Vědecký výbor výživy zvířat

Vliv výživy na výskyt patogenních bakterií v drůbežím mase

Doc. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.
Prof. Ing. Vojtěch Rada, CSc.

Praha, listopad 2014

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

OBSAH

1. Úvod 4

2. Patogenní mikroorganismy v chovech drůbeže 4

2. 1. PSEUDOMOR DRŮBEŽE 4

2. 2. SALMONELLA 5

2. 2. 1. Základní charakteristiky 5

2. 2. 2. Druhy rodu Salmonella a jejich klasifikace 5

2. 2. 3. Výskyt 6

2. 3. CAMPYLOBACTER 6

2.3.1 Základní charakteristiky 6

2. 3. 2. Druhy rodu Campylobacter 7

2. 3. 3. Výskyt 7

2. 4. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS 9

2. 4. 1. Základní charakteristika 9

2. 4. 2. Výskyt 9

2. 4. 3. Nekrotická enteritida v chovech drůbeže 10

3. Mikrobiální rizika v krmivech a kontaminace krmných směsí pro drůbež 12

3. 1. Mikroorganismy působící zoonózy 12

3. 2. Mikrobiální rizika 12

3. 3. Kontaminace krmných směsí pro drůbež mikroorganismy působícími zoonózy 16

3. 4. Mikroorganismy působící zoonózy v mase drůbeže 21

4. Antibiotická rezistence enteropatogenních bakterií 28

5. Vliv výživy na výskyt patogenních bakterií u zvířat 29

5. 1. Historie a současnost využití antibiotických stimulátorů růstu ve výživě zvířat 30

5. 1. 1. Antibiotické stimulátory růstu v zemích EU 32

5. 1. 2. Antibiotické stimulátory růstu v USA 34

5. 2. Probiotika a prebiotika ve výživě hospodářských zvířat 35

5. 2. 1. Účinek probiotik 36

5. 2. 2. Mechanismus účinku probiotik 37

5. 2. 3. Probiotika pro drůbež 41

5. 3. Prebiotika 43

5. 4. Organické kyseliny 44

5. 5. Mastné kyseliny se střední délkou řetězce 45

5. 5. 1. Využití mastných kyselin o střední délce řetězce ve výživě drůbeže 48

5. 6. Rostlinné extrakty 49

6. Závěry 50

Literatura 50

Summary 66

Keywords 66

1. ÚVOD

Ve vyspělých zemích je mikrobiální kontaminace kuřecího masa jednou z hlavních příčin alimentárních infekcí člověka. Nejčastěji se vyskytují kampylobakteriózy a salmonelózy; mezi další patří např. infekce a intoxikace související s bakteriemi rodu *Clostridium*. Přítomnost klostridií, hlavní příčiny nekrotické enteritidy, představuje v chovech drůbeže značné riziko.

Po zákazu používání antibiotických stimulátorů růstu ve výživě hospodářských zvířat představuje prevence infekce, a následné kontaminace drůbežích produktů, značný problém. Zejména proto, že maso je zpravidla kontaminováno obsahem trávicího traktu na jatkách. Pro snížení rizika lze využít několik strategií, včetně přídavku látek s antimikrobiálními účinky do krmiva. Mezi tyto alternativní antibiotické látky patří probiotika, prebiotika, organické kyseliny (včetně mastných kyselin), nebo rostlinné extrakty.

2. PATOGENNÍ MIKROORGANISMY V CHOVECH DRŮBEŽE

2. 1. PSEUDOMOR DRŮBEŽE

Pseudomor drůbeže, někdy označovaný též jako Newcastleská choroba drůbeže, je onemocnění vyvolávané virem z čeledí Paramyxoviridae, rod *Rubulavirus*. Virus je poměrně odolný vůči mírnému zahřátí, podmínky inaktivace jsou 56 ^{o}C/3 hodiny nebo 60 ^{o}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 (Anonym2; Vařejka et al., 1989; Janáč, 1977). Přenos onemocnění je možný přímým stykem zvířat, ale často se děje kontaminovanou krmnou směsí, vodou a komponenty krmiv (Hinton, 2000; Anonym2). 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 (Anonym3) § 10 nebezpečnou nákazou, která podléhá povinnému hlášení. V ČR byl poslední případ v r. 1998 (Anonym4).

2. 2. SALMONELLA

2. 2. 1. Základní charakteristiky

Podle Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Popoff a Le Minor, 2005) patří rod *Salmonella* mezi Gammaproteobakterie – fakultativně anaerobní gramnegativní tyčinky, podskupina 1 – čeleď Enterobacteriaceae. Salmonely jsou Gramnegativní, pravidelné tyčinky o přibližných rozměrech 0,7-1,5 x 2-5 μm. Obyčejně jsou pohyblivé a to pomocí peritrichně umístěných bičíků. Jsou fakultativně anaerobní a chemoorganotrofní, přičemž mohou uplatňovat jak respiratorní, tak fermentativní typ metabolizmu. Salmonely jsou mezofilní s optimální kultivační teplotou 37 ^{o}C. D-glukosa a ostatní sacharidy jsou štěpeny za tvorby kyselin a obvykle se tvoří také plyn. Oxidasa je negativní, katalasa pozitivní, indol a Voges-Proskauer negativní a reakce s metylčervení a Simmons citrátem jsou pozitivní. Většinou mají lyzin a ornitin dekarboxylasu, ale přítomnost arginin dihydrolasy je variabilní. H_2S je produkován, močovina není hydrolyzována, růst na KCN a utilizace malonátu jsou variabilní. Redukují nitráty. Spektrum fermentovatelných sacharidů obyčejně zahrnuje L-arabinosu, maltosu, D-manitol, D-manosu, L-rhamnosu, D-sorbitol, trehalosu a D-xylosu. 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.

2. 2. 2. Druhy rodu Salmonella a jejich klasifikace

Typovým druhem je *Salmonella choleraesuis.* Podle současné nomenklatury (Holt et al., 1994, Anonym1) existují v současné době pouze dva druhy a to *Salmonella bongori* a *Salmonella chleraesuis*, přičemž posledně zmíněný má ještě 5 poddruhů pojmenovaných jako *Salmonella chleraesuis* 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* (Holt et al., 1994). 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 v tomto textu, takže např. sérovar *Salmonella typhimurium* by mohl být uveden také (ze systematického hlediska správněji) jako *Salmonella* sérovar Typhimurium (Sherris, 1990). Jednotlivé sérovary se zařazují do pěti

skupin, které se označují římskými číslicemi I-V a liší se některými vlastnostmi, např. virulencí (Holt et al., 1994).

2. 2. 3. Výskyt

Salmonelózy jsou známé 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 (Hejlíček a Vrtiak, 1982). V současné době představuje výskyt salmonel a jeho důsledky celosvětový problém. Salmonely se nacházejí u všech druhů zvířat (savci, ptáci, plazi, 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 zřídkakdy patogenní pro lidi (Holt et al., 1994).

2. 3. CAMPYLOBACTER

2.3.1 Základní charakteristiky

Podle Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Vandamme et al., 2005) patří rod *Campylobacter* mezi Epsilonproteobakterie čeledi Campylobacteraceae. Jsou to – 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 nesporulující. Barví se gramnegativně. Buňky se pohybují pomocí polárních bičíků typickým šroubovitým pohybem. Jsou typickými 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 oxidasa pozitivní a ureasa 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.

2. 3. 2. Druhy rodu Campylobacter

Rod *Campylobacter* v současné době zahrnuje 13 druhů (Holt et al., 1994). 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 (Krieg, 1984). *C. fetus* subsp. *veneralis* je patogenní pouze pro skot, člověk není vnímavý. *C. jejuni* působí zmetání u ovcí a enteritidy doprovázené horečkami u lidí.

2. 3. 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 (Krieg, 1984). Častý výskyt je u brojlerových kuřat. V zemích EU je 20 až 87 % hejn kontaminováno. Relativně nízká promořenost je ve Švédsku (20 %) a v Holandsku (27 %), vyšší je v Dánsku (43%) a vysoká je např. v Německu (64 %). Hlavním izolovaným druhem je *C. jejuni* (Jay et al., 2005). Podobně vysoký výskyt kamopylobakterů je u skotu, u prasat je kontaminace naopak nízká (méně než 5 %), přičemž bývá nalezen hlavně *C. coli*.

Přenos kampylobakterióz 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 (Edwards, 1996). Přehled hlavních bakteriálních původců onemocnění z potravin souvisejících s drůbežími produkty a cesty jejich přenosu uvádí Tabulka 1.

Tabulka 1. Zdroje bakteriální kontaminace drůbežích produktů s hygienickým rizikem pro člověka a cesty jejich přenosu v chovech drůbeže

Bakterie	**Cesty přenosu**	**Klinické příznaky u drůbeže**	**Reference**
Campylobacter jejuni	horizontální (fekálně-orální cesta) vertikální? (nejednotný názor)	Bez příznaků nebo enteritis s průjmem	Höök et al., 2005 Newell and Fearnley, 2003
Salmonella spp.	horizontální vertikální	Bez příznaků, nebo mírné příznaky enteritidy u kuřat	White et al., 1997
Escherichia coli	horizontální vertikální?	Infekce žloutkového váčku, omphalitis, infekce dýchacích cest, septikémie, cellulitis	Gomis et al., 2003
Clostridium perfringens	Horizontální (půda, voda, GI trakt) predispoziční faktory: kokcidióza, krmivo s vysokým obsahem bílkovin	Necrotická enteritis akutní – vysoká mortalita (30-50 %) subklinická– zhoršené trávení a vstřebávání živin - snížené přírůstky	Timbermont et al., 2010 Cooper and Songer, 2009 Van Immerseel et al., 2004

2. 4. CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Podle Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Rainey et al., 2009) je *Cl. perfringens* zástupcem čeledi *Clostridiaceae*, řádu *Clostridiales,* třídy *Clostridia,* kmenu *Firmicutes.*

2. 4. 1. Základní charakteristika

Cl. perfringens je grampozitivní, anaerobní, sporulující, nepohyblivá, rovná tyčka, zpravidla s rozměry 0,6-2,4 x 1,3-19 µm. Spory jsou v klinických izolátech a při běžné *in vitro* kultivaci viditelné zřídka. V případě výskytu spor jsou tyto oválné, centrálně nebo subterminálně umístěné a rozšiřují obvod buňky. Bakteriální kolonie *Cl. perfringens* jsou zpravidla 2-5 mm velké, s hladkým povrchem, šedé až šedožluté barvy. Mohou produkovat hemolysin alfa, delta a theta. Optimální kultivační teplota pro *Cl. perfringens* typu A, D a E je 45 °C, typy B a C rostou optimálně při teplotách 37 °C i 45 °C. Rozmezí teploty, při níž *Cl. perfringens* obecně roste, se uvádí mezi 20 a 50 °C. Některé kmeny rostou omezeně i při teplotách od 6 °C, *Cl. perfringens* však není bakterií psychrotrofní. Bakterie fermentují sacharidy, jsou rezistentní k přítomnosti až 20 % žluči a jsou schopny růst při pH 5,5-8,0.

U bakterie *Cl. perfringens* je dle současné klasifikace rozlišováno pět toxotypů, A – E. Typ A produkuje alfa toxin, typ B produkuje alfa, beta a epsilon toxiny. Typ C se vyznačuje produkcí alfa a beta toxinů, typ D produkcí alfa a epsilon toxinů a typ E produkuje alfa a iota toxiny. Z hlediska zdravotního stavu drůbeže jsou významné zejména typy A a C, které jsou spojovány s výskytem nekrotické enteritidy drůbeže. Pro vývoj infekce je klíčová produkce nedávno objeveného NetB toxinu (Keyburn et al., 2008; 2010). Jednotlivé typy *Cl. perfringens* vykazují variabilní citlivost k antibiotikům.

2. 4. 2. Výskyt

Cl. perfringens se běžně vyskytuje v trávicím traktu teplokrevných zvířat, včetně člověka. Výskyt je rovněž častý v trávicím traktu hmyzu, v rostlinném materiálu a v půdě. U člověka může *Cl. perfringens* za určitých podmínek vyvolat onemocnění z potravin (přehled viz Tabulka 2.), u drůbeže pak může být původcem nekrotické enteritidy. Nekrotická enteritida drůbeže se řadí mezi závažná produkční onemocnění a bude o ní detailněji pojednáno níže v textu.

Výskyt bakterií rodu *Clostridium* představuje celosvětový problém v oblasti humánní i veterinární medicíny (Borriello, 1995). V zemích EU je každoročně průkaz klostridiálních

toxinů zařazen mezi hlavní příčiny onemocnění z potravin (EFSA, 2012). *Cl. perfringens* představuje značné zdravotní riziko i v USA, kde jeho výskyt v potravinách vede ke zhruba 250 000 případů onemocnění z potravin ročně (Garcia and Heredia, 2011). Jako hlavní zdroje klostridií v potravinách jsou označovány masné výrobky, zejména hovězí maso a drůbež.

2. 4. 3. Nekrotická enteritida v chovech drůbeže

Nekrotická enteritida (NE) drůbeže je infekční onemocnění trávicího traktu, vyvolané bakterií *Cl. perfringens* produkující NetB toxin (Nauerby et al., 2003; Gholamiandekhordi, 2006; Keyburt et al., 2008). Onemocnění bylo poprvé popsáno v roce 1961 (Parish et al., 1961). Výskyt NE v chovech drůbeže představuje značné hygienické riziko. Onemocnění významně snižuje produkci, což je spojeno s následnými finančními ztrátami. Významná je v tomto ohledu nejen manifestace onemocnění, ale i jeho subklinická forma. Celosvětově je v souvislosti s výskytem NE roční ztráta v chovech drůbeže odhadována na více než 2 miliardy USD (Timbermont et al., 2011). NE se v chovech drůbeže může vyskytovat jak ve formě akutní, tak i ve formě subklinické. Ta zpravidla není diagnostikována, tedy ani léčena. Kromě zdravotního a hygienického rizika způsobuje výskyt subklinické NE i snížení welfare chovaných zvířat. Subklinická forma onemocnění je obecně považována za velmi nebezpečnou, zejména pro její perzistenci v chovech a následnou možnost přenosu patogenních bakterií do produktu. Vývoj klinické formy do značné míry závisí na výskytu predispozičních faktorů, zejména na výskytu kokcidií (Dahiya, 2006). Mortalita u brojlerových kuřat je zpravidla v rozmezí 2–10 %, ale může dosáhnout i 50 %. U nosnic byla pozorována mortalita na hranici 6,5 % (Lee et al., 2011).

Tabulka 2. Prevalence (%) dominantních enteropatogenů v syrovém drůbežím mase

	Počet testovaných vzorků	Prevalence (%)	Metoda detekce	Reference
C. jejuni	243	51	CCDA agar, biochem. test (Api-Campy)	Mayrhofer et al., 2004
	198	49.5	CCDA agar; Gramovo barvení, katalasa, oxidasa, morfologie (mikroskopie)	Domínguez et al., 2002

	Počet testovaných vzorků	Prevalence (%)	Metoda detekce	Reference
	271	82.3	CCDA agar biochemický test (Api-Campy)	Ghafir et al., 2007
	135	76.3	CCDA agar; Gramovo barvení, katalasa, oxidasa, hydrolýza hypurátu; mikroskopie and hydrolýza indoxyl-acetátu, morfologie	Stoyanchev et al., 2007
Salmonella spp.	281	16.4	XLD a McConkey agar sérová aglutinace	Mayrhofer et al., 2004
	198	35.8	Rambachův agar, biochemický test (BBL Enterotube II)	Domínguez et al., 2002
	698	31.5	Brilliant green sulfa agar, aglutinační testy	Alali et al., 2012
E. coli	126	2.4*	Coli-ID-Agar; biochemický test (API-20E), patogenní *E. coli:* produkce hemolysinu na enterohemplysin agarua PCR*stx*1	Mayrhofer et al., 2004
	212	38.7	McConkey agar/eosin-methylenová modř agar; biochem. test (API-20E)	Zhao et al., 2001
Cl. perfringens	50	84	CW agar s vaječným žloutkem, mikroskopie	Miwa et al., 1998
L. monocytogenes	89	26	PALCAM agar; Api-Listeria test	Mayrhofer et al., 2004

3. MIKROBIÁLNÍ RIZIKA V KRMIVECH A KONTAMINACE KRMNÝCH SMĚSÍ PRO DRŮBEŽ

3. 1. MIKROORGANISMY PŮSOBÍCÍ ZOONÓZY

Krmiva pro hospodářská zvířata tj. zelená píce, 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. Největší mikrobiální riziko v krmivech představuje výskyt *Salmonella* spp. a *Campylobacter* spp. Tyto bakterie jsou nebezpečné jak pro člověka tak pro zvířata. Zvláště pro salmonely je typický přenos krmivem, kde tyto bakterie mohou i dlouhou dobu přežívat. 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.

