

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



**Fakulta agrobiologie,
potravinových a přírodních zdrojů**

**Výskyt salmonel na slepičích vejcích v závislosti na
způsobu chovu**

Diplomová práce

Bc. Tereza Novotná

Kvalita potravin a zpracování zemědělských produktů

prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

Ing. Hana Šubrtová Salmonová, Ph.D.

© 2022 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Výskyt salmonel na slepičích vejcích v závislosti na způsobu chovu" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 31. 3. 2022

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala především paní prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. za mimořádnou ochotu a pomoc při vypracování diplomové práce, za čas strávený kontrolou několika zaslanych verzí a konzultace. Dále bych paní profesorce chtěla poděkovat, že mi dala možnost se na Katedře mikrobiologie, výživy a dietetiky mnoho naučit a strávit čas v příjemném kolektivu. Také bych chtěla poděkovat Ing. Tereze Kodešové a Ing. Haně Šubrtové Salmonové Ph.D. za pomoc a rady při práci v laboratoři. Poděkování patří i Ing. Darině Chodové Ph.D. za konzultace ohledně způsobů chovu drůbeže. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, rodině svého přítele a přátelům, kteří mi byli velkou oporou. Zvlášť bych chtěla poděkovat mému příteli Filipovi, který mě významně podporoval nejen při vypracování diplomové práce, ale i během celého studia.

Výskyt salmonel na slepičích vejcích v závislosti na způsobu chovu

Souhrn

Salmonelóza je druhé nejčastější alimentární onemocnění v Evropské unii. Je způsobována bakteriemi rodu *Salmonella*, které velmi často kontaminují především potraviny živočišného původu, jakými jsou i slepičí vejce. Celosvětově je toto onemocnění ve spojitosti s drůbežími produkty označováno jako problém veřejného zdraví. Významným faktorem, který tuto problematiku může ovlivňovat je způsob chovu. Je také důležité neopomenout, že salmonely nejsou jediné mikroorganismy, které se na vejcích objevují a je důležité sledovat úroveň i celkového mikrobiálního osídlení slepičích vajec.

Cílem diplomové práce bylo zhodnotit vliv způsobu chovu na celkovou mikrobiální kontaminaci slepičích vajec se zvláštním zaměřením na salmonely. Hypotézou je, že systém ustájení bude mít vliv na kontaminaci slepičích vajec salmonelami.

Praktická část práce se zabývala stanovením počtu bakterií *Enterococcus*, *Escherichia coli*, koliformních bakterií a celkového počtu mikroorganismů na skořápkách slepičích vajec. Dále byla stanovována přítomnost salmonel na vejcích a v trusu. Vzorky slepičích vajec a trusu pocházely ze 3 různých farem ze systémů ustájení voliéra, free-range s voliérou a bio chov. Testování bylo provedeno kultivačními metodami na selektivních půdách a definitivní přítomnost salmonel byla potvrzena aglutinačním testem Oxoid Salmonella Test Kit. Mezi počty testovaných mikroorganismů byly nalezeny statisticky významné rozdíly, ne však v závislosti na systému chovu. Zjištěné nejvyšší i nejnižší počty výše uvedených mikroorganismů byly vždy pouze v případě voliér. Nebylo tak možné stanovit, zda jsou z hlediska mikrobiální zátěže vhodnější systémy ustájení bez výběhu nebo free-range. Vzorků vajec a trusu pozitivně testovaných na rod *Salmonella* bylo potvrzeno velmi málo, z celkem 224 vzorků vajec byly pozitivně testovány pouze dva ze systému free-range s voliérou z farmy 2 a jeden z voliéry typ A z farmy 1. Z celkem 75 vzorků trusu se jednalo pouze o 2 pozitivní vzorky ze systému voliéra z farmy 2.

Dle výsledků této diplomové práce systém ustájení nosnic nemá vliv na kontaminaci vajec salmonelami a zdá se, že na celkové mikrobiální zatížení vajec mají zásadní vliv i jiné faktory, například úroveň hygieny v chovu.

Klíčová slova: *Salmonella*, způsob chovu, mikrobiální kontaminace, kultivační stanovení

Occurrence of salmonella in hens' eggs depending on the breeding system

Summary

Salmonellosis, caused by bacteria of the genus *Salmonella*, is the second most common foodborne illness in the European Union. *Salmonella* often contaminates animal origin foodstuff such as eggs. Salmonellosis associated with poultry products is globally described as a public health problem. Method of breeding system is an important factor that can affect microbial contamination. *Salmonella* is not the only microorganism that appears on hens' eggs. And monitoring of egg microbial contamination is very important.

The aim of diploma thesis was evaluated the effect of breeding systems on the total microbial contamination of hens' eggs with a special focus on *Salmonella*. The hypothesis is that the breeding system will affect the contamination of hens' eggs with *Salmonella*.

The numbers of *Enterococcus*, *Escherichia coli*, coliform bacteria and the total number of bacteria on hens' eggs were determinate. Also, *Salmonella* presence in eggs and faeces was analysed. Eggs samples and hen faeces from 3 different farms with aviary housing systems, free-range with aviary and organic breeding were analysed by cultivation. The definitive presence of *Salmonella* was confirmed by the Oxoid Salmonella Test Kit agglutination test. Significant differences were found between the numbers of microorganisms and the highest and lowest numbers of microorganisms were in aviaries. So, level of bacterial contamination is not dependent on housing system. Very few samples of eggs and faeces were positively tested for the genus *Salmonella*. Out of 224 egg samples were positively confirmed only two from the free-range system with aviary from the farm 2 and one from the aviary type A from the farm 1. Out of 75 faeces samples were confirmed positively only in 2 samples from the aviary system from the farm 2.

According to the results of this diploma thesis, the breeding system of laying hens does not affect the contamination of eggs with *Salmonella*. Also, other factors seem to have a major impact on microbial contamination of eggs, such as hygiene in breeds.

Keywords: *Salmonella*, breeding system, microbial contamination, culture methods

Obsah

Úvod.....	7
Vědecká hypotéza a cíle práce.....	8
Literární rešerše	9
Rod <i>Salmonella</i>.....	9
1.1.1 Charakteristika rodu <i>Salmonella</i>	9
1.1.2 Taxonomie rodu <i>Salmonella</i>	10
1.1.3 Patogenita	11
1.1.4 Patogeneze	12
1.1.5 Šíření salmonel	15
Stavba a tvorba slepičích vajec	16
1.1.6 Stavba slepičího vejce.....	17
1.1.7 Tvorba slepičích vajec	18
Vliv způsobu chovu na kontaminaci slepičích vajec salmonelami	19
1.1.8 Způsob ustájení nosnic	19
1.1.9 Horizontální a vertikální přenos	21
1.1.10 Sérotypy salmonel uvnitř a na povrchu slepičích vajec.....	22
1.1.11 Salmonely v chovech drůbeže	22
Legislativa a indikátorové mikroorganismy v potravinářství	25
Metodika.....	28
Kultivační stanovení mikroorganismů.....	28
Statistická analýza.....	29
Výsledky	30
Diskuze.....	35
Závěr	39
Literatura	40
Seznam obrázků.....	47
Seznam tabulek.....	48

Úvod

Mikroorganismy se vyskytují všude kolem nás, a tak je zcela přirozený jejich výskyt i v chovech zvířat a potravinách živočišného původu. Na jedné straně se jejich přítomnost může projevit pozitivně a pro člověka zdraví prospěšně, jako je tomu například u *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* v mléku a mléčných výrobcích a na straně druhé negativně, mohou vážně narušit zdraví člověka, a takovými mikroorganismy jsou bakterie rodu *Salmonella*. Tento patogen způsobuje druhé nejčastější alimentární onemocnění v Evropské unii. Salmonelami jsou často kontaminovaná slepičí vejce a drůbeží maso. Rezervoárem jsou nejčastěji právě samotné chovy drůbeže (Yerlikaya 2019; European Food Safety Authority 2022).

V současnosti se stále rozlišují dvě skupiny systémů ustájení, a to alternativní nebo obohacené klecové systémy. Alternativní systémy mohou mít podobu voliér, podestýlky, free-range a bio chovu. Tyto způsoby chovu jsou sice vhodnější z hlediska welfare zvířat, nicméně volnost zvířat se odráží na obtížnější hygieně chovu a následně se může významně projevit i na mikrobiální kontaminaci jejich produktů. Studium mikrobiálního osídlení vajec pocházejících z různého systému ustájení je velmi aktuálním tématem (Brouček et al. 2011; Englmaierová 2016).

Vědecká hypotéza a cíle práce

Hypotéza: Systém ustájení bude mít vliv na kontaminaci slepičích vajec salmonelami. Cílem diplomové práce je zhodnotit vliv způsobu chovu na celkovou mikrobiální kontaminaci slepičích vajec se zvláštním zaměřením na salmonely.

Literární rešerše

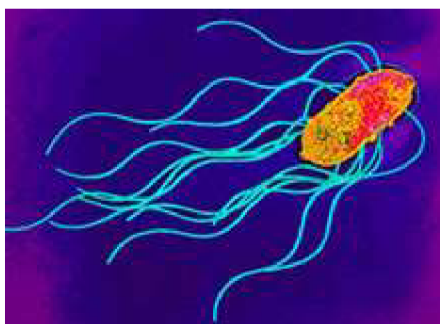
Slepičí vejce jsou v lidském jídelníčku významnou potravinou. Jejich kvalita se hodnotí z mnoha různých aspektů a jedním z nich je mikrobiální kontaminace, přičemž v mnoha studiích bylo prokázáno, že způsob ustájení ovlivňuje právě toho hledisko. Jedním z důležitých patogenů, které se na nebo ve vejcích mohou vyskytovat jsou bakterie rodu *Salmonella*.

Rod *Salmonella*

Rod *Salmonella* byl pojmenován v roce 1900 po Danielu Elmerovi Salmonovi (Katscher 1997). Rod spadá do čeledi *Enterobacteriaceae*, jenž tvoří gramnegativní fakultativně anaerobní tyčinky. Většina z nich je pohyblivá a vyskytují se především v trávicím traktu živočichů (Bednář 1996; Votava et al. 2007).

1.1.1 Charakteristika rodu *Salmonella*

Salmonely jsou rovné gramnegativní tyčinky o velikosti $0,7-1,5 \times 2,0-5,0 \mu\text{m}$. Mohou se vyskytovat samostatně, v páru nebo řetězcích. Jejich kolonie mají průměr cca 2-4 mm. Většina salmonelových bakterií je pohyblivá a bičíky mají umístěny peritrichálně tj. po celém povrchu buňky viz Obrázek 1. Dalším znakem je přítomnost fimbrií typu I (Bednář 1996; Garrity et al. 2005).



Obrázek 1: *Salmonella* (Walsh 2011)

Salmonely jsou fakultativně anaerobní bakterie s fermentativním metabolismem. Většina z nich vytváří plyny, nicméně i zde jsou výjimky, jako např. sérotyp Typhi, který plyny netvoří. Všeobecně při fermentaci sacharidů se tvoří oxid uhličitý a vodík. Mezi sacharidy, které tyto mikroorganismy zkvašují patří glukóza, maltóza, manitol a sorbitol. Většina salmonel není schopná fermentovat laktózu ani dusíkatou sloučeninu jakou je indol. Nicméně dusičnany redukují na dusitany a při štěpení bílkovin tvoří sirovodík. Velká část salmonel je schopna dekarboxylovat lysin a ornitin. Od ostatních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* se odlišují tím, že dokáží jako zdroj uhlíku využívat i sůl kyseliny citrónové (citrát) (Bednář 1996; Šilhánková 2002; Garrity et al. 2005; Votava et al. 2007).

Ačkoliv se jedná převážně o parazitický rod ve střevě obratlovců, některé druhy mohou žít jako komenzálové. Pokud se vyskytují v prostředí bohatého na bílkoviny mohou přežívat i jako saprofyté. Salmonely snášejí relativně vysoký osmotický tlak. Jsou rezistentní vůči vysychání. Sůl působí inhibičně v koncentraci minimálně 9 %. Bakterie odolávají teplotám pod

bodem mrazu a snáší i uzení. Avšak citlivé jsou na pasterační teploty, kterými je lze relativně spolehlivě usmrtit. Optimální pH pro jejich růst je 6-7, inhibiční účinek má pH pod 4 a nad 8. Mají schopnost se množit v přítomnosti žluči, ale i ve venkovních podmínkách, např. čistá studniční voda, kde přežijí až několik týdnů (Havlík 2002; Votava et al. 2007; Bhunia 2018).

1.1.2 Taxonomie rodu *Salmonella*

Rod *Salmonella* je tvořen dvěma druhy, kterými jsou *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. Druh *Salmonella enterica* se dále dělí na 6 poddruhů *Salmonella enterica* ssp. *enterica*, *Salmonella enterica* ssp. *salamae*, *Salmonella enterica* ssp. *arizonae*, *Salmonella enterica* ssp. *diarizonae*, *Salmonella enterica* ssp. *houtenae*, *Salmonella enterica* ssp. *indica* (Issenhuth-Jeanjean et al. 2014).

Rozlišit poddruhy lze pomocí analýzy DNA nebo biochemickými charakteristikami. *Salmonely* jsou dále rozlišeny podle antigenů na sérotypy. Pro označení termínu sérotyp se používá také modernější termín sérovar. Sérotypizace, tj. zařazení salmonel k příslušnému sérotypu, je založena na sérologických diagnostických metodách, jakými jsou aglutinační testy. Těmi se posoudí složení a kombinace O, H a Vi antigenů (Rosický 1994; Votava et al. 2007). Somatický O-antigen je vázán v buněčné stěně a jedná se o lipopolysacharid. Flagelární H-antigen se nachází v bičících. Kapsulární Vi antigen je v pouzdru a má povahu polysacharidu. Vi antigen se vyskytuje pouze u sérotypů Typhi, Paratyphi a některé Dublin. Pro sérotypizace prováděné zpětnou aglutinací se používají speciální zvířecí séra. Na podložním sklíčku reaguje sérum se směsí čistého kmene salmonel a fyziologickým roztokem. Pozitivní výsledek testu je signalizován vytvořením aglutinátu, došlo tedy ke shodě sérotypu kmene s příslušným sérem (Rosický 1994; Bednář 1996; Macela 2006; Votava et al. 2007; Bednář et al. 2009).

Označení sérotypu se provádí ve třech částech. V té první se charakterizuje somatický O-antigen, který je označen arabskými číslicemi a má 12 různých typů. Poté se charakterizují H-antigeny první fáze, jejich označení je malými písmeny od a do z. Třetí část kódu je dána H-antigeny druhé fáze, které jsou označeny arabskými číslicemi 1 až 12. Pokud má salmonela více než jeden O-antigen je jeden z nich označen jako hlavní. Průkaz přítomnosti Vi antigenu se provádí pouze v případě podezření na sérotypy Typhi a Paratyphi C (Bednář 1996; Bednář et al. 2009).

Názvy dostávají sérotypy obvykle podle formule svých O:H antigenů, ale především u poddruhu *Salmonella enterica* ssp. *enterica* je velká část sérotypů pro zjednodušení pojmenována slovně např. podle zeměpisného místa první izolace. Při identifikaci bakterií rodu *Salmonella* je používán dokument White-Kauffmann-Le Minor schéma. Zde jsou zaznamenány a popsány dosud objevené sérotypy salmonel. V současnosti obsahuje přes 2 500 sérotypů (Popoff et al. 2004; Macela 2006; Dědičová & Karpíšková 2009). Podle kombinace O a H antigenů, u některých sérotypů Vi antigenu, je bakterie klasifikována do Whiteova-Kauffmannova-Le Minor schématu viz Tabulka 1 (Bednář 1996).

Tabulka 1: Část Whiteova- Kauffmannova-Le Minor schématu (Upraveno dle Bednář 1996)

	sérotyp	antigen O	antigen H	
			1. fáze	2. fáze
Skupina A (1, 2, 12)	Paratyphi A	1, 2, 12	a	
Skupina B (4, 5, 12)	Paratyphi B	4, 5, 12	b	1, 2
	Typhimurium	4, 5, 12	i	1, 2
Skupina C (6, 7)	Cholerasuis	6, 7	e	1, 5
	Paratyphi C	6, 7 - Vi	e	
Skupina D (9, 12)	Typhi	9, 12 - Vi	d	
	Enteritidis	9, 12	gm	
Skupina E (3, 10)	Anatum	3, 10	eh	1, 6

1.1.3 Patogenita

Hostitelsky specifické sérotypy salmonel vyvolávají onemocnění jen u některých konkrétních živočichů a pro jiné patogenní nejsou. Na rozdíl od toho hostitelsky nespecifické sérotypy jsou patogenní pro širokou škálu hostitelů. Zoopatogeny jsou hostitelsky specifické sérotypy, které jsou adaptovány pouze na jeden zvířecí druh a je jím například sérotyp Abortusovis. Ten je nebezpečný pro ovce a velmi často je příčinou potratů u těchto zvířat. Mezi další sérotypy této skupiny patří Gallinarum, který ohrožuje drůbež.

