

**ÚČINEK ORGANICKÝCH KYSELIN NA BAKTERII
*CAMPYLOBACTER JEJUNI***

**EFFECT OF ORGANIC ACIDS ON BACTERIUM
*CAMPYLOBACTER JEJUNI***

DISERTAČNÍ PRÁCE

Program: P2901 Chemie a technologie potravin

Obor: 2901V013 Technologie potravin

Autor: Ing. Zuzana Molatová

Školitel: prof. Ing. Pavel Březina, CSc.

Školitel specialista: prof. Ing. Milan Marounek, DrSc.

Zlín, 2009

PODĚKOVÁNÍ

Ráda bych touto cestou poděkovala všem, kteří se významně podíleli na realizaci této disertační práce.

Především děkuji svému školiteli, prof. Ing. Pavlu Březinovi, CSc., za cenné rady, připomínky a odborné vedení při vypracování disertační práce. Dále děkuji svému školiteli specialistovi, prof. Ing. Milanu Marounkovi, DrSc., za odbornou pomoc, kterou mi poskytoval během celého doktorského studia a zejména za možnost experimentálně pracovat v Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce VÚŽV, v.v.i. v Praze – Uhřetěvesi.

Mé poděkování patří také MVDr. Evě Urbanové-Skřivanové, Ph.D. za vstřícnost a ochotu pomoci a poradit se všemi vyskytnuvšími se problémy, jakož i všem kolegům z Oddělení fyziologie výživy a jakosti produkce VÚŽV.

Za odbornou pomoc při zpracování vzorků pro transmisní elektronovou mikroskopii patří mé poděkování RNDr. Jiřímu Kaňkovi, DrSc. a p. Václavu Pechovi z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i. RNDr. Oldřichu Benadovi, CSc. z Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i. vděčím za zhotovení detailních snímků TEM.

Nelze opomenout přínosné spolupráce prof. Ing. Vojtěcha Rady, CSc. a Doc. Ing. Evy Vlkové, Ph.D. z Katedry mikrobiologie, výživy a dietetiky Fakulty agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů ČZU, již si velmi cením.

Ráda bych poděkovala i všem kolegům, se kterými jsem měla tu možnost spolupracovat během studijního pobytu na Aberystwyth University. Zejména Dr. Neilu McEwanu z Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences a celému týmu za vstřícnost a otevřenost při předávání svých zkušeností.

Zvláštní poděkování pak směřuji svému příteli, rodině a známým, kteří mi vždy byli chápavým a podnětným zázemím.

Práce vznikla za podpory doktorského projektu GA ČR (525/08/H060) a výzkumných záměrů MZ ČR (MZe0002701403 a MZe0002701404).

ABSTRAKT

Cílem této disertační práce bylo studium antibakteriálního účinku devatenácti organických kyselin a dvou monoacylglycerolů vůči bakterii *Campylobacter jejuni*. Záměrem bylo stanovit inhibiční koncentrace organických kyselin v pokusech *in vitro* a ověřit získané výsledky v navazujícím *in vivo* experimentu.

Pro sledování účinků organických kyselin byly zvoleny dvě základní metody – měření koncentrace bakteriálního proteinu v kultuře pomocí biuretové metody a real-time PCR. Nejvýraznější inhibiční aktivitu vykazovaly kyseliny kaprylová, kaprinová a laurová ($IC_{50} \leq 0,10$ mg/ml). Účinek organických kyselin byl do značné míry ovlivněn hodnotou pH, přičemž výrazněji se projevil v prostředí s vyšší aciditou. Oproti tomu vliv prodloužení doby inkubace na inhibiční účinek kyselin byl marginální. Klinický izolát *C. jejuni* byl méně vnímavý k působení organických kyselin než sbírkový kmen.