3. 2. MIKROBIÁLNÍ RIZIKA

Rizikem se rozumí míra pravděpodobnosti nepříznivého účinku na zdraví vyplývajícího z nebezpečí a závažnosti tohoto účinku. Mikrobiální nebezpečí jsou spolu s 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 3. 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 statistiky 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 nezanedbatelným rizikem je výskyt mykotoxinů v krmivech. Tyto látky, jsou-li přítomny ve velkých dávkách, mohou vyvolat akutní otravy zvířat, malé dávky způsobí 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 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 4.

Tabulka 3. Definice. Upraveno podle Hinton (2000)

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 (FAO/WHO, 1995).
Riziko	Je funkcí pravděpodobnosti výskytu (uplatnění) a míry účinku určitého nebezpečí (FAO/WHO, 1995).
Analýza rizik	Proces skládající se ze tří částí: hodnocení rizik, management rizik a komunikace o riziku (FAO/WHO, 1995).
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 (FAO/WHO, 1995).
Zvládnutí rizik	Proces, při němž jsou zvažovány opatření a alternativy k přijetí, minimalizování, nebo zredukování zhodnocených rizik a je prováděn výběr vhodných nástrojů (FAO/WHO, 1995).
Zoonóza	Onemocnění běžně se vyskytující jak u lidí, tak u zvířat, přičemž zvířata jsou hlavním rezervoárem těchto infekcí.

Tabulka 4. Výskyt patogenních mikroorganismů v krmivech. Podle Hinton (2000).

Kategorie	Krmiva a komponenty krmiv	Sušená nebo fermentovaná píce	Pastva	Krmiva ze zbytků potravin a odpadků
(a) Infekční agens přenosná na člověka z hospodářských zvířat, tj. zoonózy	Spory Bacillus anthracis Priony BSE[a] Salmonella enteritidis Virus pseudomoru drůbeže[b]	Toxoplasma gondii	Spory *Bacillus anthracis* *Mycobacterium* spp. Vajíčka tasemnic např. *Cysticercus bovis*	Trichinella spiralis

(b) Nezoonotické infekční agens nebo jejich produkty (metabolity), které působí onemocnění hospodářských zvířat a lidí		Toxin *Clostridium botulinum* *Listeria monocytogenes*		
(c) Infekční agens, které působí epidemie hospodářských zvířat u lidí, může způsobit pouze lehká onemocnění nikoliv vážná onemocnění	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	

[a]Předpokládáno, ale ještě stále ne zcela prokázáno

[b]Virus 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.

3. 3. KONTAMINACE KRMNÝCH SMĚSÍ PRO DRŮBEŽ MIKROORGANISMY PŮSOBÍCÍMI ZOONÓZY

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 (Hinton, 2000; Sanco, 2004). 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 (Davies, 1994). 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. Mezi jednotlivými sérovary nejsou velké schopnosti přežívat v krmných směsích a právě buňky *S. enteritidis* jsou schopny přežívat v tomto prostředí i několik měsíců (Davies a Wray, 1996).

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 předepsán standardní postup pro stanovení salmonel v krmivech. Jednotné postupy pro mikrobiologické analýzy nejsou stanoveny ani v EU.

Tabulka 5. *Salmonella* spp. v krmivech testovaných v zemích EU a v 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

[1]Některé země uvádějí počty pozitivních šarží

Údaje o frekvenci výskytu salmonel v krmivech udává zpráva Evropské komise o trendech a zdrojích zoonotických agens ve zvířatech, krmivech a potravinách (Sanco, 2004) 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.

Hodnoty 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 byla testována různá množství vzorků. Např. ve Francii, která má mnohonásobně větší trh než je v Holandsku a Švédsku, 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 olejniny a jejich vedlejší produkty než obilniny. Veldman et al. (1995) testovali ingredience krmných směsí pro drůbež na přítomnost salmonel a našli 130 pozitivních vzorků (31 %) rybí moučky, 83 pozitivních (4 %) vzorků masokostní moučky a salmonely byly také přítomny v gritu (15 vzorků; 27 %).

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, 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 četnosti kontaminace u krmiva pro drůbež byla nižší. Výsledky však nelze statisticky hodnotit ze stejných důvodů jako údaje uvedené v Tabulce 5.

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

Distribuce sérovarů se liší od četnosti sérovarů nalézaných 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 nalézány sérovary Mbandaka, Agona, Tennessee, Senftenberg a Anatum. V kompletních krmných směsích byly nejčastěji nalézány sérovany Mbandaka a Senftenberg. Sérovar Enteritidis byl nalezen jednou v krmné směsi pro drůbež a sérovar Typhimutium rovněž jednou v krmivu pro prasata. Celkově je však nutno konstatovat, že salmonely a ostatní zoonotické mikroorganismy nejsou v krmivech (oproti) potravinám, příliš často (rutinně) sledovány v systému rychlého varování EU (RASFF) není v letech 2013-2014 ani jediné hlášení o výskytu patogenních bakterií vyvolávajících zoonózy v krmivech.

Přehled metod používaných pro detekci salmonel v krmivech uvádí Jarquin et al. (2006). Klasické kultivační postupy jsou ještě plošně používány, přičemž mají výhody, že stanoví živé buňky, ale nejsou často úspěšné při detekci velmi nízkých počtů mikroorganismů. Proto jsou tyto metody experimentálně doplňovány moderními přístupy. Např. pro detekci salmonel lze použít sérologické metody zaměřené na O a H antigeny a imunochemické metody jako je ELISA (Maciorowski et al. (2006)).

Protože je krmivo často považováno za primární zdroj salmonel, které se následně vyskytují v drůbežím mase (Jarquin et al. (2009) je účelné mikrobiologicky kontrolovat továrny vyrábějící krmiva. Davies and Wales (2010) sledovali výskyt salmonel v míchárnách krmiv. Byly sledovány čtyři komerční a dva faremní provozy. V prvním provozu bylo ze 416 vzorků krmiva izolováno 5 sérovarů *Salmonella enterica* Typhimurium. V druhém provozu bylo z 386 vzorků pozitivních 11, ale autoři neudávají sérovar. Jako podezřelý zdroj se zde jevili hlodavci, vzhledem k přítomnosti jejich trusu. Směsný vzorek tohoto materiálu byl ale negativní. U třetí komerční mísírny bylo z 408 vzorků 31 pozitivních na *Salmonella enterica* Agama. V posledním provozu bylo ve 408 vzorcích nalezeno celkem 7 různých sérovarů. Ze dvou faremních byly salmonely nalezeny pouze v jednom, přičemž byl pozitivní jediný ze 40 vzorků. Jak plyne z této práce, u lidských onemocnění nejčastější sérovar Enteritidis nebyl v krmivech nalezen, zatímco téměř vždy se tento sérovar vyskytoval v prachu (vzduchu) hal nosnic. Krmivo tak nemusí být podle této práce hlavním zdrojem salmonel vyskytujících se v drůbežím mase. Na druhé straně Jay et al. (2005) uvádí, že v USA je kontaminováno

salmonelami 20-25 % procent sypkých směsí, ale jen 6 % granulovaného krmiva. Důvodem je tepelné ošetření při výrobě granulí.

Kontaminace drůbežího masa *Listerií monocytogenes* nebyla ovlivněna krmivem, a směrodatnou ani nebyla úroveň kontaminace stád přicházejících na porážku, ale hlavním faktorem byl stupeň zamoření jatek listeriemi (Sasaki et al., 2014).

3. 4. MIKROORGANISMY PŮSOBÍCÍ ZOONÓZY V MASE DRŮBEŽE

Tabulka 7 uvádí počty hlášení kontaminovaných vzorků drůbežího masa a vajec podle systému RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) v letech 2013 a 2014. Sledované období zahrnuje celkem 95 týdnů, v nichž bylo zaznamenáno celkem 71 hlášení, což představuje jedno hlášení na zhruba každých 9 dnů. Většina hlášení (66) se týkala masa, z toho nejčastěji kuřecího (33 případů), dále krůtího (16) a kachního (4), ve zbylých případech nebylo maso přesně specifikováno (uvedeno je pouze jako „drůbeží“). Je také možné, že skutečný počet hlášení byl ve skutečnosti ještě vyšší, protože u některých potravin jsou uvedeny formulace jako „masové kuličky“, „mleté maso“ apod. Z patogenních mikroorganismů v uvedených hlášeních dominují salmonely (66 hlášení) a zbytek tvoří listerie. Ačkoliv hlavní bakterií působící onemocnění z potravin je *Campylobacter* spp., jehož hlavním zdrojem je drůbeží maso, není tento patogen zmíněn ani v jednom hlášení. Důvodem je pravděpodobně obtížnější způsob detekce a také asi menší počet testovaných vzorků. Zajímavé je, že zatímco salmonely se v trusu drůbeže vyskytují spíše sporadicky, *Campylobacter* spp. je nalézán v 30-100 % (Jay et al., 2005).

Polské drůbeží maso se jeví jako nejčastější zdroj salmonel, neboť v systému RASFF je uvedené v celkovém počtu 21 případů. V šesti případech salmonely hlásilo samo Polsko, ale zbytek hlášení je z ostatních zemí EU (Itálie, Dánsko, Estonsko, Francie, Bulharsko a Lotyšsko). Jako země původu byla u salmonel na druhém místě jmenována Francie (avšak oproti Polsku jen 9 případů) a na třetím místě je Německo (8 případů). Z celkem 66 hlášení bylo pouze v sedmi případech země původu mimo EU. Čtyři pozitivní vzorky byly z Brazílie a 3 z Thajska. Největší počet případů hlásila Francie (19) a Dánsko (10).

Tabulka 7. Hlašení RASFF – potraviny (http://www.bezpecnostpotravin.cz/kategorie/hlaseni-v-systemu-rasff.aspx)

Datum	**Ohlásila země**	**Důvod ohlášení**	**Země původu výrobku**
13/10/2014	Dánsko	*Salmonella indiana* (přítomnost/ 25g) v chlazených a mražených celých kuřatech, kuřecím mase a v kuřecích játrech	Dánsko
09/10/2014	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v chlazeném „kuřeti na žluto“	Francie
07/10/2014	Nizozemsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v mletém kuřecím mase	Nizozemsko
24/09/2014	Belgie	*Salmonella* spp. v kuřecích karbanátcích	Belgie
10/09/2014	Belgie	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v chlazených kuřecích řízcích a špízech	Belgie
10/09/2014	Nizozemsko	*Listeria monocytogenes* (přítomnost/ 10g) a *Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v kuřecícm špízu	Rumunsko, přes Rakousko
10/09/2014	Nizozemsko	*Listeria monocytogenes* (přítomnost/ 10g) a *Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v mraženém kuřecím špízu	Rumunsko, přes Rakousko
10/09/2014	Nizozemsko	*Listeria monocytogenes* (v 1 z 5 vzorků/ 10g) a *Salmonella* spp. (ve 3 z 5 vzorků/ 25g) v mražených kuřecích špízech	Rumunsko, přes Rakousko
10/09/2014	Finsko	*Salmonella enteritidis* (ve 2 z 5 vzorků/ 25g) v mraženém celém syrovém kuřeti	Belgie

22/08/2014	Dánsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v celých vejcích a v celých pasterovaných vejcích v obalech	Dánsko
07/08/2014	Dánsko	*Salmonella infantis* (přítomnost/ 25g) v mražených marinovaných filetech z kuřecích prsou	Nizozemsko
01/08/2014	Francie	*Salmonella enteritidis* ve vejcích	Německo
31/07/2014	Rakousko	Nákaza z jídla (*Salmonella enteritidis*), pravděpodobným zdrojem byly vejce	Německo
31/07/2014	Francie	*Salmonella typhimurium* (přítomnost/ 25g) v mražené krůtí kůži	Nizozemsko, přes Německo
14/07/2014	Itálie	*Salmonella Saint Paul* (přítomnost/ 25g) v mraženém drůbežím a telecím kebabu	Německo
04/07/2014	Lotyšsko	*Salmonella enteritidis* ve zmrazených kuřecích stehnech	Polsko
03/07/2014	Francie	*Salmonella typhimurium* v mražených kuřecích trupech	Francie
28/05/2014	Francie	*Salmonella typhimurium* DT 7 v mraženém krůtím mase	Francie
22/05/2014	Francie	*Salmonella* spp. (přítomnost / 25g) v drůbežích klobásách (chipolata)	Francie
16/05/2014	Slovinsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mražených kuřecích filetech	Litva, přes Belgii
02/05/2014	Francie	*Salmonella typhimurium* (přítomnost/ 25g) v mražených krůtích křídlech	Francie

02/05/2014	Švédsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v mražených kořeněných krůtích prsou	Brazílie, přes Nizozemsko
02/05/2014	Dánsko	*Salmonella Stanley* v mraženém soleném kuřeti	Thajsko
29/04/2014	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mražených kuřecích nudličkách se šlachami	Polsko, přes Německo
29/04/2014	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mražených kuřecích filetech	Polsko, přes Německo
28/04/2014	Francie	*Salmonella typhimurium* v mražených krůtích bedrech (shoulders)	Itálie
25/04/2014	Polsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/25 g) v mraženém a chlazeném drůbežím mase a masných produktech	zpracováno v Polsku, surovina ze Slovenska
07/04/2014	Polsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/25g) v čerstvém / mraženém drůbežím mase	Polsko
02/04/2014	Finsko	*Salmonela* spp. (v 1 z 5 vzorků/ 25g) v mraženém kachním mase	Německo
13/03/2014	Finsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mražených solených kuřecích prsních řízcích	Německo
26/02/2014	Dánsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v mražených solených kuřecích prsních	Thajsko

		řízcích	
10/02/2014	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mraženém syrovém kuřecím mase	Polsko
05/02/2014	Itálie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/25g) v chlazených kuřecích křídlech, stehnech a dolních částech stehen (paličkách)	Polsko
31/01/2014	Belgie	*Salmonella enteritidis* v kuřeti	Belgie
27/12/2013	Francie	*Salmonella infantis* v kouskách kuřecího donneru	Rumunsko
17/12/2013	Polsko	*Salmonella enteritidis* v chlazeném drůbežím mase	Polsko, surovina z ČR
16/12/2013	Francie	*Listeria monocytogenes* (< 10 CFU/g) v perličce (guinea hen) s kachními játry	Francie
12/12/2013	Polsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) ve zmrazených kuřecích prsou ve šťávě	Polsko
12/12/2013	Dánsko	*Salmonella Newport* (přítomnost/ 25g) ve zmrazeném krůtím mase	Polsko
15/11/2013	Francie	*Salmonella* (přítomnost/10g) v různých masných preparátech obsahujících mleté drůbeží maso	Francie
14/11/2013	Česká republika	*Salmonella infantis* (přítomnost/25 g) v mrazeném kuřecím kebabu	Česká republika, surovina z Polska
11/11/2013	Francie	*Salmonella typhimurium* v chlazeném	Francie

		krůtím mase	
08/11/2013	Finsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/25 g) ve zmrazených solených filetech z kuřecích prsou.	Thajsko, přes Nizozemsko
07/11/2013	Dánsko	*Salmonella Newport* (detekována/25 g) ve zmrazené krůtě	Polsko
06/11/2013	Polsko	*Listeria monocytogenes* (přítomnost/25 g) ve zmrazené grilované kachně	Polsko
30/10/2013	Belgie	*Salmonella typhimurium* (přítomnost/25 g) ve zmrazených okořeněných krůtích stehnech	Brazílie, přes Nizozemsko
28/10/2013	Francie	*Salmonella* spp. (přítomnost/25 g) ve zmrazených marinovaných kuřecích plátcích	Nizozemsko
24/10/2013	Itálie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mraženém celém kuřeti	Polsko
10/10/2013	Itálie	*Salmonella enteritidis* v celých zmrazených kuřatech	Polsko
20/09/2013	Dánsko	*Salmonella* spp. (přítomnost/25 g) v mražených kuřecích zadních čtvrtkách	Dánsko
12/09/2013	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/25 g) v mražených kuřecích filetech	Polsko
29/08/2013	Polsko	*Salmonella* typ B (přítomnost/ 25 g) v kuřecím kebabu	Polsko
01/08/2013	Německo	*Salmonella enteritidis* (přítomnost) v mraženém filetu z kuřecích prsou	Rumunsko

