
EU – Evropská unie
FISH – Fluorescence in situ hybridizace
FLD – Farmer's lung disease (nemoc farmářských plic)
GSS – Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom
HACCP – Hazard analysis of critical control points (Systém pro kontrolu potravin pomocí tzv. kritických kontrolních bodů)
HPLC – High pressure liquid chromatography (vysokoučinná kapalinová chromatografie)
PCR – Polymerázová řetězová reakce.
VTEC - Verocytotoxin-produkující kmeny *Escherichia coli*

1. ÚVOD

Rizikem se rozumí míra pravděpodobnosti nepříznivého účinku na zdraví vyplývajícího z nebezpečí a závažnosti tohoto účinku. Mikrobiální nebezpečí jsou spolu chemickými vlivy a organoleptickými změnami nejdůležitějšími faktory ovlivňujícími kvalitu krmiv pro hospodářská zvířata. Definice některých termínů týkajících se mikrobiálních nebezpečí a rizik v krmivech jsou uvedeny v tabulce 1. Výroba krmiv pro hospodářská zvířata patří mezi nejvýznamnější aktivity v současném zemědělství a v poslední době vzrůstá také průmyslová produkce krmiv pro domácí zvířata. Tak např. v Evropské unii (EU) je ročně vyprodukováno okolo 120 milionů tun krmiv. Mikrobiální kvalita krmiv je mimořádně důležitá také pro kvalitní chov laboratorních zvířat, zejména SPF chovů.

Zatímco v minulosti byl při produkci krmiv kladen důraz především na ekonomickou efektivnost a produkční účinnost, v poslední době stále více nabývají na důležitosti hygienické aspekty a vlivy na zdravotní stav zvířat a lidské populace. Krmiva mohou být zdrojem patogenních mikroorganismů, které skrze infikovaná zvířata mohou vyvolat lidská onemocnění. V takovém případě mluvíme o tzv. zoonózách. Jinou možností je přímý přenos patogenních mikroorganismů, nebo jejich toxických metabolitů na člověka, což se týká hlavně pracovníků v zemědělství tj. při výrobě krmiv a při chovu zvířat. Podle systematického členění můžeme nebezpečné mikroorganismy rozdělit na viry, bakterie, mikroskopické houby (tj. kvasinky a plísně), prvoky a ostatní parazity. Negativně mohou působit buď samotná etiologická agens, nebo produkty mikroorganismů a to hlavně mykotoxiny. Suroviny pro výrobu krmiv mohou obsahovat širokou škálu potenciálně nebezpečných mikroorganismů, z nichž naštěstí pouze omezený počet představuje reálné riziko pro lidskou populaci. Podle statistik tři největší rizika představuje *Salmonella enteritidis*, *Toxoplasma gondii* a *Trichinella spiralis*. Jako možné čtvrté bývá uváděn výskyt prionů působících BSE, avšak v tomto případě se nejedná o mikroorganismy, ale o tzv. infekční proteiny. Rizika pro člověka z ostatních infekčních agens, které mohou kontaminovat krmiva se zdají být zanedbatelná (např. *Bacillus anthracis* a *Mycobacterium bovis*), nebo dokonce prakticky neexistující (např. toxiny *Clostridium botulinum* a *Listeria monocytogenes*). Naproti tomu zanedbatelným rizikem je výskyt mykotoxinů v krmivech. Tyto látky, jsou-li přítomny ve velkých dávkách, mohou vyvolat akutní otravy zvířat, malé dávky působí chronické otravy a mohou být následně přítomny v potravinách živočišného původu. Toto riziko je sice obecně dobře známé, ale je třeba získat více konkrétních údajů. To ostatně platí i pro mikrobiální rizika

Tabulka 1: Definice. Upraveno podle Hinton (13)

Krmivo	Jakákoliv substance, zpracovaná, částečně zpracovaná, nebo surovina, která je určena pro konzumaci zvířaty
Píce	Zelené rostliny, včetně klasů a semen, které mohou být konzumovány zvířaty buď v čerstvém stavu, nebo ošetřené (např. seno), nebo fermentované (např. siláž).
Nebezpečí	Biologické, chemické, nebo fyzikální agens přítomná v krmivu, nebo vlastnost krmiva, která může působit nepříznivě (podle 14).
Riziko	Je funkcí pravděpodobnosti výskytu (uplatnění) a míry účinku určitého nebezpečí (podle 14).
Analýza rizik	Proces skládající se ze tří částí: hodnocení rizik, management rizik a komunikace o riziku (podle 14).
Hodnocení rizik	Vědecké zhodnocení známých, nebo potenciálních účinků vyplývajících z působení nebezpečí. Proces se skládá z následujících kroků: (a) identifikace nebezpečí, (b) charakterizace nebezpečí, (c) zhodnocení expozice tj. míry a stupně působení nebezpečí, (d) charakterizace rizika (podle 14).
Zvládnutí rizik	Proces, při němž jsou zvažovány opatření a alternativy k přijetí, minimalizování, nebo zredukování zhodnocených rizik a je prováděn výběr vhodných nástrojů (podle 14).
Zoonóza	Onemocnění běžně se vyskytující jak u lidí, tak u zvířat, přičemž zvířata jsou hlavním rezervoárem těchto infekcí.

potravin obecně, a proto se v současné době zavádí v EU systém HACCP systém pro výrobu krmiv. Tento systém, který již delší dobu funguje při výrobě, distribuci a skladování potravin, se snaží nalézt tzv. „kritické kontrolní body“ při výrobě určitých potravin a prostřednictvím jejich důsledné kontroly pomocí standardizovaných postupů minimalizovat riziko zkažení potravin. Přehled mikroorganismů patogenních pro zvířata, jejichž šíření je spojeno s krmivem je uveden v tabulce 2.

Tabulka 2: Výskyt patogenních mikroorganismů v krmivech. Podle Hinton (13).

Kategorie	Krmiva a komponenty krmiv	Sušená nebo fermentovaná píče	Pastva	Krmiva ze zbytků potravin a odpadků
(a) Infekční agens přenosná na člověka z hospodářských zvířat, tj. zoonózy	Spory <i>Bacillus anthracis</i> Priony BSE ^a <i>Salmonella enteritidis</i> Virus pseudomoru drůbeže ^b	<i>Toxoplasma gondii</i>	Spory <i>Bacillus anthracis</i> <i>Mycobacterium</i> spp. Vajíčka tasemnic např. <i>Cysticercus bovis</i>	<i>Trichinella spiralis</i>
(b) Nezoonotické infekční agensnebo jejich produkty (metabolity), které působí onemocnění hospodářských zvířat a lidí		Toxin <i>Clostridium botulinum</i> <i>Listeria monocytogenes</i>		
(c) Infekční agens, které působí epidemie hospodářských zvířat u lidí může způsobit pouze lehká onemocnění nikoliv vážná onemocnění ^c	Virus afrického moru prasat Kulhavka a slintavka Mor prasat			Virus afrického moru prasat Kulhavka a slintavka Mor prasat
(d) Neinfekční agens, které působí nemoci hospodářských zvířat a lidí	Spory a hyfy plísní působící alergická onemocnění	Spory a hyfy plísní působící alergická onemocnění		
(e) Produkty neinfekčních agens, které působí onemocnění hospodářských zvířat a lidí	Mykotoxiny	Mykotoxiny	Mykotoxiny	

^aPředpokládáno, ale ještě stále ne zcela prokázáno

^bVirus pseudomoru drůbeže se může přenášet na drůbež přes krmivo a ze zvířat na člověka prostřednictvím aerosolu. Riziko infekce je velmi malé, u člověka může dojít k lehkému zánětu spojivek.

Tato studie se zabývá mikrobiálními riziky krmiv. Jsou popsány hlavní mikroorganismy, které představují reálná nebezpečí pro zdraví zvířat a lidí. U každého etiologického agens jsou popsány jeho základní biologické vlastnosti, frekvence výskytu, stupeň nebezpečnosti a metody detekce. Zvláštní kapitola je věnována mykotoxinům v krmivech. Pozornost je věnována i krmivu jako vektoru přenosu zoonóz a závěrečná kapitola je věnována možnostem prevence při snižování mikrobiálních nebezpečí krmiv.

2. PATOGENNÍ VIRY A PRIONY V KRMIVECH

2.1. VIRY

O výskytu virů v potravinách a krmivech je známo daleko méně než o výskytu bakterií a mikroskopických hub a to hned z několika důvodů (1, 15). Za prvé, protože viry jsou obligátní parazité, nerostou na kultivačních médiích tak jako bakterie a mikroskopické houby. Obvyklé metody pro jejich průkaz jsou kultivace na tkáňových kulturách a kuřecích embryích, což je daleko náročnější a v praxi se při analýzách krmiv tyto metody rutinně

nepoužívají. Za druhé, protože viry se v potravinách nepomnožují, lze očekávat, že jejich počty budou vzhledem k počtům bakterií relativně malé. Pro průkaz přítomnosti virů je proto nutné použít zpravidla extrakční a koncentrační metody. Tyto metody se poměrně rychle vyvíjejí, ale jsou stále poměrně málo efektivní, jejich účinnost při analýzách potravin je okolo 50 % (15). Za třetí, některé viry nejsou současnými metodami kultivovatelné.

O konkrétním druhovém složení virů v krmivech je velmi málo informací. Z povahy věci se však lze domnívat, že zastoupení virů v krmivech bude podobné jako v potravinách. Cliver et al. (16) uvádí, že v podstatě každá potravina může sloužit jako zdroj virů. V lidské stravě je nebezpečný přenos virů hepatitidy, častý je přenos enterovirů. Tabulka 3 uvádí nejčastěji izolované viry z potravin.

Tabulka 3 Lidské střevní viry přítomné v potravinách

1. Picornaviry	Polioviry 1-3
	Coxsackievirus A 1-24
	Coxsackievirus B 1-6
	ECHOvirus 1-34
	Enterovirus 68-71
	Virus hepatitidy A (pravděpodobně)
2. Reoviry	Reovirus 1-3
	Rotaviry
3. Parvoviry	Lidské gastrointestinální viry
4. Papovaviry	Lidské BK a JC viry
5. Adenoviry	Lidské adenoviry typu 1-33

Podle Larkin (17)

Podobně jako u potravin mohou se krmivy přenášet enteroviry. Přesto lze očekávat, že koncentrace enterovirů bude v krmivech nižší než v potravinách, protože hlavním zdrojem jsou drobní korýši, měkkýši a ústřice, kteří se infikují kontaminovanou vodou a jsou někdy schopny viry v sobě koncentrovat, protože vodu v podstatě filtrují (15,18,19). Příklady virů, které se přenášejí potravinami jsou uvedeny v tabulce 3.

