

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

Katedra biologie

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Adéla Unzeitigová

Střevní mikroflóra kuřat

Olomouc 2021

vedoucí práce: Mgr. Eva Jahodářová, Ph.D.

konzultant: Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.

## **Anotace**

Tato bakalářská práce je literární rešerší, která se zabývá složením, významem a funkcí střevní mikroflóry kuřat. V rámci tohoto tématu popisuje patogenní mikroorganismy ohrožující jak kuřata, tak jejich konzumenty. Zaměřuje se především na patogenní druh *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a problémům, které způsobuje ve velkochovech. Jelikož je prevence před patogeny pomocí antibiotik od roku 2003 zakázána, je potřeba využívat jiné, především udržitelné prostředky a jako nejvhodnější varianta se jeví probiotika. V této práci popisují mechanismy účinku a možnosti využití probiotik ve velkochovech.

Klíčová slova: střevní mikroflóra, kuřata, *Salmonella*, rezistence, probiotika

## **Anotation**

This bachelor thesis is a review of the composition, importance, and function of the chicken gastrointestinal microbiome. It focuses on the presence of chicken and human pathogens in the chicken's cecal microbiome. It describes *Salmonella enterica* subsp. *enterica* pathogenesis and problems it causes in commercial chicken production. In 2003 the use of antibiotics as prevention was banned. There is a need to find different and primarily sustainable nutritional additives. Probiotics seem to be an ideal alternative. The last part of the bachelor's thesis describes probiotics mechanisms of action and deals with the possibility of usage of probiotics in commercial chicken production.

Keywords: gastrointestinal microbiome, chickens, *Salmonella*, resistance, probiotics

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Jahodářové, Ph.D. a v kapitole Seznam použité literatury jsem uvedla veškeré použité zdroje.

Olomouc 2021

.....

Adéla Unzeitigová

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala především své vedoucí bakalářské práce paní Mgr. Evě Jahodářové, Ph.D. za praktické rady, trpělivost, vstřícnost a všechnen čas, který mi věnovala. Také bych chtěla poděkovat Mgr. Tereze Kubasové, Ph.D. za ochotu, věcné připomínky a pomoc při vyhledávání zdrojů.



## Obsah

1. Úvod .....	7
2. Cíle bakalářské práce.....	8
3. Střevní mikroflóra kuřat .....	9
3.1. Trávicí soustava ptáků .....	9
3.2. Charakteristika střevní mikroflóry a faktory, které ji ovlivňují.....	11
3.3. Význam střevní mikroflóry kuřat.....	12
3.4. Složení střevní mikroflóry kuřat .....	13
3.5. Vývoj střevní mikroflóry .....	15
3.6. Časté patogeny kuřat.....	16
4. Rod Salmonella .....	19
4.1. Obecná charakteristika.....	19
4.2. Taxonomie .....	19
4.3. Patogeneze .....	20
4.4. Faktory virulence .....	21
4.4.1. Ostrovy patogenity .....	21
4.4.2. Sekreční systém III.....	22
4.4.3. Endotoxiny a enterotoxiny .....	22
4.4.4. Plazmidy virulence .....	23
4.5. Hostitelská specifita salmonel.....	23
4.6. Salmonely vyskytující se u drůbeže.....	23
4.6.1. Národní ozdravovací programy .....	24
5. Studium a identifikace střevní mikroflóry.....	26
5.1. Kultivační metody a mikroskopie.....	26
5.2. Imunologické metody .....	26
5.3. Metody molekulární biologie.....	27
6. Antibiotická rezistence .....	31
6.1. Primární a sekundární rezistence .....	31
6.2. Mechanismy vzniku rezistence.....	32
6.3. Důsledky antibiotické rezistence .....	32
7. Probiotika .....	34
7.1. Účinek probiotik .....	34
7.2. Mechanismus účinku .....	35

7.3. Příprava probiotik .....	36
7.4. Využití probiotik v chovech drůbeže.....	36
7.4.1 Charakteristika vybraných probiotických bakteriálních rodů .....	37
7.5. Prebiotika .....	39
8. Závěr.....	40
9. Seznam zkratk.....	41
10. Seznam použité literatury .....	42

## 1. Úvod

Střevní mikroflóra tvoří velmi rozmanitou a komplexní ekologickou niku, která jedinci pomáhá s trávením potravy a chrání jej před patogeny. Mláďata v běžné přírodě získávají první zástupce své mikroflóry od rodičů, ať při průchodu porodními cestami, nebo při soužití. Kuřata ve velkochovech se vyvíjí bez kontaktu s rodiči a složení jejich mikroflóry tak závisí pouze na vnějších vlivech jako je krmivo, podestýlka a vzduch v hale. Jejich mikroflóra tak není plně rozvinuta a kuřata jsou velmi náchylná k infekcím. Jeden z primárních patogenů je bakteriální rod *Salmonella*, kterému se v této práci věnuji. Salmonely jsou v posledních letech kontrolovány programy pro tlumení výskytu salmonel, ale pro konzumenty drůbežního masa a vajec stále představují riziko.

Pro prevenci před patogenními organismy je již několik let zakázáno užívání antibiotik, které zároveň s patogeny eliminovaly i zdravé bakterie a zároveň způsobily celosvětový problém antibiotické rezistence. Z toho důvodu je prevence řešena probiotiky, tzv. zdravými bakteriemi, které jsou schopny pomocí kompetitivní exkluze a dalších mechanismů chránit střeva a posilovat imunitu jedince.

Střevní mikroflóru lze modifikovat, ovšem je nutné znát zde žijící druhy a jejich vztahy. Výzkum mikroflóry byl dříve možný pouze pomocí kultivačních a mikroskopických technik. Valná většina druhů žijících ve střevech je ale nekultivovatelná, proto s objevem molekulárně genetických metod se znalost složení a vzájemných vztahů mezi mikroorganismy značně zvýšila

## **2. Cíle bakalářské práce**

Vytvořit literární rešerši na téma střevní mikroflóra kuřat

- Konkrétně popsat složení a význam střevní mikroflóry kuřat
- Rovněž se zaměřit na infekce způsobené bakterií *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a problémy, které způsobuje ve velkochovech kuřat
- Vývoj nových probiotik při boji se *Salmonella enterica* subsp. *enterica* a dalšími střevními patogeny kuřat

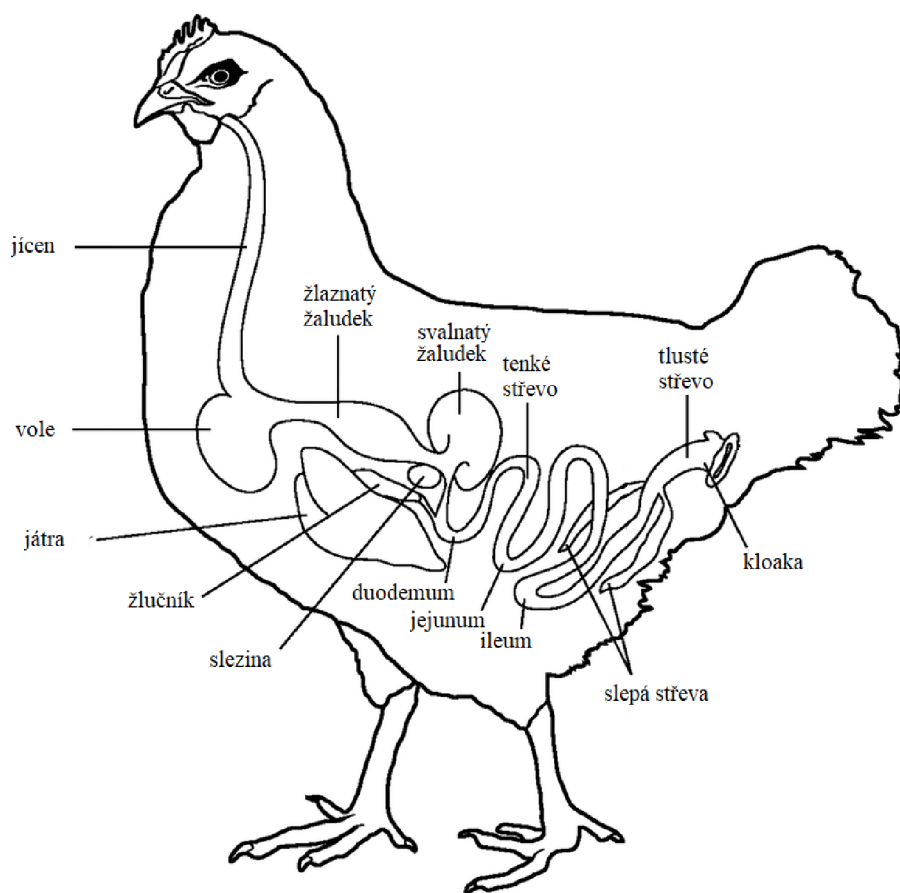
### 3. Střevní mikroflóra kuřat

#### 3.1. Trávicí soustava ptáků

Trávicí soustava ptáků je rozdělena na část hlavovou a trávicí trubici (složení trávicí soustavy slepice viz Obr. 1). Hlavová část začíná zobákem, který se přetvořil z čelistí. Zobák je i náhradou za zuby, ptáci jím dokážou rozlousknout tvrdé plody a semínka. Horní patro zobákové dutiny je opatřeno rohovými výběžky umožňující loupání semen. Do zobákové dutiny ústí několik slinných žláz mucinózního charakteru, ty obalují potravu a u některých druhů slouží k lepení jejich hnízd. Při polykání má významnou funkci hltan a jazyk. Jazyk nemá vlastní svalstvo, ale vstupují do něj svaly hyobrachiálního aparátu a ty s ním pohybují (Zicháček, 2012).

Trávicí systém pokračuje jícnem, ten začíná hltanem v zadní části zobákové dutiny a na konci je rozšířen ve vakovité vole (ingluvies). Pokud jsou žaludky plné, tak vole slouží jako zásobárna potravy (Zicháček, 2012). Ptáci mají žaludek žláznatý (proventriculus), žaludek svalnatý (ventriculus) a vrátníkovou část žaludku. Ve žláznatém žaludku je potrava trávena chemicky a v žaludku svalnatém potom mechanicky. Žláznatý žaludek je tenkostěnný, hustě prostoupený žlázami, které produkují žaludeční šťávu. Žaludeční šťáva ptactva obsahuje pepsin, chymozin a kyselinu chlorovodíkovou. Svalnatý žaludek je tvořen kruhovou svalovinou. Vnitřní vrstvu žaludku vystýlá sliznice krytá pevnou kutikulou. V dutině žaludku jsou zrnka písku a jemné kamínky, které pomáhají mechanickému trávení potravy (Černý, 2005).

Přes vrátníkovou část žaludku potrava přechází do tenkého střeva (intestinum tenue), jehož hlavní funkcí je trávení a resorpce. Na trávení v tenkém střevě se podílí žluč a pankreatické šťávy. Na tenké střevo navazuje ileocekální chlopeň, z které se větví tlusté střevo a dvě slepá střeva. Tlusté střevo (intestinum crassum) je krátké a vstřebává se zde voda a soli. Slepá střeva (ceacum) jsou poměrně dlouhá a velmi bohatá na mikrobiální flóru, a proto jsou zásadní pro trávení celulózy a imunitu (Obr. 2). V konečné části trávicí soustavy je kloaka (cloaca), kde se spojují jak vývody trávicí, tak vývody močopohlavního systému (Černý, 2005).



**Obr.1** Trávicí trakt kuřat (Upraveno dle Clavijo a Flórez, 2018)



**Obr. 2** Slepé střevo slepice (autor fotky: Mgr. Eva Jahodářová Ph.D.)

### 3.2. Charakteristika střevní mikroflóry a faktory, které ji ovlivňují

Střevní mikroflóra je soubor mikroorganismů žijících ve střevech. Objevují se zde bakterie, houby a prvoci. Dominantní jsou bakterie a ve vztahu k hostiteli jsou tyto mikroorganismy mutualistické a patogenní. Správné složení mikroflóry má zásadní význam pro fungování celého organismu. Dodává hostiteli energii ze živin, které by nezvládl metabolizovat a hlavně má nezastupitelnou funkci pro imunitní systém (Adil, Magray, 2012). Každá část střev je osídlena jiným počtem bakterií. V tenkém střevě se nachází  $<10^8$  g<sup>-1</sup>. Druhou částí jsou slepá střeva, která obsahují více bakterií  $10^{11}$  g<sup>-1</sup> a třetí částí je tlusté střevo, kde se nachází bakterie z obou předcházejících částí (Adil, Magray, 2012).

Střeva osidlují mikroorganismy fakultativně anaerobní a slepá střeva pak striktně anaerobní. Střevní mikroflóru tvoří přes 1000 druhů mikroorganismů z kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes*. Tyto dva kmeny mohou tvořit až 95 % z celkové střevní mikroflóry (Oakley a kol. 2014). Ve značně menším zastoupení se zde objevují zástupci kmenů *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Verrucomicrobia* (Harris a kol. 2012).

Střevní mikroflóra se začíná vyvíjet hned po vylíhnutí kuřete. V normálních podmínkách je hlavním donorem bakterií dospělá slepice a prostředí. Ve velkých líhních, kde jsou vejce rodičovským slepicím odebrána a sterilizována, je kolonizace mikroflóry závislá primárně na prostředí. Pokud se v prostředí velkochovu objeví patogen, snadno se usadí ve slabě kolonizovaném střevě kuřete (Vídeňská a kol. 2014).