24/07/2013	Francie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost) ve vejcích	Španělsko
09/07/2013	Bulharsko	*Salmonella enteritidis* v chlazených celých kuřatech (s krky) a v mražených (svázaných) kuřatech	Polsko
02/07/2013	Francie	Rychle se šířící nákaza z jídla (*Salmonella* spp.) pocházející z vajec	Španělsko
20/06/2013	Finsko	Hotová jídla a snacky *Salmonella* spp. (přítomnost/25g) v mražených špízech z kořeněné krůty a baby kukuřice	Německo
06/06/2013	Polsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/25g) v mraženém drůbežím kebabu	Polsko
28/05/2013	Dánsko	*Salmonella Schwarzengrund* (přítomnost/ 25g) v mražených marinovaných krůtích prsou	Německo
29/03/2013	Švédsko	*Salmonella Hadar* (přítomnost/ 25 g) v mražených krůtích prsou s bílým pepřem	Brazílie
28/03/2013	Finsko	*Salmonella* spp. v mražených kachních stehnech	Francie
28/03/2013	Estonsko	*Salmonella Newport* (přítomnost/ 25g) v mraženém krůtím mase	Polsko
20/03/2013	Dánsko	*Salmonella typhimurium* (přítomnost/ 25g) v mražených krůtích prsou	Polsko
13/03/2013	Belgie	*Salmonella* (přítomnost/ 25g) v kuřecích plátcích	Belgie

08/03/2013	Belgie	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v mražených horních kuřecích stehnech	Belgie, surovina z Polska
19/02/2013	Itálie	*Salmonella enteritidis* v mraženém telecím a krůtím kebabu	Polsko
15/02/2013	Itálie	*Salmonella* spp. (přítomnost/ 25g) v mraženém krůtím a drůbežím	Německo, přes Polsko
30/01/2013	Belgie	*Salmonella* (přítomnost /25g) v drůbežích řízcích	Belgie
24/01/2013	Polsko	*Salmonella enteritidis* (přítomnost/ 25g) v čerstvém kuřecím mase	Polsko
23/01/2013	Švédsko	*Salmonella Schwarzengrund* v mražených kořeněných krůtích prsou	Brazílie, přes Dánsko
04/01/2013	Belgie	*Listeria monocytogenes* v chlazené uzené krůtě	Belgie

4. ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE ENTEROPATOGENNÍCH BAKTERIÍ

Citlivost enteropatogenních bakterií k antibiotikům se po celou řadu let využívala nejen k léčbě, ale i k prevenci jejich výskytu v chovech drůbeže. Spolu s narůstajícím problémem antibiotické rezistence je však jejich používání omezováno, a v případě krmných antibiotik dokonce zakázáno (viz první zákaz používání antibiotických stimulátorů růstu na základě Regulace EU č. 1831/2003).

U kampylobakterů je zpravidla pozorována střední až vysoká míra rezistence k tetracyklinu, střední až nízká rezistence k chinolonům/fluorochinolonům (např. ciprofloxacin) a nízká rezistence k makrolidovým (erythromycin) antibiotikům (Gyles, 2008). Rezistence kampylobakterů k makrolidovým antibiotikům je nalézána především u izolátů animálního původu (zejména *C. coli* izolovaných z prasat a *C. jejuni* původem z drůbeže). Vyšší rezistence je pozorována u *C. jejuni* než u *C. coli* (40 % vs. 10 %). Značný rozdíl je rovněž pozorován v souvislosti s geografickým výskytem rezistence (Gibreel and Taylor, 2006; Gupta et al., 2004; Pratt and Korolik, 2005).

Prevalence výskytu salmonel v drůbežích produktech je vysoká (až 80 %) a velké množství těchto izolátů vykazuje určitou míru rezistence k antibiotikům (Parveen et al., 2007). Podle Dias de Oliveira et al. 2005 a Zhao et al., 2006 byly salmonely izolované z drůbežích produktů značně rezistentní k sulfonamidům (75,8 %) a nitrofurantoinu (52,8 %), nižší míra rezistence byla pozorována pro tetracyklin (15,4 %), streptomycin (7,7 %), kys. nalidixovou (7,7 %), gentamicin (5,5 %), norfloxacin (3,3 %), trimetroprim (3,3 %), cefalotin (2,2 %), ampicilin (1,1 %) a chloramfenikol (1,1 %). Resistence k ciprofloxacinu detekována nebyla. 51,6 % kmenů salmonel bylo multi-rezistentních (Dias de Oliveira et al. 2005).

Výskyt rezistentních kmenů *Cl. perfringens* u drůbeže sledovali např. Gholamiandehkordi et al., 2009. Autorský kolektiv pozoroval 66% rezistenci k tetracyklinu a 61% rezistenci k linkomycinu. Rezistence k enrofloxacinu, erytromycinu, tylosinu, fluorfenikolu a bacitracinu pozorována nebyla.

5. VLIV VÝŽIVY NA VÝSKYT PATOGENNÍCH BAKTERIÍ U ZVÍŘAT

Výživa je v současné době považována za nejvýznamnější složku vnějšího prostředí, která ovlivňuje zdraví hospodářských zvířat, imunitní odpověď, vylučování patogenních mikroorganismů do prostředí a následně i kontaminaci živočišných produktů. Význam jednotlivých živin a doplňků na imunitu, virové, bakteriální a parazitární onemocnění zvířat již ve své studii podrobně popisují Herzig a Suchý (2006).

Námi předkládaná studie popisuje vliv výživy v souvislosti se zákazem používání antibiotických stimulátorů růstu a zaměřuje se tedy pouze na možnosti řešení této situace. Po zákazu používání krmných antibiotik je prevence kontaminace živočišných produktů problematická. Pro snížení rizika je možné využít několik strategií, včetně přídavku látek s antibakteriálními účinky do krmiva. Mezi tyto alternativní látky patří probiotika, prebiotika, organické kyseliny včetně mastných kyselin o střední délce řetězce, nebo rostlinné extrakty.

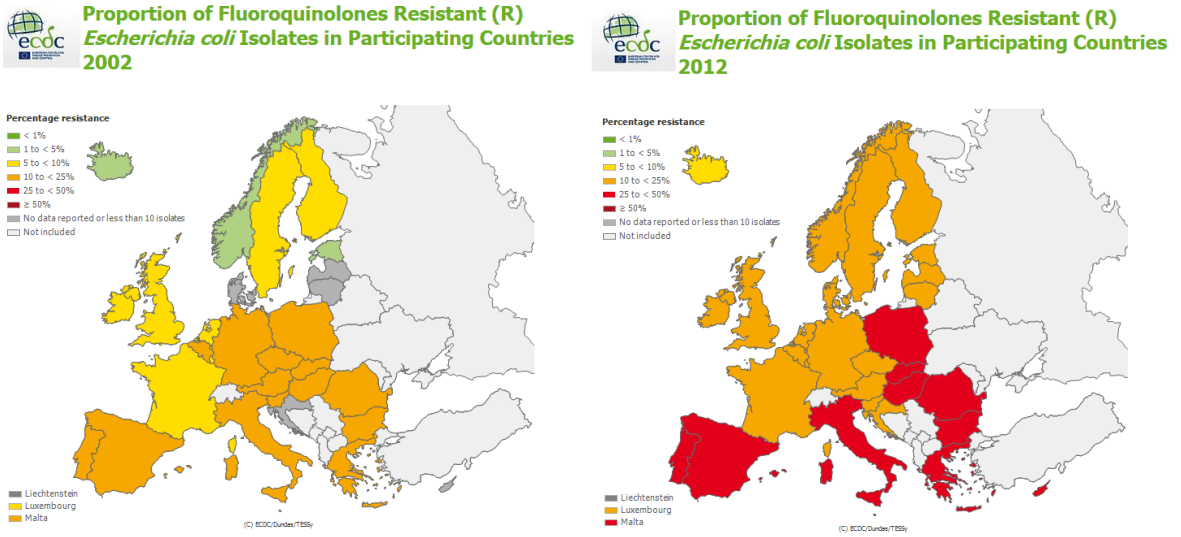
5. 1. HISTORIE A SOUČASNOST VYUŽITÍ ANTIBIOTICKÝCH STIMULÁTORŮ RŮSTU VE VÝŽIVĚ ZVÍŘAT

Objevení antibiotik a jejich následné masivní využití v oblasti humánní i veterinární medicíny lze bezesporu zařadit mezi jeden z nejvýznamnějších vědeckých průlomů lidské historie. Na objevení penicilinu Alexanderem Flemingem v roce 1928 rychle navazuje objevování a vývoj nových antibiotik a jejich začlenění do praxe. Bohužel masivní užívání antibiotik a rozhodně i používání subinhibičních koncentrací má za následek šíření antibiotické rezistence mezi bakteriemi, jak již ostatně varoval sám Fleming ve své přednášce při přebírání Nobelovy ceny (Fleming, 1945).

I přes výše zmíněné varování se antibiotika krátce po jejich uvedení do praxe začala používat i ve výživě hospodářských zvířat. K tomuto účelu byl od padesátých let minulého století užíván nejprve penicilin a streptomycin, v dalších letech pak zvláště chlortetracyklin a oxytetracyklin, později též spiramycin, oleandomycin a konečně v posledním období tzv. „specifická nutriční antibiotika“, zejména bacitracin, flavofosfolipol, virginiamycin, avoparcin a další. Jako antibiotické stimulátory růstu jsou označovány látky mající schopnost zvýšit intenzitu růstu a též účinnost konverze krmiva u zdravých zvířat krmených plně vyváženou krmnou dávkou s adekvátním obsahem známých živin. Tyto látky zásahem do mikrobiálního systému ovlivňují podmínky v trávicím traktu zvířat, čímž dochází k příznivému ovlivnění gastrointestinálního zdraví a následné zvýšení užitkovosti.

Rutinní používání antibiotik ke stimulaci růstu a prevenci onemocnění hospodářských zvířat představuje vážný veřejný problém, a to z důvodu možného šíření rezistence mezi bakteriemi (Wegener et al., 1999). Rozvoj rezistence se přisuzuje zejména častému užívání antibiotik v humánní medicíně; do jaké míry přispělo jejich používání ve veterinární medicíně a v zemědělství je stále předmětem diskuse. Rozvoj rezistence k antibiotikům v Evropě je patrný na Obrázku 1, kde jako příklad slouží situace v letech 2002 a 2012 pro rezistenci *E. coli* k fluorochinolonům.

Obr. 1: Rezistence *E. coli* k fluorochinolonům v letech 2002 a 2012 (ECDC, 2014), dostupné online:
http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/map_reports.aspx



Předepisování antimikrobiálních léčiv je řízeno takzvanou antibiotickou politikou, což je soubor opatření pro účinné a bezpečné používání antibiotik v humánní i veterinární praxi. Jejím cílem je zajistit vysokou odbornou úroveň antimikrobiální léčby, omezit vznik a šíření rezistence mikroorganismů a tak zachovat co nejdelší účinnost antimikrobiálních léčiv (Hera, 2005). Existuje názor, že během let 1950–2000 se do biosféry uvolnil přibližně 1 milion tun antibiotik, z toho zhruba 50 % pocházelo ze zemědělství a použití ve veterinární medicíně (Mazel a Davies, 1999; Teuber, 2001). Největší míra rezistence se objevuje u telat, prasat a drůbeže. Příkladem důsledku masového používání antibiotik je úmrtí dvou pacientů na rezistentní kmen *Salmonella typhimurium*, jehož zdrojem bylo pravděpodobně vepřové maso (Molbak et al., 1999). Míra rozšíření rezistence u bakterií je patrná z následujícího příkladu: z 50 izolátů *Escherichia coli* bylo 39 kmenů rezistentních na dvě nebo více skupin antibiotik se signifikantní rezistencí na ampicilin, tetracyklin, kanamycin, streptomycin a sulfamethoxazol (Teuber, 2001). Velmi rychle se šíří rezistence *Campylobacter* spp. na fluorochinolony (Zhang et al., 2003). Cesty distribuce a transportu antibiotik, antibiotické rezistence a mikroorganismů jsou znázorněny na Obrázku 2. V současné době se v zemích Evropské unie doporučuje monitorovat a hlásit rezistenci k následujícím antibiotikům:

Salmonella spp.: ampicilin, cefotaxim, chloramfenikol, ciprofloxacin, gentamicin, kys. nalidixová, streptomycin, sulfonamidy, tetracykliny, trimetoprim; *C. jejuni* a *C. coli*: erytromycin, ciprofloxacin, tetracykliny, streptomycin, gentamicin (EFSA, 2014).

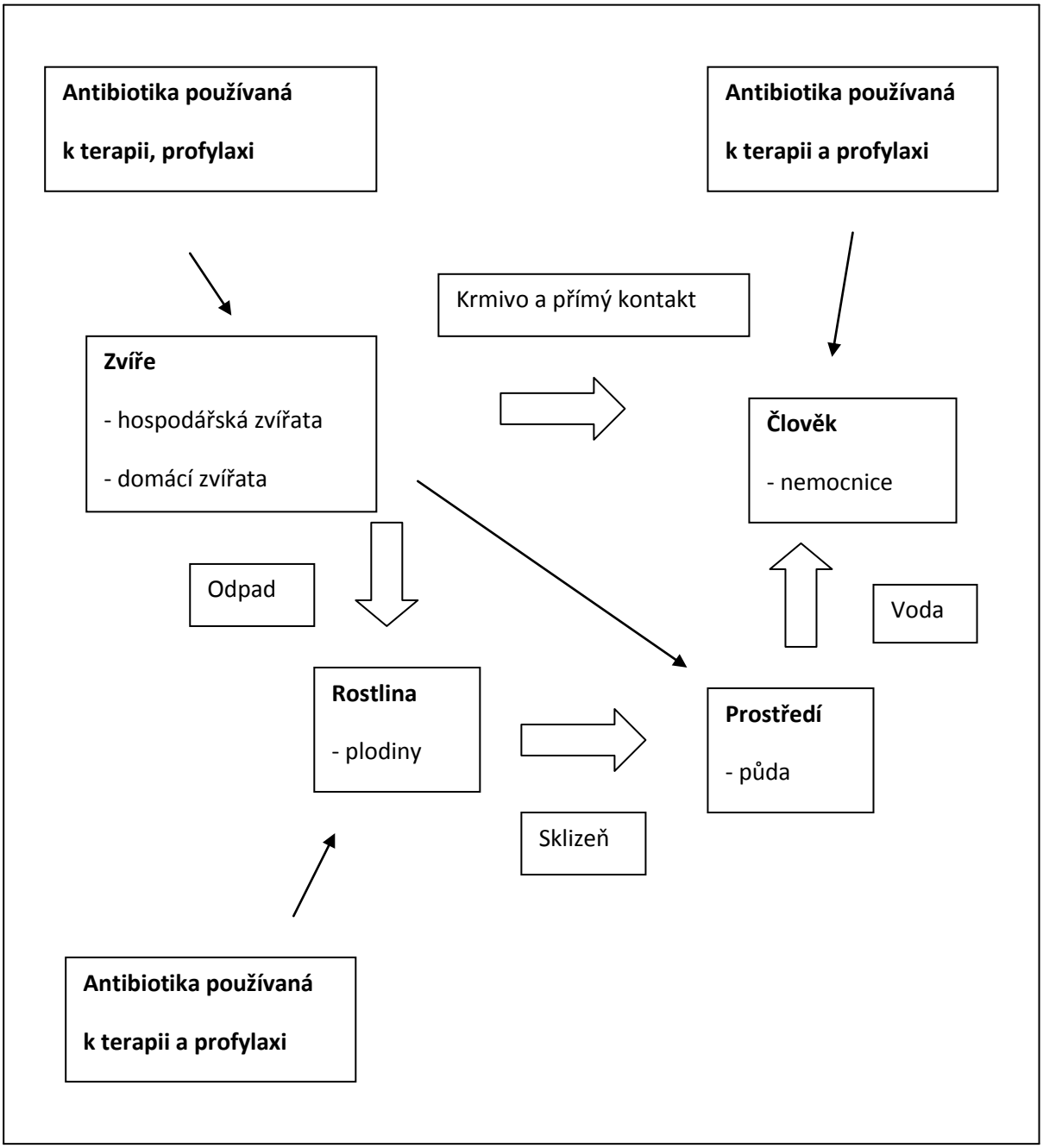
5. 1. 1. Antibiotické stimulátory růstu v zemích EU

První snahou o regulaci používání antibiotik v živočišné výrobě byla tzv. Swannova zpráva z konce šedesátých let minulého století, která vedla k nařízení, že antibiotika používaná k léčbě lidí se zároveň nesmí používat jako růstové stimulátory (Swann, 1969). Nařízení však neobsahovalo zákaz používání stejné třídy antibiotik v medicíně a v živočišné výrobě. V důsledku toho se glykopeptidy a streptograminy, které se původně používaly jako růstové stimulátory (avoparcin a virginiamycin), začaly používat i k léčení multirezistentních nosokomiálních infekcí (vankomycin a quinupristin-dalfopristin).