2.1.1. VIRUS MORU PRASAT

Mor prasat, někdy také označovaný jako klasický mor prasat (classical swine fever) je onemocnění vyvolávané virem čeledi Flaviviridae rod *Pestivirus* (20, 21). Virus je částečně rezistentní na mírné zahřátí (56°C). Je inaktivován pH nižším jak 3 a vyšším jak 11. Je citlivý na ether chloroform, β -propiolakton (0,4%), kresol hydroxid sodný (2%) a formalín (1%). Virus velmi dobře přežívá v chladných podmínkách a může přežít některé způsoby zpracování vepřového masa (nakládání do solných roztoků, studené uzení). Hlavním rezervoárem je prase domácí a prase divoké. Přenos infekce je nejčastější přímým kontaktem zvířat, ale může být uskutečněn i pomocí lidí (návštěvníci farem, veterináři, ošetřovatelé). Přenos krmivem je dáván do souvislosti zejména se zkrmováním nedostatečně tepelně zpracovaných kuchyňských odpadků (1, 20). Možný je i přenos pomocí komponentů krmných směsí. Onemocnění se vyskytuje hlavně v Asii, střední a jižní Americe a v některých částech Evropy a Afriky (20). Sporadické případy jsou nacházeny i v České a Slovenské republice a to zejména u divokých prasat (21). Poslední případ v ČR byl v roce 1997 (33).

Mor prasat se projevuje buď akutní formou charakterizovanou vysokými horečkami, malátností a vysokou mortalitou (až 100%) během 1 – 2 týdnů, nebo chronickou formou trvající až měsíc trvajícími průjmy po jejichž odeznění může následovat uzdravení, ale také návrat onemocnění vedoucí až k úhynům. Onemocnění lze prokázat sérologickými testy. Léčba není efektivní a neprovádí se, uhynulé kusy je nezbytné spálit. Hlavní zásadou při profylaxi je důsledná kontrola a evidence dovážených zvířat, sledování a vyšetřování divokých prasat. V ohrožených oblastech je možno očkovat modifikovaným živým virem. Mor prasat je podle zákona o veterinární péči (22) § 10 nebezpečnou nákazou, která podléhá povinnému hlášení.

2.1.2. AFRICKÝ MOR PRASAT

Původcem je DNA virus, který v současné době ještě není přesně klasifikován. Má některé blízké iridovirům a poxvirům (20,21). Je poměrně odolný proti mírnému zahřátí, podmínky pro inaktivaci teplem jsou 56°C/70 minut nebo 60°C/20 minut. Je citlivý na ether a chloroform, formalin a dezinfekční prostředky obsahující chlor. Přežívá dlouhou dobu v krvi, výkalech a živočišných tkáních, které zvyšují jeho odolnost vůči vysokému pH.

Hostitelem viru afrického moru prasat jsou domácí a divoká prasata. Africká divoká prasata bývají často infikována bez zjevných klinických příznaků. Přenos se děje stykem nakažených a zdravých zvířat, ale i nepřímo zkrmováním kuchyňských zbytků obsahujících

infikované maso. Možný je i přenos klíšťaty rodu *Ornithodoros*. Africký mor prasat se enzooticky vyskytuje ve většině zemí subsaharské Afriky. V Evropě byly zaznamenány ojedinělé případy na Pyrenejském poloostrově a na Sardinii.

Příznaky onemocnění jsou podobné jako u klasického moru prasat, onemocnění může probíhat buď akutně, nebo subakutně, tj. v případě méně virulentních kmenů viru. Mortalita u domácích prasat je v akutních případech vysoká a blíží se 100 %. Onemocnění není možné klinicky odlišit od klasického moru, pro diagnózu je nutné sérologické vyšetření ve specializované laboratoři. Zásady pro prevenci a kontrolu jsou shodné jako u klasického moru. Léčba se neprovádí a není ani dostupná vakcína. Africký mor prasat je podle zákona o veterinární péči (22) § 10 nebezpečnou nákazou, která podléhá povinnému hlášení.

2.1.3. SLINTAVKA A KULHAVKA

Původcem je virus čeledi Picornaviridae, rod *Aphthovirus*. Je známo sedm imunologicky odlišných sérotypů: A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3, Asia 1. Virus je konzervován chladem a mrazem, naopak je rychle inaktivován teplotami vyššími jak 50°C. Je také poměrně citlivý na změny pH prostředí (inaktivace při pH < 6 nebo > 9). Z toho plyne, že virus lze poměrně snadno inaktivovat hydroxidem sodným a kyselinou citrónovou, ale na druhé straně je odolný vůči dezinfekčním látkám na bázi jódu, fenolu a kvartérním amoniovým solím a to zvláště v přítomnosti organických látek. Virus dobře přežívá v lymfatických orgánech a v kostním morku při neutrálním pH, ale ve svalech, když dojde po posmrtném ztuhnutí (*rigor mortis*) k poklesu pH pod 6, se rychle inaktivuje (20,21). V kontaminovaných krmivech dokáže přežít až 1 měsíc a to v závislosti na teplotě a pH prostředí (20).

Slintavka a kulhavka je vysoce kontagiózní onemocnění, přenos se děje přímým stykem zvířat, prostřednictvím lidí a kontaminovaným krmivem, zvláště při zkrmování kuchyňských zbytků (1). Onemocnění se projevuje zvýšenou teplotou, charakteristická je tvorba puchýřků na rtech a v dutině ústní (u skotu), nebo léze na nohou (u prasat). U dospělého skotu je mortalita nízká, u telat a prasat může být naopak vysoká. Z ostatních zvířat jsou mírně vnímaví velbloudi a lamy. Konečná diagnóza se provádí pomocí ELISA testů.

Prevence spočívá v přísné karanténě postižených oblastí, likvidaci veškerého infikovaného materiálu. Je možno očkovat vakcínou obsahující inaktivovaný virus, imunita trvá přibližně 6 měsíců. Slintavka a kulhavka je podle zákona o veterinární péči (22) § 10 nebezpečnou nákazou, která podléhá povinnému hlášení.

2.1.4. PSEUDOMOR DRŮBEŽE

Pseudomor drůbeže, někdy označovaný též jako newcastleská choroba drůbeže, je onemocnění vyvolávané virem z čeledi Paramyxoviridae, rod *Rubulavirus*. Virus je poměrně odolný vůči mírnému zahřátí, podmínky inaktivace jsou 56°C/3 hodiny nebo 60°C/30 minut. Je citlivý na kyselé pH, ether, formalin a fenol. Přežívá dlouhou dobu hlavně ve výkalech. Hostitelem viru je domácí a divoké ptactvo. Z drůbeže je nejcitlivější kur domácí, odolnější jsou kachny a husy (20,21,23). Přenos onemocnění je možný přímým stykem zvířat, ale často se děje kontaminovanými krmnými směsí, vodou a komponenty krmiv (1,20). Inkubační doba je 4-6 dnů, klinické příznaky a mortalita závisí na virulenci viru. Objevují se dýchací a nervové příznaky, otoky a krevní podlitiny ve střevech a vnitřních orgánech a zelené vodnaté průjmy. Onemocnění se neléčí. Konečná diagnóza se provádí pomocí sérologických testů jako je hemaglutinační inhibiční test a ELISA. Prevence spočívá v přísné karanténě postižených oblastí. Proti onemocnění lze úspěšně očkovat pomocí živé vakcíny. Pseudomor drůbeže se endemicky vyskytuje v řadě oblastí včetně Evropy, některé evropské země jsou prosty nákazy. Pseudomor drůbeže je podle zákona o veterinární péči (22) § 10 nebezpečnou nákazou, která podléhá povinnému hlášení. V ČR byl poslední případ v r. 1998 (33).

2.2. PRIONY

Priony jsou bílkoviny, které jsou součástí živočišných buněk, zejména neuronů. Změnou prostorové konfigurace se z neškodných prionů stávají „infekční priony“, které způsobují patologické změny v nervových tkáních živočichů a lidí (24). Onemocnění vyvolávaná priony připomínala svými vlastnostmi virová onemocnění, resp. infekční částice tj. priony mají některé vlastnosti virů (malá velikost, přítomnost bílkovin), a proto bylo dříve používáno termínu pomalé viry, a to protože tato onemocnění jsou charakteristická velmi dlouhou inkubační dobou a pomalým rozvojem, vždy však končí smrtí. Termín pomalé viry poprvé použil syn slovenského vystěhovalce, Američan Carleton Gajdusek, který odhalil infekční podstatu nemoci kuru, kterou trpěli novoguinejští kanibalové. V roce 1976 za tento objev obdržel Nobelovu cenu. Později však jiný americký vědec Stanley Prusiner zjistil, že tzv. pomalé viry v podstatě nejsou živé částice, neobsahují totiž žádný genetický materiál, jsou to pozměněné molekuly bílkovin a vytvořil tzv. prionovou teorii za kterou obdržel v r. 1997

rovněž Nobelovu cenu. Dříve byly mezi pomalé viry řazeny i některá onemocnění (AIDS, různé formy sklerózy, encephalitidy a encephalopatie), které jsou skutečně virového původu a mají rovněž dlouhou inkubační dobu a pomalý průběh s fatálním koncem (25).

K obecným vlastnostem infekčních prionů patří bílkovinná podstata, extrémně vysoká odolnost vůči suchému teplu (300-600°C), vysoká odolnost i proti sterilaci tlakovou parou (k inaktivaci je třeba 121-134°C), odolnost proti řadě desinfekčních prostředků (formaldehyd, etanol, fenol, peroxid vodíku, přípravky s jodem, UV záření), citlivé jsou pouze na koncentrované louhy, které musí působit alespoň hodinu a inaktivují se též některými desinfekčními prostředky s obsahem chloru (25, 26). Přehled onemocnění působených priony uvádí tabulka 4.

Tabulka 4 Prionová onemocnění lidí a zvířat. Upraveno podle (24)

Onemocnění	Hostitel
CJD, GSS	Lidé
Kuru	Lidé
Bovinní spongiformní encefalopatie („nemoc šílených krav“)	Skot, v zajetí žijící kopytnatci, kočka domácí
CWD (chronické vyčerpání)	Jelen, los
Skrapie	Ovce, koza
Přenosná encefalopatie norků	Norek

CJD – Creutzfeldt-Jacob disease

CWD – Chronic wasting disease

GSS – Gerstmann-Sträussler-Scheinker syndrom

2.2.1. BOVINNÍ SPONGIFORMNÍ ENCEFALOPATIE (BSE)

BSE je degenerativní neurologické onemocnění, charakterizované dlouhou inkubační dobou. První případy se objevily v roce 1986 ve Velké Británii a počet případů vyvrcholil formou epidemie v letech 1992-3 (26,27). Absolutně nejvyšší počet případů bylo 36 680 kusů v r. 1992, zatímco v roce 2000 počet nových nakažených zvířat byl 1311. Onemocnění bylo diagnostikováno i v mnoha dalších zemích Evropy, ale dodnes není přesně vysvětleno proč nikde nedosáhlo tak velkých rozměrů. Počet případů v zemích mimo Velkou Británii jdou maximálně do stovek kusů (Francie, Německo), nebo do jednotek až desítek (Lucembursko, Dánsko).