Pro posouzení vlivu kyseliny kaprinové, fumarové a monokaprinu na změny membránového potenciálu byla použita draslíková a TPP^+ iontově selektivní elektroda. Vliv kyseliny kaprinové a fumarové na morfologii buněčných membrán *C. jejuni* byl sledován pomocí transmisní elektronové mikroskopie.

Obdržené výsledky *in vitro* pokusů potvrzují, že antimikrobiální aktivita organických kyselin vůči bakterii *C. jejuni* je značně variabilní a suplementace krmiv v některých případech může mít minimální význam. Z testovaných organických kyselin vykazuje potenciál inhibovat růst bakterií *C. jejuni* v koncentracích jež jsou uplatnitelné také *in vivo*, zejména kyselina kaprylová, kaprinová a laurová (tj. kyseliny o střední délce řetězce s 8, 10 a 12 atomy uhlíku).

Záměrem pokusu *in vivo* bylo zjistit, zda suplementace krmiv zvolenými mastnými kyselinami (kys. kaprylová a kaprinová) může zabránit infekci kuřat kampylobakterem, nebo ji alespoň částečně eliminovat. Zvolené kyseliny byly aplikovány do krmiv ve volné nebo enkapsulované formě. Krmivo obsahující enkapsulovanou formu mastných kyselin (0,25 %) významně snížilo počty *C. jejuni* u brojlerů. Výsledky experimentální infekce drůbeže tedy potvrzují potenciál mastných kyselin snížit prevalenci *Campylobacter* sp. u drůbeže.

Klíčová slova:

Campylobacter jejuni, organické kyseliny, antibakteriální účinek, inhibiční koncentrace, real-time PCR, náhrady antibiotik

ABSTRACT

The aim of the Doctoral thesis was to evaluate the antimicrobial activity of nineteen organic acids and two monoacylglycerols against *Campylobacter jejuni*. The objective was to determine inhibitory concentrations of organic acids *in vitro* and to confirm these results also by *in vivo* experiment.

Two different methods were used to assess the antimicrobial activity of acids: the measurement of cell protein concentration in treated cultures by the biuret method and a SYBR Green based real-time PCR assay. Caprylic, capric and lauric acids were the most efficient antimicrobials among the compounds tested ($IC_{50} \leq 0.10$ mg/ml). Antimicrobial activity of organic acids was pH-dependent, being more pronounced at a lower pH than at a pH higher than 6. The effect of the time of incubation was less evident. Clinical isolate of *C. jejuni* showed higher tolerance to exposure of organic acids compare to CCM 6214^T strain.

In the cells treated with capric acid, fumaric acid and monocaprin, the permeability of the cytoplasmic and outer membrane was measured using potassium ion-selective and tetraphenylphosphonium (TPP⁺)-selective electrodes, respectively. The effect of capric and fumaric acids on morphological status of *C. jejuni* cells was further studied using transmission electron microscopy.

The results of *in vitro* experiments show that antimicrobial activity of organic acid against *C. jejuni* is variable and supplementation of feeds with some acids may have insufficient effects. Among organic acids tested, namely caprylic, capric and lauric acids (i.e. straight-chain fatty acids with 8, 10 and 12 carbon atoms, respectively) have potential to be used against *C. jejuni* at concentration feasible *in vivo*.

In vivo experiment was carried out to investigate whether fatty acids (caprylic and capric acid) supplementation of feed would reduce *C. jejuni* colonization in broiler chickens. Two forms of fatty acids were tested: coated and non-coated. The diet enriched with 0.25 % of coated form of fatty acids consistently reduced enteric *Campylobacter* populations in chickens. Results of the experimental infection of broiler chickens support capability of fatty acids to reduce *Campylobacter* carriage in poultry.