Jako první země v Evropě zakázalo Švédsko již v roce 1986 aplikaci antimikrobiálních stimulátorů růstu. V květnu roku 1995 byla zakázána aplikace antibiotik typu avoparcinu nejprve v Dánsku, poté se v lednu 1996 k zákazu přidalo Německo a následně v dubnu 1997 rovněž ostatní země Evropské unie. Cílem opatření mělo být snížení selekčního tlaku na kmeny *Enterococcus faecium*, neboť v roce 1994 byly poprvé nalezeny enterokoky izolované z hospodářských zvířat, které byly rezistentní k vankomycinu (Wegener et al., 1998). Zachování plné účinnosti tohoto antibiotika v oblasti humánní medicíny se považuje za velmi důležité.

Další omezení v zemích Evropské unie přišla v roce 1999, kdy bylo zakázáno používání spiramycinu, tylosinu, virginiamycinu, Zn-bacitracinu, karbadoxu a olachindoxu. V tomtéž roce uzákonilo Švýcarsko zákaz aplikace veškerých antibakteriálních stimulátorů růstu v krmných směsích. V Dánsku pak byla zbývající povolená krmná antibiotika vyřazena ze směsí pro výkrm prasat a později též v odchovu selat. Po zákazu aplikace antibiotických stimulátorů růstu došlo v Dánsku k nárůstu v aplikaci antibiotik z terapeutických účelů, celkové množství aplikovaných antibiotik však kleslo, stejně tak byl pozorován i pokles antibiotické rezistence (Aarestrup et al, 2001).

Obr. 2 Model distribuce a transportu antibiotik, antibiotické rezistence a mikroorganismů v biosféře (Teuber, 2001).



→ Kontaminace biosféry antibiotiky

⇒ Pohyb rezistentních mikroorganismů

Dne 22. září roku 2003 byla Evropským parlamentem a radou ministrů přijata nová směrnice (č. 1831/2003) o krmných aditivech používaných ve výživě zvířat, která zakazuje používání jakýchkoliv antibiotik v krmných směsích kromě kokcidiostatik a histomonostatik. Na základě této směrnice nesmí být dosud povolená antibiotika používána jako krmná aditiva

od 1. ledna 2006. V případě kokcidiostatik a histomonostatik byla jejich povolení časově omezená a končila/končí v průběhu let 2009–2017 (Komise evropských společenství, 2008).

V posledních letech jsou proto často diskutovány možnosti efektivní náhrady krmných antibiotik. Jako možné alternativy lze uvést např. probiotika a prebiotika, nebo organické kyseliny, jež budou blíže představeny v následujících kapitolách.

5. 1. 2. Antibiotické stimulátory růstu v USA

Na území USA je používání antibiotických stimulátorů růstu omezováno podstatně menší měrou. Nicméně existují snahy o redukci používání antibiotik, které v posledních letech nabývají na intenzitě. Např. společnost „Alliance for the prudent use of antibiotics“ (APUA) vydala v roce 2001 doporučení, jež bylo převzato WHO a začleněno do národní strategie používání antibiotik (WHO, 2001). Doporučení obsahuje následující opatření (APUA, 2010):

- antibiotika ve výživě hospodářských zvířat by měla být používána pouze k léčbě onemocnění
- antibiotika by měla být aplikována pouze na základě předpisu veterinárním lékařem
- monitoring používání antibiotik by měl být dostupný v každém ze států USA, farmaceutické společnosti by měly mít povinnost vykazovat produkci antibiotik
- provést zlepšení systému národního monitoringu antibiotické rezistence, včetně standardizace vzorkování a metod
- představit, propagovat a zařadit alternativy ke krmným antibiotikům
- zavést pre-licenční hodnocení antibiotik se zaměřením na potenciální rezistenci
- na základě monitoringu rezistence identifikovat nejzávažnější problémy a zavést opatření pro ochranu lidského zdraví.

V prosinci 2013 bylo v USA nově zavedeno omezení používání antibiotik ve výživě hospodářských zvířat, je však zatím pouze dobrovolné. Food and Drug Administration vysvětluje dobrovolnost celého procesu tak, že se jedná o nejrychlejší a nejjednodušší způsob, jak danou situaci začít efektivně řešit (FDA, 2013).

5. 2. PROBIOTIKA A PREBIOTIKA VE VÝŽIVĚ HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT

Jedním z možných řešení omezení negativních důsledků zákazů používání růstových stimulátorů může být používání probiotik. Název probiotikum tj. „pro život“ pochází z řečtiny a je opakem termínu antibiotikum.

Používání probiotik, zejména bakterií mléčného kvašení, je známo již z Bible a také římský historik Plinius doporučoval podávání kyselého mléka pro léčbu zažívacích potíží. Pozornost mikrobiologů k probiotikům obrátil na začátku 20. století Ilja Mečnikov, který si všiml, že v nerozvinutých oblastech Bulharska žije mimořádně hodně lidí nad 100 let. Tuto dlouhověkost přikládal konzumaci jogurtu obsahujícímu „bulharský bacil“ (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), který omezoval rozvoj střevních bakterií produkujících toxiny a tím pozitivně působil na zdraví a dlouhověkost lidí. Pravděpodobně první pokus o použití probiotika jiného původu než bakterie mléčného kvašení (BMK) provedl Nissle s *E.coli* v r. 1916 (Schrezenmeir and de Vrese, 2001).

Cílem použití probiotik je, na rozdíl od použití antibiotik, kdy se jedná o snahu usmrtit mikroorganismy, „ošetření živými mikroorganismy“ a to především za účelem prevence. Neuvědomělé používání probiotik spadá již do předkřesťanských dob, kdy lidé konzumovali fermentované mléčné nápoje.

Termín probiotikum poprvé použili Lilly a Stillwell v roce 1965 (Lilly and Stillwell, 1965). Označili tak látku produkovanou jedním prvokem, která stimulovala růst jiného prvoka. Později byl tento termín používán pro krmné doplňky hospodářským zvířatům. Pojem zahrnoval buď živé kultury bakterií (Tortuero, 1973), nebo kromě živých většinou bakteriálních kultur i určité substance jako mikrobiální metabolity, enzymy, aminokyseliny apod. (Parker, 1974; Mičan, 1985) pozitivně ovlivňující mikroflóru trávicího traktu. Tato definice by tedy zahrnovala i krmná antibiotika. Proto byla po řadu let přijímána jako nejvýstižnější definice podle Fullera (Fuller, 1989): **„Probiotika jsou živé mikrobiální krmné doplňky, které příznivě ovlivňují hostitele zlepšením jeho střevní mikrobiocenosy“.** Tato definice klade důraz na použití živých buněk. Dále formulace „příznivě ovlivňuje hostitele“ v sobě zahrnuje všechny pozitivní vlivy – to znamená zlepšení růstu, využitelnost krmiv, vliv na zdravotní stav apod., které byly v předchozích definicích složitě rozepisovány. Definice byla později zjednodušena a v současné době platí formulace vytvořená tzv. „Pracovní skupinou evropských vědců“, která říká že probiotika jsou **„živé mikroorganismy (bakterie nebo houby), jež jsou pohlceny v dostatečném množství a jsou**

prospěšnější pro zdraví v rámci než potraviny“ (Anadon et al., 2006). O vymezení pojmu se však vede stále diskuze a někteří výzkumníci upozorňují, že v definici je zbytečné slovo „živý“, protože pozitivní vliv na zdraví měly také inaktivované buňky mikroorganismů a části buněčných struktur bakterií a kvasinek (Ouwehand et al., 2002).

Ačkoliv první pokusy na zvířatech v tomto ohledu byly uskutečněny ještě před druhou světovou válkou, hlavní rozvoj používání probiotik nastal v šedesátých a sedmdesátých letech dvacátého století. Hlavními používanými mikroorganismy byly zprvu bakterie mléčného kvašení (BMK), zejména laktobacily. Určitým přelomem bylo zavedení směsných, často nedefinovaných kultur, které se osvědčily při prevenci salmonelos u kuřat (Nurmi and Rantala, 1973). Tato metoda byla zprvu pojmenována jako „Nurmiho koncepce“ je nyní známa spíše pod pojmem „Competitive exclusion“ (CE). Od sedmdesátých let jsou dostupné komerční probiotické založené na čistých kulturách BMK. Od osmdesátých let se objevují i komerční CE kultury (Schneitz et al., 1991). V poslední době potom dochází ke kombinaci probiotik a prebiotik a to hlavně u drůbeže (Patterson et al., 1997).

5. 2. 1. Účinek probiotik

Probiotikům jsou připisovány rozličné účinky, v praxi je snaha podáváním těchto látek zlepšit buď užitkovost, nebo zdravotní stav hospodářských zvířat. Jako možné účinky probiotik uvádí (Fuller, 1997):

- větší odolnost proti infekčním onemocněním
- zvýšení růstových vlastností
- zlepšení konverze krmiv
- lepší trávení potravy
- lepší vstřebávání živin
- poskytnutí esenciálních živin
- zvýšení produkce a kvality mléka
- zvýšení produkce a kvality vajec
- zvýšení kvality jatečně opracovaného masa

Účinky na zdravotní stav se zdají být více prokazatelné a fungují zejména u mladých zvířat a ve špatných hygienických podmínkách chovu a ustájení. Je zajímavé, že zlepšení zdravotního stavu (např. snížení úhynu u kuřat, nebo pokles frekvence průjmů u selat) je často doprovázen snížením přírůstků na živé hmotnosti. Důvodem může být pokles pH v tenkém střevě následkem produkce kyseliny mléčné probiotickými bakteriemi, což vede ke snížené

aktivitě proteolytických enzymů (Fuller, 1992). Pravděpodobně nelze tedy od probiotik čekat univerzální příznivé efekty, které by zároveň zlepšovaly jak zdravotní stav, tak užitkovost.

5. 2. 2. Mechanismus účinku probiotik

Probiotika jsou rozpoznávána imunitním systémem hostitele podobně jako je rozpoznávána komensální nepatogenní mikroflóra i patogenní mikroorganismy.

Pro homeostázu je nezbytná imunologická tolerance velkého množství potravních antigenů a antigenů komenzální mikroflóry. Zároveň je však nutné účinně reagovat při výskytu patogenů, které se snaží různými mechanismy epitel narušit a změnit propustnost buněčné membrány. Hostitel je chráněn před potenciálně škodlivými mikroorganismy bariérou tvořenou enterocyty, enteroendokrinními, pohárkovými a Panethovými buňkami, které se nacházejí na klcích, a M buňkami, které jsou kryty glykokalyxem tvořeným glykoproteiny a muciny. Hlavní funkcí této bariéry je bránit kontaktu mezi obsahem střeva a buňkami střeva. Celistvost střevního epitelu je udržována především těsnými a adherentními spoji a desmozómy. Některé střevní patogeny používají M buňky překrývající lymfatickou tkáň jako cestu pro invazi do makroorganismu (Kraehenbuhl and Neutra, 2000; Neutra et al., 2001).

Imunitní systém rozpoznává vysoce konzervované mikrobiální molekulární motivy, které se nazývají PAMP (s patogeny spjaté molekulární vzory - pathogen-associated molecular patterns). Protože však tyto motivy sdílejí i komenzální mikroorganismy, doporučují někteří autoři používat termín MAMP (tj. s mikroby spjaté molekulární vzory - microbe-associated molecular patterns).

Epiteliální buňky střeva a imunitní buňky lymfatického systému asociovaného se střevem (GALT), k němuž patří intraepiteliální lymfocyty, dendritické buňky, lymfatické folikuly a Peyerovy plaky včetně imunitní výbavy lamina propria střevní sliznice (zejména střevní klky a krypty), nesou speciální receptory určené k rozpoznávání MAMP zvané TLR (Toll-like receptory). Receptory TLR1 až TLR11 rozpoznávají mikrobiální struktury a jejich stimulace vede k aktivaci zánětových signálů a faktorů. Mrtvé bakterie a dokonce i bakteriální DNA ovlivňují imunitu hostitele, protože aktivují TLR9, který se nachází v epiteliálních buňkách střeva. Velká část receptorů TLR má na epitelu slabou expresi a je významnější v jeho cytoplasmě (např. TLR5, TLR9) nebo na imunitních buňkách (TLR2, TLR4). Zvláště nebezpečné gramnegativní střevní patogeny jsou rozpoznávány vazbou jejich membránového lipopolysacharidu LPS na vazebný sérový protein LBP a buněčný membránový receptor

CD14 a celý tento komplex s určitou časovou prodlevou (15-30 minut) aktivuje TLR4 receptor pro LPS. Celá tato složitá kaskáda vede k aktivaci zánětových aktivit a fagocytóze bakterie. Proto jsou TLR4 exprimovány na epitelu střeva slabě, aby nedocházelo k aktivaci zánětu účinkem komensální gramnegativní mikroflóry.

Významnou složkou rozpoznávání MAMP jsou intracelulární receptory. Ty rozpoznávají virulentní mikroby, které pronikají do střevního epitelu (např. *Salmonella, Shigella,* některé patogenní kmeny *E.coli* atd.). Jednak to jsou některé TLR jako např. TLR5, který rozpoznává flagellin (virulentní salmonely dopravují svůj flagelin do cytoplasmy střevního epitelu svým transportním systémem III. typu) nebo TLR9 rozpoznávající bakteriální DNA, jednak to jsou tzv. NLR receptory, k nimž patří NOD1, NOD2, NALP, IPAF. Tyto nitrobuněčné receptory patří k fylogeneticky nejstarším imunitním molekulám a jsou zaměřeny na odhalení těch parazitů, které se dostanou do buněk. Některé z nich jsou součástmi komplexů sloužících k indukci zánětu (NALP v inflamasomech) nebo k indukci autofagie, apoptózy a jiných forem buněčné smrti. Významný enzym, který stojí u počátku aktivace zánětových cytokinů, caspasa-1 ve skutečnosti spojuje v sobě vlastnosti prozánětové, vlastnosti aktivace buněčné smrti, ale také vlastnosti regenerační - ochrany buněčné membrány před tvorbou děr v membráně. Samotná aktivace tohoto enzymu souvisí se základy buněčné komunikace, rozpoznání cizího a vnímání poškození (tzv. danger motivy – signály buněčného poškození).

Předpokladem pro antigen-specifickou imunitní odpověď je zachycení bakterií a jejich antigenů skrz slizniční epitel a transport antigenů do lymfatických struktur. Buňky předkládající antigeny T lymfocytům (makrofágy a dendritické buňky) se nacházejí v lamina propria střeva. Tento proces vede k produkci velkého množství imunoglobulinů IgA bez indukce systémové imunity. Lokální sekretovaný IgA specifický pro patogeny vyžaduje interakci fagocytujících dendritických buněk s T a B buňkami Peyerových plaků, v izolovaných lymfatických folikulech nebo mezenteriálních lymfatických uzlinách.

Probiotika jsou rozpoznávána imunitním systémem hostitele podobně jako je rozpoznávána komensální nepatogenní mikroflóra i patogenní mikroorganismy. Bakterie nebo jejich antigeny reagují s dendritickými buňkami a makrofágy a stimulují je k produkci cytokinů, které zároveň indukují přesmyk produkce protilátek třídy IgM na IgA. Tuto na T buňkách nezávislou přeměnu produkce indukují IL-10, IL-6, IL-4 a TGF-beta. Buňky produkující IgA v Peyerových placích cirkulují do mezenteriálních lymfatických uzlin a

dostávají se z nich do krve přes ductus thoracicus, vrací se do střevní sliznice a osidlují vzdálené slizniční povrchy, jako jsou např. bronchy. Obdobné osídlování se týká také střevních T buněk.