V České republice se testují rutinně všechna zvířata starší 30 měsíců od 1.2.2001. Do 3.9. 2004 bylo vyšetřeno celkem 635 767 vzorků mozku skotu a na toto množství bylo zjištěno 14 nemocných kusů.

Z výsledků mnohých epidemiologických studií (27, 28-32) vyplývá, k přenosu infekčních částic došlo pravděpodobně prostřednictvím masokostních mouček, kterými byly krmeni přežvýkavci. Prion BSE vyniká svojí odolností proti teplotě. Podle směrnic EU a podle našich zákonů musí být pro likvidaci prionů při zpracování kafilérní suroviny dodrženy následující parametry (33):

- teplota vyšší než 133°C
- čas 20 minut
- tlak 3 bary
- maximální velikost částic 50 mm

Problémem bylo, že v řadě zemích západní Evropy se vyráběla masokostní moučka za použití pouze pasteračních teplot (tj. do 100 °C) a takto byla ve druhé polovině 80 let zpracovávána i zvířata uhynulá na BSE, přičemž došlo k recyklaci a koncentraci prionů v krmných směsích, což mělo za následek epidemii ve Velké Británii v první polovině 90 let (27, 31). Kromě „prionové teorie“ existovaly ještě mnohé, často více či méně pravděpodobné až bizarní teorie pro vysvětlení příčiny nemoci šílených krav jako je působení určitých pesticidů (organofosfátů), nedostatek selenu či mědi a autoimunitní a bakteriální choroby (1, 26). Prionová teorie se však zdá být nejpravděpodobnější, což nejlépe dokládá rapidní pokles počtu nových případů ve Velké Británii bezprostředně po zákazu zkrmování masokostních mouček přežvýkavcům (34).

I když některé studie (1,27,31) stále vážají, zda je BSE zoonóza, zdá se pravděpodobné, že BSE priony jsou odpovědné za tzv. novou variantu Creutzfeld-Jacobovi nemoci (NV-CJD), jejíž výskyt je nejvyšší právě ve Velké Británii (26,35,36). Jak vyplývá z doporučení WHO (37), měly by členské státy dodržovat následující pravidla pro omezení rizika přenosu BSE prionů do lidské populace:

- Všechny země musí vést pečlivou evidenci kontrol poražených a uhynulých zvířat na BSE a evidenci počtu nakažených zvířat.
- Všechny země musí zakázat zkrmování tkání přežvýkavců přežvýkavcům.
- Materiál ze skotu určený pro farmaceutický průmysl musí pocházet ze zemí, ve kterých jsou dodržována výše zmíněná pravidla a zároveň je nulový či sporadický výskyt BSE.

2.2.2. SKRAPIE

Skrapie postihuje ovce a v menší míře i kozy (28). Vyskytuje se endemicky v některých zemích (GB, USA). Priony jsou podle řady studií pro člověka neškodné, a proto přenos nakaženým masem údajně není možný (1). Ovce jsou však vnímavé k hovězími prionům, které vyvolají onemocnění s podobnými příznaky jako u skrapie (26). Tento způsob přenosu byl potvrzen experimentálně a pravděpodobně k němu došlo při zkrmování masokostní moučky vyrobené ze skotu nakaženého BSE ve Velké Británii. Z tohoto důvodu byl ve Velké Británii zahájen rozsáhlý program likvidace všech prionů. Jsou prováděny krevní testy ovcí, které dokáží odhalit jedince geneticky odolné proti skrapii, ostatní zvířata musí být buď vykastrována, nebo utracena (38). Dodnes není zcela jasné jak se skrapie přenáší z jedné ovce na druhou.

3. PATOGENNÍ BAKTERIE V KRMIVECH

Krmiva pro zvířata mohou obsahovat pestré a velmi proměnlivé množství bakterií, z nichž řada může být patogenní. Ne všechny, ale představují reálné nebezpečí a to z různých důvodů jako např. velmi řídký výskyt, subinfekční koncentrace apod. Jako jednoznačně nejnebezpečnější etiologické agens z této kategorie jsou označovány salmonely (1-3). Jako další nebezpečné bakterie bývají uváděny *Campylobacter*, různé patogenní *Escherichia coli*, hlavně sérotyp O157:H7 a verocytotoxin-produkující kmeny (VTEC) a paratuberkulóza (1,4-7). Některé zdroje ještě uvádějí *Bacillus anthracis* a *Clostridium botulinum* (1,8), ale rizika v tomto případě jsou údajně malá až zanedbatelná. Podle zprávy Evropské komise (9) z roku 2002 o trendech a zdrojích zoonóz ve zvířatech, krmivech a potravinách jsou mezi nebezpečné bakterie uváděny *Mycobacterium*, *Brucella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Yersinia* a *E. coli*, tedy celkem 7 rodů, avšak pouze výskyt salmonel je podrobně monitorován v krmivech a výskyt ostatní nebezpečných bakterií je sledován u živých zvířat a v potravinách. V následujících kapitolách budou popsány hlavní bakteriální rody a druhy, jejichž výskyt v krmivech představuje riziko pro zdraví zvířat a lidí.

3.1. SALMONELLA

3.1.1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Podle devátého vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10) patří rod *Salmonella* do 5. skupiny – fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky, podskupina 1 –

čeled Enterobacteriaceae. Salmonely jsou Gramnegativní, pravidelné tyčinky o přibližných rozměrech 0,7-1,5 x 2-5 μm. Obvykle jsou pohyblivé a to pomocí peritrichně umístěných bičíků. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, přičemž mohou uplatňovat jak respiratorní, tak fermentativní typ metabolismu. Salmonely jsou mezofilní s optimální kultivační teplotou 37°C. D-glukóza a ostatní sacharidy jsou štěpeny za tvorby kyselin a obvykle se tvoří také plyn. Oxidáza je negativní, kataláza pozitivní, indol a Voges-Proskauer negativní a reakce s metylčervení a Simmons citrátem jsou pozitivní. Většinou mají lyzin a ornitin dekarboxylázu, ale přítomnost arginin dihydrolázy je variabilní. H₂S je produkován, močovina není hydrolyzována, růst na KCN a utilizace malonátu jsou variabilní. Redukují nitráty. Spektrum fermentovatelných sacharidů obvykle zahrnuje L-arabinózu, maltózu, D-manitol, D-manóza, L-rhamnóza, D-sorbitol, trehalóza a D-xyulóza. Vyskytují se v trávicím traktu lidí, teplokrevných a studenokrevných zvířat, v potravinách, zejména živočišného původu, a v prostředí např. v odpadních vodách. Jsou původci tyfu, gastroenteritid a septikémií.

3.1.2. DRUHY RODU SALMONELLA A JEJICH KLASIFIKACE

Typovým druhem je *Salmonella choleraesuis*. Podle současné nomenklatury (10, 11) existují v současné době pouze dva druhy a to *Salmonella bongori* a *Salmonella choleraesuis*, přičemž posledně zmíněný má ještě 5 poddruhů pojmenovaných jako *Salmonella choleraesuis* subsp. *arizonae*, *choleraesuis*, *diarizonae*, *houtenae* a *indica*. Další členění se provádí pomocí O a H antigenů, přičemž se takto v současné době rozlišuje více než 2500 sérovarů. K druhu *Salmonella bongori* patří méně než 10 sérovarů, jejichž výskyt je extrémně nízký, drtivá většina proto patří k druhu *Salmonella choleraesuis* (10). Sérovary jsou označovány podle onemocnění, které vyvolávají (typhimurium – tyfus u myší, enteritidis – enteritidy u lidí), nebo podle místa výskytu, resp. první izolace, popř. podle materiálu z kterého byla provedena izolace (dublin, oxford, paris, oysterbeds). Sérovary jsou běžně označovány jako druhy, což bude použito i tomto textu, takže např. sérovar *Salmonella typhimurium* by mohl být uveden také (ze systematického hlediska správněji) jako *Salmonella* sérovar typhimurium (12). Jednotlivé sérovary se zařazují do pěti skupin, které se označují římskými číslicemi I-V a liší se některými vlastnostmi, např. virulencí (10).

3.1.3. VÝSKYT

Salmonelózy jsou známe již od konce devatenáctého století. Poprvé byly izolovány z orgánů prasat, přičemž byly mylně považovány za původce moru prasat. Později byly izolovány také z krav, myší a kuřat (39). V současné době představuje výskyt salmonel a jeho důsledky celosvětový problém. Salmonely se nacházejí u všech druhů zvířat (savci, ptáci, plazy, ryby) a poměrně často i u lidí. Ačkoliv některé sérovary jsou striktně adaptovány na určitého hostitele, většina ostatních má široké spektrum potenciálních hostitelů (např. *S. typhimurium*). Některé další se vyskytují pouze v určité lokalitě na zeměkouli (např. *S. sendai* na dálném východě a *S. berta* v Severní Americe). Naproti tomu rozšíření jiných (např. *S. typhimurium*) je ubikvitární. Kmeny patřící k sérologickým skupinám II a III bývají často izolovány ze studenokrevných živočichů a pouze ojediněle z teplokrevných zvířat. Kmeny patřící do sérologických skupin IV a V bývají izolovány hlavně z vnějšího prostředí a jsou zřídka patogenní pro lidi (10).

3.1.3.1 VÝSKYT SALMONEL V KRMIVECH

Salmonelami mohou být kontaminovány v podstatě všechny složky krmiv a to jak živočišného, tak rostlinného původu. Úroveň kontaminace je zpravidla nízká, přičemž nejvyšší počty jsou nalézány v krmivech pro přežvýkavce (1,9). Tradičně jsou jako rizikové komponenty považovány živočišné moučky tj. hlavně masokostní a rybí moučka, ale ještě větší kontaminace bývá někdy nalézána v moučkách z bavlněných semen a palmových jader (40). Kontaminace pravděpodobně většinou pochází z vnějšího prostředí a z divoce žijících zvířat, protože nejčastěji izolované sérovary většinou nejsou enteritidis a typhimurium, které převažují ve výkalech infikovaných hospodářských zvířat a lidí (41). Mezi jednotlivými sérovary nejsou velké schopnosti přežít v krmných směsích a právě buňky *S. enteritidis* jsou schopny přežít v tomto prostředí i několik měsíců (41).