Mezi hostitelsky specifické antropogenní sérotypy patogenní pro člověka patří např. Typhi a Paratyphi B i C. K přenosu salmonel dochází z člověka na člověka nejčastěji prostřednictvím fekáliemi kontaminované vody a potravin. Výskyt bakterií se zvyšuje v oblastech se sníženou a omezenou hygienou. Sérotypy u lidí způsobují závažné nemoci, jakými jsou břišní tyfus a paratyfus.

Hostitelsky nespecifické sérotypy, primárně druh *Salmonella enterica*, u lidí nejčastěji způsobují onemocnění salmonelózu, což je gastroenterické alimentární onemocnění. Významnými sérotypy pro tuto skupinu jsou Typhimurium a Enteritidis. K přenosu dochází prostřednictvím bakteriemi kontaminovaných potravin (Votava 2003; Garrity et al. 2005; Macela 2006; Votava et al. 2007).

K překonání obranných mechanismů hostitele salmonelám pomáhá genetická výbava v podobě virulentních genů, které jsou umístěny na chromozomu v tzv. ostrovech patogenity. Ostrovy patogenity jsou velké genové části, které bakterie získala horizontálním přenosem sekvencí genetické informace od jiné patogenní bakterie a nesou velkou část genů, které jsou zodpovědné za produkci exotoxinů a endotoxinů. Endotoxin je lipopolysacharid (LPS), který se nachází v buněčné stěně gramnegativních bakterií. Je významný při kolonizaci střeva, invazi do hostitelské buňky a intracelulární replikaci. LPS chrání bakteriální buňku při působení buněk imunitního systému, žluči, antibakteriálních peptidů. Penetraci bakterií do eukaryotické buňky umožňují povrchové bílkoviny. Endotoxiny poškozují hostitele až ve chvíli, kdy dojde k uvolnění molekuly LPS z buněčné stěny. To může nastat během života bakterie, kdy dojde k oddělení malých částí nebo při její smrti (Bednář 1996; Macela 2006; Themes 2016; Cota García 2016).

Při porovnání s exotoxiny mají endotoxiny menší účinnost a menší aktivitu na svém substrátu. Jsou odolné vůči teple a relativně stabilní i při teplotě 250 °C po dobu jedné hodiny. Neprodukují antitoxiny a mají slabou schopnost imunogenity tj. navození tvorby protilátek (Vokurka & Hugo 2002; Giri 2021).

Exotoxiny jsou produkovány grampozitivními i gramnegativními bakteriemi. Jedná se o toxické bakteriální proteiny, konkrétně u salmonel je to cytotoxin, který ničí epiteliální buňky a enterotoxin. Bakterie tyto látky vylučují do okolního prostředí v průběhu jejich života rychlým růstem nebo během buněčné lýzy. Exotoxiny mají větší toxicitu než endotoxiny a hostiteli způsobují destrukci buněk nebo narušení normálního buněčného metabolismu. Mají extrémní imunogenitu a relativně dobře odolávají antitoxinem imunitního systému (Bednář 1996; Macela 2006; Themes 2016).

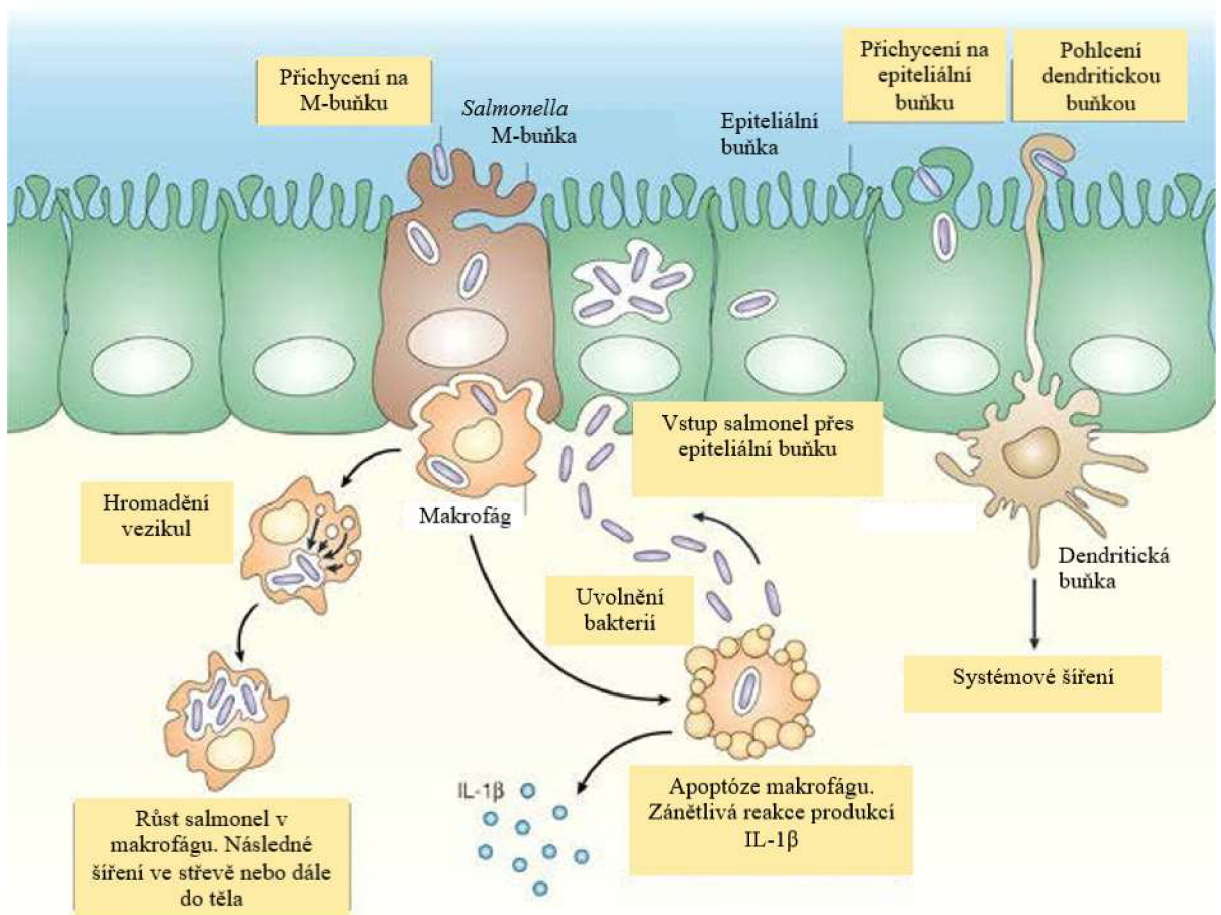
Dominantní ostrovy patogenity jsou označeny jako „*Salmonella pathogenicity island*“ (SPI). Na chromosomu spolu s nimi existuje i několik menších ostrůvků. SPI mají salmonely několik, ale pouze část z nich byla kompletně prozkoumána. Rozsah ostrovů se udává jednotkou délky DNA tzv. kilobase (kb). Velikost ostrovů se pohybuje v rozmezí 10 až 100 kb. Například prozkoumaný SPI-2 zahrnuje cca 40 genů, jeho rozsah je přibližně 40 kb a geny této oblasti jsou zodpovědné za fungování TTSS-2 (Type three secretion system tj. sekreční systém II. typu) a zajišťují tak vytvoření systémové infekce a přežití salmonel v makrofázích. Geny přítomné na SPI-2 kódují proteiny SpiC, SseF, SseG (Vokurka & Hugo 2002; Macela 2006; Gerlach & Hensel 2007; Nieto et al. 2016; Davis 2021).

1.1.4 Patogeneze

Bakterie rodu *Salmonella* mohou způsobovat dva typy onemocnění. Prvním nejčastějším typem jsou alimentární gastroenteritické salmonelózy, jejichž původcem jsou hostitelsky nespecifické sérotypy. Druhý typ jsou systémová (tyfoidní) onemocnění, které způsobují hostitelsky specifické sérotypy. U obou typů dojde nejprve k infekci salmonelami orální cestou a bakterie napadnou střevo. V případě gastroenteritické salmonelózy bakterie cílí na trávicí trakt a zůstávají v něm. U systémové infekce dochází po napadení střeva k šíření bakterií dál do těla a tělních orgánů. V ojedinělých případech se může stát, že i hostitelsky nespecifické salmonely, se budou šířit ze střeva do dalších orgánů. Alimentární gastroenteritické salmonelové infekce jsou jedny z nejčastějších střevních onemocnění nejen v České republice, ale i po celém světě (Rosický 1994; Beneš 2009).

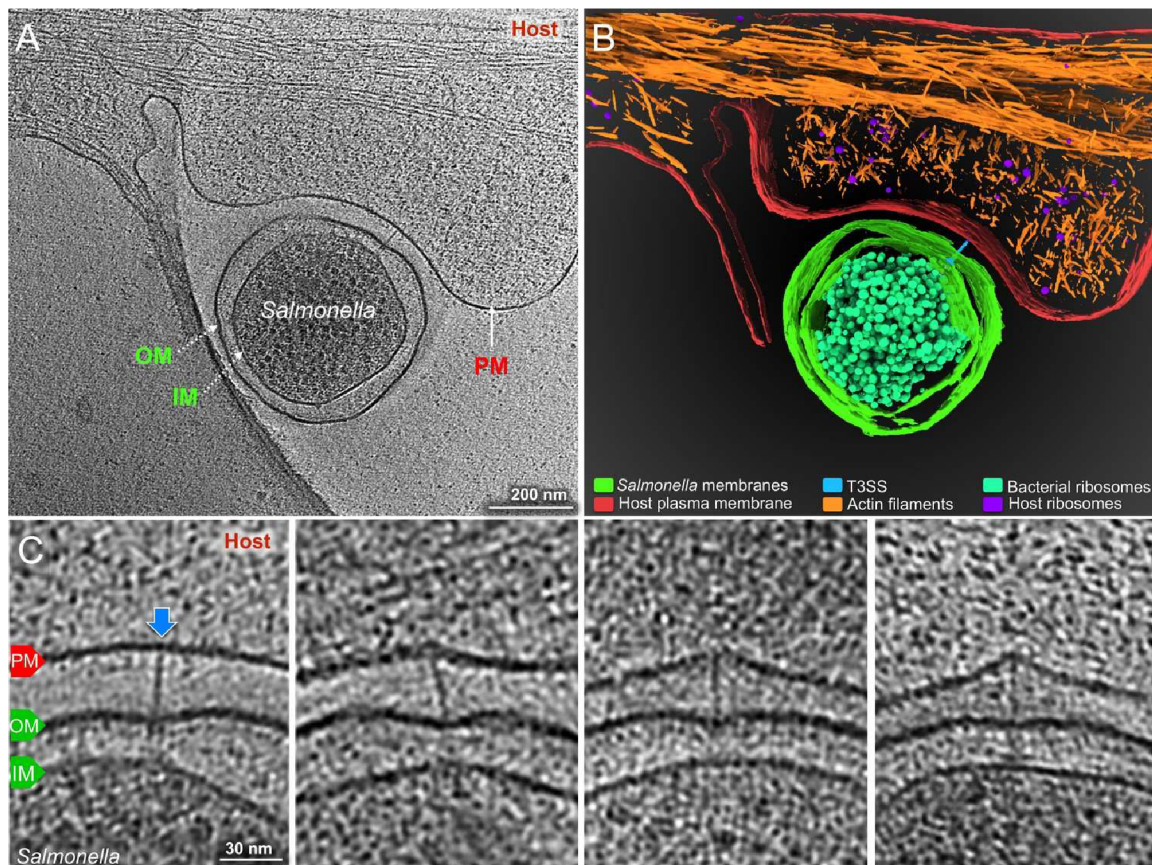
Salmonella enterica ssp. *enterica* Enteritidis a *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Typhimurium jsou nejčastější sérotypy, které způsobují gastroenteritické salmonelózy. K infekci dochází pozřením salmonelami kontaminované potraviny. Infekční dávka je cca 10^5 - 10^8 buněk. Velké množství bakterií je likvidováno nízkým pH žaludku (Havlík 2002; Votava et al. 2007).

Bakterie, které přežijí působení žaludečních šťáv se následně dostávají do tenkého střeva. V duodenu (dvanáctníku) jsou vysoké koncentrace žluči, která pomáhá trávení a může působit antibakteriálně. Nicméně jak již bylo uvedeno v kapitole 1.1.1 žluč na salmonely nemá likvidační účinky, a navíc jsou zde schopny se množit a jejím prostřednictvím se i přenášet. V této části střeva nejsou salmonelové bakterie ohroženy, a proto dále již snadno kolonizují střevo v oblasti distálního ilea (kyčelník). Zachytí se na povrchu epitelu střeva, na receptorech obsahující mannosu, což jim je umožněno velkým množstvím adhesinů. Jsou tři možné způsoby, kterými mohou salmonely proniknout do střevního epitelu viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Průnik salmonel střevním epitelem (Upraveno dle (Cota García 2016))

První způsob je prostřednictvím dendritických buněk, které jsou vmezeřeny mezi buňky epiteliální. Mají vystrčené své dendrity nad epitel a zachytávají střevní bakterie, jenž stahují na basolaterální stranu epiteliální výstelky. Tímto způsobem mohou být vtáhnuty i salmonely, a poté dochází k systémovému šíření. Další dva způsoby jsou prostřednictvím epiteliálních buněk a specializovaných M-buněk. Pro průnik bakterií do těchto dvou typů buněk jsou využity invazivní bílkoviny, které jsou do buněk vpraveny sekrečním systémem III. Typu, který je kódován na SPI-1. Přenos bílkovin je prostřednictvím tzv. injektomu, což je multiproteinový nástroj TTSS. Interakce injektomu TTSS a hostitelské buňky je detailně zachycena na Obrázek 3.



Obrázek 3: Vizualizace interakce salmonely pomocí TTSS s hostitelskou buňkou. Zachyceno kryoelektronovou tomografií (Park et al. 2018). OM= outer membrane (vnější membrána), IM= inner membrane (vnitřní membrána), PM= plasma membrane (plazmatická membrána)

Po vpravení invazivní bílkoviny se spustí buněčný aktin a dojde k zvlnění buněčného povrchu a bakterie mohou vstoupit do poškozené buňky. Významnou částí střevní slizniční imunity jsou tzv. Peyerovy pláty (PP). Jedná se o útvary, které obsahují nahromaděnou lymfatickou tkáň ve sliznici střeva a na povrchu jsou kryty M-buňkami. V případě, že došlo k zachycení salmonel M-buňkou, dojde k pohlcení makrofágem. Pokud bakterie proniknou přes nespecifické epiteliální buňky, jsou pohlceny neutrofilem tj. fagocytární vakuola. Intracelulární prostřední makrofágů a neutrofilů umožní bakteriím přežít, množit se, a především prostřednictvím makrofágů šířit se nejen ve střevě, ale i do dalších tělních orgánů. Salmonely napadené buňky poškodí nebo usmrtí vylučováním endotoxinu a exotoxinu. Následně se šíří do dalších střevních epiteliálních buněk, kterými postupně pronikají dále a poškozují stěnu střeva. Střevní sliznice se snaží o obranu, což se projeví zánětem, který ve střevě vytvoří nový luminální výklenek. Ve výklenku je snazší růst pro salmonely než pro rezidentní mikrobiotu střev. V důsledku zánětu se ve střevě hromadí tetrathionát ($S_4O_6^{2-}$), který salmonely dokáží využít ve svůj prospěch jako elektronový akceptor pro dýchání za účelem získání energie pro růst v zánětu střeva. To rezidentní mikrobiota tak efektivně nedokáže, a proto musí využívat méně účinné fermentační procesy. Projevem vytvořeného zánětu je podnícení tvorby cAMP (cyklický adenosinmonofosfát), průjem, zvýšená teplota (Vokurka & Hugo 2002; Votava et al. 2007; Šácha 2008; Beneš 2009; Cota García 2016; Kurtz et al. 2017; Bhunia 2018; Park et al. 2018).