Je známo, že mnohé patogenní bakterie manipulují určité akce imunitní odpovědi, aby unikly rozpoznání, pohlcení, působení komplementu či protilátek nebo snížily aktivaci zánětových mechanismů. Výsledkem těchto manipulací je přežívání v zakázaných nikách a poškození buněk, tkání či orgánů hostitele. Mnohdy je poškození – lidově nemoc, vyvolané samotnými imunitními mechanismy, které ve své ultimativní formě nešetří ani vlastní části organismu. Je tedy nutné někdy zánětové mechanismy zmírnit a zdá se, že mnohé z toho dokážou probiotika.

Také probiotika mění imunitní odpověď, avšak tyto změny se dějí v mutualistické – tedy vzájemně prospěšné kooperaci s imunitním systémem hostitele. Tyto kooperace byly shrnuty v recentním review (Trebichavsky and Splichal, 2006). Hostitel poskytuje probiotickým mikroorganismům bezpečnou niku (střevní dutina) a výživu, probiotické mikroby naproti tomu se chovají bezpečně, resignují na průnik do vnitřního prostředí, indukují ty antimikrobiální mechanismy, které jsou pro ně bezpečné a naopak snižují tvorbu pro ně i pro hostitele nebezpečných zánětových produktů.

Řada probiotik indukuje protizánětový cytokin interleukin-10 (*Bifidobacterium* sp., *Lactobacillus* sp., nebo v humánní medicíně využívané VSL#3 a *E.coli* Nissle 1917 (Mutaflor®, Ardeypharm, Herdecke, SRN). Cytokin IL-10 snižuje produkci interleukinu-6 a gama interferonu a má významný terapeutický účinek při zánětlivých střevních onemocněních.

Bifidobacterium sp. a *Lactobacillus* sp. indukují další významný cytokin transformační růstový faktor-beta (TGF-β), který hraje důležitou roli v lokální toleranci, snižuje patologický zánět, indukuje diferenciaci T regulačních lymfocytů a podporuje tvorbu mukózních protilátek třídy IgA, které jsou schopny projít střevní výstelkou do střevní dutiny a navíc tam odolávat účinku trávicích enzymů (proteas).

Probiotika také často zvyšují tvorbu interleukinu-8 ve střevní dutině. Tento chemokin je významným atraktantem neutrofilních granulocytů – tedy vychytavačů patogenních bakterií.

Resta-Lenert a Barrett (Gastroenterology 130: 731- 746, 2006) ukázali, že probiotika *Streptococcus thermophilus* a *Lactobacillus acidophilus* snižují škodlivé účinky zánětových cytokinů faktoru nekrotizujícího nádory (TNF-α) a gama interferonu (IFN-γ) na vitální funkce epiteliálních střevních buněk (transport iontů, transepiteliální rezistenci a epiteliální propustnost) a to více než komensální bakterie a pouze tato probiotika snižovala aktivaci SOCS3 a STAT1 a STAT3, což jsou faktory indukce zánětových cytokinů.

Kromě manipulace cytokinové odpovědi a indukce T regulačních buněk modulují probiotika epitelie střeva – enterocyty (Kozáková a spol. 2001, Otte a spol. 2003), zvyšují sekreci ochranného slizu mucinu (Mattar a spol. 2002), indukují proteiny tepelného šoku a transkripční faktor NF-kappaB – čili aktivují vigilanci (bdělost) imunitního systému hostitele (Petrof a spol. 2004), snižují expansi T buněk (Sturm a spol. 2005), modulují dendritické buňky – strážce bariéry a sběrače antigenů (Hart a spol. 2004), makrofágy (Hockertz 1991) a zvyšují produkci specifických IgA protilátek (Cukrowska a spol. 2002).

Probiotika zvyšují produkci některých AMP (antimikrobiálních peptidů) ve střevě. Pouze probiotický kmen Nissle 1917 a ne celá řada nepatogenních kmenů *E.coli* indukoval defensin HBD-2 (Wehkamp a spol. 2004) a podobně jsme prokázali indukci hlavního cytoplasmatického AMP neutrofilních granulocytů a scavengeru zinku – kalprotektinu pouze po osídlení bezmikrobních selat stejným probiotickým kmenem a nikoliv jinými nepatogenními kmeny *E.coli.* Di Caro (2005) ukázal, že probiotický kmen *Lactobacillus* GG indukuje alfa 1 defensin v lidském dvanácterníku.

Výsledky názorně ukazují, že probiotické kmeny vykazují prospěšnou modulaci antibakteriálních a protizánětových mechanismů imunity hostitele – tedy, že jsou to takové bakterie, které jsou schopny mutualistické vzájemně prospěšné symbiózy se svým hostitelem. Tím, že svému hostiteli neškodí, ale naopak mu přinášejí určitý prospěch, jsou ve své nice podporovány. Patogenním bakteriím brání v rozvoji také kompeticí o živiny a tvorbou bakteriocinů. Je jisté, že mnohé úspěšné probiotické bakterie patří svojí fittness mezi velmi životaschopné mikroorganismy (např. *E.coli* Nissle 1917 a Colinfant, Dyntec, Terezín), které mají např. velmi vyvinuté systémy střádání železa nebo velmi účinný flagellin atp. Všechny výše uvedené vlastnosti jim zaručují dobrou pozici ve střevní mikroflóře. Přesto se musí neustále obnovovat jejich přísun a většinou nejsou schopné trvalého osídlení i přesto, že některé z nich byly izolovány přímo z trávicího traktu (např. Nissle 1917 ze stolice vojáka v Dobrudži za první světové války). Je to zejména proto, že ustavení mikroflóry je natolik

složitý proces, že po její stabilizaci se nedaří exogenním bakteriím trvale usadit v trávicím traktu. Z toho důvodu je také účinek probiotik heterogenní a vykazuje různou míru úspěšnosti u různých jedinců.

5. 2. 3. Probiotika pro drůbež

Intestinální mikroflóra drůbeže je poměrně dobře zmapována. Trávicí trakt ptáků má tři zvláštnosti oproti ostatním všežravým živočichům. Je to vakovité vychlípení hltanu – vole, dále dva žaludky – žlaznatý a svalnatý a konečně dvě slepá střeva.

Vole je zásobní orgán, který slouží k uchování potravy, která je zde zvlhčena přijatou vodou a slinami. Nejsou zde přítomny žádné endogenní enzymy. Celkové počty bakterií ve voleti se blíží hodnotě 9 log CFU/g. Dominují laktobacily hlavně *Lactobacillus salivarius,* dále *Lactobacillus fermentum* a *Lactobacillus reuteri* v počtech 8-9 log CFU/g (Mead, 1997). Ve voleti je proto hlavním mikrobiálním metabolitem kyselina mléčná a to v koncentraci 100-180 mmol/l (Rada and Marounek, 1996). V **žaludcích** počet mikroorganismů klesá. Dominují stále laktobacily, které se hojně vyskytují i v **tenkém střevě,** kde postupně počet bakterií stoupá kaudálním směrem, někdy se objevují tzv. segmentované filamentosní bakterie. Dále se vyskytují enterokoky a koliformní bakterie. V dolní části tenkého střeva se objevují striktně anaerobní bakterie rodů *Eubacterium, Propionibacterium, Clostridium, Gemmiger* a *Fusobacterium* (Mead, 1997). Místem s největším výskytem bakterií jsou **slepá střeva**, kde celkový počet mikroorganismů dosahuje hodnot až 11 log CFU/g. Vyskytují se tam grampozitivní anaerobní koky, jako jsou např. peptostreptokoky, které tvoří až 30 %. Dalšími významnými bakteriemi (20 %) jsou gramnegativní nesporulující rody čeledi *Bacteriodaceae* zahrnující rody *Bacteroides* a *Megamonas*. Grampozitivní nesporulující tyčinky (*Eubacterium*) dosahují 16 %, pučící bakterie *Gemmiger* a pučící koky tvoří 10 % stejně jako klostridie a bifidobacterie (Barrow, 1992). Ve slepých střevech dospělé drůbeže se vyskytují i metanové bakterie (Miller et al., 1986).

Mikrobiota trávicího traktu je ovlivňována především věkem a složením krmiva. Normální složení bakterií ve slepých střevech se ustálí za zhruba 4-6 týdnů (Mead, 1989), metanové bakterie se však objeví až za tři měsíce (Marounek and Rada, 1998). Složení krmiva může ovlivnit hlavě proximální části trávicího traktu, zatímco caeca jsou málo ovlivnitelná. Zvýšení obsahu snadno zkvasitelných cukrů vede ke zvýšení počtu laktobacilů, zatímco dieta obohacená o proteiny jejich počty snižuje na úkor koliformních bakterií a klostridií (Barrow, 1992).

Jednodenní kuřata jsou ideálním objektem pro aplikaci probiotik, neboť se rodí prakticky sterilní a nemají žádný kontakt s rodiči. Nejvhodnějšími probiotickými bakteriemi jsou laktobacily, nejlépe pocházející z trávicího traktu drůbeže. (Morishita et al., 1971) zjistili, že zatímco drůbeží kmeny *Lactobacillus acidophilus, L. salivarius* a *L. fermentum* dobře kolonizovaly trávicí trakt jednodenních kuřat, lidský kmen *L. acidophilus, L. helveticus* a *L. brevis* byly rychle z trávicího traktu eliminovány. Při selekci vhodných kmenů se osvědčily *in vitro* testy na přežívání v kyselém pH, růst ve zvlhčeném krmivu a adherence na střevní epitel (Fuller, 1992; Rada et al., 1995). Velké množství pokusů, při nichž byly aplikovány bakterie mléčného kvašení, hlavně laktobacily, bylo provedeno zejména na hrabavé drůbeži. Výsledky jsou však velmi variabilní. Výsledky lze shrnout do následujících bodů (Barrow, 1992; Fuller, 1992; Rada et al., 1995; Fuller, 1997):

- Nejúčinnější jsou laktobacily (hlavně *L. salivarius*) drůbežího původu.
- Lepší kolonizace trávicího traktu byla dosažena u jednodenních kuřat, u nosnic jsou výsledky horší.
- Účinky na zdravotní stav se dostavily hlavně u mladých kuřat a byly největší u zvířat chovaných ve špatných hygienických podmínkách.
- Účinky na užitkovost (kvalita vajec, snáška, přírůstky na váze) nejsou konzistentní a prokazatelné.

Je nutno uvést, že v ojedinělých případech, resp. u některých kmenů, laktobacily při aplikaci kuřatům projevily negativní účinky. Obecně se nepříznivé účinky projevily při vysokých dávkách specifických kultur. (Watkins and Kratzer, 1983) uvádějí, že dávky 7 log CFU buněk *Lactobacillus* sp. na kuře a den mohou působit depresi růstu. Negativní účinky byly pozorovány hlavně u laktobacilů a jsou vesměs přičítány nadměrné tvorbě kyselin popř. tvorbě D- kyseliny mléčné (Szylit and Nugon-Baudon, 1985). Dokonce byl popsán i kmen *Lactobacillus acidophilus,* který vyvolával u bezmikrobních kuřat zdravotní obtíže s vysokou mortalitou (Champ et al., 1983).

Častým problémem při produkci drůbežího masa a vajec jsou salmonelosy. Jako prevence se ukázala být účinná metoda „competitive exclusion“ (CE). Při CE je využit fakt, že jednodenní kuřata jsou daleko více citlivá na střevní infekce, než dospělá drůbež a to vzhledem k absenci komplexní mikrobioty hlavně ve slepých střevech. Tato metoda byla poprvé použita ve Finsku (Nurmi and Rantala, 1973) a spočívala v aplikaci střevního obsahu zdravých dospělých jedinců jednodenním kuřatům. Výsledky jsou velice slibné a účinek daleko prokazatelnější v porovnání s aplikací čistých kultur BMK. Určitým nedostatkem je

nemožnost zajištění rovnoměrné kvality podávaného materiálu a jeho praktická nedefinovatelnost. Přesto zájem o „Nurmiho koncepci“, později přejmenovanou na CE dále vzrůstal a v na přelomu osmdesátých a devadesátých let minulého století se na trhu objevily i komerční preparáty, např. BROILAK fy. Orion Corporation Farmos. Uvedený preparát sice nezlepšil růstové vlastnosti kuřecích brojlerů, ale evidentně urychloval eliminaci salmonel ze slepých střev (Schneitz et al., 1991). Zvláště účinná se jeví kombinace CE s přídavkem laktosy (Hinton et al., 1991). Předpokládaný mechanismus účinku je snižování pH střevního obsahu s následnou tvorbou nedisociovaných forem kyseliny mléčné a těkavých mastných kyselin, uvažuje se i o inhibici adheze salmonel na střevní stěnu (Leffler et al., 1989;Ziprin et al., 1991).

5. 3. PREBIOTIKA

Relativně více pokusů s prebiotiky bylo provedeno u hrabavé drůbeže, a to především v souvislosti s eliminací salmonel. V testech, kde byly porovnávány účinky několika cukrů (Oyrzabal and Conner, 1995), se glukosa, sacharosa a maltosa ukázaly jako neúčinné, zatímco účinná byla laktosa a manosa. U obou cukrů se předpokládá vazba na pili buněk salmonel a tím omezení adheze na střevní epitel. U laktosy se navíc předpokládá stimulační účinek na BMK, protože drůbež nemá endogenní laktasu a laktosa je tudíž pro ni nestravitelným oligosacharidem. U drůbeže byl pozorován i bifidogenní účinek nestravitelných oligosacharidů. Bifidobakterie jsou pravidelnou součástí jak definovaných, tak nedefinovaných kultur používaných pro CE. Růst těchto bakterií je stimulován přítomností oligosacharidů, zejména pak fruktooligosacharidů (Mitsuoka, 1992). Tento jev byl pozorován také u kuřecích brojlerů, kde se rozvoj bifidobakterií dává do souvislosti s potlačením kolonizace slepých střev salmonelami (Chambers et al., 1997), účinné se projevily fruktooligosacharidy, buď jejich směsi (Oyrzabal and Conner, 1995), nebo čistý fruktooligosacharid (trisacharid) vzniklý termální syntézou ze sacharosy a fruktosy nazývaný kestosa (Patterson et al., 1997). Celý problém však zaslouží další podrobné studium, protože zejména selektivní stanovení bifidobakterií ve střevním obsahu drůbeže a také u ostatních zvířat není dostatečně metodicky propracováno. Kolonie na použitých agarových prostředích musí být často individuálně mikroskopicky vyšetřovány, aby se potvrdilo, zda se opravdu jedná o *Bifidobacterium* sp. (Krause et al., 1996;Silvi et al., 1996). Nutno však podotknout, že ani mikroskopické vyšetření nemůže s konečnou platností odlišit bifidobakterie od dalších bakteriálních rodů, u drůbeže se jedná zejména o laktobacily. V poslední době byly testovány také IMO, které v *in vitro* podmínkách stimulovaly drůbeží bifidobakterie na úkor salmonel

(Chang and Day, 2004). Množství bifidobakterií ve slepých střevech nosnic se podařilo zvýšit vysokou dávkou (5 %) inulinu v krmné směsi (Rada et al., 2001). Na druhé straně krmné směsi s obsahem sojového extrahovaného šrotu obsahují přirozeně více než 2 % prebiotických oligosacharidů rafinosové řady, hlavně stachyosy (Grmanová et al., 2010).

5. 4. ORGANICKÉ KYSELINY

U drůbeže byla z organických kyselin nejčastěji použita kyselina fumarová, Vogt a Matthes (1981) zjistili, že kyselina fumarová zvýšila u kuřecích brojlerů konverzi krmiva o 3,5-4,0 %. Patten a Waldroup (1988) zjistili, že optimální koncentrace kyseliny fumarové z hlediska rychlosti růstu byla 0,5-1,0%. Při vyšších koncentracích pozorovali již snížení příjmu krmiva. Výsledky dalších pokusů s kyselinou fumarovou u drůbeže publikovali Skinner et al. (1991) a Runho et al. (1997). Účinek kyseliny jablečné, sorbové a vinné (0,5-2,0 %) v krmné směsi brojlerů studovali Vogt et al. (1982). Nejlepší výsledky získali s přídavkem 1,12 % kyseliny sorbové a 0,33 % kyseliny vinné. Výsledky úspěšného pokusu s 2 % kyseliny mléčné u brojlerů zveřejnili Versteegh a Jongbloed (1999). Vliv kyseliny mravenčí, octové a propionové na míru kontaminace krmiva *C. jejuni* popisuje práce Chaveerach et al. (2002). Při *in vitro* inkubaci krmné směsi pro brojlerová kuřata spolu s příslušnou kyselinou (nebo jejich kombinací) a vodou došlo k redukci počtu *C. jejuni* o jeden řád za 1h inkubační dobu. Účinek organických kyselin je silně závislý na hodnotě pH. Zde byla inkubace realizována při pH = 4. Heres et al. (2004) testoval fermentované krmivo s obsahem kyseliny mléčné (5,7 %) a octové (0,4 %) na vnímavost brojlerových kuřat k infekci kampylobakterem a salmonelou. Brojlerová kuřata krmená experimentální dietou vykazovala sníženou citlivost k infekci *C. jejuni,* kde bylo k dosažení shodného efektu jako u kuřat krmených kontrolní směsí za potřebí desetinásobku infekční dávky. V případě organických kyselin jsou testovány nejen samotné látky, ale i jejich kombinace. Např. Skanseng et al. (2010) nepozoroval průkazný účinek přídavku kyseliny mravenčí (2 %) na míru kolonizace kuřat *C. jejuni,* ale v kombinaci s kyselinou sorbovou (0,1 %) již k prevenci kolonizace došlo.