O výskytu salmonel v krmivech v ČR nejsou dostupné žádné statistiky, podle přílohy k vyhlášce Ministerstva zemědělství 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání není ani stanoven standardní postup pro stanovení salmonel v krmivech. Jednotné postupy pro mikrobiologické analýzy nejsou stanoveny ani v EU. Údaje o frekvenci výskytu salmonel v krmivech udává zpráva Evropské komise o trendech a zdrojích zoonotických agens ve zvířatech, krmivech a potravinách (9) z roku 2002. Podle této studie reálné riziko výskytu *Salmonella* spp. existuje jak v krmivech živočišného, tak rostlinného

původu. Nejčastější výskyt je ve vzorcích bohatých na proteiny, celkový přehled udává tabulka 5.

Tabulka 5: Salmonella spp. v krmivech testovaných v zemích EU a Norsku v r. 2002

Země	Živočišné bílkoviny		Rostlinné bílkoviny	
	Počet vzorků ¹	Pozitivní vzorky	Počet vzorků	Pozitivní vzorky
Rakousko	195	6	366	20
Belgie	-	-	-	-
Dánsko	675	7	247	4
Finsko	325	3	1172	38
Francie	12	0	542	18
Německo	1331	37	2031	99
Řecko	453	0	84	2
Irsko	1572	2	288	6
Itálie	1092	15	1460	25
Lucembursko	-	-	-	-
Portugalsko	4	0	27	5
Španělsko	1001	10	319	13
Švédsko	2954	11	2185	5
Holandsko	909	35	11734	574
Severní Irsko	-	1	-	3
Velká Británie	225	26	10073	284
Norsko	9971	42	4406	0

¹Některé země uvádějí počty pozitivních šarží

Údaje v tabulce 5 nelze seriózně statisticky vyhodnotit a to ze dvou důvodů. Za prvé v různých zemích byly použity odlišné metodiky pro odběr vzorků a průkaz salmonel. Např. některé země evidují počty pozitivních vzorků, jiné počty pozitivních šarží. Za druhé v různých zemích byly testovány různá množství vzorků. Např. ve Francii, která má mnohonásobně větší trh než je v Holandsko a Švédsko, byl testován řádově menší počet vzorků. Lucembursko netestovalo vůbec a Severní Irsko uvádí pouze pozitivní vzorky. Přesto některé závěry lze učinit. V první řadě je jasné, že riziko kontaminace krmiv salmonelami existuje. Dále oproti předchozím létům vzrostl počet zemí, ve kterých jsou bílkovinná krmiva rostlinného původu více kontaminována, než krmiva živočišného původu. Pouze v Norsku, Švédsku a ve Velké Británii byla častěji kontaminována krmiva živočišného původu. Celková kontaminace se u krmiv živočišného původu pohybovala od 0 do 12% a u rostlinných krmiv od 0 do 18,5%. Úroveň kontaminace u masokostních mouček a rybích mouček byla podobná a činila 0 až 13% pozitivních vzorků. Salmonely byly nalézány také v obilninách a semenech olejnin. Tak jako v předchozích letech byly značně více kontaminovány olejninové a jejich vedlejší produkty než obilniny.

V některých zemích je důsledně prováděna také kontrola kompletních krmných směsí, výsledky jsou uvedeny v tabulce 6. Byla testována hlavně krmiva pro drůbež, skot a prasata,

Tabulka 6 Výskyt salmonel v kompletních krmných směsích v zemích EU a v Norsku v r. 2002.

Země	Drůbež		Skot		Prasata	
	Počet vzorků	Pozitivní vzorky	Počet vzorků	Pozitivní vzorky	Počet vzorků	Pozitivní vzorky
Rakousko	377	6	-	-	77	2
Belgie	33	0	42	0	7	0
Dánsko	350	0	754	2	1498	0
Finsko	-	-	-	-	-	-
Francie	24	0	19	0	22	0
Německo	1225	33	190	5	617	4
Řecko	68	0	17	0	21	0
Irsko	325	0	-	-	-	-
Itálie	158	2	44	1	15	0
Lucembursko	-	-	-	-	-	-
Portugalsko	4	0	-	-	-	-
Španělsko	-	-	-	-	-	-
Švédsko	-	0	-	0	-	0
Holandsko	6688	20	1671	14	3146	20
Severní Irsko	-	-	-	-	-	-
Velká Británie	-	40	-	30	-	42
Norsko	78	0	0	0	104	0

některé země testují i směsi pro ostatní zvířata, včetně výrobků určených pro domácí zvířata. Salmonely byly nalezeny v krmivech pro skot (4 ze 7 zemí). Oproti četnost kontaminace u krmiv pro drůbeže byla nižší. Výsledky však nelze statisticky hodnotit ze stejných důvodů jako údaje uvedené v tabulce 5.

Distribuce sérovarů se liší od četnosti sérovarů nalézáných ve vzorcích od zvířat a lidí. Byly sice nalezeny v několika případech pro člověka nejnebezpečnější sérovary enteritidis a typhimurium, ale ty tvoří jen malý podíl z celkového počtu kmenů izolovaných z krmiv.

Sérovar typhimurium byl izolován třináctkrát z obilovin a sérovar enteritidis dokonce jen jednou z olejnin. Nejčastěji nalézané sérovary z bílkovinných krmiv živočišného původu byly montevideo, senftenberg, cerro, ohio a give. V bílkovinných krmivech rostlinného původu byly nejčastěji nalézané sérovary mbandaka, agona, tennessee, senftenberg a anatum. V kompletních krmných směsích byly nejčastěji nalézané sérovary mbandaka a senftenberg. Sérovar enteritidis byl nalezen jednou v krmné směsi pro drůbež a sérovar typhimurium rovněž jednou v krmivu pro prasata.

3.2. CAMPYLOBACTER

3.2.1. ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Podle devátého vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10) patří rod *Campylobacter* do 2. skupiny – aerobní a mikroaerofilní, pohyblivé, helikální a vibroidní gramnegativní bakterie. Jsou to drobné vibriodně zakřivené tyčinky 0,2 – 0,5 μm x 0,5 – 5 μm veliké. Buňky mohou být jednou či vícekrát spirálovitě zatočené a výjimečně mohou být až 8 μm dlouhé. Někdy mohou mít také tvar písmene S. Ve starších kulturách se mohou vyskytovat kokoidní tvary. Jsou nesporeující. Barví se gramnegativně. Buňky jsou se pohybují pomocí polárních bičků typickým šroubovitým pohybem. Jsou typický mikroaerofilními bakteriemi s respiratorním metabolismem. Optimální koncentrace O_2 je mezi 3 až 15% a CO_2 3 až 5%. Výjimečně mohou některé kmeny růst i za atmosférické koncentrace kyslíku (tj. 21%). Některé jiné kmeny jsou anaerobní a v takovém případě vyžadují různé růstové faktory (vodík, fumarát). Jsou chemoorganotrofní, sacharidy nejsou fermentovány ani oxidovány. Netvoří žádné kyseliny. Energie je čerpána rozkladem aminokyselin v citrátovém cyklu. Želatina není hydrolyzována. Nemají lipolytickou aktivitu. Jsou oxidáza pozitivní a ureáza negativní. Neprodukují pigment. Některé druhy jsou patogenní pro zvířata a lidi. Vyskytují se v pohlavních orgánech, trávicím traktu a v dutině ústní lidí a zvířat. Jeden druh se schopností fixovat vzdušný dusík byl izolován ze slaných močálů.

3.2.2. DRUHY RODU CAMPYLOBACTER

Rod *Campylobacter* v současné době 13 druhů (10). Z hlediska zdraví zvířat a lidí mají rozhodující význam *C. fetus* a *C. jejuni*. *C. fetus* je původcem různých infekcí u lidí a zvířat. *C. fetus* subsp. *fetus* je spojován se sporadickými aborty u skotu a ovcí. U člověka působí horečky a další příznaky. Bývá izolován i z krve oslabených lidí (42). *C. fetus* subsp.

veneralis je patogenní pouze pro skot, člověk není vnímavý. *C. jejuni* působí zmetání u ovcí a enteritidy doprovázené horečkami u lidí (42).

3.2.3. VÝSKYT

Bakterie rodu *Campylobacter* se přirozeně vyskytují v trávicím traktu a urogenitálním traktu mnoha druhů zvířat. Byly nalezeny u drůbeže, psů, koček, ovcí a skotu (42). Častý výskyt je u kuřecích brojlerů. V zemích EU je 20 až 87 % hejn kontaminováno. Relativně nízká promořenost je ve Švédsku (20 %) a Holandsku (27 %), vyšší je Dánsku (43 %) a vysoká je např. v Německu (64 %). Hlavním izolovaným druhem je *C. Jejuni* (9). Podobně vysoký výskyt kamopylobakterů je u skotu, u prasat je kontaminace naopak nízká (méně než 5 %), přičemž bývá nalezen hlavně *C. coli*.

Přenos kampylobakterií se děje hlavně fekálně-orální cestou. Přenos krmivem je možný, avšak kampylobaktery v suchých krmných směsích nepřežívají tak dobře jako salmonely. Hlavním zdrojem může být kontaminovaná pitná voda (43).

3.3. ESCHERICHIA COLI

3.3.1 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKY

Podle devátého vydání Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (10) patří rod *Escherichia* do 5. skupiny – fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky, podskupina 1 – čeled *Enterobacteriaceae*. *E. coli* jsou Gramnegativní, pravidelné tyčinky o přibližných rozměrech 1,1-1,5 x 2,0-6,0 μm. Vyskytují se jednotlivě nebo v párech, mnoho kmenů (zvláště patogenních) může tvořit kapsule a mikrokapsule. Jsou gramnegativní. Pohybují se pomocí peritrichně rozmístěných bičíků, některé kmeny jsou nepohyblivé. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, přičemž mají jak respiratorní, tak fermentativní typ metabolismu. Optimální kultivační teplota je 37°C. Sacharidy jsou katabolizovány za tvorby kyselin a plynu. Většina kmenů fermentuje L-arabinózu, maltózu, D-manitol, D-manózu, L-rhamnózu, trehalózu, D-xylózu, a laktózu. Vyskytují se v trávicím traktu teplokrevných zvířat a hmyzu. Typovým druhem je *E. coli*.