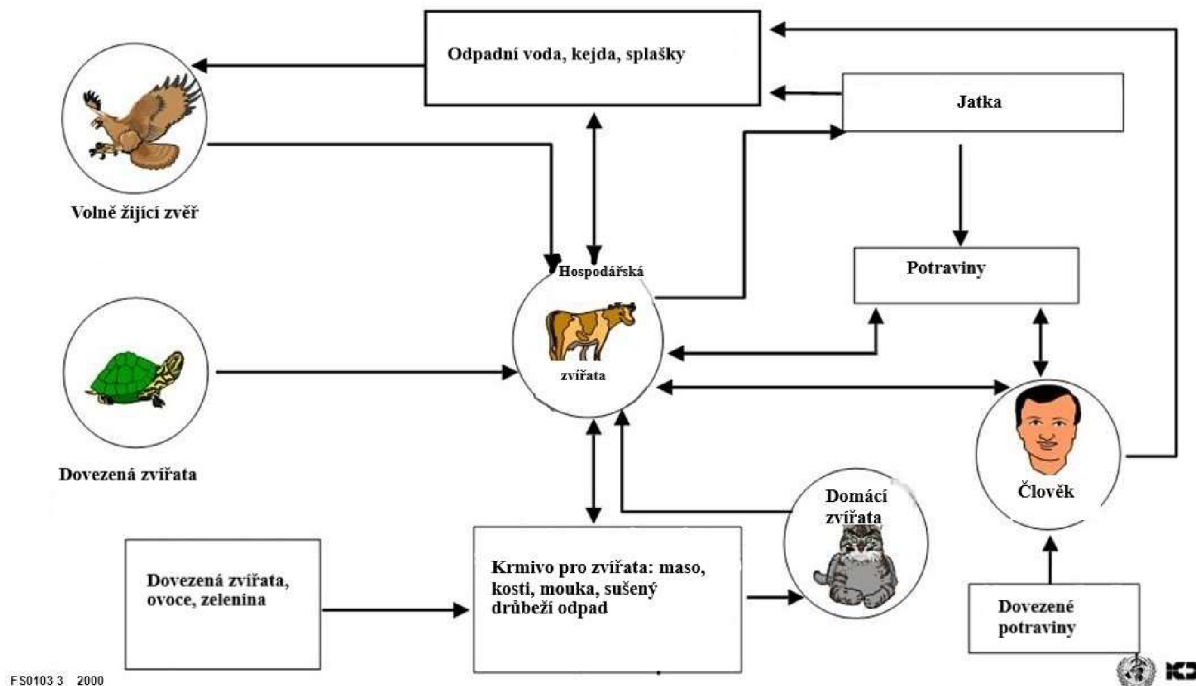
Příznaky gastroenteritické infekce se projeví cca 8 až 10 hodin po pozření kontaminované potraviny. Nakažený jedinec trpí nevolnostmi, zvracením, křečovými bolestmi v břiše a průjemem a v začátcích se může objevit vysoká horečka. Průjem a obtíže břicha mohou přetrvávat několik dnů, ale obvykle netrvá onemocnění déle než jeden týden. K vylučování stolice dochází i více jak desetkrát denně a často vede k dehydrataci. Léčba je proto založená na doplnění tekutin, podávání léků jako např. Endiaron, Smecta. Antibiotika se zpravidla nepoužívají, protože prodlužují vylučování salmonel stolicí (Rosický 1994; Havlík 2002; Beneš 2009).

Systémové onemocnění způsobené salmonelovými bakteriemi je odlišné v průběhu, ale i v šíření, protože původcem je pouze člověk. Tato onemocnění se nejčastěji vyskytují v rozvojových zemích s nedostatečnou hygienou např. Indie, Afrika. K šíření této formy onemocnění po celém světě přispívá turismus (Votava 2003; Votava et al. 2007; Walsh 2011).

Systémové onemocnění břišní tyfus a paratyfus A, B, C jsou způsobeny primárně antropogenními salmonelami. Jedná se např. o sérotypy *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Typhi, který způsobuje břišní tyfus nebo *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Paratyphi A, jenž způsobuje paratyfus A. Infekční dávka je cca 10^4 buněk. Jak již bylo výše uvedeno, po napadení střeva pronikají bakterie dále do těla například do jater, sleziny, kostní dřeně, krve nebo žlučníku. Ve žluči dochází k jejich pomnožení a žlučí, která putuje do střeva tak dochází k jeho opakované infekci. Likvidace salmonel ze žlučníku je velmi obtížná a v této souvislosti se hovoří o tzv. bacilonosičství. Systémová onemocnění se často léčí antibiotiky (Bednář 1996; Votava 2003; Macela 2006; Votava et al. 2007).

1.1.5 Šíření salmonel

Salmonelami kontaminované potraviny živočišného původu jsou nejčastější příčinou gastrointestinálních infekcí. K nákaze může docházet i prostřednictvím infikované vody, zeleniny, ovoce, kdy před pozřením nebyl dodržen správný hygienický postup. Existuje nespočet možných způsobů, kterými se salmonely mohou šířit v prostředí, mezi zvířaty až na potraviny, které člověk používá ke své výživě. Na Obrázek 4 je uvedeno schéma nejčastějších možností šíření salmonel (Dubanský 2008).



Obrázek 4: Schéma možnosti šíření salmonel (Upraveno dle York 2000)

Velkému riziku nákazy jsou vystaveni lidé, např. chovatelé, veterinární lékaři, kteří jsou v pravidelném blízkém kontaktu s nakaženými hospodářskými zvířaty. Ta vylučují salmonely výkaly, z kterých jsou bakterie schopny se dostat na prachové částice a vzduchem může dojít k přenosu na člověka. Významným ohniskem infekce je drůbež, především vodní, která se nakazí od volně žijících ptáků. Na to se velmi úzce váže riziko spojené s konzumací vajec, přičemž vejce vodní zvěře jsou rizikovější. V mnoha případech dochází k vzniku onemocnění při konzumaci nedokonale tepelně upravených vajec a výrobků z nich. Problematické jsou i tzv. křížové kontaminace, kdy při zpracování potraviny např. vejce si osoba po manipulaci s kontaminovanou skořápkou neočistí ruce a kontaktem s dalšími potravinami na ně bakterie přenáší. Obezřetnost je nutná i v případě mléka a mléčných výrobků, masa a masných výrobků, které nejsou dostatečně tepelně upravené nebo během jejich zpracování nebyla dodržena náležitá hygiena.

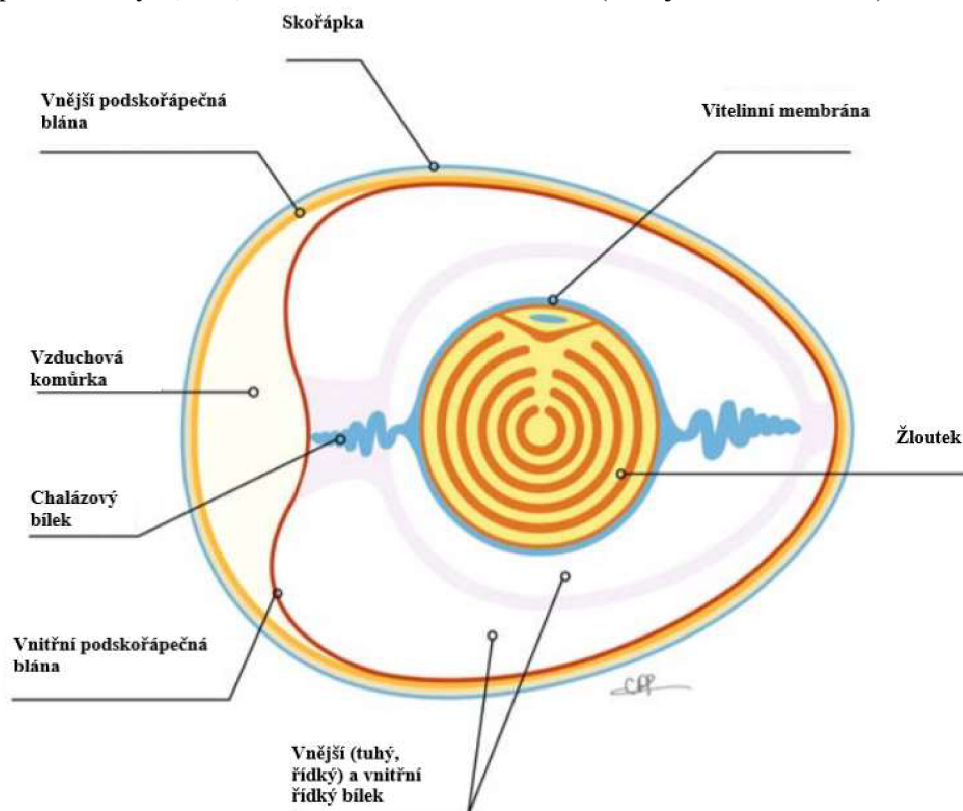
V letním období je vyšší nebezpečí zanedbání chlazení potravin, jakými jsou zmrzliny, lahůdkové saláty a vyšší teploty umožní salmonelám rychlé pomnožení do vysokých dávek. Globální obchodování je způsob, který také významně zasahuje do způsobu šíření bakterií, neboť se již kontaminované potraviny transportují do zcela jiné oblasti a tím se najednou rozšíří do několika míst zároveň. Výjimkou v možnostech nákazy nejsou ani zvířata chovaná v domácnosti, která mohou velmi snadno přenést bakterie na člověka (Rosický 1994; Votava 2003; Votava et al. 2007; Dubanský 2008).

Stavba a tvorba slepičích vajec

Tato kapitola zkráceně představí stavbu slepičích vajec a jejich tvorbu ve slepičím těle.

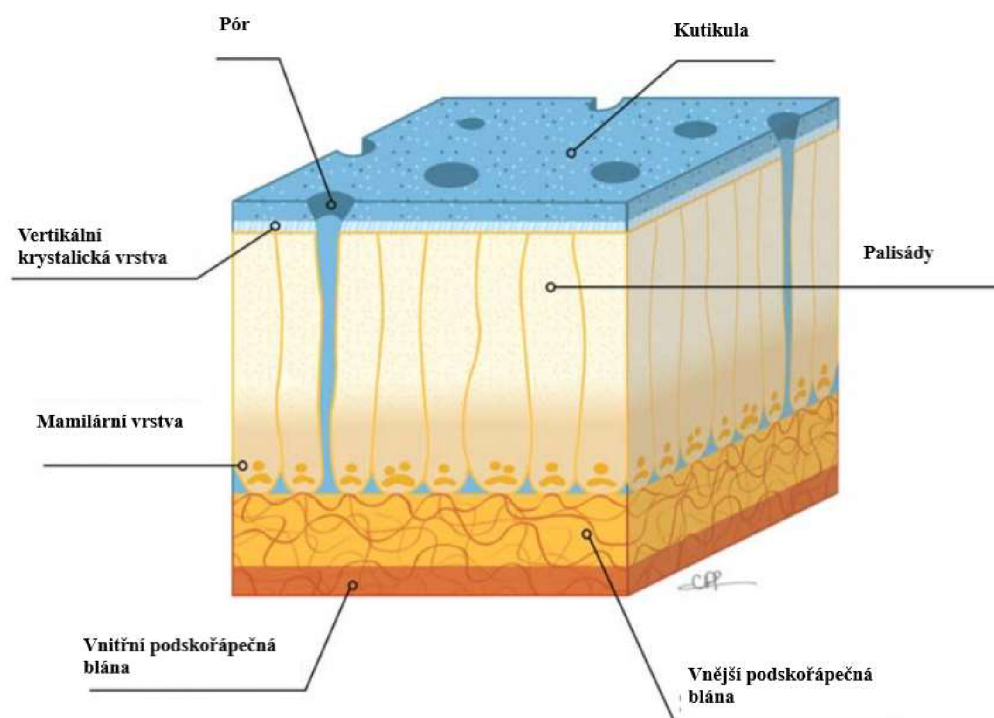
1.1.6 Stavba slepičího vejce

Slepičí vejce se skládá ze skořápky, podskořápečných blan, bílku a žloutku viz Obrázek 5. Hmotnost vajec je 53-73 g/ks. Z celkové hmotnosti vejce tvoří skořápka 9,5 %, podskořápečné blány 0,5 %, žloutek 30 % a bílek 60 % (Halaj & Golian 2011).



Obrázek 5: Stavba slepičího vejce (Upraveno dle Hincke 2012)

Skořápka je obalená kutikulou, tj. průhledná mucinózní blána, která má chránit vejce před nežádoucími mikroorganismy, usnadnit snášení, zabránit vypařování vody. Skořápka se sestává z vrstvy mamilární a palisádové viz Obrázek 6. Mamilární vrstva je tvořena organickou maticí a měkkými krystaly CaCO_3 (uhličitan vápenatý). Palisádová vrstva je tvořena sloupci tvrdého krystalu CaCO_3 . Tloušťka vaječné skořápky je cca 0,35-0,40 mm. Přítomné póry umožňují výměnu vzduchu mezi vejcem a okolním prostředím. Jsou rozmístěny nerovnoměrně a jejich počet je až 8 000, přičemž nejvíce se jich nachází na tupém konci vejce. Barva skořápky je dána barvivem ovoporfynem, který je obsažen ve vrchní palisádové vrstvě (Hincke 2012; Skládanka 2015).



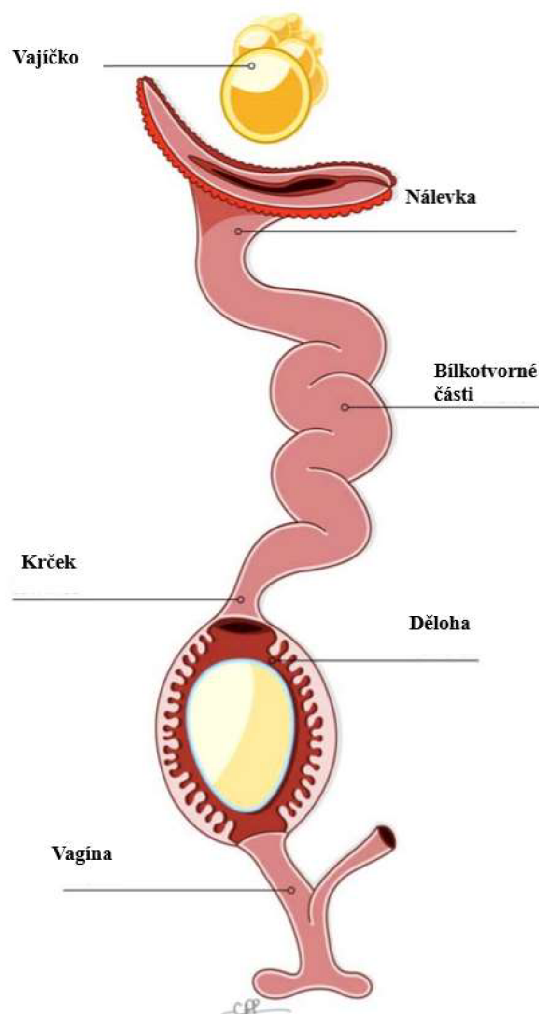
Obrázek 6: Stavba skořápky (Upraveno dle (Hincke 2012))

Bílek má funkci například zásobárny vody pro zárodek, ochrany žloutku a skládá se z bílku vnějšího tuhého (57 %), vnějšího řídkého (23 %), vnitřního řídkého (17 %) a chalázového (3 %). Je z 87 % tvořen vodou, 10 % proteinem a ve stopových množstvích jsou zde mimo jiné sacharidy a lipidy. Hlavními proteiny jsou ovoalbumin, ovoglobulin, ovomukoid. Dále enzym lysozym a glykoprotein ovotransferin. Tyto uvedené látky vytvářejí nevhodné prostředí pro růst bakterií, neboť je zde vysoké pH (cca 9) a většina mikroorganismů nemá proteázy nutné pro štěpení bílkovin (Míková 2010).

Žloutek má tvar koule a jeho povrch je tvořen pružnou a pevnou vitelinní membránou. Další jeho části jsou latebra, krček latebry a zárodečný terčík. Hlavní funkce žloutku je zásoba živin pro vývoj embrya. Je tvořen z 49 % vodou, 32 % lipidy, 17 % proteiny, 1 % sacharidy a 1 % minerálními látkami. V porovnání s ostatními částmi vejce nemá žloutek pod vitelinní membránou žádné obranné mechanismy proti nežádoucím mikroorganismům. Pokud dojde k proniknutí bakterií až do žloutku, vejce se rychle kazí (Míková 2010; Rehman & Haq 2011).

1.1.7 Tvorba slepičích vajec

Rozmnožovací soustava slepic je složena ze dvou vaječníků, nicméně funkční je pouze levý a má zajistit produkci vajíček, tj. samičích pohlavních buněk, konkrétně žloutku a také produkci hormonů (androgen, estrogen, progesteron). Vaječník je tvořen z velkého množství folikulů a každý z nich obsahuje vajíčko. Vejcovod je dlouhá, dobře prokrvená trubice, která ústí do kloaky. Jeho funkcí je zachycení ovulovaného vajíčka. Morfologické rozdělení je zachyceno na Obrázek 7 (Tuláček 2002; Damerow 2015).



Obrázek 7: Pohlavní soustava slepice (Upraveno dle (Hincke 2012))

V nálevce vejcovodu (*infundibulum*) se zachytí ovulované vajíčko, přičemž může dojít k oplodnění. Dochází zde také k tvorbě chalázového bílku. V bílkotvorné části (*magnum*) se rotačními pohyby chalázového bílku vytvoří další složky bílku, které se od sebe oddělí působící rotací. Část krčku (*isthmus*) slouží k tvorbě podskořápečných blan a tvorbě základu pro skořápku vytvořením prvních krystalů uhličitanu vápenatého. Blány jsou nejdříve spojeny a při jejich oddělení po snesení vzniká na tupém konci vzduchová komůrka. Děloha (*uterus*) je žláza, kde se tvoří skořápka a dochází zde k ukládání pigmentů. K nanesení kutikuly dochází v pochvě (vagině) a odtud vejce pokračuje do kloaky, přes kterou odchází pryč z těla (Tuláček 2002; Damerow 2015; Skládanka 2015).