Obecně lze říci, že použití organických kyselin k acidifikaci krmiva nebo vody a následné prevenci onemocnění gastrointestinálního traktu přináší (zejména v experimentech *in vivo*) variabilní výsledky. Jak bylo revidováno ve studiích Doyle and Erickson (2006) a Van Immerseel et al. (2007), výsledky jsou závislé na použité metodice, typu kyseliny, nebo kolonizaci. Rovněž záleží na stavu organismu, podmínkách chovu, atd. Na trhu bezesporu existují produkty, jejichž účinky byly popsány v literatuře jako aditiva snižující vylučování

salmonel u drůbeže (např. Hinton et al., 1988; Thompson and Hinton, 1997; Byrd et al., 2001), jejich účinky se zdají být nejsilnější v proximálních částech trávicího traktu (vole a žaludek). Organické kyseliny se z toho důvodu mohou enkapsulovat. Nejčastěji se využívá kyselina propionová a mravenčí (Vandeplas et al., 2010).

5. 5. MASTNÉ KYSELINY SE STŘEDNÍ DÉLKOU ŘETĚZCE

Antimikrobiální aktivita mastných kyselin je známá již řadu let. Mastné kyseliny působí na široké spektrum mikroorganismů; byl popsán účinek na bakterie, viry i prvoky. Těmto látkám přírodního původu nacházejících se např. v mléce či sliznicích bývá přisuzována výrazná role při obraně proti infekci patogenními bakteriemi nebo parazity (Hume, 2011). Mastné kyseliny patří mezi látky, které se v živém organismu vyskytují a jsou součástí jejich metabolismu, proto je v tomto případě bezpředmětná problematika reziduí.

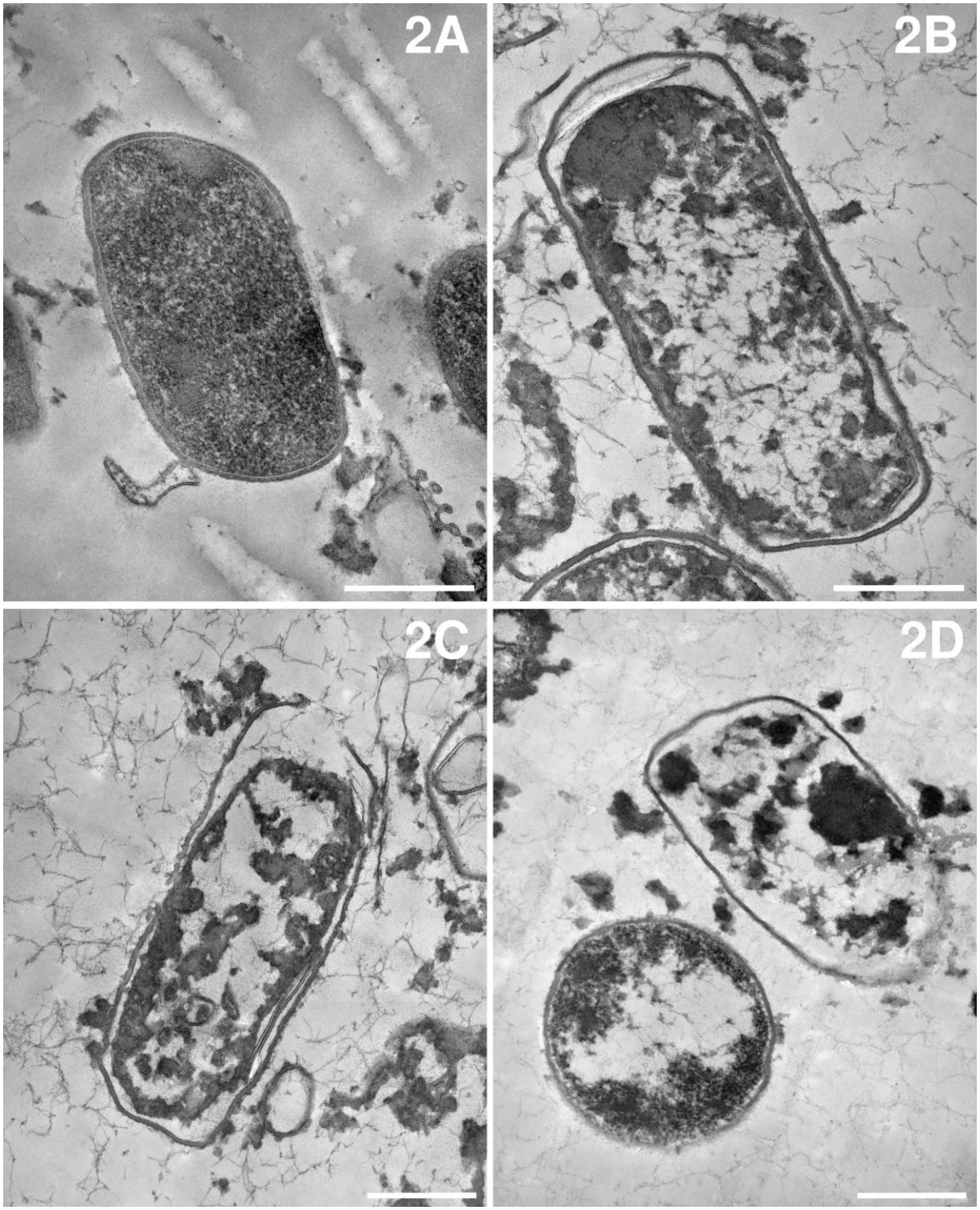
Inhibiční vlastnosti mastných kyselin závisí na celé řadě faktorů; mj. na délce řetězce a počtu dvojných vazeb kyseliny (a s tím související rozpustností kyseliny), na její koncentraci v médiu, na hodnotě pKa, molární hmotnosti, lipofilním, nebo hydrofilním charakteru látky a na jejím metabolismu. Základní chemické vlastnosti mastných kyselin o střední délce řetězce uvádí Tabulka 8. Na druhé straně hraje roli druh bakterie a v pokusech *in vitro* i růstové podmínky a složení média (Bergsson et al., 2001; Dierick et al., 2003). Mezi jednotlivými autorskými kolektivy existují určité rozdíly v názorech na možné využití konkrétních mastných kyselin. V současné době je obecně uznávaným faktem, že nejvýraznější antibakteriální aktivitu vykazují nasycené mastné kyseliny s počtem uhlíků n = 6 – 12. Kyselina laurová ($C_{12:0}$) a zejména její monoglycerid byly studovány v souvislosti s inhibiční aktivitou nejen na bakterie, ale i na viry (Lieberman et al., 2006). Účinek kyseliny laurové sledoval již v roce 1971 Galbraith et al. (autory stanovená minimální inhibiční koncentrace $C_{12:0}$ na klostridie činila 0,5 $mmol.l^{-1}$). Rovněž byla prokázána antibakteriální aktivita monoacylglycerolů mastných kyselin. Jako první studoval účinky derivátů mastných kyselin Kabara et al (1972). Ve své práci vyzdvihuje účinky monoacylglycerolů mastných kyselin nad potenciál korespondujících volných mastných kyselin; což dle jeho pozorování platí zejména pro monoglycerid kyseliny laurové. Naopak v případě 1,3-dilaurinu a trilaurinu nebyla pozorována téměř žádná inhibiční aktivita. Antiklostridiální účinky monoesteru k. laurové byly prokázány rovněž na našem pracovišti (Skřivanová et al., 2014).

Tabulka 8. Chemické vlastnosti kyseliny kapronové, kaprylové, kaprinové a laurové (Zentek et al., 2011)

Mastná kyselina	Molární hmotnost (Da)	Bod tání (°C)	Disociační konstanta (pKa)
Kapronová ($C_{6:0}$)	116.2	-3.4	4.88
Kaprylová ($C_{8:0}$)	144.2	16.7	4.89
Kaprinová ($C_{10:0}$)	172.3	31.9	4.89
Laurová ($C_{12:0}$)	200.3	44.0	5.13

Mechanismus antibakteriálního účinku mastných kyselin není ani v současnosti zcela vyjasněn, nicméně jako nejpravděpodobnější se zdá být účinek související s poškozením transportního systému mikroogranismů. Některé účinky mohou být spojeny s faktem, že mastné kyseliny působí díky své amfipatické povaze jako detergenty. Lze tedy předpokládat, že mastné kyseliny přidané k bakteriální kultuře v dostatečně vysoké koncentraci mohou působit na bakteriální membránu a způsobovat její desintegraci. Mastné kyseliny mohou uvnitř bakteriální buňky disociovat a zásadně tím ovlivnit transportní systém bakterií (Boyaval et al., 1995). Prostup kyseliny do buňky závisí na její disociační konstantě, pKa (Tabulka 8). U slabších kyselin, které mají vyšší hodnotu pKa je při stejné hodnotě pH, v porovnání se silnější kyselinou, větší množství molekul v nedisociovaném stavu. Jako takové mohou díky svému lipofilnímu charakteru proniknout do buňky, kde disociují. To má za následek snížení intracelulárního pH a narušení protonového gradientu (Ray et al., 2001). Další teorie vysvětlující mechanismus antibakteriálního účinku mastných kyselin jsou mj.: buněčná lýze, narušení enzymatické činnosti, nebo tvorba autooxidačních produktů. Rovněž je sledován vliv derivátů mastných kyselin a studován mechanismus jejich účinku. Vliv monoesteru kyseliny laurové na ultrastrukturu buňky *Cl. perfringens* CCM 4435 je znázorněn na Obrázku 3; během působení esteru došlo ke značné desintegraci vnitřních buněčných struktur (Skřivanová et al., 2014).

Obr. 3. Účinek monoesteru kyseliny laurové (0,1 a 2 mg/ml) na ultrastrukturu buněk *Cl. perfringens* CCM 4435. A: kontrola, B: kultura ošetřená esterem k. laurové 0,1 mg/ml po dobu 30 minut, 2C a 2D: ošetřeno esterem k. laurové, 2 mg/ml, 30 minut. Zdroj: Skřivanová et al., 2014.



5. 5. 1. Využití mastných kyselin o střední délce řetězce ve výživě drůbeže

Antibakteriální účinky kyseliny kaprylové a monokaprinu na míru kolonizace drůbežího trávicího traktu bakteriemi rodu *Campylobacter* byly ověřeny ve studiích Solis de los Santos et al. (2010) a Hilmarsson et al. (2006). Solis de los Santos (2010) sledoval vliv přídavku kyseliny kaprylové (0,7 %) na míru kolonizace brojlerových kuřat *C. jejuni.* Kyselinu podával po dobu tří, nebo sedmi dnů. V obou případech došlo k průkazné redukci počtu kampylobakterů ve slepých střevech pokusných kuřat. Přídavek 1 % směsi mastných kyselin o střední délce řetězce snížil pravděpodobnost kolonizace trávicího traktu kuřat kampylobakterem (van Gerwe et al., 2010). Na druhou stranu Hermans et al. (2010) žádný statisticky průkazný účinek nepozoroval. Směs mastných kyselin byla v tomto případě zařazena do krmné směsi tři dny před porážkou. Mastné kyseliny lze do krmiva přidávat v jejich volné formě, je však rovněž možné kyseliny aplikovat v jejich chráněné, obdukované formě. Molatová et al. (2011) porovnala účinek směsi (1:1) kyseliny kaprylové a kaprinové na počty *C. jejuni* ve slepých střevech experimentálně infikovaných kuřat. Obdukovaná forma kyselin měla inhibiční účinek výraznější než jejich volná forma. Ve studii byly použity dvě koncentrace; 0,25 % a 0,5 % směsi obou výše zmíněných kyselin.

Další strategií je přídavek některých derivátů mastných kyselin do napájecí vody, kde Hilmarsson et al. (2006) sledoval redukci v počtech kampylobakterů u kuřat po přídavku monokaprinu.

Účinek mastných kyselin o střední délce řetězce a jejich monoglyceridů na salmonely byl velmi dobře popsán *in vitro* (např. Van Immerseel et al., 2004; Thormar et al., 2006). V experimentech s brojlerovými kuřaty autoři poměrně často studují kombinace mastných kyselin s rostlinnými extrakty (viz níže). Účinek samotné kyseliny kaprylové popisuje např. Kollanoor Johny et al., 2012. Přídavek 0,7 % a 1 % kyseliny kaprylové do krmiva brojlerových kuřat experimentálně nakažených salmonelou (8 $\log_{10}$ CFU) snížil počty salmonel ve slepých střevech, tenkém střevě, kloakálním výtěru, v játrech a slezině v porovnání s nakaženou skupinou přijímající kontrolní krmnou směs. Mezi skupinami nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl v živé hmotnosti na konci experimentu ($p \leq 0,05$). Kyselina kaprylová byla podávána terapeuticky, po dobu 5 dnů. Po celou dobu trvání experimentu byla kyselina kaprylová podávána v experimentu práce Skřivanová et al., 2014. Koncentrace 0,25 % a 0,5 % snížila počty salmonel ve voleti a slepých střevech kuřat, jejichž krmná směs byla experimentálně kontaminována salmonelou ($p \leq 0,05$).

5. 6. ROSTLINNÉ EXTRAKTY

Na základě *in vitro* účinku rostlinných extraktů na původce enteritidy drůbeže byly vytipovány nejslibnější látky, které jsou následně testovány přímo na drůbeži. V experimentech *in vitro* je často používán trans-cinamaldehyd, carvacrol, thymol, nebo eugenol (Johny et al., 2010; Agostini et al., 2012). Autorským kolektivem Hermans et al. (2011) byl po předchozích *in vitro* experimentech se skupinou rostlinných extraktů vytipován trans-cinnamaldehyd (CIN). Přídavek do krmné směsi (0,3 % obdukované formy přípravku) po celou dobu trvání experimentu, tj. po dobu 22 dnů nepozorovali vliv CIN na průběh infekce kuřat *C. jejuni* a to i přes skutečnost, že dávka byla mnohem vyšší než *in vitro* stanovená minimální inhibiční koncentrace CIN pro totožný kmen bakterie. Testoval se rovněž účinek některých látek rostlinného původu na užitkovost v souvislosti s vyvolaným tepelným stresem. Testované látky (extrakt z citronové, pomerančové kůry a esenciální olej z *Curcuma xanthorrhiza* na užitkovost vliv neměly (Abkarian et al., 2013). Přídavek 400 mg/kg extraktu z citronové kůry a esenciálního oleje z *Curcuma xanthorrhiza* ve stejném experimentu snížil počty koliformních bakterií v ileu, druhý zmíněný produkt rovněž snížil počty koliformních bakterií ve slepých střevech ($p < 0.05$).

Vliv přídavku šalvějového extraktu *S. officinalis* L. (eukalyptol 1,59; α-thujon 5,47; kafr 2,65 a borneol 1,39 μg/100 g) na počty salmonel sledoval kolektiv Piesova et al., 2012. U experimentálně infikovaných kuřat došlo k redukci počtu salmonel v játrech, ve slezině a v obsahu slepých střev. Extrakt byl do krmné směsi přidán v koncentraci 8 g/kg a podáván po celou dobu trvání experimentu, tj. 21 dnů. Agostini et al. (2012) sledovali vliv přídavku hřebíčku do diety brojlerových kuřat Ross 308, použity byly celkem čtyři koncentrace: 100, 200, 1000, and 2500 mg/kg krmné směsi. U všech koncentrací byl sledován vliv na růst kuřat, do mikrobiologických analýz však byla zařazena pouze nejnižší z použitých koncentrací. Zde nedošlo k ovlivnění počtu *Enterobacteriaceae* v trávicím traktu kuřat, nicméně koncentrace 100 mg/kg zvýšila počty laktobacilů (9.62 vs. 9.18 log cfu/g digesty; $P < 0.05$). Nejen účinky jedné konkrétní látky, nebo extraktu z jedné rostliny jsou předmětem studií *in vivo,* ale i jejich vzájemné kombinace byly doposud studovány; např. v práci Bona et al. (2012) byl úspěšně sledován vliv směsi několika esenciálních olejů na salmonely.