Jeden z faktorů prostředí je podestýlka. Ta se skládá z počáteční podestýlky, trusu, peří a krmiva. V komerčních chovech se jako podestýlka používají piliny z měkkého nebo tvrdého dřeva, hobliny z měkkého dřeva, drcená sláma a rýžové slupky. Typ podestýlky může být zodpovědný za změny ve váhových přírůstcích v raném stádiu života slepic (Torok a kol. 2009). Podestýlka by měla být suchá s dostatečnou schopností absorpce vody. V případě příliš vlhké podestýlky se patogeny množí rychleji a také se zvyšuje produkce amoniaku. V opačném případě, kdy je podestýlka moc suchá, vzniká hrozba respiračních onemocnění (Carlile, 1984).

Dalším faktorem je krmivo a jeho složení. I přesto, že jsou kuřata označována za semenožravé živočichy, jejich anatomie, fyziologie i nutriční strategie poukazuje na všežravost (Klasing, 2005). Nosnice a brojleři jsou dva typy kuřat pro hospodářské využití. Aby byl plně využit genetický potenciál každého typu, musí mít speciálně upravenou krmnou směs. Pro krmivo nosnic je podstatný vápník, který ovlivňuje kvalitu skořápek (Zelenka a kol, 2007), dále také karotenoidy, kterými je ovlivňována sytost barvy žloutku (Zelenka, 2014).

Hlavními komponenty krmných směsí je kukuřice, tou může být tvořeno 60–70 % směsi. Druhou důležitou součástí je pšenice, která tvoří až 50 % krmné směsi. Dalšími možnými komponenty jsou ječmen, pšeničné otruby, rostlinné oleje, rybí moučka a extrahovaný šrot ze sóji, slunečnice, nebo řepky (Zelenka a kol, 2007).

Krmivo poskytuje výživu jak hostiteli, tak bakteriím žijícím ve střevech. Jednoduché a stravitelné karbohydráty jsou stráveny v tenkém střevě. Nestravitelné sacharidy, neškrobové polysacharidy, nestravitelné oligosacharidy a škrob se dostanou do slepých střev, kde podporují růst bakterií např. rodu *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, atd. (Haberecht a kol. 2020).

Při podávání krmiva s velkým obsahem proteinů, může dojít až k nekrotické enteritidě, protože bakterie při trávení bílkovin produkují toxické metabolity. Hlavně *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus gallinarum* a *Proteus mirabilis*. V tomto případě jako léčba slouží probiotikum obsahující *Bacillus subtilis*, který provádí proteolýzu bez produkce toxinu. Další možností je strava s vysokým podílem tuků, při té se zvyšuje počet bakterií množících se v lipidech jako *Verrucomicrobia*, *Deltaproteobacteria*, *Ruminococcus*, *Lachnospiraceae*, a *Bacteroidaceae*. Tyto bakterie jsou v přiměřeném počtu hostiteli přínosné, pokud se jejich počet zvýší, dochází k zánětům střev a ke zvýšení jejich propustnosti (Haberecht a kol. 2020).

Krmivo je označováno jako primární zdroj salmonel. Objevují se jak v živočišných, tak rostlinných směsích, ale nejčastější výskyt byl potvrzen ve směsích bohatých na proteiny. Buňky sérovaru *S. Enteritidis* jsou schopny v krmných směsích přežít celé měsíce (Skřivanová a Rada, 2014).

### **3.3. Význam střevní mikroflóry kuřat**

Mikroorganismy střevní mikroflóry metabolizují pro hostitele nestravitelné karbohydráty na mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA's – Short-Chain Fatty Acids), ty je jedinec schopný strávit a využít jejich energii (Adil, Magray, 2012). SCFA's tvoří až 10 % z celkové energie kuřete. Dále také snižují hodnoty pH ve střevech, a tím tlumí katabolismus žluči a následnou přeměnu na kyselinu žlučovou (Oakley a kol. 2014). Také podporují tvorbu erytrocytů, regulují produkci mucinu a proudění krve ve střevech (Pan a kol. 2014).

Jedny z důležitých SCFA's jsou acetát, propionát a butyrát. Butyrát je podstatný pro metabolismus energie buněk, a navíc potlačuje sekreční systém proteinů typu III salmonel, pomocí kterých dopravují salmonely své efektorové proteiny do buněk hostitele. Butyrát produkují zástupci skupiny *Firmicutes*, rody *Faecalibacterium*, *Roseburia* a *Eubacterium* (Van Immerseel a kol. 2005).



Mikroorganismy cekální mikroflóry mohou být významnými producenty aminokyselin a vitamínů B a K. Slepá střeva a tlusté střevo ale nemají schopnost dané sloučeniny vstřebávat, jelikož procesy vstřebávání probíhají v tenkém střevě. Tyto sloučeniny jsou proto vyloučeny spolu s trusem. Kuřata jsou zvířata koprofágická, tudíž vyloučené vitamíny a aminokyseliny, mohou projít trávicím traktem znovu a být vstřebány v tenkém střevě. Kuřata chovaná v klecích, tento zdroj vitamínů nemají (Pan a kol. 2014).

Dále pak mohou některé mikroorganismy produkovat látky, které pomáhají chránit před patogeny. Například *Lactobacillus reuteri* produkuje reuterin, ten inhibuje růst koliformních bakterií, salmonel a rotavirů (Adil, Magray, 2012). *Lactobacillus reuteri* je považován za účinné probiotikum a se zvířaty i člověkem žije v symbiotickém vztahu (Casas a Dobrogosz, 2000).

Zdravá střevní mikroflóra stimuluje vývoj mukózní vrstvy, epitelové vrstvy a slizničního vaziva. Tyto vrstvy tvoří přirozenou membránu mezi bakteriemi a hostitelem a znesnadňují patogenním bakteriím proniknutí do krevního řečiště (Shang a kol. 2018). Dále využívá principů kompetitivní exkluze, kdy jedna populace osídlí trakt tak, že znemožní osídlení jiné populací. Tato teorie byla poprvé použita v roce 1973, jako metoda prevence před patogenními organismy (Adil, Magray, 2012).

Správná střevní mikroflóra je pro hostitele energeticky náročná. Bakterie spotřebovávají živiny a proteiny, a proto jsou u bezmikrobních kuřat zaznamenány vyšší přírůstky váhy než u konvenčně chovaných (Gaskins, Collier, Anderson, 2002).

### **3.4. Složení střevní mikroflóry kuřat**

Každá ze tří částí střev je osídlena jiným typem bakterií, nebo alespoň v jiném procentuálním zastoupení (Tab. 1.). Proto má každá část střev jinou funkci a jiný podíl na vstřebávání živin, fermentaci a imunitních reakcích (Xiao a kol. 2017).

Ve studii Xiao a kol. (2017), byla pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA zkoumána střevní mikroflóra 40 zdravých, kuřat, které byly staré 42 dní. Kuřata vykazovala v rámci střevní mikroflóry 97% shodu.

Studie potvrdila výskyt 5 dominantních kmenů: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria*.

**Tab. 1.** Percentuální zastoupení bakteriálních kmenů ve střevech kuřat (upraveno dle Xiao a kol. 2017)

<b>kmeny</b>	<b>tenké střevo</b>	<b>tlusté střevo</b>	<b>slepá střeva</b>
<i>Firmicutes</i>	>60 %	>70 %	~40 %
<i>Bacteroidetes</i>	<10 %	<10 %	>50 %
<i>Proteobacteria</i>	>10 %	<10 %	<10 %
<i>Actinobacteria</i>	~10 %	~5 %	<1 %
<i>Cyanobacteria</i>	~5 %	<1 %	<1 %
ostatní	<1 %	<1 %	<1 %

Díky konstantní tělesné teplotě 37–42 °C mají kuřata podobné složení střevní mikroflóry jako ostatní teplokrevní živočichové. *Firmicutes* a *Bacteroidetes* mají většinové zastoupení v mikroflóře lidí, prasat i kuřat. Větší rozdíly se objevují až v rámci rodů a druhů. Některé druhy, které již byly popsány u lidí, se u kuřat mohou objevit jako hostitelsky adaptované. Tyto taxony mohou mít mezi sebou pouze 94% podobnost genu pro 16S rRNA (Kubasová a kol. 2019).

Na rozdíl od života komerčního brojlera, život nosnic trvá přibližně jeden rok. Jejich střevní mikroflóra má tedy možnost se plně vyvinout. K ustálení dochází kolem 20. týdne života (Rychlík, 2020).

Tenké střevo se vyznačuje malou diverzitou. Objevují se zde především bakterie kmene *Firmicutes*, rodů *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Turicibacter* a *Clostridium*. Tento kmen tvoří 94–98 % celkové mikroflóry tenkého střeva dospělé slepice. Dále se zde objevují zástupci kmene *Proteobacteria*, konkrétně rody *Escherichia coli* a *Helicobacter* (Ranjitkar a kol. 2016).

Mikroflóra slepých střev je rozmanitější. Některé cekální vzorky obsahují 58–96 % bakterií kmene *Firmicutes*. Odlišné cekální vzorky mohou obsahovat 10–90 % zástupců *Bacteroidetes*. *Proteobacteria* a *Actinobacteria* se v běžné cekální mikroflóře objevují v zastoupení 2–3 % (Ranjitkar a kol. 2016), ale bylo pozorováno i 10% zastoupení. U žádného kuřete s vysokými hodnotami rodu *Proteobacteria* a *Actinobacteria* nebyly sledovány abnormální projevy chování (Rychlík, 2020).

Vzorky mikrobiálního složení tlustého střeva jsou nejčastěji získávány z trusu kuřat. Vyskytuje se v něm 84–87 % zástupců z tenkého střeva a až 99 % zástupců ze slepého střeva.

Mikroflóra tlustého střeva je, až na výjimky, stejná jako mikroflóra slepého střeva určitého kuřete (Yan a kol. 2019).

### 3.5. Vývoj střevní mikroflóry

Život komerčního brojlera trvá většinou 42 dní. Za tuto dobu projde střevní mikroflóra mnoha změnami. Změny jsou spojeny se stářím a s různými typy stravy. Tento typ chovu je charakteristický tím, že nedochází ke kontaktu kuřete s rodičovskou slepicí. Vývoj je tedy zcela závislý na prostředí líhně (Oakley a kol. 2014).

Většina studií o vývoji střevní mikroflóry tedy sleduje pouze 42 dní života slepice. Dle výzkumu Xi a kol. (2019) dochází k největšímu rozvoji diverzity a množství cekální mikroflóry od 1 do 28 dne. Dominantními kmeny jsou *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*. Bylo zjištěno, že procentuální zastoupení *Firmicutes* s věkem roste. Naopak *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* s věkem klesá. Mezi 28. a 42. dnem nedochází k žádným významným změnám. Nastávají pouze malé změny v druhovém složení, ale kmenové složení se neliší. *Proteobacteria* tvořila 42. den pouze 4,8 % mikrobiomu, ale obsahovala patogenní taxony jako *Salmonella*, *Vibrio* a *Helicobacter*. Došlo také ke zmnožení rodu *Butyricoccus*, jde o probiotický mikroorganismus produkující butyrát. Ze studie vyplývá, že střevní mikrobiom bývá ustálen od 1 měsíce života.

Dle výzkumu Videnska a kol. (2014) se život nosnic z mikrobiologického hlediska dělí na čtyři části. První částí je první týden života kuřete. V této fázi je cekální mikrobiom tvořen téměř z 50 % kmenem *Proteobacteria*, tento kmen je reprezentován primárně zástupci čeledi *Enterobacteriaceae*, rodu *Escherichia*. Zbytek mikroflóry je tvořen kmenem *Firmicutes*, převážně z čeledi *Lachnospiraceae*.

Jako druhá část je označováno období od druhého do čtvrtého týdne života. V tomto období se téměř 90 % cekální mikroflóry skládá ze zástupců čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* a dalších zástupců kmene *Firmicutes*. Z čeledi *Lachnospiraceae* se ve střevě objevují především zástupci rodů *Blautia* a *Roseburia*, z čeledi *Ruminococcaceae* je to rod *Faealibacterium*. V tomto období tvoří *Proteobacteria* méně než 10 % mikrobiomu. Čeleď *Lactobacillaceae* z kmene *Firmicutes* má pouze minoritní zastoupení. Stejně kmeny osidlují i střevní mikroflóru kuřat z tradiční farmy, ty ale vykazují až třikrát větší druhovou rozmanitost.

Třetí fází mikrobiálního vývoje je 2.–6. měsíc života kuřat. V tomto období dochází k poklesu zastoupení kmene *Firmicutes*, ten je nahrazován zástupci čeledi

*Porphyromonadaceae* a *Bacteroidaceae* z kmene *Bacteroidetes*. V šestém měsíci tvoří zástupci *Bacteroidetes* 55 % celkové mikroflóry slepého střeva.

Po 7. měsíci zůstává složení mikroflóry víceméně stejné, toto období je čtvrtou a poslední částí vývoje cekálního mikrobiomu. Zastoupení dvou nejpočetnějších kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* je stálé, každý tvoří zhruba polovinu mikrobiomu.

Percentuální zastoupení bakterií se v různých studiích liší, může se také objevovat značná variabilita mezi jednotlivými kuřaty.