Vliv způsobu chovu na kontaminaci slepičích vajec salmonelami

1.1.8 Způsob ustájení nosnic

V současné době se rozlišují 2 hlavní systémy chovu nosnic, kterými jsou klecové a alternativní. V systému klecových chovů se původně rozlišovaly konvenční a obohacené klece, ale od 1. 1. 2012 je zakázáno v členských zemích EU používat konvenční klece a je dovoleno používat pouze obohacené. Nicméně v září 2020 byl českými poslanci schválen zákaz

klecových chovů slepic v České republice a od roku 2027 zde nebude možné používat ani klece obohacené. Změna nastane i v rámci celé EU a bude se vztahovat i na jiná zvířata než drůbež. Na konci června 2021 na základě evropské občanské iniciativy „Konec doby klecové“ se Evropská komise zavázala, že do konce roku 2023 předloží legislativní návrh na postupné ukončení a definitivní zákaz používání klecových systémů pro všechna zvířata uvedené v této iniciativě (Englmaierová 2016; Toman 2020; Vlková 2021).

Obohacené klecové systémy byly donedávna považovány za přijatelnější variantu, protože jsou oproti konvenčním klecím větší. Minimální rozměr jedné obohacené klece musí být 2 000 m² s podlahovou plochou 750 cm² na slepici, výška klece musí splňovat 45 cm na celé ploše, sklon podlahy nesmí být větší než 8 °. Dále musí klec obsahovat krmítko s délkou 12 cm na nosnici a dvě napáječky. Dále je zde vybavení jako hřady (15 cm/nosnici), snášková hnízda, popeliště, zařízení na obrušování drápů, které nosnicím umožňují přirozené druhové chování. Konstrukce klece umožňuje zachovat dobré hygienické podmínky nejen nosnicím, ale i sneseným vejcím kdy kontakt zvířete či vejce s výkaly je zde omezen na minimum. V těchto systémech ustájení byly zaznamenány nižší koncentrace prachu a kontaminantů ve vzduchu. Kladnými stránkami klecových chovů jsou nízké náklady na produkci, vysoký stupeň mechanizace, dobrá kontrola zdravotního stavu zvířat a dobrá kvalita vajec (Tůmová 2007; Stupka 2013; Englmaierová 2016).

Do alternativních systémů chovu jsou řazeny následující systémy: podestýlka, free-range, voliéry a ekologické (bio) chovy. Zvířata v těchto chovech mohou lépe vyjadřovat své přirozené chování a relativně volně se pohybovat. Nicméně nosnice jsou více stresovány sociálním složením hejna, přístupem k vodě a krmivu. U systémů ustájení, kde mají slepice možnost výběhu, je vysoké riziko vzniku onemocnění, které vzniká kontaktem s volně žijícími zvířaty. Je zde také zvýšený výskyt zevních i vnitřních parazitů, onemocnění zažívacího a dýchacího aparátu, salmonelózy, koli-infekcí a kanibalismu. Další významný nedostatek je, že nelze zabránit kontaktu slepic a trusu, a tak snadno dochází ke znečištění vaječné skořápky (Tůmová 2007; Brouček et al. 2011).

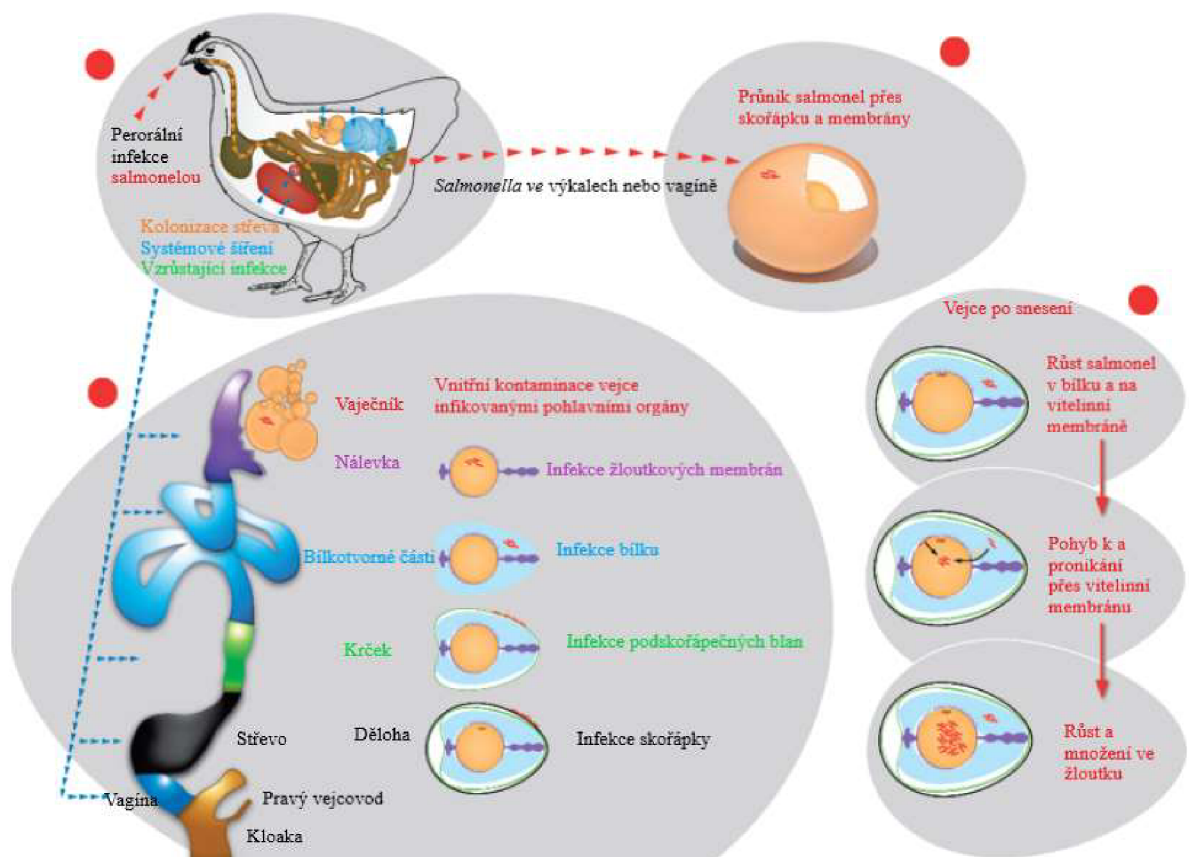
Chov na podestýlce probíhá v halách, kde musí být pokryta minimálně 1/3 podlahové plochy haly podestýlkou, která má vysokou absorpční schopnost. Stelivem jsou nejčastěji dřevěné piliny či hobliny. Podestýlka zůstává v hale po celý čas chovu a při naskladnění se vrství do 10-15 cm. Hustota osazení hal je maximálně 7 nosnic na 1 m², velikost skupiny maximálně 5 000 kusů. Nosnicím musí být k dispozici hřady, 1 kapátková napáječka na max. 10 nosnic, snášková hnízda s koncentrací max. 7 nosnic na 1 hnízdo. Pro free-range chov tj. chov na podestýlce v kombinaci s volným výběhem jsou požadavky na vybavení haly stejné, jako pro ustájení slepic na podestýlce. Možnost slepic opustit halu umožňuje jejich přirozené chování. Aby nosnice neutekly a bylo zamezeno vstupu zvířat zvenčí, musí být výběhy oploceny. Pro přístup nosnicím do výběhu jsou zařízení průlezy s výškou 35 cm a šířkou 40 cm, přičemž na každých 1 000 nosnic musí být 2 metry průlezů. Venkovní plocha výběhu musí splňovat 4 m² na 1 slepici a nejčastěji se jedná o travnaté výběhy. Obdobné podmínky pro vybavení hal a výběhů jako u free-range chovů platí pro ekologické chovy. Výběhy musí být výhradně travnaté. Zásadní rozdíl je v krmivu, kdy nosnice mohou být krmeny pouze krmnými směsmi, které jsou produktem ekologického zemědělství (Skřivan 2000; Matoušek 2013).

Voliéry (aviary) jsou kombinací klecového chovu a chovu na podestýlce. Jedná se o dvou až čtyř podlažní (etážové) baterie různých řešeních klecových konstrukcí bez dělicích přepážek a

dvířek. Je zde tak umožněn volný pohyb a biologické projevy nosnic. Více podlažní systém umožňuje chovat vyšší počet slepic než v klasických podestýlkových chovech, a to až 20 nosnic na 1 m². V jednotlivých etážích musí být zařízena krmítka (10 cm na 1 nosnici), napáječky (1 kapátková napáječka pro maximálně 10 nosnic), hřady (15 cm pro 1 nosnici) a snášková hnízda (7 nosnic na 1 hnízdo). Prostor pro hrabání a popelení je umožněn na podestýlkové podlaze v uličkách mezi řadami klecí (Brouček et al. 2011; Matoušek 2013). Systém voliér je neustále vylepšován a jedny z nejnovějších modelů mají zaručovat maximální volnost pohybu nosnic a na základě automatizovaného a počítačově řízeného provozu zde mohou být vylepšeny například systémy napájení, krmení, sběru vajec, klimatizace a čistících systémů (Tecno 2021).

1.1.9 Horizontální a vertikální přenos

Existují dva způsoby, kterými jsou salmonely schopné kontaminovat vejce, a to horizontálním nebo vertikálním přenosem. Obě možnosti jsou popsány na Obrázek 8. Bylo provedeno několik studií, které se zabývaly problematikou obou přenosů, ale nebylo jasné prokázáno, který přenos je častější. Velmi komplikované je i přesně identifikovat, kterým způsobem došlo k infekci vejce.



Obrázek 8: Horizontální a vertikální přenos salmonel (Upraveno dle Gantois et al. 2009)

Horizontální přenos spočívá v průniku bakterií z vnějšího prostředí přes skořápku vejce. K tomu může dojít už v těle slepice v salmonelami infikované vagíně nebo kloace. Po ovipozici může ke kontaminaci skořápky dojít prakticky kdekoliv a záleží na podmínkách okolního prostředí, především hygieně chovu. V případě vertikálního přenosu dochází k přímé

kontaminaci žloutku, bílku a podskořápečných blan infikovanou rozmnožovací soustavou slepice ještě před ovipozicí. Kolonizaci rozmnožovacích orgánů salmonelám umožňují virulentní faktory, který byly zmíněny v podkapitole 1.1.3. Systémová infekce slepice vznikne způsobem, který byl popsán v části 1.1.4. Pro pohyb bakterií jsou důležité bičíky, a to jak na povrchu vejce, tak v jeho obsahu.

Při kontaminaci vejce salmonelové bakterie nezpůsobí jeho znatelné změny. Snahou mikroorganismů je proniknout ke žloutku, který je bohatý na živiny. Žloutek je chráněn fyzickými a chemickými bariérami. Fyzické jsou 3 a jsou jimi kutikula, skořápka a podskořápečné blány. Jejich spolehlivost je dána faktory jako je například tloušťka a struktura. Mezi chemické bariéry, které se nachází především v bílku patří například antibakteriální složky protein ovotransferin, enzym lysozym a proteinázové inhibitory ovomukoid, ovostatin aj. Významný je především ovotransferin, který funguje několika způsoby. V podskořápečných blánách a kalcifikovaných vrstvách skořápky působí jako bakteriostatický filtr a zároveň přímo v bílku chelatuje uvolněné železo, které tak není k dispozici bakteriím (Ibrahim et al. 2000; Messens et al. 2006; Gantois et al. 2008, 2009; Martelli & Davies 2012).

1.1.10 Sérotypy salmonel uvnitř a na povrchu slepičích vajec

Nejčastější sérotyp, který se vyskytuje v souvislosti se slepičími vejci je *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Enteritidis a to v 77 % případů. Je to dáno především tím, že narozdíl od ostatních sérotypů zvládá bez větších problémů oba způsoby přenosu. Dalším významným sérotypem je *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Typhimurium. Infekce vajec tímto sérotypem je spojena především s horizontálním přenosem, a proto je jeho výskyt 3,5 %, tedy výrazně nižší. Ve zbylých 19,5 % se jedná o sérotypy, které jsou spojeny hlavně s horizontálním přenosem a jsou jimi například *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Hadar, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Infantis, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Virchow, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Heidelberg, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Mbandaka, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Livingstone, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Kentucky, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Sofia (Gantois et al. 2008, 2009; Martelli & Davies 2012).

1.1.11 Salmonely v chovech drůbeže

Jelikož salmonelami nakažená zvířata jsou často bez klinických příznaků, je těžké infekci odhalit. Je tedy nezbytné provádět pravidelná testování. Česká Státní veterinární správa provedla monitoring zoonózy v roce 2020, ve kterém byly vzorky u drůbeže odebírány z kůže z krku, u skotu a prasat byly provedeny stěry z jatečně upravených těl pomocí abrazivní houbičky. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 2. Ačkoliv je počet odebraných vzorků u brojlerů nižší než u skotu a prasat, počet pozitivních vzorků je u brojlerů výrazně vyšší (Státní veterinární správa 2021a).

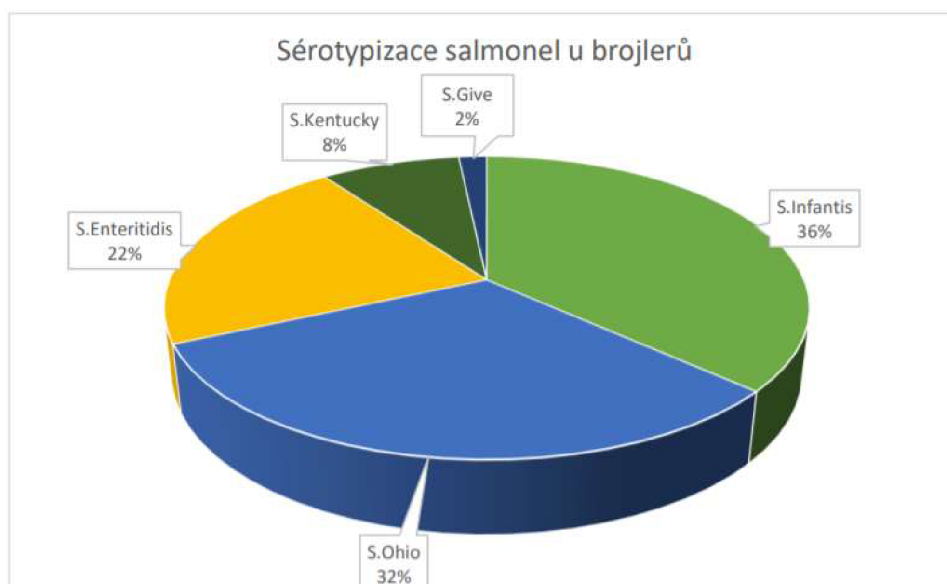
Tabulka 2: Výsledky monitoringu *Salmonella* ssp. v roce 2020 (Upraveno dle Státní veterinární správa 2021a)

Druh zvířete	Počet odebraných vzorků	Počet odebraných šarží	Počet pozitivních šarží	Počet pozitivních vzorků	% pozitivních vzorků
Skot	2858	750	8	10	0,35
Prasata	4562	1337	20	37	0,81
Brojler	1035	207	24	60	5,8
Krůty	335	67	3	5	1,49

Následně byla provedena i sérotypizace pozitivně testovaných vzorků. Výsledky jsou zaznamenány v Tabulka 3 a na grafu Obrázek 9. Nejznámější sérotyp v souvislosti s chovy drůbeže *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Enteritidis zde nebyl zastoupen nejvíce a nejčastěji se jednalo o sérotyp *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Infantis.