Key words:

Campylobacter jejuni, organic acids, antimicrobial effect, inhibitory concentration, real-time PCR, replacements of antibiotics

OBSAH

PODĚKOVÁNÍ.....	2
ABSTRAKT	3
ABSTRACT	4
OBSAH	5
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	7
1.1 TAXONOMIE RODU <i>CAMPYLOBACTER</i>	8
1.1.1 Charakteristika <i>Campylobacter sp.</i>	9
1.1.2 <i>Campylobacter jejuni</i> (Jones a kol., 1931; Véron a Chatelain, 1973).....	9
1.2 EPIDEMIOLOGIE ONEMOCNĚNÍ <i>CAMPYLOBACTER SP.</i>	10
1.2.1 Způsoby přenosu infekce	11
1.2.2 Výskyt a klinické příznaky kampylobakteriózy	12
1.2.3 Epidemiologie onemocnění	13
1.3 VÝSKYT A PŘEŽÍVÁNÍ <i>CAMPYLOBACTER SP.</i> V CHOVECH DRŮBEŽE.....	14
1.3.1 Mechanismus šíření <i>Campylobacter sp.</i>	15
1.3.2 Vliv jatečného zpracování na výskyt <i>Campylobacter sp.</i> u drůbeže.....	16
1.3.3 Výskyt <i>Campylobacter sp.</i> na drůbežím mase	18
1.3.4 Faktory ovlivňující přežívání <i>Campylobacter sp.</i> v potravinách	19
1.4 PROBLÉM ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	20
1.4.1 Alternativy náhrady antibiotik.....	22
1.5 ORGANICKÉ KYSELINY	23
1.5.1 Obecná charakteristika organických kyselin.....	23
1.5.2 Monoacylglyceroly	24
1.5.3 Mechanismus účinku organických kyselin.....	24
1.5.4 Antimikrobiální účinky organických kyselin	27
1.5.5 Organické kyseliny jako alternativa antibiotik.....	29
1.5.6 Enkapsulace organických kyselin.....	31
2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE	32
3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	33
3.1 PŘEHLED METOD SPOLEČNÝCH PRO VŠECHNY ČÁSTI DISERTAČNÍ PRÁCE.....	33
3.1.1 Bakteriální kmeny.....	33
3.1.2 Kultivace bakterií rodu <i>Campylobacter</i>	33
3.1.3 Testované organické kyseliny	35
3.2 POKUSY <i>IN VITRO</i>	36
3.2.1 Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin.....	36
3.2.2 Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin.....	37
3.2.3 Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou.....	38
3.2.4 Studium mechanismu účinku organických kyselin	40
3.3 POKUS <i>IN VIVO</i>	43
3.3.1 Experimentální infekce drůbeže	43
4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE	51
4.1 POKUSY <i>IN VITRO</i>	51

4.1.1	<i>Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin.....</i>	51
4.1.2	<i>Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin.....</i>	53
4.1.3	<i>Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou.....</i>	58
4.1.4	<i>Studium mechanismu účinku organických kyselin</i>	62
4.2	POKUS IN VIVO	66
4.2.1	<i>Experimentální infekce drůbeže</i>	66
5.	DISKUSE.....	72
5.1	POKUSY IN VITRO	72
5.1.1	<i>Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin.....</i>	72
5.1.2	<i>Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin.....</i>	73
5.1.3	<i>Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou.....</i>	74
5.1.4	<i>Studium mechanismu účinku organických kyselin</i>	76
5.2	POKUS IN VIVO	77
5.2.1	<i>Experimentální infekce drůbeže</i>	77
6.	PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	80
7.	ZÁVĚR.....	81
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	83
	SEZNAM ILUSTRACÍ.....	96
	SEZNAM TABULEK	97
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	99
	SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA	101

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Dle zpráv Světové zdravotnické organizace (WHO) jsou onemocnění potravinového původu vážným a narůstajícím problémem. Mezi významná onemocnění skupiny alimentárních toxoinfekcí přenosných ze zvířat (zoonózy) patří zejména salmonelózy a kampylobakteriízy. Četnost výskytu kampylobakterií v České republice zaznamenala po roce 1995 zásadní změnu, kdy se trend nemocnosti prudce zvýšil a již řadu let má toto onemocnění stabilně vzrůstající tendenci. V roce 2007 překonal výskyt kampylobakterií počtem hlášených onemocnění dokonce i výskyt salmonelóz a stal se tak hlavní příčinou onemocnění potravinového původu [1]. Tento stav odpovídá situaci v západní Evropě, kde kampylobakteriíza spolu se salmonelózou představuje jedno z nejčastějších potravinových onemocnění.