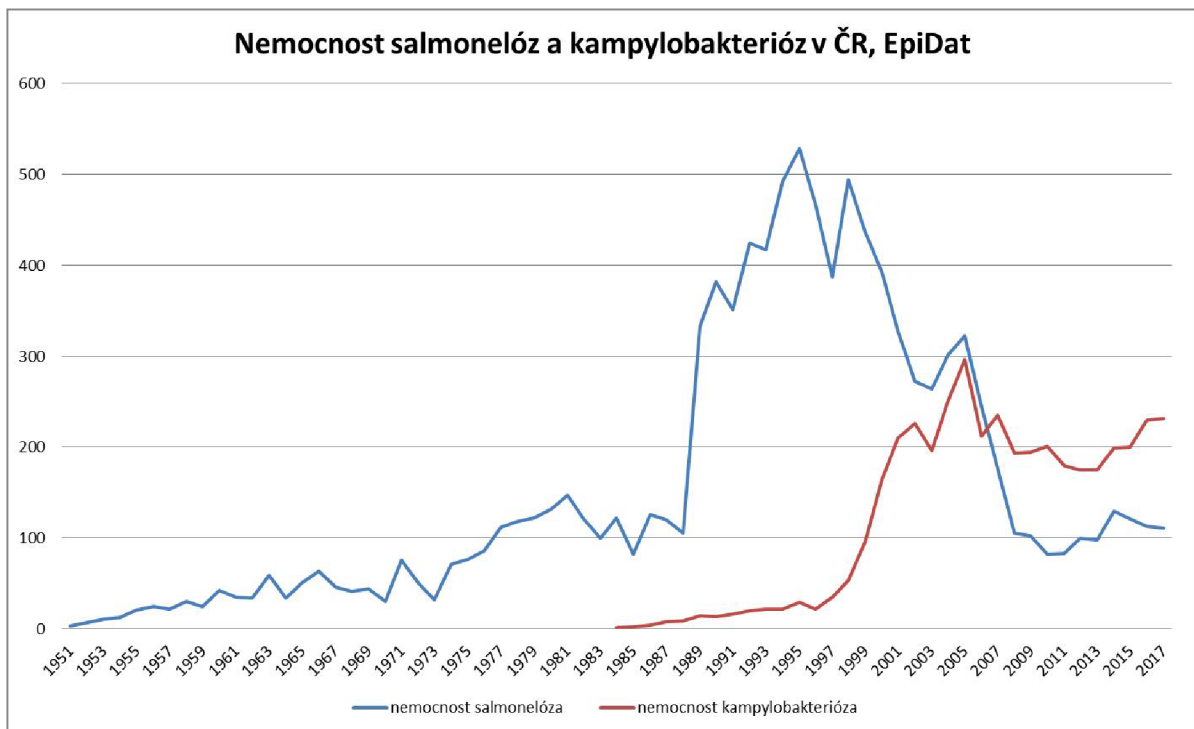
### 3.6. Časté patogeny kuřat

Nejčastější patogeny nacházející se ve střevech drůbeže jsou *Salmonella*, *Campylobacter*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Listeria*. Všechny tyto bakterie způsobují celosvětový problém alimentárních onemocnění (Bhaisare a kol. 2014).

Drůbeží maso běžně patogeny neobsahuje, ale při porážce dochází ke křížové kontaminaci přes výkaly. Maso se pak stává vhodným médiem pro růst bakterií díky vlhkosti, dostatku dusíkatých látek a dostatku minerálů. I pH je ideální pro množení mikroorganismů, pohybuje se od 5,7–6,7 (Bhaisare a kol. 2014).

V České republice je v posledních 13 letech je u lidí nejčastějším původcem průjmových onemocnění *Campylobacter*. V roce 2018 byl prokázán v cékách 60 % brojlerů na jatkách. Dle studií se kamylobakter vyskytuje na povrchu 70 % veškerého chlazeného kuřecího masa. Výskyt kamylobakterů je sledován Národní referenční laboratoří pro kamylobaktery. U člověka stačí k vyvolání kamylobakteriíózy pouhých 500 bakterií. Inkubační doba onemocnění je běžně 2–5 dnů (Špačková, 2018). Nejčastěji izolovanými druhy jsou *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* (Bhaisare a kol. 2014). Hlavním symptomem u člověka je krvavý průjem, horečka, křeče břicha a bolesti hlavy. V České republice jsou kamylobakteriíózy hlášeny jako sporadické nebo rodinné výskyty (Špačková, 2018). V rozvojových zemích kamylobaktery způsobují epidemie a to především u dětí (Kaakoush a kol. 2015). Pro kuřata není kamylobakter ohrožením, ve střevech působí jako běžná komenzální bakterie (Newell, Fearnley, 2003).

Počet hlášených salmonelóz se od roku 2005 značně snížil, pravděpodobně je to způsobeno fungujícími programy tlumení salmonelóz (Graf 1.).



**Graf 1.** Nemocnost salmonelóz a kampylobakterióz v ČR v letech 1951-2017, EpiDat, počet nakažených na 100 000 obyvatel (Špačková, 2018)

*Staphylococcus aureus* krom jiných onemocnění způsobuje u lidí stafylokokovou enterotoxikózu. Jedná se o nejčastější otravu z potravin u nás. Inkubační doba infekce je 1–6 hodin. Onemocnění je u lidí provázeno průjmem, zvracením, křečemi a bolestmi hlavy. Symptomy jsou velmi intenzivní, ale přechází do 24 hodin (Bhaisare a kol. 2014).

*Escherichia coli* je běžný saprofytický organismus vyskytující se ve střevech. Jsou známy stovky sérovarů a přibližně 10–15 % z nich je patogenních, způsobujících kolibacilózu. Jedná se o endemické onemocnění, kvůli kterému dochází k úhynu embryí a kuřat v líhních. Většina sérovarů vyvolává onemocnění pouze u ptáků, ale některé se mohou přenést i na člověka. Mezi projevy u kuřat patří zánět žloutkového váčku, koliseptikéme, aerosakulitida, salpingitida. Tyto klinické příznaky mohou způsobovat úhyn (Nolan a kol. 2020).

Listerióza způsobená bakterií *Listeria monocytogenes* je označována za jednu z nejnebezpečnějších antropozoonóz, její mortalita je až 20 %. Výskyt listeriózy na 100 000 obyvatel je přibližně 0,15. Nejzávažnější problémy způsobuje lidem s oslabenou imunitou, důchodcům a těhotným ženám, může způsobit i smrt plodu. Listeriíóza má několik typů

projevů. Jedním typem je průjem a horečka trvající 2 dny. Listerióza ale může způsobit i bakteriémii, meningitidu, encefalitidu nebo zánět osrdečníku (Rothrock a kol. 2017). Pro kuřata představuje listerie také velkou hrozbu. Onemocnění se u nich projevuje septikémií nebo encefalitidou (Dhama a kol. 2013).

## 4. Rod *Salmonella*

### 4.1. Obecná charakteristika

*Salmonella enterica* sérovar Choleraesuis byla poprvé izolována v USA v roce 1885 Theobaldem Smithem z prasete, které trpělo morem. Rod *Salmonella* byl pojmenován podle Daniela Elmeraa Salmona, ředitele instituce kde výzkum probíhal (Katscher, 1997).

*Salmonella* je rod gramnegativních nesporulujících bakterií patřících do čeledi *Enterobacteriaceae*. Téměř všechny typy salmonel mají peritrichální bičíky umožňující pohyb, pouze *Salmonella enterica* sérovar Gallinarum a *Salmonella enterica* sérovar Pullorum nemají bičíky žádné (Andrews-Polymenis, 2010). Z praktických důvodů se salmonely dělí na antropopogenní a zoopogenní. Do antropopogenních salmonel patří sérovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C, které způsobují onemocnění břišní tyfus a paratyfus. Zoopogenní sérovary jsou například *S. Enteritidis* a *S. typhimurium*, ty způsobují salmonelózu. K přenosu dochází při konzumaci nakažených potravin, jako vejce a maso, obsahující salmonely. Aby nedošlo k nákaze, je nutné potraviny tepelně zpracovat. Salmonely přežijí teploty do 60°C (Votava, 2010). Obvyklá inkubační doba salmonelózy je 12–36 hodin (může být 6–72 hodin). Salmonelóza bývá provázena průjmami, křečemi břicha, horečkou až 39°C, tyto příznaky by neměly trvat déle než 7 dní. Salmonely jsou poté obvykle 4 týdny vylučovány se stolicí (Špačková a Daniel, 2019).

### 4.2. Taxonomie

Rod *Salmonella* se dělí do dvou druhů *S. enterica* a *S. bongori*. *Salmonella enterica* se dále dělí do šesti poddruhů (Andrews-Polymenis, 2010) (Tab. 2.).

Taxonomie salmonel je popsána v Kauffmann–White–Le Minor schématu. To bylo publikováno Fritzem Kauffmannem v roce 1934. Jde o dokument obsahující všechny dosud známé sérovary salmonel. V roce 1934 obsahovalo schéma 44 sérovarů, do dnes jich bylo popsáno přes 2500 (Dědičová, Karpíšková, 2009). Sérovary jsou klasifikovány na základě antigenů vyskytujících se na povrchu bakterií. Jedná se o antigen somatický (O), bičíkový (H) a kapsulární (Vi). 50 z těchto sérovarů bylo určeno jako patogeny člověka a dalších obratlovců, všechny patří do poddruhu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Liu a kol. 2014).

**Tab. 2.** Taxonomie rodu *Salmonella* (upraveno dle Brenner a kol., 2000).

rod	druh	poddruh	počet sérovarů
<i>Salmonella</i>	<i>enterica</i>	<i>enterica</i>	1 454
		<i>salamae</i>	489
		<i>arizonae</i>	94
		<i>diarizonae</i>	324
		<i>houtenae</i>	70
		<i>indica</i>	12
<i>Salmonella</i>	<i>bongori</i>		20

O antigen je součástí lipopolysacharidových struktur na povrchu gramnegativních bakterií. Somatické antigeny se dělí na dvě hlavní skupiny podle prvního cukru O-struktury. První skupina obsahuje N-acetylglukosamin nebo N-acetylgalaktosamin, druhá skupina začíná galaktózou. Podle O-antigeny bylo v Kauffmann-White- Le Minor schématu popsáno 46 sérovarů. Vyznačují se alternativními kombinacemi struktur, což poskytuje selektivní výhodu (Liu a kol. 2014). H antigen je tvořen proteinem flagelinem, který je kódován geny *fliC* a *fliB*, dělí se na antigen první a druhé fáze (McQuinston a kol. 2011). Vi antigen je typický pro sérovar *S. Typhi*. Je významným faktorem virulence, protože obaluje celou bakterii a inhibuje fagocytózu. Představuje protektivní antigen a má důležitou roli při vývoji vakcín proti břišnímu tyfu (Hu a kol. 2017).

Často se objevují salmonely autoaglutinogenní, což znamená, že aglutinují bez přítomnosti antisér, a poté je není možné zařadit (Bale a kol. 2016). Také se mohou objevovat salmonely monofázické. Monofázický typ, který se v poslední době v Česku často objevuje, je monofázická *S. Typhimurium* (postrádá gen *fljB* kódující druhou fází H antigenu), v letech 2017 a 2018 tvořila 0,6 % všech případů a tím se dostala na 4. místo v přehledu nejčastějších sérovarů *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (Daniel a kol. 2019).

### 4.3. Patogeneze

V naprosté většině případů se *Salmonella* do těla dostává kontaminovanou potravou. V žaludku musí překonat velmi kyselé pH. Bakteriální buňky, které přežijí, začnou v tenkém střevě napadat sliznici pomocí adhezínů. Poté vstoupí do epitelu skrz M buňky, které jsou součástí Peyeroých kanálků. V bazální části epitelu jsou salmonely pohlceny makrofágy,



dendrickými buňkami a neutrofilními granulocyty. V těchto buňkách přežívá salmonela ve speciální membránové organelle SCV (Salmonella Containing Vacuole) (Santos a Bäumlér, 2004). Makrofágy obsahující SCV jsou pasivně transportovány do mízních uzlin, sleziny a jater (Ernst a kol. 2001).

Ke kontaminaci vajec dochází přes skořápku, nebo přímo v procesu utváření vejce. *S. Enteritidis* i *S. Typhimurium* mají schopnost kolonizovat i reprodukční systém slepic. *S. Enteritidis* je častější původce přímé kontaminace, díky její schopnosti se lépe přichytit k epitelu reprodukčního systému (Whiley a Ross, 2015).

#### **4.4. Faktory virulence**

##### **4.4.1. Ostrovy patogenity**

Součástí chromozomů jsou i geny virulence, které jsou vždy seskupeny. Tyto shluky se nazývají ostrovy patogenity a mají velikost 10 000 pb až 200 000 pb. Ostrovy patogenity zajišťují genetickou přizpůsobivost a kódují faktory virulence, jako jsou toxiny, invaziny, sekreční systémy II, III a IV, apod. K přenosu ostrovů patogenity dochází horizontálně přes genetické elementy, tj. plazmidy, bakteriofágy a transpozony (Hacker a kol. 1997). U salmonel bylo dosud objeveno 21 ostrovů patogenity (SPI – Salmonella pathogenicity island), ty jsou obsaženy v genomu téměř všech sérovarů (Lou a kol. 2019). Nejprobádanější jsou SPI-1 a SPI-2, které zároveň kódují dva sekreční systémy typu III (T3SS) (Hansen-Wester a Hensel 2001).