6. ZÁVĚRY

- Krmiva pro drůbež (a i ostatní hospodářská zvířata) nejsou oproti potravinám téměř vůbec testována na přítomnost patogenních mikroorganismů.
- V drůbežím mase je nejčastěji nalézána *Salmonella* spp. a *Listeria* spp. Naproti tomu bakterie rodu *Campylobacter* nebyly v posledních dvou letech v systému RASFF hlášeny, zjevně proto, že nejsou sledovány.
- Nejvíce mikrobiálně kontaminované maso v EU mělo v letech 2013 až 2014 Polsko.
- Možnost úplného zákazu používání antibiotik v krmných směsích pro drůbež k preventivních účelům se projevuje jako racionální a proveditelná, zejména v případě dobré zoohygieny. Šíření patogenů se také výrazně omezilo zkrácením doby výkrmu brojlerů. Alternativní látky ke krmným antibiotikům (probiotika, prebiotika, rostlinné extrakty, mastné kyseliny) mají omezený účinek a i zde je třeba sledovat možné negativní účinky a bezpečnost těchto látek.

LITERATURA

Aarestrup F. M., Sewfarth A. M., Emborg H. D., Pedersen K., Hendriksen R. S., Bager F. 2001. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal enterococci from food animals in Denmark. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 45, 2054-2059.

Agostini P. S., Solà-Oriol D., Nofrarías M., Barroeta A. C., Gasa J., Manzanilla E. G. 2012. Role of in-feed clove supplementation on growth performance, intestinal microbiology, and morphology in broiler chicken. *Livestock Science* 147, 113-118.

Alali W. Q., Gaydashov R., Petrova E., Panin A., Tugarinov O., Kulikovskii A., Mamleeva D., Walls I., Doyle M. P. 2012. Prevalence of Salmonella in retail chicken meat in Russian Federation. Jourlan of Food Protection 75 (8), 1469 – 1473.

Anadon A., M. R. Martinez-Larranaga, Aranzazu M. M. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 45 (1), 91-95.

Anonym1: http://www.dsmz.de/bactnom/nam2662.htm

Anonym2: http://www.oie.int/eng/maladies/fiches/

Anonym3: Zákon č. 166 z r. 1999 Sb. o veterinární péči a o změně některých souvisejících zákonů (veterinární zákon).

Anonym4: http://www.svscr.cz

APUA 2010. Antibiotics in food animal production: A forty year debate. *APUA Newsletter* 28 (2), 14-18.

Barrow P. 1992. Probiotics for chickens. In R. Fuller ed., Probiotics - The Scientific Basis.: London, Chapman & Hall.

Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson Ó., Thormar H. 2001. Killing of gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS* 109, 670–678.

Bona T. D. M. M., Pickler L., Miglino L. B., Kuritza L. N., Vasconcelos S. P., Santin E. 2012. Oregano, rosemery, cinnamon essential oil and pepper extract to control Salmonella, Eimeria and Clostridium in broiler chickens. *Pesquisa Veterinaria Brasileira* 32 (5), 411-418.

Borriello S. P. 1995. Clostridial disease of the gut. *Clinical Infectious Diseases* 20 (Suppl. 2), 242 – 250.

Boyaval P., Corre, C., Dupuis C., Roussel E. 1995. Effects of free fatty acids on propionic acid bacteria. *Lait* 75, 17–29.

Byrd J. A., Hargis B. M., Caldwell D. J., Bailey R. H., Herron K. L., McReynolds J. L., Brewer R. L., Anderson R. C., Bischoff K. M., Callaway T. R., Kubena L. F. 2001. Effect of lactic acid administration in the drinking water during preslaughter feed withdrawal on Salmonella and Campylobacter contamination of broilers. *Poultry Science* 80, 278–283.

Chambers J. R., Spencer J. L., Modler H. W. 1997. The influence of complex carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization, pH, and density of broiler ceca. *Poultry Science* 76, 445-451.

Chang C. H., Day D. F. 2004. Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. *Poultry Science* 83, 1302-1306.

Chaveerach A. Keuzenkamp P. D., Lipman L. J. A., Van Knapen F. 2002. In vitro study on the effect of organic acids on Campylobacter jejuni/coli population in mixtures of water and feed. *Poultry Science* 81, 621-628.

Cooper K. K., Songer J. G. 2009. Necrotic enteritis in chickens: A paradigm of enteric infection by Clostridium perfringens type A. *Anaerobe* 15 (1-2), 55 – 60.

Cukrowska B., Lodinova-Zadnikova R., Enders C., Sonnenborn U., Schulze J., Tlaskalova-Hogenova H. 2002. Specific proliferative and antibody responses of premature infants to intestinal colonization with nonpathogenic probiotic E. coli strain Nissle 1917: *Scandinavian Journal of Immunology* 55 (2), 204-209.

Dahiya J. P., Wilkie J. P., Van Kessel A. G., Drew M. D. 2006. Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. *Animal Feed Science and Technology* 129, 60–88.

Davies R.H. 1994. Salmonella contamination in animal feedmills. *State Veterinary Journal* 4, 11-13.

Davies R. H., Wray C. 1996. Persistence of *Salmonella enteritidis* in poultry units and feed. *British Poultry Science* 37, 589-596.

Dias de Oliveira S., Siqueira Flores F., dos Santos L.R., Brandelli A. 2005. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. *International Journal of Food Microbiology* 97, 297-305.

Di Caro S., Tao H., Grillo A., Elia C., Gasbarrini G., Sepulveda A. R., Gasbarrini A. 2005. Effects of Lactobacillus GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Digestive and Liver Disease* 37 (5), 320-329.

Dierick N. A., Decuypere J. A., Degeyter I. 2003. The combined use of whole *Cuphea* seeds containing medium chain fatty acids and an exogenous lipase in piglet nutrition. *Archives of Animal Nutrition* 57, 49–63.

Domínguez C., Gomez I., Zumalacarregui J. 2002. Prevalence of Salmonella and Campylobacter in retail chicken meat in Spain. International Journal of Food Microbiology 72 (1-2), 165 – 168.

Doyle M. P., Erickson M. C. 2006. Reducing the carriage of foodborne pathogens in livestock and poultry. *Poultry Science* 85, 960–973.

Edwards P. 1996. Wastewater-fed aquaculture systems: status and prospects. The ICLARM Quarterly, January 33-35.

EFSA 2014. Manual for reporting on antimicrobial resistance within the framework of Directive 2003/99/EC and indicator bacteria for information derived from the year 2013. EN-574. EFSA, Parma, Italy.

EFSA 2012. Scientific report of EFSA and ECDC, The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 10 (3): 2597 (422 pp).

FAO/WHO 1995. Application of risk analisis to food standard issues. Issued by the World Health Organisation and Food and Agriculture Organisation (WHO/FNU/FOS/95.3).

FDA 2013. Phasing out certain antibiotics use in farm animals. FDA consumer health information (www.fda.gov/consumer), Dec 2013.

Fleming A. 1945. Penicillin. Nobel lecture.

Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66 (5), 365-378.

Fuller R. 1992. The effect of probiotics on the gut micro-ecology. In BJB Wood ed. The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. London, *Elsevier Applied Science*, 69-114.

Fuller R. 1997. The effect of probiotics on the gut micro-ecology. In GW Tannock ed., Probiotics - A Critical Review. Wymondham, England, Horizon Scientific Press, p. 15-22.

Garcia S., Heredia N. 2011. *Clostridium pefringens*: A dynamic food borne pathogen. *Food Bioprocess Technology* 4, 624–630.

Ghafir Y., China B., Dierick K., De Zutter L., Gaube G. A seven-year survey of Campylobacter contamination in meat at different production stages in Belgium. *International Journal of Food Microbiology* 116 (1), 111 – 120.

Gholamiandekhordi A. R., Timbermont L., Lanckriet A., Van Den Broeck W., Pedersen K., Dewulf J., Van Immerseel F. 2006. Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. *Avian Pathology* 36, 375–382.

Gholamiandekhordi A., Eeckhaut V., Lanckrier A. 2009. Antimicrobial resistance *Clostridium perfringens* isolates from broiler in Belgium. *Veterinary Research Communications* 33, 1031-1037.

Gibreel A., and Taylor D. E. 2006. Macrolide Resistance in Campylobacter Jejuni and Campylobacter Coli. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 58 (2), 243–55.

Gomis S., Babiuk L., Godson D. L., Allan B., Trush T., Townsend H., Willson P., Waters E., Hecker R., Potter A. 2003. Protection of chickens against Escherichia coli infections by DNA containing CpG motifs. Infection and Immunity 71 (2), 857 – 863.

Grmanová M., Rada V., Sirotek K., Vlková E. (2010): Naturally occuring prebiotic oligosaccharides in poultry feed mixtures. *Folia Microbiologica* 55, 326-328.

Gupta A., Nelson J. M., Barrett T. J., Tauxe R. V., Rossiter S. P., Friedman C. R., Joyce K. W., Smith K. E., Jones T. F., Hawkins M. A. 2004. Antimicrobial Resistance among Campylobacter Strains, United States, 1997-2001. *Emerging Infectious Diseases* 10 (6), 1102–1109.

Gyles C. L. 2008. Antimicrobial Resistance in Selected Bacteria from Poultry. *Animal Health Research Reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 9 (2), 149–158.

Hart A. L., Lammers K., Brigidi P., Vitali B., Rizzello F., Gionchetti P., Campieri M., Kamm M. A., Knight S. C., Stagg A. J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 53 (11), 1602-1609.

Hejlíček K., Vrtiak J.O. Speciální epizootologie 1. SZN Paha 1982, 320 s.

Hera A. 2005. Regulace a pravidla, kterým podléhají antibiotika po vstupu do EU. *Veterinářství* 2, 108-112.

Heres L., Engel B., Urlings H.A., Wagenaar J. A., Van Knapen F. 2004. Effect of acidified feed on susceptibility of broiler chickens to intestinal infection by Campylobacter and Salmonella. *Veterinary Microbiology* 99, 259–267.

Hermans D., Martel A., Van Deun K., Verlinden M., Van Immerseel F., Garmyn A., Messens W., Heyndrickx M., Haesebrouck F., Pasmans F. 2010. Intestinal mucus protects Campylobacter jejuni in the caeca of colonised broiler chickens against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. *Poultry Science* 89, 1144 – 1155.

Herzig I., Suchý P. 2006. Výživa a infekční nemoci zvířat. Vědecký výbor výživy zvířat. Praha, 2006, 49 s.

Hilmarsson H., Thormar H., Thrainsson J. H., Gunnarsson E. 2006. Effect of glycerol monocaprate (monocaprin) on broiler chickens: An attempt at reducing intestinal Campylobacter infection. *Poultry Science* 85, 588–592.

Hinton A. Jr., Corrier D. E., Ziprin R. L., Spates G. E., a DeLoach J. R. 1991. Comparison of the efficacy of cultures of cecal anaerobes as inocula to reduce Salmonella typhimurium colonization in chicks with or without dietary lactose. *Poulry Science* 70 (1), 67-73.

Hinton M., Linton A. H. 1988. Control of Salmonella infections in broiler chickens by the acid treatment of their feed. *Veterinary Record* 123, 416–421.

Hinton M.H. 2000. Infections and intoxications associated with animal feed and forage which may present a hazard to human health. *Veterinary Journal* 159, 124-138.

Hockertz S., 1991. [Immunomodulating effect of killed, apathogenic Escherichia coli, strain Nissle 1917, on the macrophage system]. *Arzneimittelforschung* 41 (10), 1108 - 1112.

Höök H., Fattah M. A., Ericsson H., Vagsholm I., Danielsson-Tham M. L. 2005. Genotype dynamics in Campylobacter jejuni in a broiler flock. *Veterinary Microbiology* 106 (1-2), 109 – 117.

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.

Hume M. 2011. Food safety symposium: Potential impact of reduced antibiotic use and the roles of prebiotics, probiotics, and other alternatives in antibiotic-free broiler production. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to antibiotics. Poultry Science 90, 2663–2669.

Janáč A. 1977. Mikrobiologie a veterinářství. SZN Praha, 149 s.

Jarquin R., Hanning I., Soohyoun A., Ricke S.C. 2009. Development od rapid detection and genetic characterization of *Salmonella* in poultry breeder feeds. *Sensor* 9, 5308-5323.

Jay J. M., Loessner M. J. Golden D. A. 2005. Modern Food Microbiology. Springer, New York, 790 s.

Johny A. K., Darre M. J., Donoghue A. M., Donoghue D. J., Venkitanarayanan K. 2010. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on Salmonella Enteritidis and Campylobacter jejuni in chicken cecal contents in vitro. *Journal of Applied Poultry Research* 19 (3), 237-244.

Kholanoor-Johny A., Mattson T., Baskaran S. A., Amalaradjou M. A. R., Hoagland T. A., Darre M. J., Khan M. I., Schreiber D. T., Donoghue A. B., Donoghue D. J., Venkitanarayanan K. 2012. Caprylic acid reduces Salmonella Enteritidis populations in various segments of digestive tract and internal organs of 3- and 6-weeks-old broiler chickens, therapeutically. *Poultry Science* 91 (7), 1686-1694.

Lee K. W., Lillehoj H. S., Jeong W., Jeoung H. Y., An D. J. 2011. Avian necrotic enteritis: Experimental model, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. *Poultry Science* 90, 1381–1390

Lieberman S., Enig M. G., Preuss H. G. 2006. A review on monolaurin and lauric acid. *Alternative and Complementary Therapies* 12(6), 310 – 314.

Kabara J. J., Swieczkowski D. M., Conley A. J., Truant J. P. 1972. Fatty acids and derivates as antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2, 23 – 28.

Keyburn A. L., Bannam T. L., Moore R. J., Rood J. I. 2010. NetB, a poreforming toxin from necrotic enteritis strains of *Clostridium perfringens*. *Toxins* 2, 1913 – 1927.

Keyburn A. L., Boyce J. D., Vaz P., Bennam T. L., Ford M. E., Parker D., di Rubbo A., Rood J. I., Moore R. J. 2008. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. *PLoS Pathogens* 4, 26.

Komise evropských společenství 2008. Zpráva komise radě a evropskému parlamentu o používání kokcidiostatik a histomonostatik jako doplňkových látek. V Bruselu dne 5.5.2008. KOS (2008) 233 v konečném znění.

Kozakova H., Rehakova Z., Kolinska J. 2001. Bifidobacterium bifidum monoassociation of gnotobiotic mice: effect on enterocyte brush-border enzymes. *Folia Microbiologica* 46 (6), 573 - 576.

Kraehenbuhl J. P., Neutra M. R. 2000. Epithelial M cells: differentiation and function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 16, 301 - 332.

Krause L. J., Forsberg C. W., O'Connor D. L. 1996. Feeding human milk to rats increases Bifidobacterium in the cecum and colon which correlates with enhanced folate status. Journal of Nutrition 126 (5), 1505 - 1511.

Krieg N. G. 1984. Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology Vol.1, Williams and Wilkins, Baltimore, 964 s.

Leffler H., Masiarz F. R., Barondes S. H. 1989. Soluble lactose-binding vertebrate lectins: a growing family. *Biochemistry* 28 (23), 9222 - 9229.

Lee K. W., Lillehoj H. S., Jeong W., Jeoung H. Y., An D. J. 2011. Aviannecrotic enteritis: Experimental model, host immunity, pathogenesis, risk factors, and vaccine development. Poultry Science 90, 1381 – 1390.

Lieberman S., Enig M. G., Preuss H. G. 2006. A review on monolaurin and lauric acid. Alternative Comlementary Therapy 12(6), 310–314.

Lilly D. M., Stillwell R. H. 1965. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147, 747-748.

Maciorowski K. G., Herrera P., Jones F. T., Pillai S. D., Ricke S. C. 2006. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. In animal feeds - A review. *Veterinary Research Communications* 30, 127 - 137.

Marounek M., Rada V. 1998. Age effect on in vitro fermentation pattern and methane production in the caeca of chickens. *Physiological Research* 47 (4), 259 - 263.