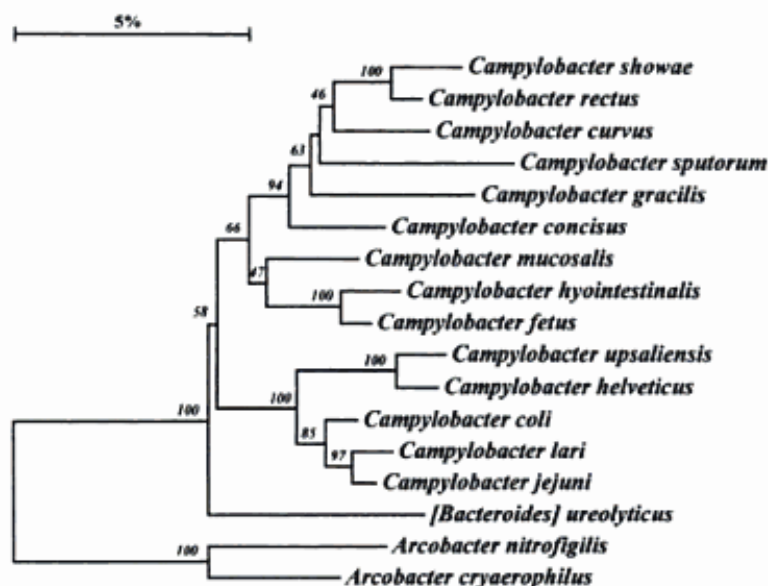
Hlavním etiologickým agens kampylobakterií nadále zůstává *Campylobacter jejuni*. Bakterie *C. jejuni* je součástí mikroflóry střevního traktu řady teplokrevných zvířat, aniž by u nich vyvolávala klinické příznaky onemocnění, proto jsou infikovaná zvířata na jatkách při použití běžných zdravotních kontrol v podstatě nezachytitelná. Velmi častým nositelem *C. jejuni* jsou ptáci a drůbež, z toho důvodu se za nejrizikovější potravinu z hlediska možnosti onemocnění kampylobakteriízou považuje drůbeží maso.

K pochopení současné problematiky zoonóz je nutné posuzovat poslední vývoj v kontextu mnoha faktorů. Jedním z nich je legislativa Evropského společenství. Vzhledem k možnosti vzniku zkřížené rezistence u antimikrobiálních látek, jež jsou používány v humánní terapii, státy Evropské unie postupně omezily a od 1. ledna 2006 pak zcela zakázaly používání doplňkových látek ve výživě zvířat (viz nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1831/2003 z 22. září 2003). Tento zákaz může negativně ovlivnit zdravotní stav zvířat a počty patogenních bakterií v jejich trávicím traktu, s následnou možností kontaminace produktů živočišné výroby těmito bakteriemi a tím zvýšit riziko vzniku nemocí z potravin u lidí.

Vzniklá situace vytváří potřebu hledat alternativní krmná aditiva, která by alespoň z části nahradila účinek antibiotik. Cílem předkládané disertační práce je studium antibakteriálního účinku vybraných organických kyselin na bakterii *Campylobacter jejuni*, která je nejčastější příčinou bakteriálních alimentárních infekcí v Evropské unii.