SPI-1 má klíčovou roli pro invazi patogenu do hostitelské buňky. Je zde kódován jeden sekreční systém typu III, který za tuto funkci zodpovídá. Další proteiny kódované v SPI-1 způsobují změny v cytoskeletu a metabolismu hostitelské buňky a také potlačují zánětlivou reakci hostitele. Množství a vývoj exprese těchto proteinů má vliv na závažnost průběhu infekce (Lou a kol. 2019).

V SPI-2 je kódován T3SS druhého typu, ten ovlivňuje růst a replikaci v hostitelském organismu. Jsou zde kódovány proteiny, které tvoří SCV membránu (Hansen-Wester a Hensel 2001).

Hlavní funkcí SPI-3 je tvorba proteinu MgtCB, který je nezbytný pro přežití v intracelulárním prostředí makrofágu s nízkou hladinou  $Mg^{2+}$ . Výzkum mezi sérovary ukázal, že SPI-3 má velmi variabilní sekvenci, ve struktuře se objevují delece i přidané genové shluky (Hensel, 2004). SPI-4 kóduje protein SiiE, který zprostředkovává nefimbriální

adhezi (Gerlach a kol. 2007). SPI-5 kóduje efektorové proteiny pro oba druhy T3SS. Významným ostrovem patogenity je SPI-7, který se objevuje u sérovarů *S. Typhi*, *S. Paratyphi C* a *S. Dublin*. Tento ostrov je totiž zodpovědný za expresi kapsulárního antigenu (Pickard a kol. 2003)

#### **4.4.2. Sekreční systém III**

Sekrece proteinů je důležitá funkce prokaryotické buňky, umožňuje transport proteinů z cytoplazmy do organel buňky vlastní nebo cizí. Je popsáno 7 typů sekrečních systémů, některé se nachází téměř u všech bakterií, ale některé jsou vysoce specializované a nachází se pouze u pár druhů, nebo slouží k přenosu pouze jednoho proteinu. Tyto sekreční systémy slouží k růstu bakterií, a v některých případech vytváří ideální vnější prostředí pro replikaci (Green, Meccas, 2016). Sekreční systém III se objevuje u gramnegativních bakterií, dosud byl popsán u rodů *Salmonella*, *Yersinia*, *Shigella*, *Escherichia*, *Chlamydia* a *Pseudomonas* (Schindler, 2014).

Sekreční systém III, se podílí na dvou na sobě nezávislých dějích. Prvním dějem je výstavba obou základních struktur bičíku, což jsou proteinové disky, které kotví bičík do cytoplazmatické membrány a buněčné stěny. Druhou částí je samotné vlákno bičíku, které vzniká polymerizací flagelinu (Imada, 2018). Druhým dějem je sekrece toxických proteinů do eukaryotické buňky, kterou poškodí, či usmrtí. Tento proces probíhá přes komplexní strukturu zvanou injektozom složenou z jehlovitého přívěsku a bazálního tělesa. V bazálním tělese se nachází chaperony a ATPáza, které udržují protein v nesbaleném stavu, aby byl schopen transportu skrz kanál jehlovitého přívěsku (Galán a kol. 2014) T3SS je schopen překonat tři bariéry, a to vlastní cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu hostitelské buňky (Green, Meccas, 2016).

#### **4.4.3. Endotoxiny a enterotoxiny**

Součástí vnější membrány buněčné stěny salmonel je lipopolysacharid endotoxin. Endotoxiny jsou zodpovědné za septický šok, ten způsobuje buněčné a metabolické abnormality hostitelských buněk, které vedou k apoptóze (da Silva a kol. 1993). Studie ukázala, že rozpoznání endotoxinu kuřecími makrofágy způsobilo mnoho signálních kaskád, které vedou ke změně exprese genů. Makrofágy na endotoxiny salmonel reagují nejvíce po 4 hodinách, po 8 hodinách jejich imunitní odpověď prudce klesá. To znamená, že po prvotním šoku se makrofágy kuřat rychle vrací k homeostáze (Ciraci a kol. 2010).

Enterotoxin se dříve uváděl jako příčina průjmu, ale enterotoxiny byly objeveny i u sérovarů, které průjem nezpůsobují. Poslední studie naznačují, že enterotoxiny nejsou faktory virulence, ale udržují stavbu membrány a její integritu (Nakanoa a kol. 2012).

#### **4.4.4. Plazmidy virulence**

Plazmidy jsou kruhové molekuly DNA, které se přirozeně vyskytují v cytoplazmě prokaryotických a někdy i eukaryotických organismů. Plazmidy se dělí na několik typů, kdy každý typ je zodpovědný za specifickou funkci. Pro virulenci patogenů jsou podstatné plazmidy virulence, které mají velikost 50 až 100 kpb. Plazmidy virulence kódují geny odpovědné za přežití salmonel v makrofázích, invazi do živočišných buněk i antibiotickou rezistenci. Plazmidy virulence se nachází pouze u některých sérovarů rodu *Salmonella*. Nejvíce prozkoumané jsou ty, vyskytující se u *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, *S. Dublin*, *S. Choleraesuis*, *S. Gallinarum*, *S. Pullorum* a *S. Abortusovis* (Rychlík, Gregorová a Hradecká, 2006).

#### **4.5. Hostitelská specifita salmonel**

Na základě hostitelské specifity dle Uzzau a kol. (2000) se sérovary salmonel dělí do tří skupin: hostitelsky specifické, hostitelsky adaptované a hostitelsky nespecifické.

Hostitelsky specifické jsou například *S. enterica* sérovar Typhi a Paratyphi, které jsou přizpůsobeny pouze na člověka. Dále *S. enterica* sérovar Gallinarum, je adaptovaná pouze k infekci drůbeže, *S. Abortusovis* je vázána na ovce a *S. Typhisuis* na prasata.

Hostitelsky adaptované jsou ty organismy, které sice mají jednoho hlavního hostitele, ale jsou schopny nakazit i jiné druhy. Příkladem je *S. Choleraesuis*, jejímž hlavním hostitelem jsou prasata, ale onemocnění se může projevit i u člověka. Také *S. Dublin* je hostitelsky adaptovaná. Její primární hostitel je skot, ale může postihnout i člověka.

Hostitelsky nespecifické jsou například *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium*, postihují širokou škálu hostitelů a vyvolávají různá onemocnění. U člověka vyvolávají akutní gastroenteritidu, naopak u drůbeže nákaza probíhá bez příznaků.

#### **4.6. Salmonely vyskytující se u drůbeže**

Počátkem 20. století byly u drůbeže nejčastěji sledovanými sérovary *S. Gallinarum* a *S. Pullorum*. Jelikož jsou tyto sérovary hostitelsky specifické, adaptované k infekci drůbeže, způsobovaly rozsáhlé úhyny hejn. Během 60. let minulého století se tyto dva sérovary z velkochovů podařilo eradikovat. Jejich ekologickou niku ale vyplnila *S. Enteritidis*. Pozdější

studie uvedly, že *S. Gallinarum* potlačovala výskyt *S. Enteritidis* pomocí kompetitivní exkluze (Foley a kol. 2011).

V roce 2004 v České republice ve sledovaných velkochovech činila četnost *S. Enteritidis* a *S. Typhimurium* 62 %. Jelikož byl Evropský průměr 20 %, Česká republika dopadla nejhůře ze všech evropských států, proto od roku 2007 na území ČR probíhají národní ozdravovací programy (Fejfarová a Šatrán, 2008).

#### **4.6.1. Národní ozdravovací programy**

Na základě evropské legislativy, byly 1. 1. 2007 zahájeny programy pro tlumení výskytu salmonel. Hlavním cílem těchto programů je zajištění produkce zdravotně nezávadných potravin (Fejfarová a Šatrán, 2008). Státní veterinární správa ministerstva zemědělství každý rok vydává opatření obecné povahy, kterým stanovuje metodiku kontroly zdraví zvířat a nařízenou vakcinaci. Velkochovy nosnic a brojlerů jsou kontrolovány třemi programy.

##### **I. Národní program pro tlumení výskytu salmonel v chovech nosnic produkujících konzumní vejce.**

Všechna hospodářství, která produkují konzumní vejce pro Českou republiku, musí zajišťovat pravidelné odběry vzorků a jejich následné testování. Dále vést řádnou dokumentaci o chovu a provádět nařízenou vakcinaci a revakcinaci atenuovanou vakcínou *Salmonella* spp. (SVS ČR, 2018).

##### **II. Národní program pro tlumení výskytu salmonel v reprodukčních chovech kura domácího**

V rámci tohoto programu dochází k pravidelným odběrům vzorků a sledování sérovarů *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, monofázické *S. Typhimurium*, *S. Infantis*, *S. Virchow* a *S. Hadar*. Na základě výsledků přijímají hospodářství opatření pro zdraví lidí a také dalších hejn drůbeže. Vakcinace v reprodukčních chovech je dobrovolná (SVS ČR, 2018).

##### **III. Národní program pro tlumení salmonel v chovech kuřat chovaných na maso**

Cílem tohoto programu je zjišťování výskytu *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* a monofázické *S. Typhimurium* v hejnech chovaných na maso, která mají být poražena na jatkách. Hejno je považováno za pozitivní, pokud se v jakémkoli vzorku objeví zmíněné sérovary, nebo pokud jsou vzorky pozitivní na antimikrobiální látky (SVS ČR, 2018).

Při confirmaci onemocnění přijímá chovatel mimořádná veterinární opatření. Chovatel musí zlikvidovat konzumní vejce, pokud se mu to nepodaří, krajská veterinární zpráva zprostředkuje porážku hejna a zlikvidování vajec. Například v roce 2007 bylo v rámci národních programů pro tlumení výskytu salmonel utraceno 278 000 kusů drůbeže (Fejfarová a Šatrán, 2008).

## 5. Studium a identifikace střevní mikroflóry

### 5.1. Kultivační metody a mikroskopie

I přes velký rozvoj moderních a alternativních metod zůstávají standardním vyšetřením kultivační techniky. Tyto metody jsou dobře známé, cenově dostupné a mohou být použity pro kvalitativní i kvantitativní analýzu. Kvalitativní analýza má za úkol zjistit přítomnost či absenci určitého mikroorganismu a probíhá v několika krocích, těmi jsou předpomnožení, pomnožení, izolace a konfirmace. Kvantitativní metody jsou zaměřeny na zjišťování počtu životaschopných mikroorganismů ve vzorku. Jejich nevýhodou je dlouhá doba růstu mikroorganismů a tím prodloužená doba identifikace druhů (Bursová a kol. 2014).

Mikroskopie je druhou ze základních mikrobiologických laboratorních metod. Nejstarším druhem mikroskopie je světelná, neboli optická mikroskopie. Obvykle je vzorek nanesen na sklíčko a pro zvýšení kontrastu k podloží obarven. Dalšími druhy jsou fluorescenční mikroskopie, která využívá rozdíly ve vlnových délkách světla a elektronová mikroskopie, která má rozlišovací schopnosti v rozmezí nanometrů (Bursová a kol. 2014).

### 5.2. Imunologické metody

Imunologické metody jsou založeny na vysoce specifické reakci mezi protilátkou a antigenem. Jedním z typů imunologických metod je aglutinace, které nachází využití pro identifikaci bakterií při klinické diagnostice (Bursová a kol. 2014). Je to například nejčastější metoda k průkazu a identifikaci salmonel. Tato metoda je velmi dobře probádaná a je aplikovatelná na kterýkoli sérovar. Výsledky aglutinace je snadné taxonomicky zařadit. Toto testování ale trvá  $\geq 3$  dní, je potřeba údržba  $>250$  specifických komerčně vyráběných zvířecích sér, což dělá celý proces velmi nákladným (Daniel a kol. 2019).

Metoda ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) je využívána k detekci patogenů, ale i k detekci a izolaci mikroorganismů na kultivačním médiu. Tato metoda, stejně jako všechny ostatní imunologické metody, je založená na specifické reakci mezi protilátkou a antigenem. Metody ELISA jsou díky vysoce citlivým protilátkám dostatečně specifické. Jsou schopny detekovat rod, druh, i sérovar. Provedení metody je jednoduché, a díky své rychlosti jsou vyváženy i vyšší finanční náklady. Citlivost těchto testů je  $10^5$  buněk v ml, proto před samotným testem musí být provedeno pomnožení vzorku. Bez tohoto kroku by bakterie s nízkou infekční dávkou, jako je *E. coli* a *C. jejuni*, nemusely být detekovány (Bursová a kol. 2014).

### 5.3. Metody molekulární biologie

Metody molekulární biologie jsou hojně využívány v mnoha biologických disciplínách. Jsou schopny prokázat přítomnost a kvantitu mikroorganismů, určit přesnou sekvenci bází a identifikovat celá společenstva ve velmi krátkém čase. Tyto metody jsou založeny na izolaci nukleonových kyselin, jejich amplifikaci a sekvenování (Bártová a Literák, 2011). Na konci 70. let minulého století byly vyvinuty první dvě metody sekvenování, Sangerova metoda a Maxam-Gilbertova metoda. Od té doby byly vyvinuty další 3 generace sekvenování, tzv. New Generation Sequencing (NGS). Hlavní rozdíl mezi původními metodami a NGS je rychlost a kvantita sekvenování. Zatímco při Sangerově metodě dochází k sekvenaci pouze jednoho fragmentu DNA, NGS jsou schopny sekvenace milionů fragmentů najednou (Slatko, Gardner a Ausubel, 2018).