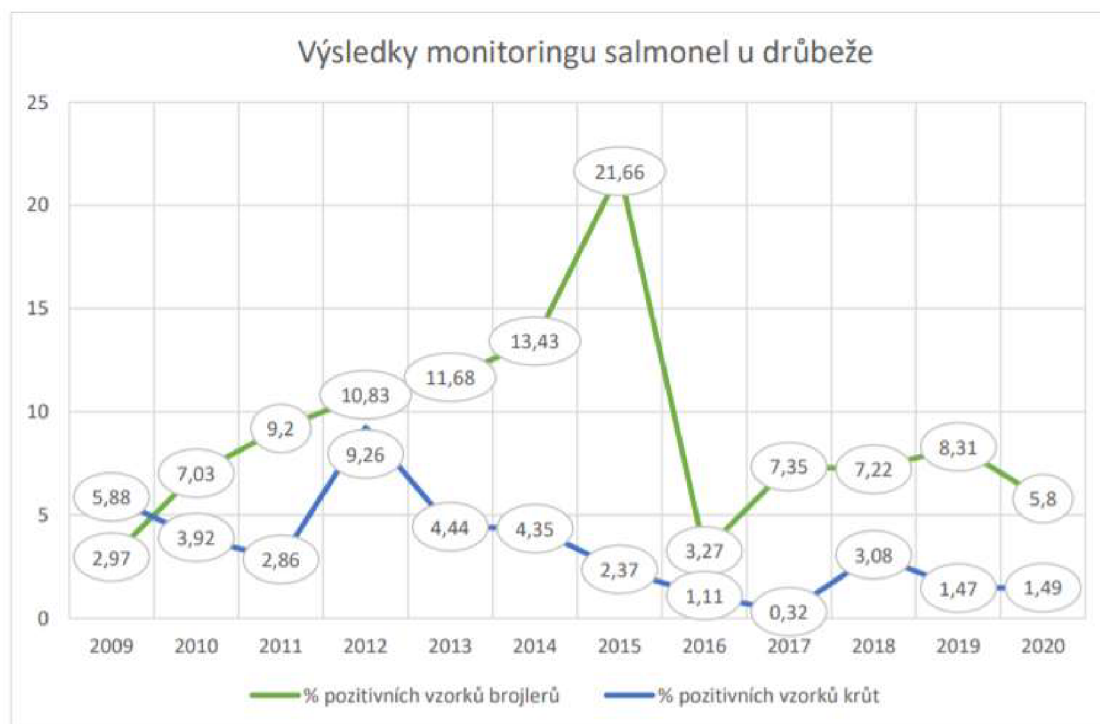
Tabulka 3: Výsledky sérotypizace salmonel u brojlerů v roce 2020 (Upraveno dle Státní veterinární správa 2021a).

Sérotyp	Počet pozitivních vzorků
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Infantis	22
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Ohio	19
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Enteritidis	13
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Kentucky	5
<i>Salmonella enterica</i> ssp. <i>enterica</i> Give	1



Obrázek 9: Výsledky sérotypizace salmonel u brojlerů v roce 2020 (Státní veterinární správa 2021a).

Stálá přítomnost salmonel v drůbežích chovech je potvrzena i na grafu Obrázek 10. Zde je porovnávána míra výskytu salmonel pozitivních vzorků krůt a brojlerů mezi roky 2009 a 2020. Je patrné, že výskyt salmonel byl vždy vyšší v chovech brojlerů. Od roku 2016 je situace bez větších výkyvů, nicméně maso a vejce těchto zvířat nelze vyloučit z rizikové skupiny potravin (Státní veterinární správa 2021a).



Obrázek 10: Výsledky monitoringu salmonel u drůbeže (Státní veterinární správa 2021a)

V podestýlce nebo trusem kontaminované půdě mohou být salmonely infekční půl roku i déle, v samotném drůbežím trusu až 28 měsíců. Prach z líhni a peří může být zdrojem infekce i několik let. Zásadní pro omezení výskytu salmonel, ale i jiných nežádoucích mikroorganismů, je tedy hygiena chovu. Následně se tak sníží i riziko kontaminace potravin. Dohoda Ministerstva zemědělství a Státní veterinární správy, ve spolupráci s chovateli umožnila vytvářet od 1. 1. 2007 tzv. Národní programy tlumení výskytu salmonel v chovech drůbeže. Snahou tohoto programu je zamezit výskytu nebo podchytit šíření sérotypů salmonel v drůbežích chovech, které mají dopad na veřejné zdraví. Pro rok 2021 jsou vydané a platné „Národní programy tlumení salmonel- Metodika kontroly zdraví a nařízené vakcinace na rok 2021“. Dílčí programy se zabývají vakcinací, ošetřením zvířat, správnou hygienickou praxí chovu, vyhovujícími požadavky pro nosné a masné chovy a odběrem vzorků pro laboratorní vyšetření. Sledované sérotypy pro programy ve výkrmech a chovech nosnic pro produkci konzumních vajec jsou *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Enteritidis a *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Typhimurium. V případě reprodukčních chovů do sledovaných sérotypů spadá ještě *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Infantis, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Hadar, *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Virchow. V chovech nosnic s produkcí konzumních vajec je v současné době povinná pouze vakcinace proti *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Enteritidis.

Evropskou legislativou jsou pro výše uvedené sérotypy určeny hodnoty prevalence (tzv. cíle), kterých má být dosaženo a následně mají být udrženy. Cílová prevalence pro reprodukční chovy a výkrmny je 1 %, pro chovy nosnic s produkcí konzumních vajec 2 %. V případě chovů nosnic pro konzumní vejce testovaných pozitivně na výskyt sérotypů Enteritidis a Typhimurium je hejno buď poraženo, nebo pokračuje ve snášce vajec, která jsou dále určena pouze na tepelné zpracování. Je zakázáno je poskytovat na trh jako vejce třídy A. Toto opatření je v platnosti, dokud je výskyt salmonel potvrzen nebo vyloučen výsledkem vyšetření úředního vzorku (Ježková 2017; Semerád 2019; Státní veterinární správa 2021b, 2021c).

V roce 2020 byla prevalence sledovaných sérotypů v chovech nosnic pro produkci konzumních vajec 3,6 %, což je nejvyšší zjištěná prevalence za posledních deset let a cíl stanovený evropskou legislativou nebyl splněn. Pozitivně testovaných na sérotyp Enteritidis bylo 17 hejn v 10 chovech. Jednalo se o 6 hejn v obohacených klecích, 7 hejn ve voliére a 4 hejna v ekologickém chovu. Vývoj výskytu salmonel v chovech nosnic pro konzumní vejce v letech 2015-2020 je zachycen na grafu Obrázek 11 (Státní veterinární správa 2021c).



Obrázek 11: Výskyt salmonel v chovech nosnic pro konzumní vejce v letech 2015-2020 (Státní veterinární správa 2021c)

Legislativa a indikátorové mikroorganismy v potravinářství

Obecná mikrobiologická kritéria pro potraviny jsou uvedena v Nařízení komise (ES) č. 1441/2007. Zde je v kritériích bezpečnosti potravin pro rod *Salmonella* stanoveno, že ve 25 gramech potraviny nesmí být přítomna ani jedna buňka bakterie tohoto rodu. Jako návod pro stanovení a aplikaci mikrobiologických kritérií pro potraviny v jakémkoliv stádiu potravinového řetězce (prvovýroba až konečný spotřebitel) je vytvořena ČSN 56 9609 (569609) Pravidla správné hygienické a výrobní praxe-Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Zde jsou stanoveny nejvyšší mezní hodnoty pro bakteriální původce onemocnění z potravin i nejvyšší mezní hodnoty pro toxické produkty mikroorganismů. Pro rod *Salmonella* v potravinách pro přímou spotřebu platí stejná limitní hodnota jako ve výše zmíněném Nařízení komise (ES).

Slepičí vejce jako nezpracovaná surovina či potravina živočišného původu by tyto limitní hodnoty měla splňovat a v ideálním případě by se salmonelami infikovaná vejce neměla na trhu objevovat. Zároveň je nereálné testovat každý jednotlivý kus před jeho vstupem do prodejního oběhu, a tak jsou slepičí vejce rizikovou potravinou. Je nezbytné neopomenout, že kromě salmonel se na slepičích vejcích objevuje celá řada mikroorganismů, a je tak žádoucí sledovat celkové mikrobiální osídlení. K výběru mikroorganismů, které dále sledovat jsou velmi často využívány tzv. Indikátorové mikroorganismy.

Indikátorové mikroorganismy jsou pro odvětví zemědělské prvovýroby a potravinářského průmyslu rozděleny na 2 hlavní skupiny viz Tabulka 4. Tyto vytipované skupiny mikroorganismů mají zásadní vypovídací hodnotu ohledně mikrobiální kvality testovaných vzorků (Cupáková et al. 2010).

Tabulka 4: Rozdělení indikátorových mikroorganismů (Upraveno dle Cupáková et al. 2010)

Mikroorganismy informující o primární a sekundární kontaminaci surovin, potravin, výrobních ploch a dodržení správné výrobní praxe	Mikroorganismy informující o kažení potravin
celkové počty mikroorganismů (CPM)	počet kvasinek a plísní
počet bakterií čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	počet aerobních sporotvorných bakterií
počet koliformních bakterií	počet anaerobních sporotvorných bakterií
počet <i>Escherichia coli</i>	počet proteolytických a lipolytických bakterií
počet enterokoků	počet bakterií rodu <i>Proteus</i>
počet psychrotrofních bakterií	
počet termorezistentních bakterií	
počet termofilních bakterií	

Pozornost je tak kromě salmonel věnována stanovení celkového počtu mikroorganismů, počtu koliformních bakterií, *Escherichia coli*, *Enterococcus*. Jedná se o mikroorganismy, které člověku způsobují různě závažná onemocnění a je tedy žádoucí rizika infekce snížit na minimum. Současně se tyto bakterie velmi často vyskytují v drůbežích chovech (Tůmová et al. 2010). Stanovení uvedených mikroorganismů bylo předmětem i praktické části této diplomové práce.

Celkovým počtem mikroorganismů se stanoví počet mezofilních aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů (bakterie, kvasinky, plísně). Tyto mikroorganismy jsou kultivovány aerobně na neselektivních nutričně bohatých agarových půdách nebo v bujónech při 30 °C, 72 hodin. Takto provedeným stanovením mikroorganismů se lze nejlépe přiblížit absolutnímu celkovému počtu přítomných mikroorganismů a zjistit tak stupeň znečištění analyzovaného vzorku. Pro stanovení CPM může být využita platná ČSN EN ISO 4833-1 (560083) Mikrobiologie potravinového řetězce-Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů-Část 1: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C.

Počtem koliformních bakterií jsou stanovovány aerobní či fakultativně anaerobní gramnegativní nesporeující tyčinky, které patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Zkvašují laktózu, vytváří kyseliny a plyny při kultivaci na selektivních půdách při teplotách 30 °C (při stanovení v potravinách), 37 °C (při stanovení pro ochranu zdraví), 44,5 °C (při stanovení

kmenů pouze intestinálního původu) do 48 hodin. Tato skupina mikroorganismů slouží jako významný indikátor fekálního znečištění a indikátor dodržení sanitačního a technologického postupu. Pro stanovení koliformních bakterií je vytvořena současně platná ČSN ISO 4832 (560085) Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií-Technika počítání kolonií.

Významným představitelem koliformních bakterií je druh *Escherichia coli*, který současně patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. *Escherichia coli* jsou fakultativně anaerobní krátké rovné tyčinky. Velká část tohoto druhu je pohyblivá a vytváří slizová pouzdra. Až na určité výjimky tyto bakterie zkvašují laktózu a vytváří kyseliny a plyny. Pro stanovení *Escherichia coli* jsou využívány selektivní chromogenní média a teploty 44-45 °C, 24 hodin. Bakterie tohoto druhu slouží jako indikátor čerstvého fekálního znečištění. Pro stanovení může být využita platná část ČSN ISO 16649-2 (560079) Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu β -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*-Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-glukuronidu.

Bakterie rodu *Enterococcus* také spadají do čeledi *Enterobacteriaceae* a jedná se o grampozitivní koky, které se vyskytují v krátkých řetízcích nebo ve dvojicích. Jejich podmínky kultivace jsou v rozmezí 10-45 °C a 24-48 hodin. Rod se uplatňuje jako indikátor fekálního znečištění. Pro stanovení enterokoků je vytvořena platná ČSN EN 15788 (467049) Krmiva-Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* (*E. faecium*) (Cupáková et al. 2010).

Pro významného zástupce patogenních bakterií rod *Salmonella*, jehož charakteristika byla podrobně rozepsána v podkapitole 1.1.1, je zavedena platná ČSN EN 6579-1 (560088) Mikrobiologie potravinového řetězce-Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu *Salmonella*-Část 1: Průkaz bakterií rodu *Salmonella*.

Metodika

Cílem praktické části bylo stanovit celkovou mikrobiální kontaminaci a výskyt salmonel na slepičích vejcích. Uvedená metodika probíhala a vycházela ze základu norem ČSN ISO a ČSN EN ISO, které jsou uvedeny v části Legislativa a indikátorové mikroorganismy v potravinářství. Postupy byly pro tuto diplomovou práci upraveny.

Pro analýzu byla použita vejce slepic chovaných volně v rámci bio chovu, slepic ustájených formou free-range a ve voliérách. Vzorky pocházely celkem ze 3 farem. Ve všech farmách byly chovány slepice hybrida Lohmann brown. Z těchto farem byly také odebírány a analyzovány vzorky slepičího trusu. Odběr byl na jednotlivých farmách proveden ve stejný den jako slepičích vajec. Celkové počty odebraných vzorků pro dané farmy a systémy ustájení jsou uvedeny v Tabulka 5.

Tabulka 5: Celkové počty vzorků

Farma	Systém ustájení	Počty vzorků	
		Slepičí vejce	Trus
1	voliéra typ A	44	15
	voliéra typ B	45	15
2	voliéra	30	10
	free-range s voliérou	45	15
	bio chov	45	15
3	voliéra	15	5

Kultivační stanovení mikroorganismů

Vzorky slepičích vajec byly z farmy do laboratoře transportovány v čistých kartonových proložkách. Stanovovány byly celkové počty mikroorganismů (CPM), *Escherichia coli* a ostatní koliformní bakterie, bakterie rodu *Enterococcus* a *Salmonella*. Každý vzorek slepičího vejce byl jednotlivě vložen do sterilního igelitového sáčku, do kterého bylo přidáno 10 ml fyziologického roztoku s peptonem (9 g NaCl, 1 g Peptone (Oxoid) 1000 ml dH₂O). Zde byl vzorek cca 30 vteřin důkladně omýván. Následně byl roztok přelit zpět do zkumavky a byla vytvořena desítková ředící řada do ředění 10⁻⁶. Naředěné vzorky byly od nejvyššího ředění pipetovány na Petriho misky. Při kultivaci byly misky v termostatech uloženy dnem vzhůru.

Pro stanovení celkového počtu mikroorganismů byl použit Standard plate count agar (1 g glukosa, 5 g Tryptone (Oxoid), 9 g Technical agar (Oxoid), 2,5 g Yeast extrakt (Oxoid), 1000 ml dH₂O) a ředění 10⁻² až 10⁻⁶. Na Petriho misku bylo pipetováno 0,5 ml z příslušného ředění a zalito výše uvedeným agarem. Kultivace probíhala aerobně při 30 °C, 72 hodin. Po uplynutí doby kultivace byly celkové počty mikroorganismů na agaru hodnoceny jako všechny narostlé bílé kolonie.

Stanovení bakterií rodu *Enterococcus* bylo provedeno na Slanetz-Bartley agaru (Oxoid). Použito bylo ředění 10⁻¹ až 10⁻³. Na Petriho misku s již předem připraveným zatuhlým agarem bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění, které bylo rozetřeno po povrchu sterilní

mikrobiologickou hokejkou. Kultivace probíhala aerobně při 44 °C, 48 hodin. Po uplynutí doby kultivace byly enterokoky na agaru odečítány jako typicky kaštanové kolonie.

Koliformní bakterie a *Escherichia coli* byly stanovovány na T.B.X. (Tryptone Bile X-Glucuronice) mediu (Oxoid), ředění 10^{-1} až 10^{-4} . Použity byly opět Petriho misky s již předem připraveným zatuhlým agarem a bylo pipetováno 0,1 ml příslušného ředění, které bylo rozetřeno po povrchu sterilní mikrobiologickou hokejkou. Tyto misky byly kultivovány aerobně při 37 °C, 24 hodin. Po uplynutí doby kultivace byly na agaru hodnoceny koliformní bakterie jako počet bílých kolonií a bakterie *Escherichia coli* byly odečítány jako modré kolonie, případně jako bílé kolonie s modrým středem.

Pro stanovení salmonel byly využity malé Erlenmeyerovy baňky s 50 ml Rappaport-Vassiliadis bujónu (Oxoid), do kterého byl převeden zbylý obsah zkumavky (9 ml) prvního ředění (10^{-1}). Kultivace probíhala aerobně při 37 °C, 6 dní. Po uplynutí doby kultivace byly vzorky, které v bujónu změnilly barvu z modré na žlutou, vytřeny pomocí sterilní kličky ve tvaru hada na již připravený zatuhlý Salmonella Shigella (S.S.) agar. Tyto misky byly ponechány aerobní kultivaci při 37 °C, 24 hodin. V případě, že po uplynutí doby kultivace došlo na S.S. agaru k vytvoření černých kolonií, byly vybrané kolonie přeočkovány na již připravený zatuhlý agar Trypton soya agar (Oxoid) pomocí sterilní kličky. Tyto vzorky byly ponechány opět aerobní kultivaci při 37 °C, 24 hodin. Definitivní potvrzení či vyvrácení přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* bylo provedeno latexovým aglutinačním testem (Oxoid *Salmonella* Test Kit). Vybraná kolonie narostlá na Trypton soya agaru byla kličkou přenesena na spot s připraveným roztokem testu. Kolonie zde byla pečlivě rozetřena. Vytvoření aglutinátu potvrdilo přítomnost bakterií rodu *Salmonella*.