1.1 Taxonomie rodu *Campylobacter*

Rod *Campylobacter* byl poprvé zmíněn roku 1963 (Sebald a Véron) a zahrnoval pouze dva druhy *Campylobacter fetus* a “*Campylobacter bubulus*” (nyní *Campylobacter sputorum*), doposud klasifikované jako *Vibrio* spp. Od té doby prošla taxonomie rodu *Campylobacter* dramatickými změnami. V současnosti zahrnuje 16 druhů (a šest poddruhů) - *C. fetus*, *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* (NARTC – dříve známé jako Nalidixic Acid Resistant Thermophilic Campylobacters), *C. helveticus*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. sputorum*, *C. mucosalis*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. rectus*, *C. gracilis*, *C. showae*, *C. lanienae*, *C. hominis* [2], přičemž mnoho druhů dříve označovaných jako *Campylobacter* spp. bylo přeřazeno do jiných rodů, patří mezi ně *Arcobacter*, *Helicobacter* a *Sulfospirillum*.



Obr. 1 Fylogenetický strom jednotlivých druhů rodu *Campylobacter* odvozený na základě podobnosti sekvence 16S rRNA. Pro sestavení stromu byla použita metoda neighbour-joining. Měřítko reprezentuje 5% odlišnost v sekvenci [3]

Taxonomické začlenění rodu *Campylobacter*

Je následující: kmen *Proteobacteria* » třída *Epsilonproteobacteria* » řád *Campylobacterales* » čeleď *Campylobacteraceae* » rod *Campylobacter*

1.1.1 Charakteristika *Campylobacter* sp.

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou typickými zástupci čeledi *Campylobacteraceae*. Patří sem štíhlé, mírně spirálovitě zakřivené tyčky, velké 0,2– 0,8 μm x 0,5– 5 μm . Kratší formy mají tvar písmene S nebo "profil letícího racka" [3].

Mikroskopický obraz závisí do značné míry na stáří kultury. Pro exponenciální fázi růstu jsou typické krátké spirálovité formy, které mohou dosáhnout v časně stacionární fázi až dvojnásobné délky. Pro starší kultury je příznačný přechod buněk v kokovité útvary. Za nevýhodných podmínek mohou bakterie přecházet do tzv. "živé, ale nekultivovatelné formy". Tento fenomén je v mnoha směrech analogický sporulaci u gram pozitivních bakterií [4].

Buňky netvoří spóry, jsou gramnegativní a pohyblivé polárně umístěnými bičíky. Neobalený bičík na jednom nebo obou koncích buňky umožňuje charakteristický rotační pohyb. Tento pohyb spolu s tvarem buňky usnadňuje průnik, např. vrstvou hlenu. Zástupci rodu jsou mikroaerofilní mikroorganismy s respiratorním typem metabolismu. Energií získávají z aminokyselin nebo meziproductů Krebsova cyklu, nefermentují ani neoxidují sacharidy. Mezi další biochemické vlastnosti patří: redukce fumarátu na sukcinát, negativní reakce s methylčervení a produkce acetonu a indolu [3, 5].

Některé druhy kampylobakterů díky teplotním požadavkům nad 40 °C získaly přívlastek termotolerantní. Optimální růstová teplota 30–42 °C je řadí do skupiny mezofilních mikroorganismů.

1.1.2 *Campylobacter jejuni* (Jones a kol., 1931; Véron a Chatelain, 1973)

C. jejuni patří mezi nejdůležitější druhy v čeledi. Je velmi rozšířen v přírodě, většinou je adaptován na střevní trakt teplokrevných zvířat. Vyskytuje se hlavně u drůbeže. Je častým patogenem zvířat, ale patogenní je také pro člověka. Na humánních enteritidách se z rodu *Campylobacter* podílí v největší míře (80–85 %) [6].

Jsou známy dva poddruhy, *C. jejuni* subsp. *jejuni* a *C. jejuni* subsp. *doylei*. Hlavním fenotypovým znakem běžně používaným pro odlišení je neschopnost *C. jejuni* subsp. *doylei* redukovat nitrát. Další charakteristickou vlastností je rozdílný růst při 42 °C a vysoká citlivost k cefalotinu. Avšak pro oba poddruhy je příznačná hydrolýza hippurátu [3, 7]. Patogenní role *C. jejuni* subsp. *doylei* není známa. Typické biochemické vlastnosti a antimikrobiální charakteristika termotolerantních druhů rodu *Campylobacter* jsou shrnuty v následující Tab. 1.