#### Izolace DNA

Podstatou všech těchto metod je oddělení nukleové kyseliny od ostatních součástí buňky. Izolace musí být provedena správným a standardním postupem aby izolovaná DNA byla kvalitní, čistá a nefragmentovaná. Izolace nukleové kyseliny zahrnuje lýzu buněk, popřípadě narušení buněčných membrán, uvolnění buněčného obsahu a oddělení nukleové kyseliny. K narušení buněčných membrán se užívají iontové detergenty, neiontové detergenty, nebo ultrazvuk. K narušení buněčné stěny se užívá enzym lysozym. Lýza probíhá v solném roztoku obohaceném o řadu enzymů např. proteináza K, která slouží k denaturaci bílkovina a RNáza, která odstraňuje RNA. Také obsahuje ethylendiamin triacetát, jehož funkcí je potlačení degradace DNA (Konvář, 2016).

#### PCR

Polymerázová řetězová reakce je cyklicky se opakující amplifikace úseku DNA pomocí enzymu DNA-polymerázy. Polymerázy jsou získávány z bakterií žijících v horkých pramenech, jedná se o druhy *Thermus aquaticus* a *Thermus thermophilus* (Ishino, 2014). PCR probíhá ve třech krocích. V prvním je DNA zahřátá na 95 °C, při čemž dochází k rozpadu vodíkových můstků a denaturaci DNA. Tato fáze probíhá 20–30 sekund. Výsledkem jsou dvě jednořetězcové DNA vlákna. Druhý krok probíhá při teplotě 50–65 °C po dobu 30–60 sekund, tzv. annealing, neboli připojení primerů k templátové DNA. Připojením primerů je ohraničen vybraný úsek DNA, který je v poslední části zvané elongace amplifikován při teplotě 72 °C. Syntéza probíhá ve směru od 5' ke 3' konci. Poslední fáze trvá 45 sekund až dvě minuty. Tyto 3 kroky se několikrát po sobě opakují. Celý proces PCR probíhá v přístroji zvaném termocykler, ve kterém se teplota mění automaticky (Bursová a kol. 2014).

### **Maxam-Gilbertova metoda**

Sekvenace probíhá na jednovláknové DNA, která je na jednom konci radioaktivně značena. Tato metoda je prováděna ve čtyřech zkumavkách, přičemž v každé dochází k chemickému štěpení pouze jedné z bází. Tím vznikají různě dlouhé fragmenty, končící v místě určité báze. Poté se provede elektroforéza v hustém polyakrylamidovém gelu a při porovnání fragmentů se ukáže pozice jednotlivých bází A, T, C a G. Po odečtení pozice jednotlivých bází ve všech čtyřech reakcích je možné stanovit sekvenci daného úseku (Maxam a Gilbert, 1977)

### **Sangerova metoda**

Sangerova metoda využívá principu DNA replikace, kdy je jednovláknová DNA množena pomocí primerů a DNA polymerázy. V původní verzi syntéza probíhá ve čtyřech zkumavkách, přičemž každá obsahuje deoxyribonukleotidy, templát, primer, polymerázu a individuální fluorescenčně značený dideoxynukleotid (ddNTP). Těmto dideoxynukleotidům chybí –OH skupina na 3'uhlíku, takže po začlenění se na ně nemůže připojit další nukleotid a syntéza řetězce končí. Zařazení ddNTP je čistě náhodné a výsledkem jsou tedy různě dlouhé fragmenty DNA. Fragmenty ze všech zkumavek jsou poté elektroforézou v polyakrylamidovém gelu seřazeny dle velikosti. Po ozáření vznikne obraz dle fluorescenčních proužků, které znázorňují sekvenci DNA. Metoda je schopna přečíst fragmenty dlouhé až 1000 pb. Dnes už je možné sloučit všechny čtyři reakce do jedné zkumavky, tzv. metodou kapilární elektroforézy, kdy seřazené fragmenty projíždí kapilárou a detektor na konci zaznamenává právě projíždějící barvu. Díky její přesnosti je Sangerova metoda stále nejpoužívanější pro sekvenaci *de novo*. Na této metodě byl vystaven celý proces Human Genome Project, který byl zahájen roku 1990 (Adams, 2008).

### **Fingerprintové molekulární metody**

Fingerprintové molekulární metody DGGE, TGGE a T-RFLP, zkoumají celkové změny mikroflóry, zaměřují se na dominantní druhy a jsou schopny detekovat důsledky antimikrobiální nebo probiotické léčby (Palmer, 2006).

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je metoda založená na separaci DNA v polyakrylamidovém gelu, podle rozdílné sekvence nukleotidů. Metoda probíhá tak, že dvouvláknová DNA putuje gelem, který má v určitém bodě vysokou koncentraci denaturačních látek. V tomto bodě se DNA začne rozdělovat na dvě vlákna a rychlost tohoto procesu závisí na počtu vodíkových můstků mezi nukleotidy. Jednovláknová DNA gelem putuje pomaleji a v určitém bodě se zastaví. Gel je nabarven fluorescenčním barvivem a



analyzován speciálním programem. Podle množství vzniklých proužků je možné určit diverzity společenstva, protože každý z nich představuje jeden druh. Aby byly proužky ostřejší, používá se na jedné straně tzv. CG-svorka (Muyzer a Smalla, 1998), což je asi 40 pb dlouhý úsek skládající se pouze z cytosinu a guaninu. Předpokládá se, že metoda zvládne detekovat 1–2 % celkové střevní mikroflóry. Princip teplotní gradientové gelové elektroforézy (TGGE) je shodný, pouze k denaturaci využívá měnící se teplotu. Tyto metody jsou rychlé levné a dostupné (Krsek, 2014).

Třetí metodou pro výzkum diverzity bakteriálních společenstev je T-RFLP, tedy polymorfismus délky terminálních restričních fragmentů. Při reakci jsou jeden nebo oba primery fluorescenčně značené, takže po PCR a elektroforéze jsou na gelu vidět pouze restriční fragmenty. Výsledkem je obraz, kde je jednou nebo dvěma čárkami na gelu reprezentován jeden druh. Nevýhodou této metody je pravděpodobnost, že příbuzné druhy mají společný terminální fragment a proto nebudou rozpoznány. Pro zkoumání bakteriálních společenstev je nejčastěji využíván marker 16S rRNA (Krsek, 2014).

### **Sekvenační metody nové generace**

NGS jsou založeny na principu, že se všechny zkoumané fragmenty ukotví na čip, který má pouze několik centimetrů a pomocí velmi podrobných metod jsou detekovány. Proto jsou NGS schopny během jedné sekvenace přečíst miliony bází (Krsek, 2014). Pro zkoumání bakteriálních společenstev se využívá především sekvenace amplikonů 16S rRNA a shotgun sekvenace. Výsledkem je obrovské množství výstupních dat, která jsou náročná na roztřídění a analýzu (Schuster, 2008). Tyto metody se používají pro metagenomické studie, pro sekvenování mitochondrií a jednotlivých chromozomů, pro studium genetické variability a proteinových interakcí (Krsek, 2014).

### **16S rRNA**

Typ ribonukleové kyseliny rRNA, je stavebním materiálem malé a velké jednotky ribozomů. Ribozomy prokaryotických organismů mají velkou podjednotku 50S, složenou z 23S a 5S rRNA a 34 proteinů a malou podjednotku 30S složenou z 16S rRNA a 21 proteinů (Sládek, 2007). Při identifikaci bakterií se metody zaměřují na úsek 16S rRNA, který obsahuje jak úseky společné pro všechna prokaryota, tak úseky pro každý druh specifické. Díky molekulárně biologickým metodám založených na sekvenaci 16S rRNA je možné vytvářet fylogenetické stromy (Suau a kol. 1999) a současně bez nutnosti předchozí kultivace určit přesný druh (Krsek, 2014).

## **Metagenomika**

Metagenomika se zabývá charakteristikou komplexních společenstev a kombinuje poznatky molekulární biologie a genetiky (Suau a kol. 1999). Více než 99 % mikroorganismů žijících na zemi je nekultivovatelných. Metagenomické metody na kultivaci nejsou závislé, a tak poskytují zcela nové poznatky o složení mikrobiálních společenstev (Allan, 2014). V metagenomických studiích jsou užívány dva přístupy, a to sekvenování a funkční detekce genů. Sekvenování slouží k detekci daného markeru. Tento marker je specifický pro určité skupiny organismů, např. pro bakterie se nejčastěji využívá gen pro malou podjednotku ribozomu 16S rRNA (Krsek, 2014). Metodou funkční detekce genů mohou být objeveny nové funkce, ale můžou se zde projevit funkční produkty hostitelské buňky (Krsek, 2014), protože genom mikrobů, pro zachování v metagenomických knihovnách, bývá vkládán do heterologního organismu (Allan, 2014).

## 6. Antibiotická rezistence

Antibiotika jsou chemické látky, které inhibují růst bakterií. Jsou produkovány mikroorganismy, nebo jsou vytvářeny synteticky (Eng a kol. 2015). Antibiotika byla objevena v roce 1928 Alexandrem Flemingem. S objevem dalších druhů bakterií a pochopení jejich patofyziologie a epidemiologie se manufakturní procesy zjednodušily a přístup k antibiotikům měl téměř každý. Od té doby se značně snížila úmrtnost na infekční choroby. Antibiotika se stala velmi populární a byla užívána na léčbu téměř všech infekcí, i těch, které nebyly bakteriálního původu (Alanis, 2005).

Antibiotika se při chovu hospodářských zvířat nepoužívala pouze k léčbě bakteriálních onemocnění, ale také k jejich prevenci (Eng a kol. 2015) a zároveň sloužila jako stimulatory růstu. Tyto látky totiž ovlivňují střevní mikroflóru, čímž dochází k pozitivnímu ovlivnění zdraví a užitkovosti. S tímto fenoménem se ale objevovalo více mikroorganismů včetně salmonel s určitým druhem antibiotické rezistence (Skřivanová a Rada, 2014). První záznam o salmonele rezistentní k antibiotikům se objevil na začátku 70. let (Eng a kol. 2015). V důsledku toho, vyšla tzv. Swannova zpráva, která podmínila nařízení, že antibiotika užívaná v humánní léčbě, nesmí být přidávána do krmných směsí (Skřivanová a Rada, 2014).

Dnes je užívání antibiotik řízeno tzv. antibiotickou politikou, která se snaží o zdravé nakládání s antibiotiky, jak v humánní, tak ve veterinární péči (Skřivanová a Rada, 2014). V EU funguje agentura ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), která se snaží posílit ochranu proti infekčním nemocem. V této agentuře vznikl projekt EARSS (European Surveillance Resistance System), který má za úkol sledovat antibiotickou rezistenci na evropském území (Jakubů, 2008).

Například dle regulace Evropské unie je od roku 2003 zakázáno přidávat antibiotika do krmných směsí. V USA bylo podobné nařízení zavedeno až v roce 2013, ale je pouze dobrovolné (Skřivanová a Rada, 2014).

### 6.1. Primární a sekundární rezistence

Oba druhy rezistence jsou určité druhy genetické mutace, kterými se bakterie přizpůsobuje prostředí. Primární rezistence je vrozená, je určena vlastní stavbou bakteriální buňky. Bakterie je tudíž rezistentní i bez předchozího kontaktu s antibiotikem (Cosby a kol. 2015). Například gramnegativní střevní tyčky jsou primárně rezistentní vůči penicilinům, makrolidům a linkosamidům. Dále enterokoky a listerie jsou typicky rezistentní vůči cefalosporinům (Votava, 2010). Druhy primárně citlivé mohou získat tzv. sekundární rezistenci. Resistence bakterií je velmi komplexní a různorodá. Nejčastěji je získávána

horizontálním přenosem přes plazmid. Zároveň s vývojem nových antibiotik, si bakterie vyvíjely obranné mechanismy. Ke každému typu antibiotik existuje minimálně jeden obranný mechanismus (Alanis, 2005).

Bakterie mohou být rezistentní vůči jednomu typu antibiotik, nebo mohou být multirezistentní, což znamená, že jsou rezistentní vůči více typům antibiotik (MDR – multi-drug resistance) (Eng a kol. 2015). Typickým multirezistentním sérovarem je *S. Typhimurium*, která je rezistentní vůči pěti antibiotikům (ampicilin, chloramfenikol, streptomycin, sulfonamidy a tetracyklin) (Moultotou a kol. 2017).