3.3.2. PATOGENNÍ ESCHERICHIA COLI

E. coli je za normálních okolností běžnou součástí mikroflóry trávicího traktu. Působí jako neškodný komenzál, nebo je dokonce prospěšná tvorbou vitamínu K (42). Existují však kmeny, které za určitých okolností mohou být patogenní pro zvířata a člověka (12,21,39). Podobně jako u salmonel se identifikace patogenních *E. coli* provádí pomocí sérologických

testů. Hlavní členění je podle přítomnosti O (somatický, vázaný na buněčnou stěnu) a K (kapsulární) antigenů, u některých kmenů se zjišťuje i přítomnost H (flagelární) antigenů. Patogenní *E. coli* se také klasifikují podle klinických příznaků, které vyvolávají. Hlavní rozlišovací znaky těchto infekcí jsou uvedeny v tabulce 7

Tabulka 7: Příznaky alimentárních infekcí působených patogenními *E. coli*. Podle (12, 24) upraveno.

Znak	ETEC	EIEC	EHEC (VTEC)	EPEC
Mechanismus patogenního účinku	Enterotoxin LT, ST	Invaze do enterocytů	Shigalike toxin	Adherence na enterocyty
Místo působení	Tenké střevo	Tlusté střevo	Tlusté střevo	Tenké střevo
Účinek na stěvní sliznici	Neporušená, hyperemie (překrvení)	Nekróza, tvorba vředů, zánět	Destrukce mikrokloků, odumírání buněk	Destrukce mikrokloků
Epidemiologie	Cestovatelské průjmy, dětské průjmy	Sporadický výskyt	Hemorragická kolitida	Kojenecké a dětské průjmy
Horečka	Ne	Ano	Ne	Ano
Stolice	Hodně, vodnatá bez krve a hnisu	Málo s krví a hnisem	Hodně, krvavá bez hnisu	Hodně vodnatá bez krve a hnisu

ETEC – Enterotoxigenní *E. coli*

EIEC – Enteroinvazivní *E. coli*

EHEC – Enterohemorragické *E. coli*

EPEC – Enteropatogenní *E. coli*

VTEC – Verocytotoxin-produkující *E. coli*

U hospodářských zvířat je aktuální výskyt EHEC, které se mohou přenést jako zoonóza na člověka. Častý výskyt je zejména u skotu, člověk se infikuje nedostatečně tepelně opracovaných většinou mletým hovézím masem (24). EHEC produkují dva odlišné toxiny které jsou aktivní proti kulturám tkáňových buněk Vero a Hela a jsou označovány jako: Shiga-like toxin 1 (verotoxin 1) a Shiga-like toxin 2 (verotoxin 2). Svými účinky připomínají infekce krvavé průjmy způsobené shigely. Existuje více než 50 různých sérotypů EHEC, ale prakticky všechna lidská onemocnění jsou způsobena sérotypem O157:H7, někdy označovaným též verotoxin-produkující *E. coli* O157:H7, nebo jen VTEC.

Sérotyp O157:H7 je patogenní pro člověka a neškodný pro skot, který je jeho hostitelem. Pro telata je patogenní sérotyp K99 a pro prasata K88 (21,39).

3.3.3. VÝSKYT VTEC U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT A V KRMIVECH

Hlavním hostitelem *E. coli* O157:H7 jsou přežvýkavci, hlavně skot. Infekční agens je rozšířeno celosvětově a představuje vážný problém pro zdraví lidí (44). Podle zprávy EK (9) se procento nakažených zvířat pohybuje v rozpětí 1 až 15%. V Dánsku byly VTEC *E. coli* O157:H7 nalezeny u 5,5% zvířat. V Belgii bylo pozitivních 1,1% poražených kusů hovězího

dobytka. Velké procento nakažených mléčných krav (14,1%) bylo nalezeno v Holandsku, stejně jako v Německu (12,2%). Podobná situace je i v USA (45). U lidí dochází často k hromadným infekcím např. špatně tepelně opracovanými hamburgery nebo karbanátky v podnicích rychlého občerstvení. Mortalita může být i několik procent. V roce 2002 bylo v EU evidováno 2664 laboratorně ověřených případů infekcí *E. coli* O157:H7. Celkový počet případů alimentárních nálezů způsobených EHEC (VTEC) bude nepochybně vyšší, problém je, že pouze sérotyp O157:H7 lze jednoduše a rutinně identifikovat (12, 24).

E. coli O157:H7 se přenáší mezi zvířaty nejčastěji horizontálně, tedy přímo z jednoho zvířete na druhé. Možným zdrojem infekčního agens může být také vnější prostředí, krmivo pro skot, voda a napáječky (46). Konkrétní statistické údaje o výskytu VTEC v krmivech nejsou k dispozici. Typ krmiva však pravděpodobně může mít vliv na procento infikovaných zvířat ve stádě a na přežívání *E. coli* O157:H7 v trávicím traktu přežvýkavců. Kudva et al. (6) testovali vliv diety, změny diety a hladovění na výskyt *E. coli* O157:H7 u ovcí. Zvířata byla krmena buď dietou s vysokým obsahem vlákniny a nízkým obsahem bílkovin (zelená píce, seno, „grass“ G skupina), nebo krmivem na bázi kukuřice a granulovanou vaječnou (,,corn“ C skupina), které bylo bohaté na proteiny a energii. Po jednorázové experimentální infekci byla všechna zvířata kultivačně pozitivní na *E. coli* O157:H7, avšak skupina G měla vyšší koncentraci *E. coli* O157:H7 a navíc tyto bakterie přežívaly dvakrát delší dobu než tomu bylo u skupiny C. Počet kultivačně pozitivních zvířat vzrostl když došlo ke změně krmiva z C na G a naopak došlo k poklesu po změně z G na C. Výsledky ukazují, že úprava krmné dávky může redukovat riziko zavlečení *E. coli* O157:H7 do potravního řetězce.

3.3.3. OSTATNÍ NEBEZPEČNÉ BAKTERIE V KRMIVECH

V následující kapitole jsou popsány některé patogenní bakterie, které se mohou vyskytovat v krmivech pro hospodářská zvířata, jejich výskyt je však našich podmínkách malý až zcela zanedbatelný (antrax) nebo jsou zdravotní rizika pro zvířata a člověka malá (listerie).

3.3.3.1. MYCOBACTERIUM spp.

Mykobakterie jsou mírně zakřivené tyčinky 0,2-0,7 x 1,0-10 µm, někdy mají tendenci k větvení. Jejich zvláštností je, že se velmi obtížně barví podle Grama, obvykle se jeví jako slabě gramnegativní. Charakteristický pro ně je pomalý růst v podmínkách *in vitro*, viditelné kolonie se často objeví až po 60 dnech kultivace. Zvláště obtížně kultivovatelný druh je *M. paratuberculosis*, nekultivovatelný je *M. leprae*. Typovým druhem je *M. tuberculosis*, původce tuberkulózy (10).

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 (1). Riziko přenosu je však údajně malé, ve vyspělých státech se pravidelně provádí testování zvířat na tuberkulózu. V Československu byla tuberkulóza skotu poměrně rozšířená v období mezi 1 a 2 světovou válkou a ještě v roce 1959, kdy byl poprvé vyšetřen na tuberkulózu všechen skot bylo zjištěno 22,48% pozitivních zvířat, což svědčilo o velké promořenosti chovů. V 60 letech minulého století proběhla proto velká ozdravovací akce při níž bylo provedeno téměř 100 000 000 tuberkulinací a bylo utraceno 1 318 040 zvířat, tuberkulóza skotu tak byla v podstatě utlumena a počet nakažených zvířat např. v r. 1977 byl jen 0,068% (39).

Riziko přenosu tuberkulózy ze skotu na člověka je také snižováno důkladnou pasterizací mléka (1). Tuberkulóza tak zůstává reálným problémem hlavně v rozvojových zemích. Ve vyspělých zemích je v současné době výskyt tohoto onemocnění sporadický, V EU bylo v r. 2002 zaznamenáno celkem 49 případů, přičemž v osmi státech (Rakousko, Dánsko, Francie, Finsko, Německo, Lucembursko, Švédsko, Holandsko) byly zcela prosté nákazy (9).

3.3.3.2 BACILLUS ANTHRACIS

Rod *Bacillus* jsou grampozitivní pravidelné tyčinky 0,5-2,5 x 1,2-10 µm. Jsou sporulující, chemoorganotrofní a aerobní, nebo fakultativně anaerobní (10). Typovým druhem je *Bacillus subtilis* (10).

Bacillus anthracis je původcem antraxu, čili sněti slezinné, což je infekční onemocnění s akutním průběhem a vysokou mortalitou, vnímavý je hlavně skot, člověk a v menší míře prasata (12, 24). Onemocnění se vyskytuje kosmopolitně, v mírném

klimatickém pásmu se v Evropě ojediněle, v subtropích a tropech má v některých zemích s extenzivní živočišnou výrobou povahu enzootií (39). Zdrojem infekce je většinou krmivo, skot se většinou nakazí při pastvě, prasata z krmných směsí, nebezpečná je hlavně masokostní moučka vyrobená při nedostatečné teplotě. Vnější prostředí (pastvy) mohou být také kontaminovány při hnojení masokostní moučkou vyrobenou z nakažených zvířat (47, 48).

3.3.3.3. LISTERIA MONOCYTOGENES

Rod *Listeria* jsou pravidelné tyčinky 0,4-0,5 x 0,5-2 μm velké. Jsou grampozitivní, pohyblivé a fakultativně anaerobní. Optimální kultivační teplota je 20-25°C. Listerie jsou široce rozšířeny ve vnějším prostředí, vykytují se pravidelně např. v kazící se zelenině. Typovým druhem je *Listeria monocytogenes*, který působí celková septická onemocnění, většinou u imunitně oslabených lidí (10).

Listeria monocytogenes je psychrofilní bakterií, která může snadno kontaminovat siláže, zvláště pokud jsou špatné kvality a mají vysoké pH (>5,5). Přežvýkavci, zvláště ovce, po zkrmování kontaminované siláže mohou onemocnět listeriózou, častými následky jsou zmetání (49). Příležitostně může *Listeria monocytogenes* vyvolávat mastitidy u skotu a listerie se mohou dostávat do nepasterizovaného mléka a z něho vyrobených produktů (50-52). Pomocí ribotypizace izolovaných kmenů bylo zjištěno, že existuje souvislost mezi kmeny vyskytujícími se v siláži a izoláty z nemocných ovcí (53). Listeriózy mohou mít vysokou mortalitu u mláďat, zejména u drůbeže (39). Listerióza se vyskytuje celosvětově, v některých zemích EU (Německo, Finsko, Švédsko a Norsko) je vážným problémem (9). Je pravidelně izolována ze skotu, ovcí, prasat a koz (9). V přírodě jsou rezervoárem listerií hlodavci, kteří se na podzim stahují do zemědělských objektů, kde infikují krmiva, listeriózy mají proto v našich podmínkách sezónní výskyt (39).