Tab. 1 Diagnostické znaky termotolerantních druhů *Campylobacter* sp. [3, 5; upraveno].

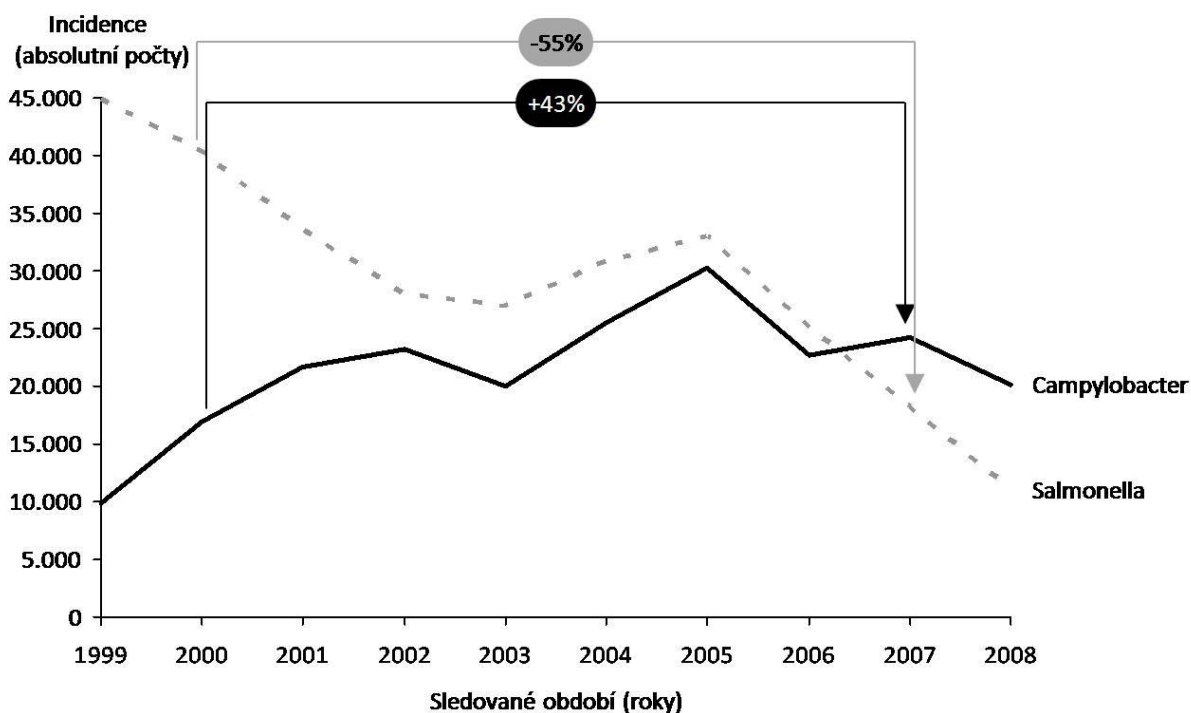
	Druh	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus</i>
	Poddruh	subsp <i>jejuni</i>	subsp <i>doylei</i>			subsp <i>fetus</i>
Aerobní růst při	30 nebo 36 °C	-	-	-	-	-
Mikroaerobní růst při	25 °C	-	-	-	+	+
	37 °C	+	+	+	+	+
	42 °C	+	-	+	+	částečně
Růst v přítomnosti	NaCl (4 %)	-	-	-	-	-
Biochemické testy	průkaz oxidázy	+	+	+	+	+
	průkaz katalázy	+	+	+	+	+
	redukce nitrátu	+	-	+	+	+
	hydrolýza hippurátu	+	+	-	-	-
	hydrolýza indoxyl acetátu	+	+	+	-	-
	produkce sirovodíku	-	-	-	+	+
Citlivost na antibiotika	kyselina nalidixová	S	S	S	R	R
	cefalotin	R	S	R	R	S
	penicilin	R	R	R	R	R
	TTC (<i>trifenylný</i> tetrazoliumchlorid)	R	R	R	S	S