## 6.2. Mechanismy vzniku rezistence

Dosud byly objeveny 4 biochemické mechanismy, kterými si bakterie vytváří rezistenci. V buňce se může objevovat i více než jeden mechanismus. Prvním mechanismem je produkce specifických proteinů, převážně enzymů, které inaktivují antibiotickou látku (Regea, 2018). Příkladem je produkce beta-laktamázy salmonelami, které inaktivují celou skupinu betalaktamových antibiotik. Druhým mechanismem je zabránění antibiotiku dostat se do cílové struktury v buňce. K tomu slouží takzvané efflux pumpy, které vypuzují antibiotika ven z buňky. V gramnegativní bakterii vytvářejí trojdílný komplex efflux pumpy s cytoplasmatickou membránou a buněčnou stěnou. Tento komplex vytváří výkonný kanálek pro vypuzení antibiotik a jiných škodlivých sloučenin. Příkladem je rezistence salmonel vůči tetracyklinům a chloramfenikolu. Tento trojdílný komplex je vypudí ještě předtím, než zasáhnou 30S ribozomální podjednotku, kde by zastavily proteosyntézu. Třetím mechanismem je chemická změna antibiotického cíle, což antibiotiku znemožní se na něj navázat (Cosby a kol. 2015). Čtvrtým mechanismem je adaptace. Pro přežití v hostiteli musí bakterie odolávat hostitelskému imunitnímu systému a k přežití se musí adaptovat. Podobná situace nastává i při stálé přítomnosti antibiotik. Významným příkladem je *Streptococcus aureus*, který se adaptoval na prostředí s přítomností daptomycinu a vankomycinu (Regea, 2018).

## 6.3. Důsledky antibiotické rezistence

Zvyšující se antibiotická rezistence pro populaci znamená, že léčba bakteriální infekce běžnými antibiotiky již nebude možná. Rezistence může brzdit terapii, také hrozí vyšší riziko hospitalizace a následných komplikací, které mohou způsobit i smrt (Moultotou a kol. 2017). Rezistentní bakterie zvyšují nákladnost léčby, jelikož je potřeba intravenózní terapie a zároveň delší hospitalizace. Velmi obávaný scénář je, že antibiotika přestanou zcela fungovat.

Už konec 20. století je označován za post-antibiotickou éru, protože došlo k pochopení závažnosti problému rezistence (Holub a kol. 2013).

Jelikož se antibiotika neukázala jako udržitelný způsob k léčbě bakteriálních onemocnění, je v poslední době diskutována možnost efektivní náhrady. Možnými alternativami antibiotické léčby by se mohly stát probiotika a prebiotika (Skřivanová a Rada, 2014).

## 7. Probiotika

Dle definice WHO jsou probiotika živé mikroorganismy, které v přiměřeném množství pozitivně ovlivňují zdravotní stav jedince, díky zlepšení střevní mikrobiální rovnováhy. Jsou to zdraví prospěšné, netoxické a nepatogenní mikroorganismy (Kabir, 2009). Slovo probiotikum znamená „pro život“, je opakem pojmu antibiotikum. Na rozdíl od antibiotik, která mají za cíl usmrtit škodlivé bakterie, podstatou probiotik je podpora zdravých bakterií (Skřivanová a Rada, 2014).

Probiotika jako taková jsou známá tisíce let. Už ve starém Římě bylo doporučováno pití kyselého mléka při zažívacích obtížích. Na začátku 20. století začala skupina vědců věnovat pozornost dlouhověkosti v návaznosti na konzumaci jogurtů s laktobacily a doporučovali podávání bifidobakterií novorozencům, kteří trpěli průjmy. Lilli a Stivel v roce 1965 poprvé použili pojem probiotikum, pro označení látky, která je vylučována jedním organismem a podporuje růst jiného (Schrezenmeir a de Vrese, 2001). V této době nastal velký rozvoj v používání probiotik. Nejvyužívanější byly bakterie mléčného kvašení, především laktobacily. Už v roce 1973 se probiotika ukázala jako účinná v prevenci salmonel u drůbeže (Nurmi and Rantala, 1973). I přesto, že jsou probiotické účinky známé již dlouho, jejich využití ve výživě hospodářských zvířat je ukázkou moderního přístupu. Probiotika totiž chrání střeva před patogeny a zároveň vytvářejí optimální prostředí pro využití živin v krmivu (Skřivanová a Rada, 2014).

### 7.1. Účinek probiotik

Probiotika mají důležitou roli ve správném a zdravém trávení a zároveň v celkovém zdravotním stavu jedince. Hlavní důvody pro zařazení probiotik do běžného krmiva pro zvířata jsou dle Corcionivoschi a kol. (2010) následující:

- již existující mikroflóru mění tak, aby pro hostitele byla ještě výhodnější
- stimulují procesy, jako jsou proliferace periferních mononukleárních buněk
- podporují imunitní systém při zánětlivých onemocněních
- inhibují růst gramnegativních i grampozitivních patogenů, pomocí inhibičních látek bakteriocinů a organických kyselin
- *Bifidobacterium longum* produkuje protein BIF, který se podílí na anti-patogenní aktivitě probiotik. Tento protein cílí na gramnegativní bakterie
- kmen *Bifidobacterium* produkuje lipofilní sloučeniny, které mají silné antimikrobní účinky vůči *S. Typhimurium* a *E. coli*

Probiotika ale zároveň musí splňovat určitá kritéria. Zaprvé, musí být běžnými zástupci střevní mikroflóry daného organismu. Musí být schopny překonat nízké pH žaludku a kyselinu žlučovou v tenkém střevě. Dalším faktorem je schopnost adherence a kolonizace trávicího traktu (Kabir, 2009).

Proces selekce vhodných probiotik probíhá tak, že se z kuřat izolují bakteriální kmeny a *in vitro* se vyberou vhodné druhy. *In vivo* se poté hodnotí probiotický potenciál. Ten zahrnuje kategorie jako produkce inhibičních sloučenin, faktory rezistence, faktory adherence a soutěž o živiny. *In vivo* se také hodnotí schopnost kolonizace a histopatologie. Po těchto šetřeních jsou probiotika vystavena patogenům. Pokud probiotikum projde všemi testy, následuje hodnocení ekonomické výhodnosti a proces registrace (Kabir, 2009).

## 7.2. Mechanismus účinku

Brojleři díky velké metabolické aktivitě produkují více tepla, proto u nich častěji dochází k přehřívání. Přehřívání a teplotní šoky způsobují snížení přírůstků váhy a vyšší mortalitu kuřat a s tím spojené velké ekonomické ztráty (Khan a kol. 2016). Při teplotním šoku se v buňkách tvoří bílkoviny teplotního šoku (HSP), které chrání správné prostorové uspořádání ostatních proteinů a tím, udržují vazby mezi epitelovými buňkami střev a chrání mukózu. HSPs jsou rozděleny do 4 kategorií podle jejich molekulární váhy, jsou to malé hsp, hsp60, hsp70, hsp90. Ve střevech je tvořen protein hsp25, který stabilizuje aktin, a hsp72, který předchází denuraci buněk. Probiotika stimulují tvorbu těchto stresových proteinů a chrání strukturu střev (Aureli a kol. 2011).

V epitelových buňkách střev jsou obsaženy systémy vyvolávající imunitní odpověď. V cytoplasmě se nachází neaktivní NFκB skupina faktorů navázaná na inhibiční molekulu IκB kinázy. Když se objeví možný původce zánětu, IκB se odpojí od NFκB a NFκB vstoupí do jádra a spustí zánětlivou odpověď (transkripci určitých genů). Některá probiotika mají schopnost degradace IκB, nebo simulace NFκB, čímž je zrychlují imunitní odpověď (Aureli a kol. 2011).

Některá probiotika jsou schopna potlačovat apoptózu epitelových buněk střev aktivací anti-apoptických proteinů, nebo inhibicí pro-apoptických proteinů. *Lactobacillus rhamnosus* aktivuje proteiny p75 a p40, které urychlují dělení buněk, a aktivuje anti-apoptický protein Akt. *L. rhamnosus* je důležitý pro udržování střevní homeostázy a může potlačovat zánětlivé reakce (Yan a kol. 2011).

Probiotika indukují cytokiny, díky kterým jsou schopna ovlivňovat imunitní odpověď makrofágů skrz přímé nebo nepřímé vlivy na signální dráhy. Makrofágy se dělí na typ M1 a

M2. M1 makrofágy mají pro-zánětlivé schopnosti a jsou spojovány s aktivací imunitních reakcí, jsou aktivovány cytokiny TNF, IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL1 $\beta$  a IL-4. M2 makrofágy jsou spojovány s homeostázou mukózy a aktivují protizánětlivou odpověď, jsou aktivovány cytokiny IL-10, TGF a IL-1R $\alpha$  (Yousefi a kol. 2019; Hegazi a kol. 2009). Někdy je nutné zmírnit zánětlivé reakce, kvůli nebezpečí chronického zánětu a poškození vlastních součástí. Bifidobakterie a laktobacily produkují cytokin IL-10, který má velký vliv na zmírnění zánětlivých odpovědí organismu (Skřivanová a Rada, 2014).

Dalším mechanismem je produkce SCFAs, které jsou schopny redukovat počty salmonel ve střevech a dodávat hostiteli energii (Van Immerseel a kol. 2004). Jako účinný se ukázal například druh *Propionibacterium acidipropionici* (Campaniello a kol. 2015).

Svou schopností aktivace mitózy a indukci proliferace epitelových buněk střeva, jsou probiotika schopna stimulovat růst klků. Delší klky, u kuřat krmených probiotiky, znamenají zvýšení absorpce živin (Park a kol. 2016).

### 7.3. Příprava probiotik

Základ každé produkce čistých bakteriálních kultur se nachází v mezinárodní sbírce mikroorganismů, kam je kultura zařazena po pečlivé genotypové identifikaci. Ve sbírce je zajištěno uchování původního kmene. Kultury jsou hluboce zamrazeny v tekutém dusíku ( $-176^{\circ}\text{C}$ ), v mrazáku ( $-80^{\circ}\text{C}$ ) nebo jsou lyofilizovány (Saxelin a kol. 1999). Aby mohla být probiotika uvedena na trh musí projít sérií hodnocení. Prostřednictvím *in vitro* testů se testuje rezistence na kyseliny, schopnost adherence, produkce metabolitů a bezpečnost kultury (Rada, 2010). Probiotika musí být pečlivě značena po celou dobu výroby, aby se dalo kdykoli najít původní kolonii (Saxelin a kol. 1999). Po zhodnocení užitečnosti a schválení určitého biovaru může začít výroba pro potravinové doplňky a startovací kultury pro mléčné výrobky. Fermentace probiotik probíhá v mediu bohatém na dusíkaté látky, karbohydráty, soli a živiny nezbytné pro růst. Fermentace je zastavena, když se zpomalí spotřeba média. Tento proces trvá přibližně den při  $37^{\circ}\text{C}$ . Buňky jsou poté pomocí centrifugace odděleny od média. Do čisté kultury jsou přidávány kryoprotektanty nebo lyoprotektanty, podle toho jaká bude později zvolena metoda stabilizace. Zmražené kultury jsou odesílány do podniků zpracovávajících probiotika (Fenster a kol. 2019; Saxelin a kol. 1999).

### 7.4. Využití probiotik v chovech drůbeže

Střevní mikroflóra se u kuřat z velkochovů nevyvíjí přirozeně, protože se líhnou a vyvíjí bez kontaktu s dospělými slepicemi. Proto jejich trávicí trakt potřebuje alternativní zdroj prospěšných bakterií, a to probiotik (Kabir, 2009). Za posledních 20 let kdy jsou



probiotika častěji implementována do krmiva kuřat prokázaly se jejich pozitivní účinky na vyšší hmotnostní přírůstky, zlepšení trávení, vyšší produkce vajec a snížení výskytu onemocnění a tím pádem i snížení mortality (Park a kol. 2016).

Druhy probiotik užívaných v chovech kuřat by měly být získány z běžné střevní mikroflóry kuřat. Jak ukázala studie Kollarčíková a kol. (2020) na bakteriích rodu *Bacteroides*, druhy izolované z lidské mikroflóry nebyly schopny kolonizovat střeva drůbeže.

Dostupná probiotika jsou založena především na rodech *Lactobacillus*, *Enterococcus* a *Bacillus*. Ukazuje se ale, že *Lactobacillus* v prostředí líhni je pro kuřata plnohodnotným zdrojem a rody *Enterococcus* a *Bacillus* nejsou schopny kolonizovat trávicí trakt, pokud jsou podávány jako čisté kultury (Kubasova a kol 2019).

Existují i přípravky pro kompetitivní exkluzi jako Aviguard a Broilact, která mají na rozdíl od probiotik nedefinované a rozmanité složení, podobné tomu, které se přenáší z dospělé slepice na kuřata. Tyto přípravky se skládají z rodů *Lactobacillus*, *Clostridiales*, různé druhy *Bacteroides*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Phascolarctobacterium*, *Sutterella*, *Parasutterella*, *Bifidobacterium* (Rychlík, 2020).

#### **7.4.1 Charakteristika vybraných probiotických bakteriálních rodů**

##### rod *Lactobacillus*

Laktobacily jsou robustní grampozitivní tyčinky často spojené do řetízků. Jsou součástí přirozené střevní mikroflóry. Jedná se o největší skupinu čeledi *Lactobacillaceae*, obsahují více než 100 druhů a poddruhů. Dělí se na dvě skupiny dle schopnosti kvašení cukrů. První skupina je homofermentativní, což znamená, že fermentuje cukry na kyselinu mléčnou. Heterofermentativní skupina fermentuje cukry na kyselinu mléčnou, kyselinu octovou, etanol a oxid uhličitý (Votava, 2010). Jako probiotika pro kuřata jsou užívány druhy *L. thermophilus*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gallinarum*, *L. jensenii*, *L. plantarum*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* a *L. salivarius* (Popova, 2017). *L. salivarius* produkuje bakteriociny působící proti grampozitivním bakteriím a *Campylobacter jejuni* (Stern a kol. 2006).