Vzorky čerstvého trusu byly na farmě asepticky převedeny do anaerobní sterilní zkumavky, která obsahovala roztok skládající se z Nutrient Broth No. 2 (5 g, Oxoid), Tryptone (5 g, Oxoid), Yeast extrakt (2,5 g, Oxoid), Tween (0,5 ml, Sigma-Aldrich) a L-cysteine (0,25 g, Sigma-Aldrich), 1 000 ml dH₂O. Vzorky byly v průběhu transportu chlazeny ledem a do analýzy skladovány při 4 °C. Před samotným začátkem analýzy byly zkumavky pomocí vortexu pečlivě homogenizovány. Následně byla pro každý vzorek vytvořena ředící řada do hodnoty 10^{-9} . Množství (ml), které bylo převáděno z prvního ředění 10^{-1} do 10^{-2} bylo vypočítáno podle vztahu: $1 / (\text{hmotnost zkumavky se vzorkem} - \text{hmotnost zkumavky bez vzorku})$. Dále pokračovalo ředění od 10^{-2} podle desítkové ředící řady. Stanovovány byly stejné mikroorganismy jako v případě slepičích vajec, avšak pro účel této práce byly vybrány pouze výsledky rodu *Salmonella*. Množství, které bylo z ředění 10^{-1} aplikováno do Rappaport-Vassiliadis bujónu bylo stejné pro vypočítané množství do ředění 10^{-2} . Následně byly vzorky slepičího trusu kultivovány stejným způsobem, jaký je popsán pro slepičí vejce.

Statistická analýza

Byly spočítány narostlé kolonie, které byly následně převedeny na log KTJ/vejce. Detekční limit pro zvolenou metodu byl 2 log KTJ/vejce. Z vypočítaných hodnot byly vytvořeny průměry a směrodatné odchylky. Statistická analýza byla provedena v programu STATISTICA 12 (StatSoft CR s.r.o.) pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu ANOVA ($p < 0,05$) s použitím Scheffého metody.

Výsledky

Cílem práce bylo porovnat mikrobiální kontaminaci vajec z různých systémů ustájení. Mikroorganismy byly stanoveny kulturačními metodami na selektivních půdách. V této kapitole jsou uvedeny výsledky narostlých kolonií jednotlivých mikroorganismů, které jsou statisticky vyhodnoceny. Výsledky jsou uvedeny v Tabulka 6 a Tabulka 7.

V Tabulka 6 jsou uvedeny počty mikroorganismů stanovených na vejcích slepic, která byla ustájena různým způsobem na 3 různých farmách. Výsledky jsou uvedeny jako průměr ± směrodatná odchylka log KTJ/vejce.

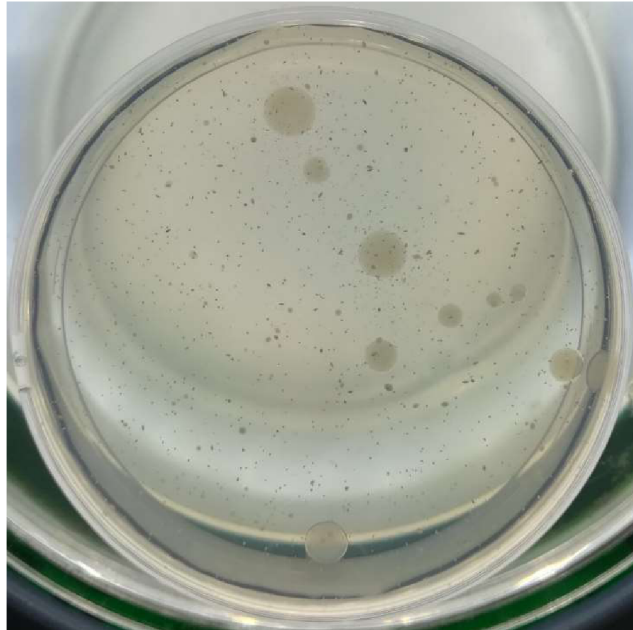
Tabulka 6: Stanovené počty mikroorganismů na vejcích

Farma	Systém ustájení	log KTJ/vejce				
		CPM	<i>E. coli</i>	Koliform.	Celk. koliform.	<i>Enterococcus</i>
1	voliéra typ A	5,48 ± 0,62 ^a	2,10 ± 0,24 ^{ab}	2,54 ± 0,61 ^a	2,59 ± 0,61 ^a	2,92 ± 0,75 ^a
	voliéra typ B	4,89 ± 0,76 ^b	2,00 ± 0,00 ^a	2,04 ± 0,18 ^b	2,04 ± 0,19 ^b	2,03 ± 0,14 ^b
2	voliéra	5,61 ± 0,56 ^a	2,12 ± 0,32 ^{ab}	2,49 ± 0,84 ^a	2,51 ± 0,85 ^{ab}	2,80 ± 0,88 ^a
	free-range s voliérou	5,55 ± 0,65 ^a	2,19 ± 0,55 ^{ab}	2,16 ± 0,48 ^{ab}	2,26 ± 0,66 ^{ab}	2,67 ± 0,85 ^a
	bio chov	5,49 ± 0,55 ^a	2,08 ± 0,27 ^{ab}	2,15 ± 0,35 ^{ab}	2,21 ± 0,42 ^{ab}	2,52 ± 0,67 ^{ab}
3	voliéra	6,37 ± 0,62 ^c	2,41 ± 0,69 ^b	2,75 ± 1,01 ^a	2,81 ± 1,02 ^a	2,74 ± 0,72 ^a

CPM = celkové počty mikroorganismů, *E. coli* = *Escherichia coli*, Koliform. = ostatní koliformní bakterie, Celk. koliform. = celkové koliformní bakterie

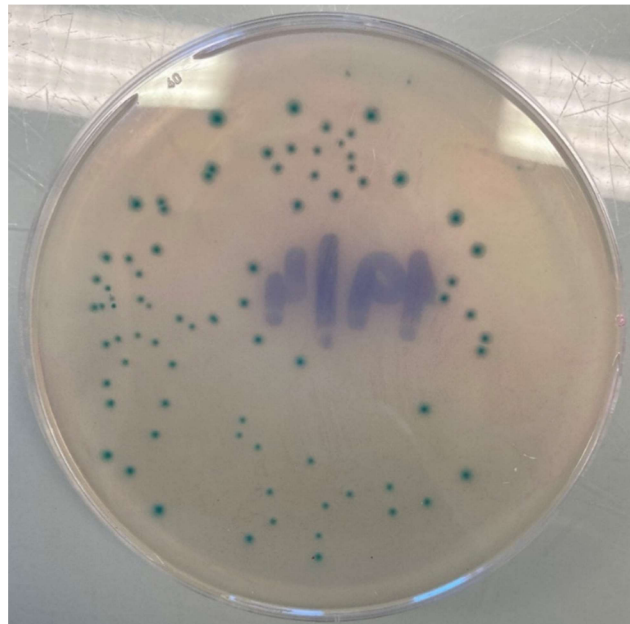
Hodnoty ve sloupcích s rozdílnými horními indexy se od sebe statisticky významně liší na hladině významnosti $\alpha=0,05$. Všechny nejnižší hodnoty v testovaných systémech ustájení pro všechny testované skupiny mikroorganismů byly detekovány na farmě 1 se systémem ustájení typu B. Bakterie druhu *Escherichia coli* nebyly vůbec detekovány, nebo byly pod detekčním limitem který byl 2 log KTJ/vejce. Nejvyšší hodnoty pro počty CPM, *E. coli*, ostatní koliformní bakterie a celkové koliformní bakterie byly zjištěny na farmě 3 s voliérou. Pouze rod *Enterococcus* měl nejvyšší počty na farmě 1 voliéra typ A.

Celkové počty bakterií na Standard plate count agaru se pohybovaly od 4,89 ± 0,76 - 6,37 ± 0,62 log KTJ/vejce. Narostlé kolonie jsou zachyceny na Obrázek 12. Statisticky významně nejvyšší rozdíly byly při hodnocení CPM zjištěny mezi farmou 1 voliéra typu B a farmou 3 systémem ustájení voliéra a současně se oba uvedené systémy odlišovaly od všech ostatních systémů ustájení.



Obrázek 12: Kolonie celkového počtu mikroorganismů na Standard plate count agaru

Počty bakterií druhu *Escherichia coli* na T.B.X mediu se pohybovaly v rozmezí $2,00 \pm 0,00$ a $2,41 \pm 0,69$ log KTJ/vejce. Kolonie těchto bakterií jsou zbarvené do modra s modrým středem viz Obrázek 13. V případě počtu bakterií druhu *Escherichia coli* byly nalezeny statisticky významné rozdíly pouze mezi systémy ustájení voliéra typ B z farmy 1 a voliéra z farmy 3.

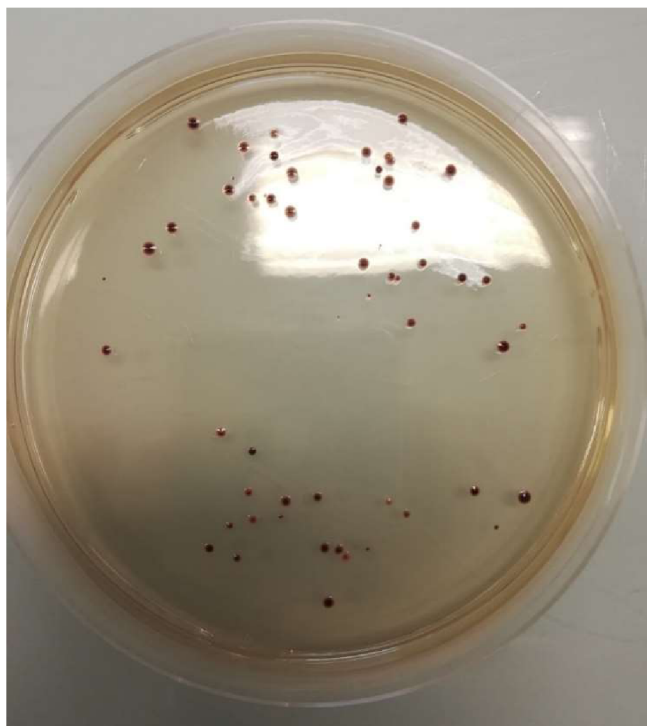


Obrázek 13: Narostlé kolonie na TBX médiu

Ostatních koliformní bakterie se pohybovaly v počtech od $2,04 \pm 0,18$ do $2,75 \pm 1,01$ log KTJ/vejce a celkové koliformní bakterie měly rozmezí $2,04 \pm 0,19$ - $2,81 \pm 1,02$ log KTJ/vejce.

Statisticky nejvyšší rozdíly ostatních koliformních bakterií byly opět mezi farmou 1 typ ustájení B a farmou 3 systém ustájení voliéra. Oproti CPM a *E. coli*, zde byly zaznamenány i jiné odlišnosti mezi ostatními systémy ustájení. Bylo zjištěno, že existují statisticky významné rozdíly na farmě 1 mezi voliérou typu A a B. Dále se liší systém ustájení farmy 1 voliéra typ B od voliéry z farmy 2. Zaznamenán byl rozdíl i mezi voliérou z farmy 3, ustájením free-range s voliérou a bio chovem z farmy 2. Statisticky významně nejvyšší rozdíl mezi farmou 1 typ ustájení B a farmou 3 ustájení voliéra byl vyhodnocen i u celkových koliformních bakterií. Dále zde byla opět odlišnost mezi systémem ustájení voliéra typ A a B z farmy 1.

Počty bakterií rodu *Enterococcus* na Slanetz-Bartley agaru byly v rozmezí $2,03 \pm 0,14$ - $2,92 \pm 0,75$ log KTJ/vejce. Narostlé kolonie na tomto agaru jsou na Obrázek 14. V případě vyhodnocení počtu bakterií rodu *Enterococcus* se systém voliéra typ B farma 1 statisticky liší ode všech hodnocených systémů ustájení kromě bio chovu z farmy 2, zde nebyla zaznamenána odlišnost.



Obrázek 14: Narostlé kolonie na Slanetz-Bartley agaru

Dále byla stanovena přítomnost salmonel na vejcích a slepičím trusu. Nejprve byly vzorky kultivovány v Rappaport-Vassiliadis médiu. Pokud došlo ke změně barvy indikátoru v médiu z modré na žlutou viz Obrázek 15, důsledkem poklesu pH, byly bakterie přetřeny na S.S. agar. Zde se přítomnost salmonel projevila nárůstem černých kolonií viz Obrázek 16.

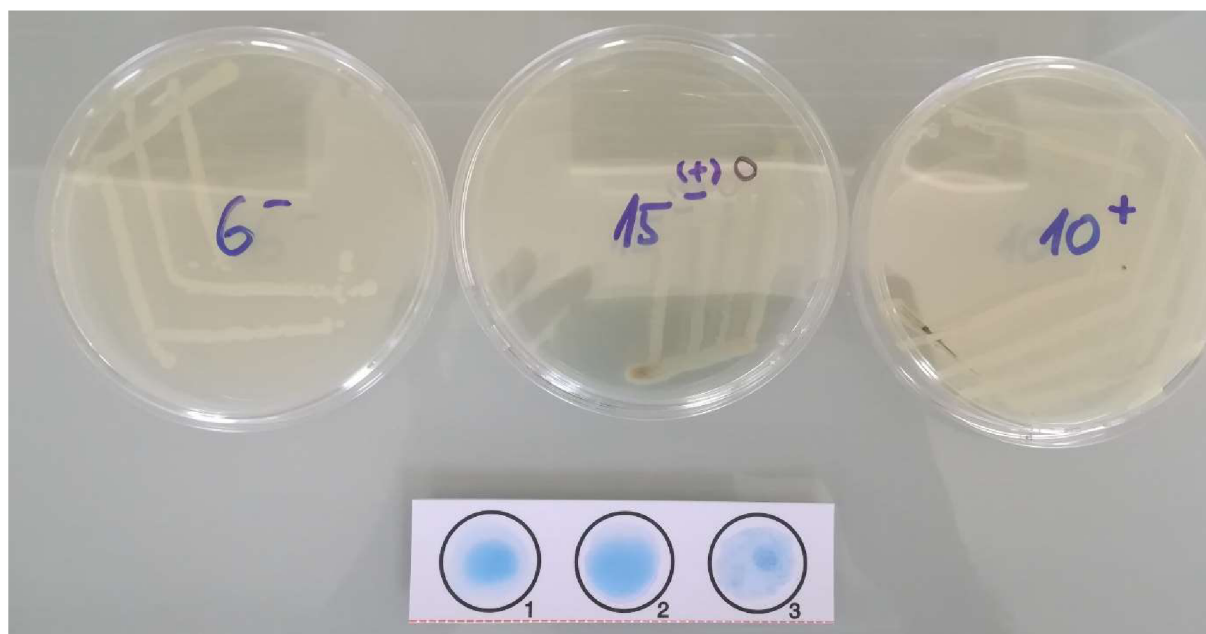


Obrázek 15: Porovnání změny barvy Rappaport-Vassiliadis bujónu.



Obrázek 16: Nárůst kolonií na *Salmonella Shigella* agaru

Vybrané černé kolonie byly rozetřeny na Trypton soya agar, aby odsud mohly být odebrány čisté kolonie pro definitivní potvrzení přítomnosti salmonel aglutinačním testem. Na Obrázek 17 jsou zachyceny Petriho misky s narostlými koloniemi na Trypton soya agaru. Pod nimi je přiložen aglutinační test. Izolát číslo 10 z farmy 1, systému ustájení voliéra A byl identifikován jako pozitivní na rod *Salmonella*, neboť došlo ke tvorbě aglutinátu.



Obrázek 17: Kolonie narostlé na Trypton soya agaru a Oxoid Salmonella Test Kit

Jediná farma, která neměla pozitivně testovaný vzorek slepičích vajec ani trusu byla farma 3. U farmy 2 byly salmonely prokázány u dvou vzorků vajec v systému free-range s voliérrou a v případě trusu se jednalo o 2 pozitivní vzorky z voliérového systému. Farma 1 měla pouze 1 vzorek slepičího vejce pozitivní na rod *Salmonella*, a to v systému ustájení voliéra typu A.

V Tabulka 7 jsou uvedeny počty pozitivních vzorků testovaných na rod *Salmonella*. Jedná se o velmi malý záchyt těchto bakterií.

Tabulka 7: Výsledky pozitivních vzorků na rod *Salmonella*

Farma	Systém ustájení	<i>Salmonella</i> - Počty pozitivních vzorků	
		Vejce	Trus
1	voliéra typ A	1	0
	voliéra typ B	0	0
2	voliéra	0	2
	free-range s voliérrou	2	0
	bio chov	0	0
3	voliéra	0	0

Diskuze

Mikroorganismy jsou nedílnou součástí živočišných produktů a slepičí vejce nejsou výjimkou. Nicméně je nutné zajistit co nejmenší míru kontaminace a v ideálním případě nepřítomnost patogenů. Již v chovech drůbeže je tak snaha eliminovat množství mikroorganismů na minimum. Způsob a podmínky chovu jsou zásadními faktory, neboť je to prostředí, ve kterém dochází k prvnímu kontaktu sneseného vejce s okolím. Předpokládá, že čím mají vejce znečištěnější skořápku, tím více mikroorganismů proniká do jejich obsahu, a je tak ohrožena bezpečnost produkce (Tůmová et al. 2010).