+, pozitivní; -, negativní; S, senzitivní; R, rezistentní

1.2 Epidemiologie onemocnění *Campylobacter* sp.

Na přelomu 80. a 90. let patřila kampylobakterióza v České republice k téměř neznámému onemocnění. Četnost výskytu kampylobakterióz zaznamenala zásadní zvrát až po roce 1995, kdy se trend nemocnosti prudce zvýšil a již řadu let má toto onemocnění stabilně vzrůstající tendenci. Počty hlášených infekcí kampylobakteriózy a salmonelózy se dlouhodobě přibližovaly (dynamiku výskytu obou onemocnění v České republice v letech 1999–2008 znázorňuje Obr. 2). V roce 2000 bylo evidováno téměř 17 000 případů onemocnění kampylobakteriózou a již v roce 2005 počet hlášených infekcí překročil hranici 30 000 případů [1]. Podle údajů Národního referenčního centra pro analýzu epidemiologických dat z roku 2007, překonal výskyt kampylobakterióz počtem hlášených onemocnění výskyt salmonelóz a zaujal tak přední místo ve výskytu alimentárních onemocnění. Tento stav odpovídá situaci v Evropské unii (EU), kde kampylobakterióza spolu se salmonelózou představuje jedno z nejčastějších onemocnění tohoto typu. V téže roce onemocnělo kampylobakteriózou v evropské sedmadvacítce celkem přes 200 000 lidí, což je oproti roku 2006 čtrnáctiprocentní nárůst [8]. Příčiny vzestupu incidence kampylobakterových

enteritid nejsou zcela jasné. Částečný podíl se přikládá zvýšené informovanosti lékařů o této bakterii, zdokonalení mikrobiologické diagnostiky a zkvalitnění zdravotnické evidence. V souvislosti s tím se nabízí otázka, zda nebyly dřívější klinické diagnózy salmonelózy ve skutečnosti chybně diagnostikované případy kampylobakterií. Navíc se odhaduje, že skutečný výskyt kampylobakterií je pravděpodobně několikanásobně vyšší než udávají oficiální statistiky. Důvodem je velký počet nediodagnostikovaných onemocnění, pro které je příznačný mírnější průběh nebo sporadický výskyt.



Obr. 2 Dynamika výskytu kampylobakterií a salmonelózy v ČR v letech 1999–2008 [1; upraveno]

1.2.1 Způsoby přenosu infekce

Přenos se uskutečňuje především alimentární cestou (potravinami nebo vodou) nebo přímo (např. kontaktem se zvířetem). Interhumánní přenos je vzácný, byl nicméně popsán v kolektivních zařízeních péče o děti a v ústavech sociální péče. Vzácné jsou i epidemie kampylobakterií. V hlášení převládají sporadické případy, nebo případy rodinného charakteru.

Pravděpodobně nejčastějším vehikulem onemocnění jsou potraviny. Infekce u člověka často souvisí s konzumací syrové nebo nedostatečně tepelně opracované drůbeže nebo masa, přičemž významný podíl mají zejména nedostatečně tepelně ošetřené potraviny typu „fast food“ (tzv. minutky). Člověk se může nakazit také pitím nepasterovaného mléka nebo produktů z takového

mléka, pitím kontaminované vody, popřípadě vody z neznámých zdrojů a v neposlední řadě sekundární kontaminací již hotových potravin. Opomenout nelze ani přenos nákazy prostřednictvím nakažených zvířat (zejména domácími mazlíčky) [9–12].