4. MIKROSKOPICKÉ HOUBY V KRMIVECH

Mikroskopické houby, tedy plísně a kvasinky, jsou prostřednictvím svých spor de facto všudypřítomné. Jsou tedy přítomné i v krmivech, kde se začínají množit přiblíží-li se vlhkost 20%. V pokročilém stádiu množení mohou plísně tvořit jedovaté metabolity tzv. mykotoxiny (podrobněji viz. kapitola 7).

Plísně v krmivech představují i nebezpečí pro lidi pracující se zvířaty a ve výrobě krmných směsí. U těchto pracovníků může dojít k rozvoji tzv. syndromu „farmářských plic“

(Farmer's lung disease, FLD). Toto onemocnění se projevuje akutními dýchacími potížemi spojenými se záněty alveol, později může přejít do chronické formy (1). Podle posledních prací (53, 54) je hlavním původcem plíseň *Absidia corymbifera*, v menší míře potom *Eurotium amstelodami* a *Wallemia sebi*. Onemocnění má údajně sezónní výskyt s největší incidencí v lednu (54). Největší nebezpečí hrozí ze špatně usušeného a ve vlhku skladovaného sena (1, 53.).

5. PRVOCI A PARAZITI V KRMIVECH

5.1. TOXOPLASMA GONDII

Toxoplazmóza je nakažlivé onemocnění protozárního původu postihující domácí i volně žijící teplokrevná zvířata a je přenosné rovněž na člověka (39). *Toxoplasma gondii* může působit potraty u dojnic a úmrtí plodu u lam. Nákaze se děje většinou perorální cestou po pozření krmiva kontaminovaného výkaly koček a hlodavců, což jsou koneční hostitelé tohoto prvoka (55). Prevence tedy logicky spočívá v eliminaci koček a hlodavců ze stájového prostředí, což je ovšem velmi obtížné. Lidé se nakazí při nedodržování hygienických zásad pozřením oocyst vylučovaných kočkou. Dalším zdrojem je syrové (tatarský biftek), nebo nedostatečně tepelně opracované (karbanátky) maso, nejnebezpečnější je z tohoto hlediska skopové (56). Ničí se mrazem, a proto se salámy ze syrového masa smějí vyrábět jen z masa prošlého mrazírnou (57).

5.2. TRICHINELLA SPIRALIS

Parazitický červ *Trichinella spiralis* má široký okruh hostitelů (39). Z hospodářských zvířat se nejvíce vyskytuje u prasat, byly však popsány případy trichinelózy u koní a lidí (58-60). Larvální stádia zapouzdřená ve svalové tkáni mohou infikovat člověka po konzumaci nedostatečně tepelně zpracovaného masa. Původce se ničí podobně jako toxoplazmóza mrazem -18°C po 20 dnech (1).

6. ZOONÓZY

Zoonózy jsou infekční a invazivní onemocnění společná více druhům živočichů. Dnes se tohoto termínu používá pro onemocnění navzájem přenosná mezi zvířaty a člověkem (39).

Přehled významných zoonóz je uveden v tabulce 8. Ve světě se vyskytuje více než 100 zoonóz mikrobiálního nebo parazitárního původu. V našich poměrech se vyskytují, nebo se vyskytly ornitóza, antrax, brucelóza, tuberkulóza, listerióza, salmonelózy, tularémie, leptospiróza, toxoplazmóza, cysticerkóza a trichofytóza.

Tabulka 8: Některé významné zoonózy. Podle (12) upraveno.

Nemoc	Etiologické agens	Rezervoár	Způsob přenosu	Přenos mezi lidmi	Způsob přenosu mezi lidmi	Zvláštní charakteristika
Pasteurelóza	<i>Pasteurella multocida</i>	Dutina ústní zvířat	Kousnutí, škrábnutí	Ne		
Mor	<i>Yersinia pestis</i>	Hlodavci	Blechy	Ano	Kapénková nákaza	Velký epidemický potenciál
Ostatní nemoci působené <i>Yersinia</i> spp.	<i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i>	Divoce žijící zvířata, prasata, skot, domácí zvířata	Fekal-oral	Ano	Fekal-oral	
Borelióza	<i>Borrelia</i> spp.	Hlodavci, hmyz, klíšťata	Bodnutí	Ano	Prostřednictvím vší a blech	Epidemický potenciál
Salmonelóza	<i>Salmonella</i> spp.	Drůbež, dobytek	Kontaminovaná potrava	Ano	Kontaminace potravin výkaly	
Skvrnitý tyfus	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Hlodavci, klíšťata, roztoči	Bodnutí	Ne		
Myší tyfus	<i>Rickettsia typhi</i>	Hlodavci	Blechy	Ne		
Q horečka	<i>Coxiella burnetii</i>	Skot, ovce, koza	Kontaminovaný prach a aerosol	Ne		

Podle zprávy EK z roku 2002 (9) je třeba věnovat pozornost celkem jedenácti zoonózám:

- Tuberkulóza
- Brucelóza
- Salmonelóza
- Trichinelóza
- Vzteklna
- Kamylobakteriόza
- Listeriόza
- Yersiniόza
- Echinokokόza
- Toxoplazmόza
- Kolibacilόzy působené VTEC

Co se týče počtu lidských onemocnění, jsou daleko nejvýznamnější salmonelózy a kamylobakteriόzy se zhruba 150 000 případy ročně. U salmonelóz již zhruba 5 let dochází k poklesu, zatímco počet kamylobakteriόz donedávna stoupal a dnes stagnuje. Na třetím místě v počtu případů jsou Yersiniόzy (10147), následují VTEC (2664), brucelόza (2386), listeriόza (860), toxoplazmόza (477), echinokokόza (266), tuberkulóza

(49), trichinelóza (48) a vzteklna (1). ČR byla od července 2004 podle WHO prohlášena za zemi prostou vztekliny (33).

7. TOXICKÉ PRODUKTY MIKROORGANISMŮ V KRMIVECH

7.1. BOTULOTOXIN

Botulotoxin je neurotoxin produkovaný bakterií *Clostridium botulinum*. Spory *C. botulinum* jsou široce rozšířeny v půdě, vodě v bahně rybníků a jezer (10). Botulotoxin je nejjedovatější známou látkou přírodního původu, smrtelná dávka pro dospělého člověka je menší než 1 µg (12). Botulotoxiny se dělí podle antigenních vlastností do sedmi skupin označených A-G. Otravy lidí bývají hlavně působeny skupinami A,B,E a F, zatímco otravy zvířat hlavně skupinou C (1,12,24). Obecně se dá říci, že otravy zvířat botulotoxinem jsou zřídka. Přicházejí v úvahu, když jsou zkrmovány sušené výkaly drůbeže, nebo fermentovaná drůbeží podestýlka, kde může dojít k pomnožení klostridií a produkci toxinu. Takové otravy byly popsány hlavně u skotu a drůbeže (1). I když je výskyt *C. botulinum* v přírodě poměrně velký, naštěstí ne vždy mají tyto bakterie podmínky vhodné pro pomnožení. Vyžadují totiž striktně anaerobní podmínky, suchá krmiva navíc mají malou vodní aktivitu a konečně bakterie *C. botulinum* mají malou konkurenční schopnost a pokud se v prostředí pomnoží jiné bakterie nedojde růstu producentů botulotoxinu a následné produkci toxinu (61). Přesto byly popsány případy, že bakterie *C. botulinum* byly schopny růst v senážích a silážích a vyvolaly botulismus u skotu (1). Zvláštní případ byl popsán u mladých kuřat (62), která přijala krmivo se spory *C. botulinum*, které následně vyklíčily v trávicím traktu a produkovaly toxin. K růstu klostridií ve střevě přispěly pravděpodobně dva faktory – nedostatečně vyvinutá mikroflóra mladých kuřat a vysoká koncentrace železa v použité pitné vodě. Podobné případy se občas stávají u lidských kojenců, (tzv. Infant botulism) kteří nemají dostatečně vyvinutou mikroflóru (12).

Výskyt botulotoxinu v peletovaných kompletních krmných směsích je nepravděpodobný, protože toxin se rychle inaktivuje teplem (13).

7.2. MYKOTOXINY

Mykotoxiny jsou sekundární metabolity plísní, mohou se vyskytovat v různých krmivech jako jsou píce, siláž a hlavně v různých obilovinách. Mezi hlavní mykotoxiny nalézané v krmivech patří aflatoxin B1 (produkovaný *Aspergillus flavus*), citrinin (*Penicillium*

citrinum, *P. viridicatum*), fumonisin (*Fusarium* spp.), ochratoxin (*Aspergillus ochraceus*, *Penicillium viridicatum*) a vomitoxin (*Fusarium* spp) (63).

Obiloviny a zelenina sklizená ke krmným účelům vždy obsahuje spory toxikogenních plísní. Naštěstí nízká vodní aktivita zabraňuje růstu plísní. Růst plísní může být redukován také přísady organických kyselin, hlavně k. propionové (64). Pro eliminaci již vytvořených mykotoxinů v krmivech neexistuje spolehlivý postup. Určité výsledky mělo ošetření amoniakem spolu se zahřátím pod tlakem (65). Obsah aflatoxinů přijatých zvířaty s krmivem lze snížit pomocí přísadků sorbentů jako je aktivované uhlí, aluminosilikáty a esterifikovaný glukomanan (66). Velmi kontaminované krmivo by v žádném případě nemělo být podáváno zvířatům, kontaminované obiloviny však lze využít pro produkci etanolu (1). Lidem hrozí pravděpodobně největší riziko otrav mykotoxiny z přímé konzumace kontaminovaných obilovin, luštěnin a zeleniny. Z potravin živočišného původu je riziko pravděpodobně menší i když mykotoxiny byly nalezeny v mase, mléku, vejcích a také ve zpracovaných surovinách např. v párcích (65, 67).

7.2.1. AFLATOXINY

Aflatoxiny byly první objevené mykotoxiny. Produkčním organismem je *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus* (15). Následkem akutní otravy uhynulo v Anglii v 60 letech minulého století 100 000 krůtích brojlerů po zkrmování kontaminované moučky z podzemnice olejné (15). Dnes se vyskytují hlavně v kukuřici, bavlněném semeni a manioku a to hlavně jsou-li skladovány v tropických oblastech při vyšší teplotě a vlhkosti (68). Jsou známy čtyři hlavní druhy alfatoxinů, označované velkými písmeny B1 a B2 (svítí modře po ozáření ultrafialovým světlem) a G1 a G2 (svítí zeleně). Na aflatoxiny jsou citlivá zejména mláďata drůbeže a prasata. Skot a ovce jsou odolnější (69). Aflatoxiny mají kancerogenní účinky, zejména v játrech. Tvorbu tumorů mohou vyvolat dávky již od 1 ppm. Zvláště citlivé jsou kachny, na jejichž mláďata negativně působí již 30 ppb. Podle vyhlášky k zákonu o krmivech (70) se pohybují přípustné koncentrace aflatoxinu B1 v krmivech v ČR v rozmezí 5 až 20 ppb. Podle jiných zdrojů (68) je maximální pro drůbeží brojlerů 2.5 ppm. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce 9. Aflatoxin B1 je jediný mykotoxin, který je podle zákona sledován a pro který existuje závazná standardní metoda podle vyhlášky pro laboratorní zkoušení krmiv (71).