Mattar A. F., Teitelbaum D. H., Drongowski R. A., Yongyi F., Harmon C. M., Coran A. G. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. Pediatric Surgery International 18 (7), 586 - 590.

Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders S. J. M., Hilbert F. 2004. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *International Journal of Food Microbiology* 97 (1), 23 – 29.

Mead G. C. 1989. Microbes of the avian cecum: types present and substrates utilized. *Journal of Experimental Zoology* Suppl 3, 48 - 54.

Mead G. C. 1997. Bacteria in the gastrointestinal tract of the birds. In IR Mackie, BA Whita, and RE Isaacson eds., *Gastrointestinal Microbiology*.: London, Chapman & Hall, p. 216-240.

Mičan P. 1985. Hygienické aspekty použití probiotik v živočišné výrobě.: Pohořelice, p. 3-5.

Miller T. L., Wolin M. J., Kusel E. A. 1986. Isolation and characterization of methanogens from animal faeces. *Systematic and Applied Microbiology* 8, 234 - 238.

Mitsuoka T. 1992. The human gastrointestinal tract. In BJB Wood ed., The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.: London, *Elsevier Applied Science*, p. 69 - 114.

Miwa N., Nishina T., Kubo S., Atsumi M., Honda H. 1998. Amount of enterotoxigenic Clostridium perfringens in meat detected by nested PCR. *International Journal of Food Microbiology* 42 (3), 195 – 200.

Molatová Z., Skřivanová E., Baré J., Houf K., Bruggeman G., Marounek M. 2011. Effect of coated and non-coated fatty acid supplementation o broiler chickens experimentally infected with Campylobacter jejuni. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 95 (6), 701 - 706.

Molbak K., Baggesen D. L., Aarestrup F. M., Ebbesen J. M., Engberg J., Frydendahl K., Gerner-Schmidt P., Petersen A. M., Wegener H. C. 1999. An outbreak of multidrug-resistant, quinolone-resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104. *The New England Journal of Medicine* 341, 1420 - 1425.

Morishita Y., Mitsuoka T., Kaneuchi C., Yamamoto S., Ogata M. 1971. Specific establishment of lactobacilli in the digestive tract of germ-free chickens. *Japanese Journal of Microbiology* 15 (6), 531 - 538.

Nauerby B., Pedersen K., Madsen M. 2003. Analysis by pulsed-field gel electrophoresis of the genetic diversity among *Clostridium perfringens* isolates from chickens. *Veterinary Microbiology* 94, 257 – 266.

Neutra M. R., Mantis N. J., Kraehenbuhl J. P. 2001. Collaboration of epithelial cells with organized mucosal lymphoid tissues. *Nature Immunology* 2 (11), 1004 - 1009.

Newell D. G., Fearnley C. 2003. Sources of Campylobacter colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology* 69 (8), 4343 – 4351.

Nurmi E., Rantala M. 1973. New aspects of Salmonella infection in broiler production. *Nature* 241 (5386), 210-211.

Otte J. M., Kiehne K., Herzig K. H. 2003. Antimicrobial peptides in innate immunity of the human intestine. *Journal of Gastroenterology* 38 (8), 717 - 726.

Ouwehand A. C., Salminen S., Isolauri E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek* 82 (1-4), 279-289.

Oyrzabal O. A., Conner D. E. 1995. *In vitro* frucooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. *Poultry Science* 74, 1418 - 1425.

Parish W.E. 1961. Necrotic enteritis in the fowl *Gallus gallus domesticus*. I. Histopathology of the disease and isolation of a strain of *Clostridium welchii*. Journal of Comparative Pathology 71, 377 – 393.

Parker R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibioticum story. *Animal Nutrition and Health* 29, 4 - 8.

Patten, J.D., Waldroup, P.W. 1988. Use of organic acids in broiler diets. *Poultry Science* 67: 1178-1182.

Patterson J. A., Orban J. I., Sutton A. L., a G. N. Richards G.N. 1997. Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. *Poultry Science* 76 (3), 497 - 500.

Piesova E., Makova Z., Levkut M., Faixova Z., Pistl J., Marcin A., Levkut M. 2012. The effects of sage extract feed supplementation on biochemical parameters, weight of

intermal organs and Salmonella counts in chickens. *Research in Veterinary Science* 93 (3), 1307 - 1308.

Popoff M.Y., Le Minor L.E. 2005. Genus *Salmonella.* In: Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Stanley (eds.), Springer, New York,

Pratt A, Korolik V. 2005. Tetracycline Resistance of Australian Campylobacter Jejuni and Campylobacter Coli Isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (4), 452 – 60.

Rada V., Marounek M. 1996. Effect of monensin on the crop microflora of broiler chickens. *Annales de Zootechnie* 45, 283 - 288.

Rada V., Marounek M., Rychlý I., Šantrůčková D., Voříšek K. 1995. Effect of *Lactobacillus salivarius* administration on microflora in the crop and caeca of broiler chickens. *Journal of Animal Feed Science and Technology* 4, 161 - 170.

Rada V., Dušková D., Marounek M. and Petr J. 2001. Enrichment of bifidobacteria in the hen caeca by dietary inulin. *Folia Microbiologica* 46, 73-75.

Rainey F.A., Hollen B.J., Small A. 2009. Genus *Clostridium.* In: Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, Paul deVos, George M. Garrity, Dorothy Jones, Noel L. Krieg, Wolfgand Ludwig, Fred A. Rainey, Karl-Heinz Schleifer, William B. Whitman (eds.) Springer, New York, 764-799.

Ray B. 2001. Fundamental Food Microbiology, Second Edition. CRC Press LLC, USA, 562 s.

Runho, R.C., Sakomura, N.K., Kuana, S., Banzatto, D., Junqueira, O.M., Stringhini, J.H. 1997. Use of an organic acid (fumaric acid) in broiler rations. R. Bras. Zootec. 26: 1183-1191.

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 Norways 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, 441 s.

Sasaki Y., Haruna M., Murakami M., Hayashida M., Takahashi N., Urushiama T., Ito K., Yamada Y. 2014. Contamination of Poultry products with *Listeria monocytogenes* at poultry processing plants. *Journal of Veterinary Medical Science* 76, 129 - 132.

Schneitz C., Kiiskinen L. N. T., Nurmi E., 1991. Pilot-scale testing of the competitive exclusion method in chickens. *British Poultry Science* 32 (4), 881 - 884.

Schrezenmeir J., de Vrese M. 2001. Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition: *American Journal of Clinical Nutrition* 73 (2) Suppl, 361S - 364S.

Sherris J.C. 1990. Medical Microbiology. Prentice-Hall International Inc., Toronto, 991s.

Silvi S., Rumney C. J., Rowland I. R. 1996. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *Journal of Applied Bacteriology* 81 (5), 561 - 564.

Skanseng B., Kaldhusal M., Moen B., Gjevre A.-G., Johannessen G. S., Sekelja M., Trosvik P., Rudi K. 2010. Prevention of intestinal Campylobacter jejuni colonisation in broilers by combinations of in-feed organic acids. *Journal of Applied Microbiology* 109, 1265 – 1273.

Skinner, J.T., Izat, A.L., Waldroup, P.W. 1991. Research note: fumaric acid enhances performance of broiler chickens. *Poultry Science* 70, 1444-1447.

Skřivanová E., Hovorková P., Čermák L., Marounek M. 2014. Potential use of caprylic acid in broiler chickens: effect on Salmonella Enteritidis. *Foodborne Pathogens and Disease*. V tisku. DOI: 10.1089/fpd.2014.1833.

Skřivanová E., Pražáková Š., Benada O., Hovorková P., Marounek M. 2014. Susceptibility of *Escherichia coli* and *Clostridium perfringens* to sucrose monoesters of capric and lauric acid. *Czech Journal of Animal Science* 59, 374 – 380.

Solís de los Santos F. S., Hume M., Venkitanayanan K., Donoghue A. M., Hanning I., Slavik M. F., Aguiar V. F., Metcalf J. H., Reyes-Herrera I., Blore P. J. and Donoghue D. J. 2010. Caprylic acid reduces enteric Campylobacter colonisation in marketaged broiler chickens but does not appear to alter caecal microbial populations. *Journal of Food Protection* 73, 251–257.

Stoyanchev T., Vashin I., Ring C., Atanassova V. 2007. Prevalence of Campylobacter spp. in poultry and poultry products for sale on the Bulgarian retail market. *Antonie van*

Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology 92 (3), 285 – 288.

Sturm A., Rilling K., Baumgart D. C., Gargas K., Abou-Ghazale T., Raupach B., Eckert J., Schumann R. R., Enders C., Sonnenborn U., Wiedenmann B., Dignass A. U. 2005. Escherichia coli Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infection and Immunity* 73 (3), 1452 - 1465.

Swann M.M. 1969. Report of the Secretary of State for Social Services, the Secretary of State for Scotland, the Minister of Agriculture, Fisheries and Food and the Secretary of State for Wales (Cmnd. 4190). *Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. London HM Stationary Office.

Szylit O., Nugon-Baudon L. 1985. Lactobacillus contribution to the nutritional physiology of the host. *Sci. Alim*., v. 5, p. 257-262.

Teuber M. 2001. Veterinary use and antibiotic resistence. *Current Opinion in Microbiology* 4, 493 - 499.

Thompson J. L., Hinton M. 1997. Antibacterial activity of formic acid and propionic acid in the diet of hens on salmonellas in the crop. *British Poultry Science* 38, 59 – 65.

Thormar H., Hilmarsson H., Bergsson G. 2006. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria Campylobacter jejuni, Salmonella spp, and Escherichia coli. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 522 - 526.

Timbermont L., Lanckriet A., Dewulf J., Nollet N., Schwarzer K., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. 2010. Control of Clostridium perfringens-induced necrotic enteritis in broilers by target-released butyric acid, fatty acids and essential oils. *Avian Pathology* 39 (2), 117 – 121.

Timbermont L., Haesebrouck F., Ducatelle R., Van Immerseel F. 2011. Necrotic enteritis in broilers: an updated review on the pathogenesis. *Avian Pathology* 40, 341 – 347.

Tortuero F. 1973. Influence of the implantation of Lactobacillus acidophilus in chicks on the growth, feed conversion, malabsorption of fats syndrome and intestinal flora. *Poultry Science* 52 (1), 197 - 203.

Trebichavsky I., Splichal I. 2006. Probiotics manipulate host cytokine response and induce antimicrobial peptides. Folia Microbiologica (Praha) 51 (5), 507 - 510.

Van Gerwe T., Bouma A., Klinkenberg D., Wagenaar J. A., Jacobs-Reitsma W. F., Stegeman A. 2010. Medium chain fatty acid feed supplementation reduces the probability of Campylobacter jejuni colonisation in broilers. *Veterinary Microbiology* 143, 314 – 318.

Vandamme P., Dewhirst F.E., Paster B.J., On S.L.W. 2005. Family Campylobacteriaceae. In: Bergey´s Manual of Systematic Bacteriology, Don J. Brenner, Noel R. Krieg, James T. Stanley (eds.), Springer, New York, 1145-1165.

Vandeplas S., Dubois Dauphin R., Beckers Y., Thonart P., Théwis A. 2010. Salmonella in chicken: current and developing strategies to reduce contamination at farm level. *Journal of Food Protection* 73 (4), 774 - 785.

Van Immerseel F. 2007. Preventing Salmonella infections by rationally designed feed additives: the use of organic acids. *Lohmann Information* 42, 10 – 17.

Van Immerseel F., De Buck J., Boyen F., Bohez L., Pasmans F., Volf J., Sevcik M., Rychlik I., Haesebrouck F., Ducatelle R. 2004. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through hilA supression shortly after infection of chickens with Salmonella enterica serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology* 70, 3582 - 3587.

Van Immerseel F., De Buck J., Pasmans F., Huyghebaert G., Haesebrouck F., Ducatelle R. 2004. Clostridium perfringens in poultry: an emerging threat for animal and human health. *Avian Pat*hology 33 (6), 537 – 549.

Vařejka F., Mráz O., Smola J. Speciální veterinární mikrobiologie, SZN, Praha 1989, 264 s.

Vogt, H., Matthes, S. 1981. Effect of organic acids in rations on the performance of broilers and laying hens. Arch. Geflügelkd. 45: 221-232.

Vogt, H., Matthes, S., Harnisch, S. 1982. Effect of organic acids in rations on the performances of broilers. Arch. Geflügelkd. 46: 223-227.

Wegener H. C., Aarestrup F. M., Gerner-Smidt P., Bager F. 1999. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Veterinaria Scandinavica* 92, 51 - 57.

Wegener H. C., Aarestrup F. M., Jensen L. B., Hammerum A. M., Bager F. 1998. The association between the use of antimicrobial growth promoters and development of resistance of pathogenic bacteria towards growth promoting and therapeutic antimicrobials. *Journal of Animal and Feed Sciences* **7**, 7 - 14.

Veldman A., Vahl H.A., Borggreve G.J., Fuller D.C. 1995. A survey of the incidence of *Salmonella* species and Enterobacteriaceae in poultry feeds and feed components. *Veterinary Record* 136, 169 - 172.

Versteegh, H.A.J., Jongbloed, A.W. 1999. The effect of supplementary lactic acid in diets on the performance of broilers. ID-DLO Rep. No. 99.006. Inst. Anim. Sci. Hlth., Lelystad, The Netherlands.

Watkins B. A., Kratzer F. H. 1983. Effect of oral dosing of Lactobacillus strains on gut colonization and liver biotin in broiler chicks. *Poultry Science* 62 (10) 2088 - 2094.

Wehkamp J., Harder J., Wehkamp K., Wehkamp-von Meissner B., Schlee M., Enders C., Sonnenborn U., Nuding S., Bengmark S., Fellermann K., Schröder J. M., Stange E. F. 2004. NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by Escherichia coli Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and Immunity* 72 (10), 5750 - 5758.

White P. L., Baker A. R., James W. O. 1997. Strategies to control Salmonella and Campylobacter in raw poultry products. *Revue Scientifique et Technique de l'Office International des Epizooties* 16 (2), 525 – 541.

World Health Organization. 2001. WHO Global Health Strategy for Containment of Antimicrobial Resistance. World Health Organization, Switzerland., 99 s.

Ziprin R. L., Elissalde M. H., Hinton A. Jr., Beier R. C., Spates G. E., Corrier D. E., Benoit T. G., DeLoach J. R. 1991. Colonization control of lactose-fermenting Salmonella typhimurium in young broiler chickens by use of dietary lactose. *American Journal of Veterinary Research* 52 (6), 833 - 837.

Zhang Q., Lin J., Pereira S. 2003. Fluoroquinolone - resistant Campylobacter in animal reservoirs: dynamics of development, resistance mechanisms and ecological fitness. *Animal Health Research Reviewes* 4(2), 63-71.

Zhao C. W., Ge B. L., De Villena J., Studler R., Yeh E., Zhao S. H., White D. G., Wagner D., Meng J. H. 2001. Prevalence of Campylobacter spp., Escherichia coli and Salmonella serovars in retail chicken, turkey, pork, and beef from from the Greater Washington, DC, area. *Applied and Environmental Microbiology* 67 (12), 5431 – 5436.

Zhao S., McDermott P. F., Friedman S., Qaiyumi S., Abbott J., Kiessling C., Ayers S., Singh R., Hubert S., Sofos J., White D. G. 2006. Characterization of antimicrobial-resistant Salmonella isolated from imported foods. *Journal of Food Protection* 69 (3), 500 – 507.

SUMMARY

Among the alimentary risks for humans in developed countries, microbial contamination of poultry meat represents one of the most frequent sources of the infection. The most frequent are campylobacteriosis and salmonellosis, followed by other alimentary infections and intoxications, such as clostridial intoxications. The presence of *Clostridium perfringens* is not only a thread for humans, but also a risk for the animal itself, as the leading cause of necrotic enteritis.

The EU restriction of in-feed antibiotics in animal nutrition, together with other factors as poor zoohygienic parameters, can increase the risk of bacterial contamination of animal products. Among the candidate alternatives for in-feed antibiotics are probiotics, prebiotics, organic acids (including medium-chain fatty acids), or plant extracts. These alternatives are less potent than original antibiotics, and are not very constant in terms of the effect on production traits of the animal. However, together with a good hygiene, they both can decrease the occurrence of microbial contamination of the animal product. However, the safety of the additive must be taken into the account as well.

KEYWORDS

Alimentary infection; nutrition; campylobacter; salmonella; feed; additive; polutry