##### rod *Bifidobacterium*

Bifidobakterie jsou grampozitivní bakterie tyčinkovitého tvaru, které se spojují do větvičích se vláken. Jsou významné pro udržování rovnováhy střevní mikroflóry. Při podávání antibiotik se jejich počty redukuje a nerovnováha se projevuje různě závažnými průjmy. Do probiotických přípravků pro kuřata se přidávají druhy *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. bifidus*, *B. thermophilus*, *B. longum*, *B. breve* (Popova, 2017).

### rod *Enterococcus*

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou schopny osidlovat prostředí širokého rozpětí pH i teploty. Jsou rezistentní vůči vnějším vlivům a také vylučují bakteriociny, které jsou velmi účinné proti patogenním bakteriím. Mají velký potenciál pro nahrazení antibiotik v boji proti multirezistentním patogenům. Mezi enterokoky patří zástupci jak komenzálů, tak patogenů (Hanchi a kol. 2018). Jelikož jsou někteří zástupci enterokoků patogenní, jejich užití v probioticích je stále problematické (Franz a kol. 2011).

### rod *Bacteroides*

Rod *Bacteroides* patří do čeledi *Bacteroidaceae*, což jsou zástupci běžné mikroflóry teplotokrevných živočichů. Pro bakteroidy je typická produkce beta-laktamáz. Jejich buňky jsou pleomorfní a tvoří pouzdra (Votava, 2010). Při tvorbě probiotik pro střevní mikroflóru kuřat je dle studie Kollarčíková a kol. (2020) vhodné využití druhů *Bacteroides gallinaceum*, *B. caecigallinarum*, *B. mediterraneensis*, *B. caecicola*, *B. plebeius*, *B. coprocola* a *Mediterranea massiliensis*. *Bacteroides* je prospěšný pouze v mikrobiomu střeva, pokud se dostane do jiné části těla, stává se patogenní (Votava, 2010).

### rod *Bacillus*

Bacily jsou fakultativně anaerobní grampozitivní tyčinky, které v aerobním prostředí sporulují (Votava, 2010). Jejich schopnost přežít nízké pH žaludku a výkyvy teplot jim dává výhodu nad ostatními mikroorganismy. Bylo objeveno přes 100 druhů rodu *Bacillus* a jako probiotika pro kuřata se používají *B. coagulans*, *B. clausii*, *B. cereus*, *B. subtilis* a *B. licheniformis*. Spory bacilů jsou hydrofobní, což je spojováno s lepší schopností adherence (Mingmongkolchai, Panbangred, 2018).

### rod *Clostridium*

Studie Yang a kol. (2012) ukázala že suplementace některých biovarů rodu *Clostridium butyricum* funguje jako účinné probiotikum, díky jejich schopnosti snižování počtů salmonel a *C. perfringens* ve střevech a zároveň podpořit růst laktobacilů a bifidobakterí.

## 7.5. Prebiotika

Prebiotika jsou živočichy nestravitelné zbytky potravy, které jsou metabolizovány komenzálními bakteriemi ve střevech. Jedná se především o rezistentní škrob, neškrobové polysacharidy (pektin, celulóza a hemicelulóza), oligosacharidy (laktóza, laktulóza, rafinóza, oligofruktóza), glykoproteiny produkované pohárkovými buňkami a mukopolysacharidy (výměšky pankreatu a ostatních bakterií). Do tlustého střeva se dostanou i některé peptidy a bílkoviny přijaté s potravou, ale v mnohem menším množství než zmíněné sacharidy. Prebiotika poskytují probiotikům vyšší pravděpodobnost přežití ve střevní mikroflóře (Manning a kol. 2004).

Aby byla prebiotika účinná musí dle Manning a kol. (2004) splňovat tři kritéria:

- 1) nesmí být strávena v žaludku nebo tenkém střevě
- 2) musí být vhodná pro komenzální bakterie
- 3) fermentace těchto látek je zdraví prospěšná

Prebiotika byla zkoumána i v souvislosti s eliminací salmonel u kuřat, za předpokladu, že se cukry navážou na pili salmonel a zabrání jim v adhezi. V testech se jako neúčinná ukázala glukóza, maltóza a sacharóza. Oproti tomu laktóza a manóza měly pozitivní účinek (Skřivanová a Rada, 2014).

Studie prebiotik jsou zaměřeny především na oligosacharidy tří skupin mannanoligosacharidy (MOS), galaktooligosacharidy (GOS) a fruktooligosacharidy (FOS). Prebiotika založená na MOS, mají schopnost snížit koncentrace *Campylobacter* spp. a upravit mikroflóru. MOS jsou obsaženy i v buněčné stěně kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* a *Saccharomyces boulardii*. FOS prebiotika snižují koncentrace salmonel a zajišťují lepší vstřebávání živin. GOS jsou přirozeně obsaženy v živočišném mléku a pozitivně ovlivňují vývoj kolonií laktobacilů (Miccichea a kol. 2018).

Prebiotika se přirozeně nachází v zelenině a v živočišných produktech jako je med nebo mléko. Jsou syntetizovány skrz chemické a biochemické reakce, nebo přírodní formou, jsou syntetizovány některými mikroorganismy, např. *Aureobasidium pullulans*, *Aspergillus niger*, *Bacillus circulans*, *Pseudomonas aurantiaca*, *Aspergillus aculeatus*, *Penicillium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, a *Lactobacillus reuteri* (Farias a kol. 2019).

## 8. Závěr

I přesto že se již od 70. let minulého století ví, že kuřata, která jsou ve styku s dospělými slepicemi a jejich trusem jsou odolnější vůči salmonelovým infekcím, tak se ve velkochovech kuřata líhnou sama ve sterilním prostředí. Proto se stále vyvíjejí nové způsoby jak tuto přirozenou mikroflóru kuřatům zajistit alternativní cestou. Snaha působit na mikroflóru antibiotiky se ukázala jako trvale neudržitelná a v Evropské unii je tato suplementace zakázaná. Probiotika by mohla sloužit alespoň jako částečná náhrada přirozeně získávaných bakterií. Nemohou ale nahradit mikroorganismy, které kuřatům poskytují dospělé slepice. V posledních studiích se ukázalo, že čisté kmeny *Enterococcus* a *Bacillus*, které se podávají v probioticích nejsou schopny trvale osídlit trávicí trakt. Střevní mikroflóra bývá v posledních letech označována za „samostatný orgán“ a výzkumy tohoto komplexního společenství stále pokračují. Metody sekvenování nové generace, které přinášejí nové poznatky o společenství mikroorganismů ve střevech, umožňují sledovat diverzitu, vztahy mezi bakteriemi a poskytují informace pro sestavení vhodných suplementů. Správně sestavená probiotika mají vliv na zvýšení celkového welfare kuřat v halách a také na prevenci alimentárních onemocnění.

## 9. Seznam zkratk

**SCFA's** – Short-Chain Fatty Acids

**ELISA** – (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

**ddNTP** – dideoxynukleotid

**DGGE** – denaturační gradientová gelová elektroforéza

**TGGE** – teplotní gradientová gelová elektroforéza

**T-RFLP** – polymorfismus délky terminálních restrikčních fragmentů.

**PCR** – polymerázová řetězová reakce

**NGS** – New Generation Sequencing

**SCV** – Salmonella Containing Vacuole

**SPI** – Salmonella pathogenicity island

**T3SS** – sekreční systémy typu III

**ECDC** – European Centre for Disease Prevention and Control

**EARSS** – European Surveillance Resistance System

**HSP** – heat shock protein

**MOS** – mannanoligosacharidy

**GOS** – galaktooligosacharidy

**FOS** – fruktooligosacharidy

## 10. Seznam použité literatury

- ADAMS, J. DNA sequencing technologies. *Nature Education*, 2008, 1.1: 193
- ADIL, S.; MAGRAY, S. N. Impact and manipulation of gut microflora in poultry: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11.6: 873-877.
- ALANIS, Alfonso J. Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era?. *Archives of medical research*, 2005, 36.6: 697-705.
- ALLAN, Elaine. Metagenomics. *Virulence*, 2014, 5.3: 397-398
- ANDREWS-POLYMENIS, Helene L., a kol. Taming the elephant: *Salmonella* biology, pathogenesis, and prevention. *Infection and Immunity*, 2010, 78.6: 2356-2369.
- AURELI, Paolo, a kol. Probiotics and health: an evidence-based review. *Pharmacological Research*, 2011, 63.5: 366-376.
- BALE, Janet, a kol. Characterization of new *Salmonella* serovars by whole-genome sequencing and traditional typing techniques. *Journal of Medical Microbiology*, 2016, 65.10: 1074-1078.
- BÁRTOVÁ E. a LITERÁK I. Molekulární biologie, VFU Brno (OPVK), 2011, Dostupné také z: [mmp.vfu.cz/opvk2011/](http://mmp.vfu.cz/opvk2011/)
- BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vydání. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-2380-297-6.
- BHAISARE, Darshana B., a kol. Bacterial pathogens in chicken meat. *International Journal of Life Sciences Research*, 2014, 2.3: 1-7.
- BRENNER, F. W., a kol. *Salmonella* nomenclature. *Journal of Clinical Microbiology*, 2000, 38.7: 2465-2467.
- BURSOVÁ, Šárka, a kol. Mikrobiologické laboratorní metody. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-675-9
- CAMPANIELLO, Daniela, a kol. Screening of *Propionibacterium* spp. for potential probiotic properties. *Anaerobe*, 2015, 34: 169-173.
- CASAS, Ivan A.; DOBROGOSZ, Walter J. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microbial Ecology in Health and Disease*, 2000, 12.4: 247-285.
- CARLILE, Fiona S. Ammonia in poultry houses: A literature review. *World's Poultry Science Journal*, 1984, 40.2: 99-113.
- CIRACI, Ceren, a kol. Unique genome-wide transcriptome profiles of chicken macrophages exposed to *Salmonella*-derived endotoxin. *BMC genomics*, 2010, 11.1: 1-11.

CLAVIJO, Viviana; FLÓREZ, Martha Josefina Vives. The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: a review. *Poultry science*, 2018, 97.3: 1006-1021.

COSBY, Douglas E., a kol. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. *Journal of Applied Poultry Research*, 2015, 24.3: 408-426.

CORCIONIVOSCHI, Nicolae, a kol. The effect of probiotics on animal health. *Scientific Papers Animal Science and Biotechnologies*, 2010, 43.1: 35-41.

ČERNÝ, Hugo. Anatomie domácích ptáků. Brno: Metoda, 2005. s. 6. ISBN 80-239-4966-7. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:13b86a80-254d-11e4-8c14-5ef3fc9bb22f>

D'AOUST, Jean-Yves; MAURER, John. *Salmonella* species. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, Third Edition*, 2007. p. 187-236.

DA SILVA, Angelo M. Taveira, a kol. Shock and multiple-organ dysfunction after self-administration of *Salmonella* endotoxin. *New England Journal of Medicine*, 1993, 328.20: 1457-1460.

DANIEL, a kol. Přehled nejčastějších sérotypů salmonel hlášených v ČR v letech 2017 a 2018 a doporučení pro laboratoře. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)*, 2019, 28.8: 309-310.

DE PAULO FARIAS, David, a kol. Prebiotics: Trends in food, health and technological applications. *Trends in Food Science & Technology*, 2019, 93: 23-35.

DENG, Wanyin, a kol. Assembly, structure, function and regulation of type III secretion systems. *Nature Reviews Microbiology*, 2017, 15.6: 323-337.

DĚDIČOVÁ, Daniela a Renáta KARPÍŠKOVÁ. Nová revize Kauffmannova – Whiteova schématu pro identifikaci salmonel. *Zprávy EM (SZÚ, Praha)*. 2009, 18.2. Dostupné z: [http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy\\_EM/18\\_2009/3\\_brezen/99\\_salmon.pdf](http://www.szu.cz/uploads/documents/CeM/Zpravy_EM/18_2009/3_brezen/99_salmon.pdf)

DHAMA, Kuldeep, a kol. *Listeria monocytogenes* infection in poultry and its public health importance with special reference to food borne zoonoses. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2013, 16.7: 301-308.

ENG, Shu-Kee, a kol. *Salmonella*: a review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 2015, 8.3: 284-293.

ERNST, Robert K.; GUINA, Tina; MILLER, Samuel I. *Salmonella* typhimurium outer membrane remodeling: role in resistance to host innate immunity. *Microbes and Infection*, 2001, 3.14-15: 1327-1334.

FENSTER, Kurt, a kol. The production and delivery of probiotics: A review of a practical approach. *Microorganisms*, 2019, 7.3: 83.