Tabulka 9: maximální přípustné koncentrace aflatoxinu B1 v krmivech. Podle (70).

Typ krmiva	Maximální obsah v mg/kg (ppm) krmiva o vlhkosti 12%
Všechny krmné suroviny	0,02
Kompletní krmiva pro skot, ovce a kozy s výjimkou:	0,02
- kompletních krmiv pro zvířata chovaná pro mléko	0,005
-kompletních krmiv pro telata a jehňata	0,01
Kompletní krmiva pro selata a drůbež (kromě mladých zvířat)	0,02
Ostatní kompletní krmiva	0,01
Doplňková krmiva pro skot ovce a kozy (kromě doplňkových krmiv pro zvířata chovaná pro mléko, telata a jehňata)	0,02
Ostatní doplňková krmiva	0,005

7.2.2. CITRININ

Tento mykotoxin je produkován hlavně *Penicillium citrinum* a *Penicillium viridicatum*, ale také některými dalšími plísněmi (15). Byl nalezen v rýži, plesnivém chlebu, pšenici a ovsu. Po ozáření UV světlem žlutě fosforeskuje. Citrinin působí jako karcinogen. Často bývá nalezen v potravinách jako je špatně skladovaná šunka (72). Produkční organismy bývají často nalézány v kávě, kde je však jejich růst inhibován kofeinem a toxiny proto netvoří (15). Podle studie provedené ve Velké Británii byl citrinin nalezen ve 20% krmné pšenice a ječmene, nejvyšší nalezená koncentrace koncentrace byla 8 ppb (73).

7.2.3. FUMONISINY

Fumonisinu jsou mykotoxiny produkované plísněmi rodu *Fusarium*. Vyskytují se na kukuřici a ostatních zrninách. V oblastech zvýšeného výskytu jednoho z produkčních kmenů – *F. moniliforme*, byl zaznamenán větší výskyt rakoviny jícnu u lidí (74). Kontaminace kukuřice a ní vyrobených produktů je běžná v řadě zemí. Zatímco produkty z kukuřice určené pro lidskou výživu zpravidla obsahují méně než 1mg/kg fumonisinu B1 (FB1), krmiva pro zvířata bývají často těžce kontaminována. Jsou popsány mykotoxikózy jako je leukoencefalomalácie

u koní a plicní edémy u prasat způsobené fumonisinem. Např. až 330 mg/kg FB1 bylo nalezeno v krmivu pro prasata (75).

7.2.4. OCHRATOXINY

Existuje celkem asi sedm ochratoxinů, z nichž nejznámější je ochratoxin A (OA), který je zároveň i nejvíce toxický (15). Hlavním produkčním organismem je *Aspergillus ochraceus*, dále pak *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A. mellus* a další plísně tohoto rodu. OA je produkován také pinicilií: *Penicillium viridicatum*, *P. cyclopium*, *P. variable* a další (15, 68). Mykotoxin byl nalezen v kukuřici, bobu, kakau, sójových bobech, ovsu, ječmeni, citrusových plodech, podzemnici olejné a kávě (15). V krmivech pro hospodářská zvířata bývá nalézán v menší koncentraci a méně často než aflatoxin B1. Ve Velké Británii byl nalezen u 20% vzorků pšenice a ječmene (73). Při testování otrub z rýže byl nalezen pouze u pěti procent vzorků (76). Podobně malý byl výskyt v krmné kukuřici (77). OA působí hepatotoxicky a nefrotoxicky. U většiny hospodářských zvířat je limit toxicity pro OA 1 ppm (68).

7.2.5. TRICHOTHECENY

Jsou toxiny produkované *Fusarium* spp., které se vyskytují hlavně v kukuřici, příležitostně ve špatně skladované rýži a pšenici (68). Nejznámějšími zástupci jsou T₂ toxin a vomitoxin (1,68). U obou látek je toxický limit pro kuřata 4 ppm (68). Stejný limit platí i pro nosnice u kterých jsou vyšší dávky spojeny s dramatickým poklesem snášky a dochází i k poklesu kvality vajec (78). Trichotheceny bývají nalézány také v krmivech pro prasata, které je mohou částečně transformovat a tak snad i detoxifikovat pomocí svojí střevní mikroflóry (79).

8. PREVENCE MIROBIÁLNÍCH RIZIK KRMIV

8.1. METODY PRO ANALÝZU MIKROBIÁLNÍCH RIZIK KRMIV

Při mikrobiologických analýzách potravin a krmiv je na rozdíl od chemických a fyzikálně-chemických rozborů nutno brát v potaz i fakt, že mikroorganismy jsou živé a v případě příznivých podmínek (hlavně vlhko a teplo) dojde k jejich pomnožení, případně k tvorbě toxických metabolitů. Rizika jsou tak nejen při výrobě, ale většinou riziko stoupá v průběhu skladování, manipulace a v průběhu dalšího zpracování (1, 80). V různých laboratořích po celém světě je používáno velké množství rozmanitých metod pro stanovení mikroorganismů v krmivech. Co je velkým nedostatkem je praktická absence mezinárodně platných standardních metod (1, 9). Metody používané pro detekci nebezpečných bakterií

(mikroorganismů) v krmivech jsou tak většinou stejné, nebo podobné jako se používají při analýzách potravin a zahrnují (1, 15, 81):

- klasické kultivační metody
- rychlé nepřímé testy (např. stanovení ATP)
- mikroskopické metody, většinou pomocí epifluorescenčních technik
- elektrické metody (měření odporu nebo vodivosti)

V poslední době se rozvíjejí také molekulárně-genetické metody (DGGE, FISH), které jsou rutinně používány zatím jen při analýzách mikroflóry trávicího traktu (82), testování potravin těmito metodami je ve stadiu zkoušek a krmiva se zatím takto testují jen velmi málo, výjimku tvoří použití PCR metod pro identifikaci živočišných bílkovin v krmivech (83). Obecně platí, že molekulárně-genetické metody jsou velmi specifické, avšak spíše kvalitativní, nebo semikvantitativní a většinou nemohou zjistit počty živých buněk. Přesné kvantitativní metody jako je FISH v krmivech a potravinách mají omezené použití, vzhledem k nízké koncentraci mikroorganismů oproti trávicímu traktu. Metody kultivační, které jsou dosud nejvíce používané, bývají oproti rychlým metodám (měření ATP, měření vodivosti, mikroskopie) zpravidla přesnější, avšak zdlouhavější (trvají 24 hod až několik dní). Podobně jako v potravinách nepostihnou klasické kultivační metody tzv. živé ale nekultivovatelné buňky, které byly popsány u mnoha bakterií v potravinách, z nichž v krmivech má význam *Salmonella enteritidis*, *Shigella* spp., *Campylobacter jejuni* a EPEC (15).

Pro detekci botulotoxinu se používal klasický biologický pokus na myších, nyní se používá ELISA test, stejně jako pro stanovení koncentrace mykotoxinů (15, 68). V ČR je předepsanou standardní metodou HPLC (71).

8.2. ANALÝZA MIKROBIÁLNÍCH RIZIK V KRMIVECH

Analýza mikrobiálních rizik a rizik obecně má tři kroky (80):

- Hodnocení rizik
- Zvládnutí rizika
- Riziková komunikace

Při hodnocení rizik je nejprve potřeba identifikovat nebezpečí tj. v tomto případě konkrétní mikroorganismus (např. *Salmonella*, *Campylobacter*). Dále je třeba určit pravděpodobnost, že se nebezpečí skutečně vyskytne. Jak vyplývá z předchozího textu je pravděpodobnost velmi rozdílná, např. u zoonóz byl v EU počet případů salmonelóz 150 000 v r. 2002, ale vzteklinou

onemocněl ve stejném období pouze jeden člověk (9). Dále je třeba vzít v úvahu závažnost nebezpečí. Ta je v případě salmonelózy naopak daleko menší, než v případě vztekliny. Po skončení hodnocení rizika je třeba zvolit metodu (opatření, postupy) jak riziko zvládnout, v případě, že se reálně objeví. Podle (1, 80) je třeba zodpovědět tři otázky:

- Co má být uděláno pro snížení rizika?
- Jaká je cena a jaký přínos (snížení rizika)?
- Jaký bude mít dopad současné rozhodnutí do budoucna?

Konečným cílem takového postupu je samozřejmě maximální snížení rizika bez zbytečného plýtvání prostředky. Pro hodnocení mikrobiálních rizik krmiv v současné době neexistuje jednotný mezinárodně platný a užívaný standardní postup. Pro prevenci alimentárních nákaz a enterotoxikóz byl přijat tzv. systém HACCP (Hazard analysis of critical control points). Což je systém komplexních preventivních opatření při výrobě, skladování, distribuci a prodeji potravin (1, 15, 84). Základem tohoto systému je určení tzv. kritických kontrolních bodů (CCP – critical control point), což jsou místa, výrobní postupy, operace a procedury jejichž pečlivou kontrolou lze podstatně snížit určité riziko. Např. při výrobě pasterovaného mléka je jedním z CCP pasterace u níž je třeba sledovat (dodržet) mimo jiné správnou teplotu a dobu. Mezi hlavní principy a elementy HACCP patří (15, 84):

- Identifikace rizik
- Určení CCP
- Určení kritických limitů, které musí být dodrženy na CCP
- Metody pro monitorování CCP
- Opravné prostředky
- Kontrola a dokumentace systému

Systém HACCP je specifický pro každý výrobek, ale v ideálním případě by měl být shodný, nebo alespoň podobný pro stejné výrobky na různých pracovištích (15). Systém HACCP by měl být zaveden i do zemědělské prvovýroby, kde by se týkal např. sledování zdravotního stavu dojnic (mastitidy), dodržování hygienických předpisů jako je např. sanitace dojících zařízení. Při výrobě a skladování krmiv by CCP představovaly např. dobré prokysání siláže, sledování vlhkosti při skladování a kontrola krmiv na přítomnost patogenních bakterií a mykotoxinů (84).