V našem experimentu byly testovány chovy, které jsou zařazeny do alternativního systému ustájení. Ve většině dostupných zdrojů, se studie zabývají porovnáním klecových a alternativních systémů. Nicméně od roku 2027 budou i obohacené klece v ČR zakázány a je tak důležité se začít více zabývat rozdíly v rámci alternativních chovů. V našem experimentu byly dostupné výsledky jak chovů s venkovním výběhem (free-range s voliérou v hale a bio chov z farmy 2), tak bez výběhu v podobě voliér. Mezi počty mikroorganismů testovaných v této práci byly nalezeny statisticky významné rozdíly, které však neměly závislost na způsobu chovu. Při porovnání všech hodnot byly nejvyšší počty mikroorganismů nalezeny u voliérových chovů. Obdobný výsledek byl v provedené studii Kulshreshtha et al. (2021), kteří při porovnávání kvality kutikuly u systémů ustájení bez výběhu a free-range zjistili nižší bakteriální zátěž u systému free-range. Naopak Taghreed et al. (2013) při srovnání bio a konvenční produkce vajec vyhodnotili nejvyšší mikrobiální zátěž u bio chovů. Nicméně v našem experimentu byly i nejnižší počty daných mikroorganismů detekovány ve voliérovém systému, konkrétně typu B na farmě 1, což jistě signalizuje dobře zvládnutou hygienu chovu. V rámci této farmy byly nalezeny statisticky významné rozdíly v počtu mikroorganismů mezi voliérou typu A a B. Jedním z možných důvodů, může být právě odlišný typ voliér, kdy u typu B může být lépe prováděná sanitace a prostorové uspořádání je překážkou pro snadný přenos mikroorganismů v prostředí chovu.

Vlčková et al. (2018) prováděli studii ve které, mimo jiných ukazatelů, byla vyhodnocována mikrobiální kontaminace vaječných skořápek v různých systémech ustájení. V systému free-range byly zjištěny hodnoty pro CPM 5,04 log KTJ/vejce, a *Enterococcus* 2,56 log KTJ/vejce, které relativně odpovídají námi zjištěným hodnotám v tomto chovu CPM 5,55 ± 0,65 log KTJ/vejce a *Enterococcus* 2,67 ± 0,85 log KTJ/vejce. Vyšší počet byl v této studii zaznamenán u mikroorganismů druhu *Escherichia coli* 4,51 log KTJ/vejce oproti námi zjištěným 2,19 ± 0,55 log KTJ/vejce. Při porovnání počtů mikroorganismů z uvedené studie a námi testovaného bio chovu, ve kterém mají zvířata také volný výběh, jsou hodnoty pro CPM 5,49 ± 0,55 log KTJ/vejce a *Enterococcus* 2,52 ± 0,67 log KTJ/vejce srovnatelné s výsledkem uvedené studie. Dále v porovnání u bakterií *Escherichia coli* je naše detekovaná hodnota 2,08 ± 0,27 log KTJ/vejce opět výrazně nižší.

De Reu et al. (2008) porovnávali hygienu a kvalitu vaječné skořápky za komerčních podmínek. Jejich výsledný průměrný počet CPM pro voliérové systémy ustájení byl 4,96 log KTJ/vejce je blízký naší nejnižší zjištěné hodnotě 4,89 ± 0,76 log KTJ/vejce. Englmaierová et al. (2014) sledovali mimo jiných ukazatelů také mikrobiální kontaminaci vaječných skořápek ve voliérách a byly zjištěny hodnoty pro CPM 5,49 log KTJ/vejce, což je porovnatelné i s našimi hodnotami. Počet pro druh *Escherichia coli* 5,22 log KTJ/vejce však opět převyšuje naši

nejvyšší průměrnou detekovanou hodnotu $2,41 \pm 0,69$ log KTJ/vejce. V případě rodu *Enterococcus* výzkum zjistil počet 3,33 log KTJ/vejce, která je vyšší než námi zjištěná nejvyšší hodnota pro tento rod $2,92 \pm 0,75$ log KTJ/vejce. De Reu et al. (2007) se zabývali mikrobiální kontaminací v neklecových systémech konkrétně voliérách a podlahových systémech, jejichž výsledkem je rozsah 4,35-5,51 log KTJ/vejce, který je při porovnání s našim CPM voliéroových systémů $4,89 \pm 0,76$ – $6,37 \pm 0,62$ lehce nižší.

Při srovnání námi provedeného experimentu a studií, které se zabývaly podobnou problematikou, lze tedy pozorovat především celkem výraznou odlišnost v počtu detekovaných *Escherichia coli*, a to jak ve voliéroových chovech, tak v chovech s otevřeným výběhem (free-range a bio chov). I když byl nalezen statisticky významný rozdíl u námi testovaných voliér při porovnání hodnot ze studií, je i naše nejvyšší průměrná hodnota z farmy 3 velmi dobrým výsledkem z pohledu mikrobiální zátěže tímto rodem. V této práci byly mikrobiologickou analýzou zjišťovány odděleně počty pro *Escherichia coli*, ostatní koliformní bakterie a celkové koliformní bakterie. Dosud nalezené studie se zabývaly z tohoto pohledu pouze počty *Escherichia coli*, neboť jsou ukazatelem čerstvého fekálního znečištění a celkové koliformní bakterie, které jsou širší skupinou, jsou ukazatelem obecného fekálního znečištění. Výhradně pro koliformní bakterie nebyly nalezeny hodnoty, které by mohly sloužit pro porovnání s našimi výsledky. Avšak podle výsledků výše uvedených studií pro druh *Escherichia coli*, u nich lze předpokládat i vyšší počty celkových koliformních bakterií, než byly zjištěny v našem experimentu. Nicméně Isnawaida et al. (2021), kteří se zabývali přítomností koliformních bakterií na povrchu slepičích vajec z tradičních trhů z Marosu, stanovili průměrný počet koliformních bakterií $1,1 \times 10^{-1}$ KTJ/g, což je počet velmi nízký. Celkové počty mikroorganismů v naší práci a v uvedených studiích se pohybovaly v poměrně srovnatelných rovinách, nicméně naše výsledky byly spíše vyšší. Nicméně nejnižší a nejvyšší počty CPM byly zjištěny vždy pouze v případě voliér a nelze tak stanovit, zda jsou z hlediska celkové mikrobiální zátěže vhodnější systémy ustájení bez výběhu nebo free-range. Počty bakterií rodu *Enterococcus* v našich chovech byly relativně porovnatelné s ostatními studii Englmaierová et al. (2014; Vlčková et al. (2018) a nebyly zde zásadní rozdíly.

Bakterie rodu *Salmonella* jsou příčinou alimentárního onemocnění salmonelóza a kontaminace vajec a vaječných skořápek těmito bakteriemi byla celosvětově shledána jako problém veřejného zdraví. Záludnost salmonel spočívá především v tom, že u infikovaných zvířat většinou nezpůsobují klinické příznaky a u kontaminovaných potravin nedochází k jejich viditelným změnám. Nejvýznamnější fáze, kdy patogeny kontaminují vejce, probíhá právě v chovech zvířat. Je tedy nezbytné se soustředit na způsob a hygienu chovu, kterými lze fáze výskytu a kontaminace ovlivnit. Je také nutné sledovat mikrobiální situaci pravidelným testováním (Guard-Petter 2001; Whiley & Ross 2015).

Záchyt pozitivních vzorků slepičích vajec a trusu na rod *Salmonella* byl v našem experimentu velmi malý, z celkem 224 testovaných vzorků vajec byly pozitivní pouze 3. Dva vzorky pocházely z free-range chovu farmy 2 a jeden z voliéry typ A z farmy 1. Testovaných vzorků trusu bylo celkem 75, z nichž pouze dva z ustájení voliéra z farmy 2 měly pozitivní výsledek na salmonelu. Jelikož je množství detekovaných vzorků velmi nízké, nebylo možné statistické vyhodnocení, které by mělo vypovídající hodnotu. Předpoklad našeho experimentu, že systém ustájení bude mít vliv na kontaminaci slepičích vajec salmonelami se nepotvrdil. Je ovšem možné, že nízký počet detekovaných vzorků mohl být způsoben tím, že pro průkaz

salmonel byla použita pouze konvenční kultivační metoda. Loongyai et al. (2011) pro detekci salmonel použili PCR (polymerase chain reaction-polymerázová řetězová reakce) se sadou primerů specifických pro invazi genu *invA* pro salmonelu, který detekoval přítomnost salmonel i ve vzorcích vaječných skořápek, které byly kultivační metodou vyhodnoceny jako salmonely negativní. Vliv na náš výsledek měl i poměrně malý počet vzorků jednotlivých chovů a nerovnoměrné zastoupení systémů ustájení, do kterého byly zahrnuty pouze 3 farmy.

Předpokladem zvýšeného rizika výskytu salmonel u drůbeže z free-range produkce se zabývali ve Švédsku Wierup et al. (2017), kteří porovnali výskyt salmonel v letech 2007-2015 u nosnic a brojlerů ve venkovní a vnitřní produkci. Jako výsledek stanovili, že venkovní drůbež nebyla salmonelami více exponovaná než drůbež ustájená v hale. Vysoký výskyt salmonel v chovech s volným výběhem nepotvrdil ani Ferreira et al. (2020) při provedení předběžného výzkumu výskytu salmonel na vejcích z rodinných farem a dvorků v Rumunsku a Portugalsku. V Rumunsku byly všechny vzorky 202 vajec na salmonely negativní a v Portugalsku bylo z 200 vzorků pozitivních pouze 6. Dokonce jako relevantní potravinu pro lidskou spotřebu z hlediska mikrobiální kontaminace vyhodnotili Pesavento et al. (2017) slepičí vejce, která pocházela z volného výběhu a bio chovu. Z celkem 300 testovaných vajec nebylo ani jedno pozitivně testované na rod *Salmonella* ani na žádný další patogen např. *Escherichia coli* 0157:H7.

Dynamiku salmonel v chovech, kde mají slepice možnost volného výběhu mapovali McWhorter & Chousalkar (2019). Provedli longitudinální studii v drůbeží produkci s volným výběhem od vylíhnutí až do konce výroby. Zjištěné výskyty salmonel byly ve všech stádiích produkce velmi nízké a nebyly zaznamenány významné rozdíly v jednotlivých fázích produkce. Dalším faktorem, který má potenciál významně zasáhnout do četnosti výskytu salmonel, především v chovech s volným výběhem, je roční období. V Austrálii Chousalkar et al. (2016) sledovali v různých ročních obdobích četnost výskytu salmonel na vejcích, v trusu a prostředí drůbežích chovů s volným výběhem a z trusu u volně žijících ptáků a lišek v okolí farmy. Bylo zaznamenáno, že výskyt salmonel byl v létě výrazně vyšší, a že volně žijící zvířata hrají důležitou roli v ekologii a bezpečnosti potravin.

Mnoho studií, které se zabývají problematikou vlivu systému ustájení nosnic na výskyt bakterií rodu *Salmonella* se soustředí opět především na srovnání klecových a alternativních systémů. Výsledky jsou velmi různorodé a protichůdné, což je zřejmě způsobené rozdílnou metodikou a populací zvířat v jednotlivých zemích. Nejčastěji se objevují 3 závěry studií a momentálně nelze ani jednu z možností jednoznačně potvrdit. Zaprvé se jedná o výzkumy se závěrem, že výskyt salmonel v klecových systémech byl vyšší než v alternativních. Zadruhé jsou studie, které uvádějí, že výskyt salmonel byl nižší v chovech klecových oproti alternativním a zatřetí jsou studie, které tvrdí, že není rozdíl ve výskytu salmonel mezi těmito dvěma způsoby chovu. Podle Evropského úřadu pro bezpečnost potravin (EFSA - European Food Safety Authority) většina studií, která v EU porovnávala klecové a alternativní systémy, uvádí vyšší prevalenci salmonel v klecových systémech. Byl proveden monitoring výskytu *Salmonella enterica* ssp. *enterica* Enteritidis v klecových a alternativních chovech v některých členských státech EU. Následně byla provedena modelová analýza shromážděných dat a bylo zjištěno, že existují významné rozdíly mezi zeměmi a systémy chovu. Prevalence výskytu salmonel v České republice je v obou systémech podobná (EFSA Panel on Biological Hazards et al. 2019). Ke stejnému závěru došli i Jones et al. (2012) v USA při sledování prevalence

salmonel v souvislosti s vejci a nezjistili významné rozdíly mezi free-range a klecovým systémem. Naopak experiment Neira et al. (2017) ve kterém identifikovali přítomnou mikrobiotu na vaječných skořápkách pocházejících z volného výběhu a klecí technikou PGM založenou na DNA, uvádí vyšší výskyt salmonel u vzorků z klecového chovu než z volného výběhu, nicméně početnost pozitivních vzorků byla v obou systémech velmi nízká. Dominantní kmen v obou systémech chovu byl *Firmicutes*, dále byly potvrzeny kmeny vyskytující se ve střevní mikrobiotě kuřat a slepic jako *Clostridiaceae*, *Ruminococcaceae* a *Lachnospiraceae*.

Kromě sledování přítomnosti salmonel v souvislosti se slepičími vejci je zkoumána také citlivost těchto bakterií na antibiotika, neboť antibiotická rezistence je také problémovým faktorem, a i vejce mohou být rezervoárem antibioticky rezistentních salmonel. Tessema et al. (2017) testovali 384 slepičích vajec z drůbeží farmy v Etiopii. V podestýlkovém systému ustájení byly salmonely biochemickým testem potvrzeny u 11 vzorků vajec, z čehož u 9 vzorků byly bakterie přítomny pouze na skořápce a 2 vejce měly salmonelové bakterie i ve svém obsahu. Všechny izoláty byly testovány na citlivost šesti běžně používaných antimikrobiálních látek pomocí deskové difúzní metody. Z 11 testovaných izolátů bylo 8 rezistentní vůči jednomu nebo více testovaným antimikrobiálním látkám. Nejčastěji byla zjištěna rezistence na tetracyklin (72,7 %), ampicilin (72,7 %), amoxicilin (63,6 %). Proti většině izolátů salmonel byly účinné spektinomycin, kanamycin, chloramfenikol. Studie provedená Atikur et al. (2019) mimo jiné testovala citlivost izolovaných a biochemickými testy charakterizovaných salmonel ze slepičích vajec, která pocházela z trhů a farem v Bangladéši. Deskovou difúzní metodou byla zjištěna nejvyšší rezistence (60 %) u chloramfenikolu, ampicilinu, gentamicinu a tetracyklinu. Bakterie salmonel, které byly izolovány ze skořápky byly odolnější než izoláty z vaječného žloutku. Je zjevné, že i toto je důležité téma pro další výzkumy, neboť první studie uvádí chloramfenikol jako látku účinnou a podle druhé by použití této antimikrobiální látky nebylo efektivní.

Závěr

- Systém ustájení neměl vliv na celkovou kontaminaci slepičích vajec ani kontaminaci salmonelami.
- Počet pozitivně detekovaných slepičích vajec a trusu na rod *Salmonella* byl velmi nízký. Z celkem 224 vzorků vajec se jednalo pouze o 3 vzorky. V případě trusu byly ze 75 vzorků pozitivně testovány pouze 2.
- Je důležité se začít více zabývat monitoringem a eliminací mikroorganismů v alternativních systémech ustájení, neboť od roku 2027 budou v České republice zakázány i obohacené klecové systémy.
- Z výsledků této práce i jiných studií vyplývá, že kromě hlediska způsobu chovu je nezbytné posuzovat i jiné faktory, které tuto problematiku významně ovlivňují. Jedním z nich je hygiena v chovech.