- FOLEY, Steven L., a kol. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77.13: 4273-4279.
- FRANZ, Charles MAP, a kol. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *International journal of food microbiology*, 2011, 151.2: 125-140.
- GALÁN, Jorge E., a kol. Bacterial type III secretion systems: specialized nanomachines for protein delivery into target cells. *Annual review of microbiology*, 2014, 68: 415-438.
- GASKINS, H. R.; COLLIER, C. T.; ANDERSON, D. B. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Animal biotechnology*, 2002, 13.1: 29-42.
- GERLACH, Roman G., a kol. *Salmonella* Pathogenicity Island 4 encodes a giant non-fimbrial adhesin and the cognate type 1 secretion system. *Cellular Microbiology*, 2007, 9.7: 1834-1850.
- GREEN, Erin R.; MECSAS, Joan. Bacterial secretion systems: an overview. *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, 2016, 213-239. ISBN 9781683670711
- HABERECHEHT, Sarah, a kol. Poultry feeds carry diverse microbial communities that influence chicken intestinal microbiota colonisation and maturation. *AMB Express*, 2020, 10.1: 1-10.
- HACKER, J., a kol. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution. *Molecular Microbiology*, 1997, 23.6: 1089-1097.
- HARRIS, Kristina, a kol. Is the gut microbiota a new factor contributing to obesity and its metabolic disorders?. *Journal of Obesity*, 2012, 14: 1
- HANSEN-WESTER, Imke; HENSEL, Michael. *Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems. *Microbes and Infection*, 2001, 3.7: 549-559.
- HEGAZY, Sahar K.; EL-BEDEWY, Mohamed M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF- $\kappa$ B activation in ulcerative colitis. *World Journal of Gastroenterology*, 2010, 16.33: 4145.
- HENSEL, Michael. Evolution of pathogenicity islands of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294.2-3: 95-102.
- HU, Xiaomei, a kol. Vi capsular polysaccharide: Synthesis, virulence, and application. *Critical Reviews in Microbiology*, 2017, 43.4: 440-452.
- ISHINO, Sonoko; ISHINO, Yoshizumi. DNA polymerases as useful reagents for biotechnology—the history of developmental research in the field. *Frontiers in Microbiology*, 2014, 5: 465.
- IMADA, Katsumi. Bacterial flagellar axial structure and its construction. *Biophysical Reviews*, 2018, 10.2: 559-570.



- JAKUBŮ, Vladislav. EARS-Net. *Státní zdravotní ústav* [online]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/ears-net-4>
- KAAKOUSH, Nadeem O., a kol. Global epidemiology of *Campylobacter* infection. *Clinical Microbiology Reviews*, 2015, 28.3: 687-720.
- KABIR, S. M. The role of probiotics in the poultry industry. *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10.8: 3531-3546.
- KATSCHER, Friedrich. Salmonella or Smithella? *Nature*, 1997, 388.6640: 320-320.
- KHAN, Alam Zeb, a kol. Effects of selenium-enriched probiotics on heart lesions by influencing the mRNA expressions of selenoproteins and heat shock proteins in heat stressed broiler chickens. *Pakistan Veterinary Journal*, 2016, 36.4.
- KOLLARCIKOVA, Miloslava, a kol. Different *Bacteroides* Species Colonise Human and Chicken Intestinal Tract. *Microorganisms*, 2020, 8.10: 1483.
- KUBASOVA, Tereza, a kol. Gut anaerobes capable of chicken caecum colonisation. *Microorganisms*, 2019, 7.12: 597.
- KUBASOVA, Tereza, a kol. Contact with adult hen affects development of caecal microbiota in newly hatched chicks. *PLoS One*, 2019, 14.3: e0212446.
- KOČÁREK, Eduard. Molekulární biologie v medicíně. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů v Brně, 2007, 48. ISBN 978-80-7013-450-4. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:3314fd60-2bc7-11e8-b257-005056825209>
- KONVÁŘ, Pavel. Sekvenování DNA – historie, současnost, perspektivy [online]. Západočeská univerzita v Plzni, 2016 Dostupné z: [https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/25437/1/SEKVENACE\\_DNA\\_BcPrace\\_Konvar.pdf](https://dspace5.zcu.cz/bitstream/11025/25437/1/SEKVENACE_DNA_BcPrace_Konvar.pdf).
- KLASING, K. C. Poultry nutrition: a comparative approach. *Journal of Applied Poultry Research*, 2005, 14.2: 426-436.
- KRSEK, Martin. Metody studia diverzity půdních mikrobiálních společenstev [online]. Masarykova univerzita, 2014. ISBN 978-80-210-7673-0. Dostupné z: [https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob\\_spol/web/pages/03-extrakce-kyseliny.html](https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/ps2014/mikrob_spol/web/pages/03-extrakce-kyseliny.html)
- LIU, Bin, a kol. Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2014, 38.1: 56-89.
- LOU, Lixin, a kol. *Salmonella* pathogenicity island 1 (SPI-1) and its complex regulatory network. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9: 270.
- MAXAM, Allan M.; GILBERT, Walter. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1977, 74.2: 560-564.

MCQUISTON, John R., a kol. Molecular determination of H antigens of *Salmonella* by use of a microsphere-based liquid array. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, 49.2: 565-573.

METODIKA KONTROLY ZDRAVÍ ZVÍŘAT A NAŘÍZENÉ VAKCINACE NA ROK 2019. *Ministerstvo zemědělství* [online]. Praha: Státní veterinární správa, 2018. Dostupné z: <https://www.svuolomouc.cz/file.php?nid=15757&oid=6661782>

MICCICHE, Andrew C., a kol. A review of prebiotics against *Salmonella* in poultry: current and future potential for microbiome research applications. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 191.

MOUTTOTOU, Niki, a kol. Prevalence, risks and antibiotic resistance of *Salmonella* in poultry production chain. *Current topics in Salmonella and Salmonellosis*, 2017, 215-234. ISBN 978-953-51-3066

MUYZER, Gerard; SMALLA, Kornelia. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 1998, 73.1: 127-141.

NAKANO, Masayuki, a kol. *Salmonella* enterotoxin (Stn) regulates membrane composition and integrity. *Disease Models & Mechanisms*, 2012, 5.4: 515-521.

NEWELL, D. G.; FEARNLEY, Cjaem. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69.8: 4343-4351.

NOLAN, Lisa K., a kol. Colibacillosis. *Diseases of Poultry*, 2020, 770-830.

OAKLEY, Brian B., a kol. The chicken gastrointestinal microbiome. *FEMS Microbiology Letters*, 2014, 360.2: 100-112.

PALMER, Chana, a kol. Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34.1: e5-e5.

PAN, Deng; YU, Zhongtang. Intestinal microbiome of poultry and its interaction with host and diet. *Gut Microbes*, 2014, 5.1: 108-119.

PARK, Yong Ha, a kol. Application of probiotics for the production of safe and high-quality poultry meat. *Korean Journal for Food Science of Animal Resources*, 2016, 36.5: 567.

PICKARD, Derek, a kol. Composition, acquisition, and distribution of the Vi exopolysaccharide-encoding *Salmonella enterica* pathogenicity island SPI-7. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185.17: 5055-5065.

POPOVA, Teodora. Effect of probiotics in poultry for improving meat quality. *Current Opinion in Food Science*, 2017, 14: 72-77.

RADA, Vojtěch, Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína pro praxi*, 2010, 12.2: 92-97.

- RANJITKAR, Samir, a kol. Bacterial succession in the broiler gastrointestinal tract. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82.8: 2399-2410.
- RANTALA, Marjatta; NURMI, E. Prevention of the growth of *Salmonella infantis* in chicks by the flora of the alimentary tract of chickens. *British Poultry Science*, 1973, 14:6, 627-630.
- REGEA, Gemechu. Review on antibiotics resistance and its economic impacts. *Journal of Pharmacology Clinical Research*, 2018, 5.5: 555675.
- ROZSYPAL, Hanuš; HOLUB, Michal; KOSÁKOVÁ, Monika. Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči. Karolinum Press, 2013. ISBN 9788024621975
- ROTHROCK JR, Michael J., a kol. *Listeria* occurrence in poultry flocks: detection and potential implications. *Frontiers in Veterinary Science*, 2017, 4: 125.
- RYCHLÍK, Ivan. Composition and function of chicken gut microbiota. *Animals*, 2020, 10.1: 103.
- RYCHLÍK, I.; GREGOROVA, D.; HRADECKA, H. Distribution and function of plasmids in *Salmonella enterica*. *Veterinary Microbiology*, 2006, 112.1: 1-10.
- SANTOS, Renato L.; BÄUMLER, Andreas J. Cell tropism of *Salmonella enterica*. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004, 294.4: 225-233.
- SAXELIN, M., a kol. The technology of probiotics. *Trends in Food Science & Technology*, 1999, 10.12: 387-392.
- SHANG, Yue, a kol. Chicken gut microbiota: importance and detection technology. *Frontiers in Veterinary Science*, 2018, 5: 254.
- SCHREZENMEIR, Jürgen; DE VRESE, Michael. Probiotics, prebiotics, and synbiotics—approaching a definition. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 2001, 73.2: 361-364.
- SCHUSTER, Stephan C. Next-generation sequencing transforms today's biology. *Nature Methods*, 2008, 5.1: 16-18.
- SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, 2014. ISBN 978-80-247-4771-2.
- SKŘIVANOVÁ, Eva a Vojtěch RADA. *Vliv výživy na výskyt patogenních bakterií v drůbežím mase* [online]. Praha, 2014. Dostupné také z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/03/Studie-Rada-Skřivanová-2014.pdf>
- SLATKO, Barton E.; GARDNER, Andrew F.; AUSUBEL, Frederick M. Overview of next-generation sequencing technologies. *Current Protocols in Molecular Biology*, 2018, 122.1: e59.

- SLÁDEK, Zbyšek. Buněčná biologie. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2007. s. 42. ISBN 978-80-7375-086-2. Dostupné také z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:b30df390-6010-11e9-98bc-5ef3fc9ae867>
- STERN, N. J., a kol. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrointestinal system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50.9: 3111-3116.
- SUAU, Antonia, a kol. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65.11: 4799-4807.
- ŠPAČKOVÁ, Michaela. Stručný komentář k výskytu onemocnění salmonelami a kampylobaktery v ČR. *Státní zdravotní ústav* [online]. 2018, 3. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/strucny-komentar-k-vyskytu-onemocneni-salmonelami-a>
- ŠATRÁN, FEJFAROVÁ: Programy tlumení výskytu salmonel [online]. Dostupné z: <http://zemedelec.cz/programy-tlumeni-vyskytu-salmonel/>
- ŠPAČKOVÁ, DANIEL, Přehled výskytu salmonelóz a kampylobakterióz v České republice v roce 2018. *Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie (SZÚ, Praha)* 2019; 28.4: 139-145.
- TOROK VA, HUGHES RJ, OPHEL-KELLER K, ALI M, MACALPINE R. Influence of different litter materials on cecal microbiota colonization in broiler chickens. *Poultry Science*. 2009, 88,12: 2474-81.
- UZZAU, Sergio, a kol. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiology & Infection*, 2000, 125.2: 229-255.
- VAN IMMERSEEL, Filip, a kol. Microencapsulated short-chain fatty acids in feed modify colonization and invasion early after infection with *Salmonella enteritidis* in young chickens. *Poultry Science*, 2004, 83.1: 69-74.
- VAN IMMERSEEL, Filip, a kol. Supplementation of coated butyric acid in the feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. *Poultry Science*, 2005, 84.12: 1851-1856.
- VARMUZOVA, Karolina, a kol. Composition of gut microbiota influences resistance of newly hatched chickens to *Salmonella* Enteritidis infection. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 957.
- VIDENSKA, Petra, a kol. Succession and replacement of bacterial populations in the caecum of egg laying hens over their whole life. *PLoS one*, 2014, 9.12: e115142.
- VIDENSKA, Petra, a kol. Characterization of egg laying hen and broiler fecal microbiota in poultry farms in Croatia, Czech Republic, Hungary and Slovenia. *PLoS One*, 2014, 9.10: e110076.

VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody. Brno: Neptun, 2010. ISBN 978-80-86850-04-8. Dostupné z: <https://ndk.cz/uuid/uuid:e5af6490-f95a-11e8-bc37-005056827e51>

WHILEY, Harriet; ROSS, Kirstin. *Salmonella* and eggs: from production to plate. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2015, 12.3: 2543-2556.

XIAO, Yingping, a kol. Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken. *Poultry Science*, 2017, 96.5: 1387-1393.

YAN, Fang, a kol. Colon-specific delivery of a probiotic-derived soluble protein ameliorates intestinal inflammation in mice through an EGFR-dependent mechanism. *The Journal of Clinical Investigation*, 2011, 121.6: 2242-2253.

YAN, Wei, a kol. Efficacy of fecal sampling as a gut proxy in the study of chicken gut microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 2019, 10: 2126.

YANG, CM, a kol. Effects of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune function, and cecal microflora in broiler chickens. *Poultry science*. 2012, 91.9: 2121-9.

YOUSEFI, Bahman, a kol. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *Journal of Cellular Physiology*, 2019, 234.6: 8008-8018.

ZELENKA, Jiří, Jaroslav HEGER a Ladislav ZEMAN. Doporučený obsah živin v krmných směsích a výživná hodnota krmiv pro drůbež. Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, 2007. ISBN 978-80-7375-091-6.

ZHONG, Yan, a kol. Effects of probiotics, probiotic DNA and the CpG oligodeoxynucleotides on ovalbumin-sensitized Brown-Norway rats via TLR9/NF- $\kappa$ B pathway. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2012, 66.1: 71-82.

ZICHÁČEK, Vladimír. Zoologie. Olomouc, 2012. ISBN 978-807-1822-912.

ZELENKA, J.: Výživa a krmění drůbeže. Olomouc: Agriprint, 2014. ISBN 978-80-87091-53-1.