8.3. KONTROLA PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V KRMIVECH

Všechny ingredience krmiv musí být skladovány, přepravovány a zpracovávány tak, aby nedošlo ke kontaminaci. Zejména je žádoucí zabránit styku krmiva s divokým ptactvem a hlodavci, což je ne vždy beze zbytku uskutečnitelné. Je třeba pamatovat, že mikroorganismy jsou všudypřítomné a skoro vždy jsou v krmivech přítomny i patogenní, nebo alespoň potenciálně nebezpečné mikroorganismy. Tak např. vždy jsou přítomny spory plísní, z nichž skoro vždy jsou některé schopny produkovat mykotoxiny (85). Proto je nezbytné skladovat krmiva v suchu a vlhku, tak aby nedošlo k pomnožení mikroorganismů.

8.3.1. TEPELNÉ OŠETŘENÍ

Tepelné ošetření (pasterizace) při teplotě 80-85°C po dobu 4 min usmrtí drtivou většinu vegetativních buněk bakterií a citliví jsou i prvoci jako *Toxoplasma gondii* a *Trichinella spiralis*. Pasteračních teplot je většinou dosaženo při výrobě granulovaných krmných směsí (1). Na druhé straně nedojde k inaktivaci bakteriálních endospor a prionů BSE. Pro likvidaci prionů je třeba teplota 138-140 °C po dobu 20 min v páře a za tlaku 3 barů. (1, 22). Po skončení tepelného ošetření je nezbytné zabránit rekontaminaci.

8.3.2. FERMENTACE

Fermentované krmivo je v podstatě siláž, která je-li vyrobena kvalitně, obsahuje cca 1,7% kyseliny mléčné a necelé 1% kyseliny octové. Taková koncentrace je v podstatě baktericidní pro gramnegativní patogenní bakterie (salmonely) a bakteriostatická i pro klostridie. Fermentované krmivo připadá v úvahu i pro prasata, kde krmiva na bázi obilovin smíchaná s vodou mohou být snadno fermentována mléčnými bakteriemi. Fermentovat lze i živočišné zbytky po přidavků fermentovatelných sacharidů např. melasy a/nebo organických kyselin např. kyselina propionová. Shih (86) popsal anaerobní fermentaci uhynulých kuřat, při níž došlo k eliminaci patogenů včetně spor, navíc údajně došlo k přeměně peří na protein stravitelný zvířaty.

9. ZÁVĚRY

Krmiva pro hospodářská zvířata tj. zelená píče, siláže, senáže, kompletní krmné směsi a krmné doplňky mohou být buď přímo zdrojem rozmanitých infekcí, nebo mohou být v průběhu zrání na poli, sklizně, zpracování, distribuce a skladování kontaminovány mikroorganismy. Mikrobiální nebezpečí v krmivech představuje rizika pro zdraví jak zvířat tak člověka. Jednotlivá rizika vyplývající z určitých mikrobiálních nebezpečí se liší svým

významem a pravděpodobným výskytem, některá jsou skutečně reálná, jiná menší a další pouze teoretická či zanedbatelná. Na základě provedené literární rešerše lze formulovat následující závěry:

- Největší mikrobiální riziko v krmivech představuje výskyt *Salmonella* spp. a *Campylobacter* spp.. Tyto bakterie jsou nebezpečné jako pro člověka tak pro zvířata. Zvláště pro salmonely je typický přenos krmivem, kde tyto bakterie mohou i dlouhou dobu přežívat.
- Přenos prionů BSE krmivy je reálný. Je proto nezbytné vyloučit živočišné moučky z výživy přežvýkavců. Je třeba zabránit míchání rybích a masokostních mouček.
- Některá rizika jako je botulismus a antrax jsou v praxi málo pravděpodobná, avšak následky jejich manifestace mohou být fatální, a proto je nelze zcela opomíjet.
- Na rozdíl od kontaminace chemickými látkami jsou nebezpečná i malá množství mikroorganismů v krmivech, neboť mikroorganismy se při špatném skladování (teplo, vlhko) mohou pomnožit a produkovat toxiny.
- Reálné riziko představují mykotoxiny. Hlavním mykotoxinem v krmivech je aflatoxin B1. Bylo by žádoucí rutinně testovat i další mykotoxiny např. toxiny *Fusarium* spp. Častý výskyt mykotoxinů je v kukuřici.
- Je třeba zavést jednotný systém kontroly kvality krmiv (HACCP).
- Je třeba zavést standardní analytické postupy pro identifikaci mikrobiálních nebezpečí v krmivech.

LITERATURA

1. Hinton MH (2000): Vet. J. 159, 124.
2. Skov MN, Angen O, Chriel M, Olsen JE, Bisgaard M (1999): Poult. Sci. 78, 848.
3. Heyndrickx M, Vandekerchove D, Herman L, Rollier I, Grijspeerdt K, De Zutter L (2002): Epidemiol. Infect. 129, 253.
4. Renter DG, Sargeant JM (2002): Anim. Health Res. Rev. 3, 83.
5. Rasmussen MA, Casey TA (2001): Crit. Rev. Microbiol. 27, 57.
6. Kudva IT, Hunt CW, Williams CJ, Nance UM, Hovde CJ (1997): Appl. Environ. Microbiol. 63, 3878.
7. Smith RA, Griffin DD, Dargatz DA (1997): Rev. Sci. Tech. 16, 359.
8. Pecelunas KS, Wages DP, Helm JD (1999): Avian Dis. 43, 783.
9. SANCO/29/2004, Trends and sources of zoonotic agents in animals, feedingstuff, food and man in the European Union and Norway in 2002. An evaluation of the trend reports provided for the years 2002 by the Member States and Norway to the EC in accordance with Article 5 of the Directive 92/117/EEC. Prepared by the Community Reference Laboratory on the Epidemiology of Zoonoses, BfR, Berlin, Germany, 441s.
10. Holt JG, Krieg NG, Sneath PHA, Staley JT, Williams ST (1994): Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore, 787 s.

46. Meyer-Broseta S, Bastian SN, Arne PD, Cerf O, Sanaa M (2001): *Int. J. Hyg. Environ. Health.* 203, 347.
47. Williams DR, Rees GB, Rogers ME (1992): *Veterinary Records* 131, 363.
48. Williams TO, Powell JM, Fernandezrivera S (1995): *Outlook on Agriculture* 24, 43.
49. Wilesmith JW, Gitter M (1977): *Veterinary Record* 119, 467.
50. Feido WM, Schoonderwoerd M, Shute RH, Jackson H (1990): *Canadian Veterinary Journal* 31, 773.
51. Fenlon DR, Wilson J (1989): *Journal of Applied Bacteriology* 66, 191.
52. Bourry A, Poutrel B, Rocourt J (1995): *Journal of Medical Microbiology* 43, 125.
53. Weidmann M, Bruce JL, Knorr R (1996): *Journal of Clinical Microbiology* 34, 1086.
54. Roussel S, Reboux G, Dalphin JC, Bardonnnet K, Millon L, Piarroux R (2004): *Occupational and Environmental Medicine* 61, 3.
55. Blewett DA (1984): *Veterinary Annual* 25, 120.
56. Nesbakken T, Skjerve E (1996): *Meat Science* 43, S47.
57. Marounek M, Březina P, Šimůnek J (2000): *Fyziologie a hygiena výživy. Vysoká vojenská škola pozemního vojska*, 132 s.
58. Arriaga C, Yezpezmulia L, Viveros N, Adame LA, Zarlenga D, Lichtenfels J, Benitez E, Ortegapierras MG (1995): *Journal of Parasitology* 81, 781.
59. Celano GV, Cafarchia C, Pozio E, Pavia C, Casolino A, Capriuolo G, Fattizzo F, Pomo L, Rubini AR, Goffredo E (1996): *Industrie Alimentari* 35, 1311.
60. Dupouycamet J, Soule C, Ancelle T (1994): *Journal de la Societe Francaise de Parasitologie* 1, 99.
61. Sneath PHA, ed. (1984): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2*, Williams and Wilkins, Baltimore, 635 s.
62. Pecelunas KS, Wages DP, Helm JD (1999): *Avian Diseases* 43, 783.
63. Meronuck R, Cincibido V (1996): *Feedingstuff.* 68, 139.
64. Lacey J (1989): *Journal of Applied Bacteriology* 67, 11S.
65. Park DL, Laing BL (1993): *Trends in Food Science and Technology* 4, 334.
66. Ramos AJ, Finkgremmels J, Hernandez E (1996): *Journal of Food Protection* 59, 631.
67. Luskey K, Tesch D, Gobel R (1995): *Archiv Für Lebensmittelhygiene* 46, 45.
68. Larbier M, Leclercq (1992): *Nutrition and feeding of Poultry*, Nottingham University Press, 305 s.
69. Piskač A, Kačmár P (1985): *Veterinární toxikologie*, SZN Praha, 256 s.
70. Vyhláška č. 451/2000 Sb., kterou se provádí zákon č. 91/1996 Sb., o krmivech, ve znění pozdějších předpisů.
71. Vyhláška Ministerstva zemědělství č. 124/2001 Sb., kterou se stanoví požadavky na odběr vzorků a principy metod laboratorního zkoušení krmiv, doplňkových látek a premixů a způsob uchovávání vzorků.
72. Wu MT, Ayres JC, Koehler PE (1974): *Applied Microbiology* 27, 427.
73. Scudamore KA, Hetmanski MT, Chan HK, Collins S (1992): *Food Additives and Contaminants* 14, 157.
74. Marasas WFO, Jackiewicz K, Venter FS, Schalkwyk DJ (1988): *South Africa Medicine Journal* 74, 110.
75. Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Sydenham EW (1996): *Journal of AOAC International* 79, 671.
76. Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT, Rainbird SC (1998): *Food Additives and Contaminants* 15, 185.
77. Scudamore KA, Nawaz S, Hetmanski MT (1998): *Food Additives and Contaminants* 15, 30.
78. Brake J, Hamilton PB, Kittrell RS (2002): *Poultry Science* 81, 1807.

79. Eriksen GS, Pettersson H, Johnsen K, Lindberg JE (2002): Archives for Animal Breeding 56, 263.
80. Ahl AS, Buntain B (2000): Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties 16, 322.
81. Collins CH, Lyne PM, Grange JM (1995): Microbiological Methods 7th ed. Butterworth-Heinemann Ltd, Oxford, GB, 493 s.
82. McCartney AL (2002): British Journal of Nutrition 88, Suppl.1, S29-S37.
83. Wang HC, Lee SH, Chang TJ, Wong ML (2004): Journal of Veterinary Medicine Sciences 66, 855.
84. Jičínská E, Havlová J (1995): Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích. UZPI Praha, 106 s.
85. Moreno MA, Pro MJ, Olivares A, Suarez G (1988): Mycopathologia 104, 149.
86. Shih JCH (1993): Poultry Science 72, 1617.