Literatura

- Atikur R et al. 2019. Isolation, Identification and Antibiotic Sensitivity Pattern of Salmonella spp from Locally Isolated Egg Samples. American Journal of Pure and Applied Biosciences 1:1–11.
- Bednář M. 1996. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Triton, Praha.
- Bednář M, Smíšek J, Němečková V, Adámková V. 2009. Určení sérotypu (sérovaru) bakterie zpětnou aglutinací. Available from <http://mikrobiologie.lf3.cuni.cz/bak/uceb/obsah/sklicaglu/sklicaglu.htm> (accessed October 28, 2021).
- Beneš J. 2009. Infekční lékařství. Galén, Praha.
- Bhunja AK. 2018. Foodborne Microbial Pathogens: Mechanisms and Pathogenesis 2nd ed. 2018. Springer, New York, NY.
- Brouček J, Benková J, Šoch M. 2011. Technologie a technika chovu drůbeže při splnění podmínek welfare: certifikovaná metodika. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice. Available from <https://docplayer.cz/3073388-Technologie-a-technika-chovu-drubeze-pri-splneni-podminek-welfare.html>.
- Chousalkar K, Gole V, Caraguel C, Rault J-L. 2016. Chasing Salmonella Typhimurium in free range egg production system. Veterinary Microbiology 192:67–72.
- Cota García I. 2016. Epigenetic control of O-antigen length in Salmonella enterica. PhD Thesis. Universidad de Sevilla, Sevilla. Available from <https://idus.us.es/handle/11441/34335> (accessed October, 2021).
- Cupáková Š, Karpíšková R, Necidová L. 2010. Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II. Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno. Available from <https://fvhe.vfu.cz/files/skripta-mikrobiologie-potravin-ii.pdf>.
- ČSN EN ISO 4833-1. 2014. Mikrobiologie potravinového řetězce-Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů-Část 1: Technika roztěrem a počítání kolonií vykultivovaných při 30 °C. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN ISO 4832. 2010. Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu koliformních bakterií-Technika počítání kolonií. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.

- ČSN ISO 16649-2. 2003. Mikrobiologie potravin a krmiv-Horizontální metoda stanovení počtu β -glukuronidázopozitivních *Escherichia coli*-Část 2: Technika počítání kolonií vykultivovaných při 44 °C s použitím 5-bromo-4chloro-3-indolyl- β -D-glukuronidu. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN EN 15788. 2010. Krmiva-Izolace a stanovení počtu bakterií rodu *Enterococcus* (*E. faecium*). Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN 56 9609. 2008. Pravidla správné hygienické a výrobní praxe-Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- ČSN EN ISO 6579-1. 2017. Mikrobiologie potravinového řetězce – Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu *Salmonella* – Část 1: Průkaz bakterií rodu *Salmonella*. Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví, Praha.
- Damerow G. 2015. The chicken health handbook: a complete guide to maximizing flock health and dealing with disease 2nd edition. Storey Publishing, North Adams, MA.
- Davis CP. 2021. Medical Definition of Kilobase. MedicineNet. Available from <https://www.medicinenet.com/kilobase/definition.htm> (accessed October 28, 2021).
- De Reu K, Messens W, Heyndrickx M, Rodenburg TB, Uyttendaele M, Herman L. 2008. Bacterial contamination of table eggs and the influence of housing systems. *World's Poultry Science Journal* **64**:5–19.
- De Reu K, Rodenburg B, Grijspeerds K, Heyndrickx M, Tuytens F, Zoons J, Herman L. 2007. Bacteriological contamination of eggs and eggshell quality in furnished cages and non-cages systems for laying hens: an international on-farm comparison. Pages 46–47. Praha.
- Dědičová D, Karpíšková R. 2009. Nová revize Kauffmannova – Whiteova schématu pro identifikaci salmonel. *Zprávy EM (SZÚ)* **18**:99–100.
- Dubanský V. 2008. Zdroje a způsob přenosu salmonelových infekcí jako zoonóz – review. *Veterinářství*. Available from <https://www.vetweb.cz/zdroje-a-zpusob-prenosu-salmonelovych-infekci-jako-zoonoz-review/> (accessed October 29, 2021).
- EFSA Panel on Biological Hazards et al. 2019. *Salmonella* control in poultry flocks and its public health impact. *EFSA Journal* **17**:155.
- Englmaierová M. 2016. Kvalita vajec slepic z různých ustájení. *Drůbežář hydínár* **10**:4–5.

- Englmaierová M, Tůmová E, Charvátová V, Skřivan M. 2014. Effects of laying hens housing system on laying performance, egg quality characteristics, and egg microbial contamination. *Czech Journal of Animal Science* **59**:345–352.
- European Food Safety Authority. 2022. Salmonella. European Food Safety Authority. Available from <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/salmonella> (accessed March 25, 2022).
- Evropská komise. 2007. Nařízení komise (ES) č. 1441/2007 ze dne 5. prosince 2007, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny. Pages 12–29 in *Úřední věstník Evropské unie L 322*, Brusel.
- Ferreira V, Cardoso MJ, Magalhães R, Maia R, Neagu C, Dumitrașcu L, Nicolau AI, Teixeira P. 2020. Occurrence of *Salmonella* spp. in eggs from backyard chicken flocks in Portugal and Romania - Results of a preliminary study. *Food Control* **113**:107180.
- Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouck F, Gast R, Humphrey TJ, Van Immerseel F. 2009. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. *FEMS Microbiology Reviews* **33**:718–738.
- Gantois I, Eeckhaut V, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R, Van Immerseel F. 2008. A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of *Salmonella*. *Avian Pathology* **37**:399–406.
- Garrity GM, Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology* Second ed. Springer, New York.
- Gerlach R, Hensel M. 2007. Salmonella Pathogenicity Islands in host specificity, host pathogen-interactions and antibiotics resistance of *Salmonella enterica*. *Berliner und Munchener Tierarztliche Wochenschrift*:317–327.
- Giri D. 2021. Difference between Endotoxin and Exotoxin . Laboratory info. Available from <https://laboratoryinfo.com/endotoxin-vs-exotoxin/> (accessed October 28, 2021).
- Guard-Petter J. 2001. The chicken, the egg and *Salmonella enteritidis*. *Environmental Microbiology* **3**:421–430.
- Halaj M, Golian J. 2011. Vajce biologické, technické a potravinárske využitie1. Garmond, Nitra.
- Havlík J. 2002. *Infekční nemoci*. Galén, Praha.
- Hincke M T. 2012. The eggshell: structure, composition and mineralization. *Frontiers in Bioscience* **17**:1266.

- Ibrahim HR, Sugimoto Y, Aoki T. 2000. Ovotransferrin antimicrobial peptide (OTAP-92) kills bacteria through a membrane damage mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1523**:196–205.
- Isnawaida, Yuliati FN, Prahesti KI, Malaka R, Hajrawati. 2021. Detection of coliform bacteria, total plate count and pH value in chicken eggs from Maros traditional market. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* **788**:012158.
- Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill F-X. 2014. Supplement 2008–2010 (no. 48) to the White–Kauffmann–Le Minor scheme. *Research in Microbiology* **165**:526–530.
- Ježková T. 2017. Paratyf drůbeže. Veterinární průvodce. Available from <https://zverolekarka.com/paratyf-drubeze/> (accessed November 12, 2021).
- Jones DR, Anderson KE, Guard JY. 2012. Prevalence of coliforms, Salmonella, Listeria, and Campylobacter associated with eggs and the environment of conventional cage and free-range egg production. *Poultry Science* **91**:1195–1202.
- Katscher F. 1997. Salmonella or Smithella? *Nature* **388**:320–320.
- Kulshreshtha G, Benavides-Reyes C, Rodriguez-Navarro AB, Diep T, Hincke MT. 2021. Impact of Different Layer Housing Systems on Eggshell Cuticle Quality and Salmonella Adherence in Table Eggs. *Foods* **10**:2559.
- Kurtz JR, Goggins JA, McLachlan JB. 2017. Salmonella infection: Interplay between the bacteria and host immune system. *Immunology Letters* **190**:42–50.
- Loongyai W, Wiriya B, Sangsawang N. 2011. Detection of Salmonella and Escherichia coli in Egg Shell and Egg Content from Different Housing Systems for Laying Hens. *International Journal of Poultry Science* **10**:93–97.
- Macela A. 2006. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií. Grada, Praha.
- Martelli F, Davies RH. 2012. Salmonella serovars isolated from table eggs: An overview. *Food Research International* **45**:745–754.
- Matoušek V. 2013. Chov hospodářských zvířat II. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích Zemědělská fakulta, České Budějovice.
- McWhorter AR, Chousalkar KK. 2019. From hatch to egg grading: monitoring of Salmonella shedding in free-range egg production systems. *Veterinary Research* **50**:58.

- Messens W, Grijspeerdt K, Herman L. 2006. Eggshell penetration of hen's eggs by *Salmonella enterica* serovar Enteritidis upon various storage conditions. *British Poultry Science* **47**:554–560.
- Míková K. 2010. Vejce jako vynikající potravina. Naše vejce. Available from <http://www.nasevejce.cz/o-vejci/vejce-jako-potravina> (accessed October 29, 2021).
- Neira C, Laca A, Laca A, Díaz M. 2017. Microbial diversity on commercial eggs as affected by the production system. A first approach using PGM. *International Journal of Food Microbiology* **262**:3–7.
- Nieto PA, Pardo-Roa C, Salazar-Echegarai FJ, Tobar HE, Coronado-Arrázola I, Riedel CA, Kalergis AM, Bueno SM. 2016. New insights about excisable pathogenicity islands in *Salmonella* and their contribution to virulence. *Microbes and Infection* **18**:302–309.
- Park D, Lara-Tejero M, Waxham MN, Li W, Hu B, Galán JE, Liu J. 2018. Visualization of the type III secretion mediated *Salmonella*–host cell interface using cryo-electron tomography. *eLife* **7**:e39514.
- Pesavento G, Calonico C, Runfola M, Lo Nostro A. 2017. Free-range and organic farming: Eggshell contamination by mesophilic bacteria and unusual pathogens. *Journal of Applied Poultry Research* **26**:509–517.
- Popoff MY, Bockemühl J, Gheesling LL. 2004. Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann–White scheme. *Research in Microbiology* **155**:568–570.
- Rehman Z, Haq A ul. 2011. Nutritional Importance of an Egg. Available from <https://en.engormix.com/poultry-industry/articles/egg-nutritional-composition-t34923.htm> (accessed October 29, 2021).
- Rosický B. 1994. *Salmonelózy: aktuální informace pro lékaře, veterinární lékaře a potravinářskou praxi*. Scientia Medica, Praha.
- Semerád Z. 2019. Informace SVS – Metodika kontroly zdraví zvířat a nařízené vakcinace pro rok 2020. Komora veterinárních lékařů České republiky. Available from <https://www.vetkom.cz/informace-svs-metodika-kontroly-zdravi-zvirat-a-narizene-vakcinace-pro-rok-2020/> (accessed November 13, 2021).
- Skládanka J. 2015. *Základy chovu kura domácího*. Available from https://web2.mendelu.cz/af_291_projekty2/vseo/print.php?page=4584&typ=html (accessed March 26, 2022).
- Skřivan M. 2000. *Drůbežnictví 2000*. Agrospoj, Praha.

- Státní veterinární správa. 2021a. Monitoring zoonóz. Státní veterinární správa. Available from <https://www.svscr.cz/zivocisne-produkty/monitoring-zoonoz/> (accessed November 12, 2021).
- Státní veterinární správa. 2021b. Národní programy tlumení salmonel - Metodika kontroly zdraví a nařízené vakcinace na rok 2021. Státní veterinární správa. Available from <https://www.svscr.cz/zdravi-zvirat/programy-tlumeni-vyskytu-salmonel/> (accessed November 13, 2021).
- Státní veterinární správa. 2021c. Zpráva o činnosti v oblasti ochrany zdraví zvířat v roce 2020. Státní veterinární správa. Available from <https://www.svscr.cz/zprava-o-cinnosti-v-oblasti-ochrany-zdravi-zvirat-v-roce-2020/> (accessed November 13, 2021).
- Stupka R. 2013. Chov zvířat. Powerprint, Praha.
- Šácha P. 2008. Peyerovy pláty - důležité místo pro imunitu. Celostní medicína. Available from <https://www.celostnimedicina.cz/peyerovy-platy-dulezite-misto-pro-imunitu.htm> (accessed October 29, 2021).
- Šilhánková L. 2002. Mikrobiologie: pro potravináře a biotechnology Vyd. 3., opravené a doplněné. Academia, Praha.
- Taghreed A, Hanan A, Amal A. 2013. A COMPARISON BETWEEN ORGANIC AND CONVENTIONALLY PRODUCED EGGS. Assiut Veterinary Medical Journal **59**:55–59.
- Tecno. 2021. Tecno | State of the art Layer systems. Available from <https://www.poultryequipment.com/en/solutions/layers> (accessed November 23, 2021).
- Tessema K, Bedu H, Ejo M, Hiko A. 2017. Prevalence and Antibiotic Resistance of Salmonella Species Isolated from Chicken Eggs by Standard Bacteriological Method. Journal of Veterinary Science & Technology **08**:421.
- Themes UFO. 2016. Endotoxemia. Veterian Key. Available from <https://veteriankey.com/endotoxemia/> (accessed October 28, 2021).
- Toman M. 2020. Slovo ministra – zákaz klecových chovů. eAGRI Ministerstvo zemědělství. Available from <https://eagri.cz/public/web/mze/ministerstvo-zemedelstvi/ministr/vystoupeni-a-clanky/slovo-ministra-zakaz-klecovych-chovu.html> (accessed November 9, 2021).
- Tuláček F. 2002. Chov hrabavé drůbeže. Brázda, Praha.

- Tůmová E. 2007. Vliv systému ustájení a výživy na kvalitu masa a vajec drůbeže. Výzkumný ústav živočišné výroby. Available from <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/04/Tumova-maso-a-vejce-2007.pdf>.
- Tůmová E, Englmaierová M, Ledvinka Z, Dlouhá G. 2010. Mikrobiální kontaminace vajec z klecového a podestýlkového chovu. ČZU v Praze, Praha.
- Vlčková J, Tůmová E, Ketta M, Englmaierová M, Chodová D. 2018. Effect of housing system and age of laying hens on eggshell quality, microbial contamination, and penetration of microorganisms into eggs. *Czech Journal of Animal Science* **63**:51–60.
- Vlková N. 2021. Evropská občanská iniciativa: Komise navrhne, aby se postupně ukončilo používání klecí pro chov hospodářských zvířat. Czech Republic - European Commission. Available from https://ec.europa.eu/czech-republic/news/210630_iniciativa_doba_klecova_cs (accessed November 9, 2021).
- Vokurka M, Hugo J. 2002. Velký lékařský slovník. Maxdorf, Praha.
- Votava M. 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno.
- Votava M, Broukal Z, Vaněk J. 2007. Lékařská mikrobiologie pro zubní lékaře. Neptun, Brno.
- Walsh M. 2011. Salmonellosis. Infection landscapes. Available from <http://www.infectionlandscapes.org/2011/10/salmonellosis.html> (accessed October 28, 2021).
- Whiley H, Ross K. 2015. Salmonella and Eggs: From Production to Plate. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **12**:2543–2556.
- Wierup M, Wahlström H, Lahti E, Eriksson H, Jansson DS, Odelros Å, Ernholm L. 2017. Occurrence of Salmonella spp.: a comparison between indoor and outdoor housing of broilers and laying hens. *Acta Veterinaria Scandinavica* **59**:13.
- Yerlikaya O. 2019. Probiotic potential and biochemical and technological properties of *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* strains isolated from raw milk and kefir grains. *Journal of Dairy Science* **102**:124–134.
- York K. 2000. Microbiological ecology - ppt video online download. Available from <https://slideplayer.com/slide/4685951/> (accessed October 29, 2021).

Seznam obrázků

Obrázek 1: <i>Salmonella</i>	9
Obrázek 2: Průnik salmonel střevním epitelem.....	13
Obrázek 3: Vizualizace interakce salmonely pomocí TTSS s hostitelskou buňkou.....	14
Obrázek 4: Schéma možnosti šíření salmonel	16
Obrázek 5: Stavba slepičího vejce.....	17
Obrázek 6: Stavba skořápky	18
Obrázek 7: Pohlavní soustava slepice.....	19
Obrázek 8: Horizontální a vertikální přenos salmonel	21
Obrázek 9: Výsledky sérotypizace salmonel u brojlerů v roce 2020.	23
Obrázek 10: Výsledky monitoringu salmonel u drůbeže.....	24
Obrázek 11: Výskyt salmonel v chovech nosnic pro konzumní vejce v letech 2015-2020	25
Obrázek 12: Kolonie celkového počtu mikroorganismů na Standard plate count agaru.....	31
Obrázek 13: Narostlé kolonie na TBX médiu	31
Obrázek 14: Narostlé kolonie na Slanetz-Bartley agaru.....	32
Obrázek 15: Porovnání změny barvy Rappaport-Vassiliadis bujónu.	33
Obrázek 16: Nárůst kolonií na Salmonella Shigella agaru	33
Obrázek 17: Kolonie narostlé na Trypton soya agaru a Oxoid Salmonella Test Kit.....	34

Seznam tabulek

Tabulka 1: Část Whiteova- Kauffmannova-Le Minor schématu	11
Tabulka 2: Výsledky monitoringu <i>Salmonella</i> ssp. v roce 2020	23
Tabulka 3: Výsledky sérotypizace salmonel u brojlerů v roce 2020	23
Tabulka 4: Rozdělení indikátorových mikroorganismů	26
Tabulka 5: Celkové počty vzorků.....	28
Tabulka 6: Stanovené počty mikroorganismů na vejcích.....	30
Tabulka 7: Výsledky pozitivních vzorků na rod <i>Salmonella</i>	34