Z 16 doposud objevených druhů rodu *Campylobacter*, je nejméně osm z nich považováno za potenciální humánní patogeny: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. fetus*, *C. upsaliensis*, *C. sputorum*, *C. concisus* a *C. curvus* [13].

Více než 95 % případů kampylobakterové infekce vyvolávají tzv. termotolerantní druhy *C. jejuni* a *C. coli* [9]. V posledních letech se pozornost obrací také na *C. upsaliensis* a *C. lari*, jejichž nález u lidí je ale mnohem vzácnější. Hlavním etiologickým agens tedy nadále zůstává *C. jejuni* (80–90 % infekcí). Tato bakterie je součástí mikroflóry střevního traktu řady teplokrevných zvířat, aniž by u nich vyvolávala klinické příznaky onemocnění. Z toho důvodu jsou infikovaná zvířata na jatkách, při použití běžných zdravotních kontrol, v podstatě nezachytitelná. Velmi častým nositelem *C. jejuni* jsou ptáci a drůbež, což je dáváno do souvislosti s jejich zvýšenou tělesnou teplotou, která je pro tyto bakterie příznivá (*Campylobacter* je schopen růstu v teplotním rozmezí 30–46 °C, optimální růstovou teplotou je 42 °C). Proto nepřekvapí, že za nejrizikovější potravinu z hlediska možnosti onemocnění kampylobakteriózou se považuje právě drůbeží maso (podle četných literárních zdrojů kontaminované od 20–90 %). Trend spotřeby drůbežího masa bezesporu přispívá k nárůstu výskytu kampylobakteriózy. Průměrná spotřeba drůbežího masa v Evropské unii je poměrně stabilní a pohybuje se kolem hodnoty 22,7 kg/osobu. V České republice je spotřeba drůbeže nad úroveň průměru států Evropské unie a vykazuje dlouhodobý růstový trend. Obecně lze říci, že spotřeba drůbežího masa byla iniciována řadou příznivých faktorů, mezi nejvýznamnější patří především jeho příznivé nutriční vlastnosti a relativně nízká maloobchodní cena, podpořená změnou životního stylu populace.

Význam drůbeže jako hlavního původce onemocnění lze demonstrovat na dioxinové krizi v Belgii v červnu 1999, kdy díky medializaci případu významně poklesla spotřeba drůbežího masa a souvztažně byl v následujících měsících zaznamenán přechodný (40%) pokles incidence kampylobakteriózy [14].

1.2.2 Výskyt a klinické příznaky kampylobakteriózy

Bakterie rodu *Campylobacter* vyvolávají akutní střevní infekce u lidí tzv. kampylobakteriózu a potraty u domácích zvířat. V přírodě jsou kampylobaktery značně rozšířeny, většina je adaptována na střevní trakt teplokrevných zvířat. Velmi častým rezervoárem kmenů *C. jejuni* jsou volně

žijící ptáci a drůbež. Poměrně četné jsou také pozitivní nálezy u prasat, ale zde bývá izolován zejména *C. coli*. Také nálezy u ostatních hospodářských zvířat, např. u ovcí a skotu nejsou výjimkou. Z těchto živočišných zdrojů se člověk nakazí nejčastěji. Infekce nastává požitím infikované potravy nebo vody, ale i kontaktem s nakaženými zvířaty.

Onemocnění způsobené *Campylobacter* spp. probíhá nejtypičtěji jako enteritida v klinických projevech shodná s jinými infekcemi bakteriálního původu. Průběh nemoci je ovlivněn vnímavostí pacienta k infekcím, virulencí kmene a v neposlední řadě infekční dávkou. Ta není přesně stanovena, ale předpokládá se, že zejména u malých dětí, starých osob a imunokompromitovaných osob je velmi nízká – méně než 500 bakteriálních buněk [15]. Experimentálně bylo zjištěno, že dávka 500 až 800 buněk je schopna vyvolat klinické příznaky asi u 10 % mladých a zdravých osob. Při reinfekci mívá onemocnění mírnější příznaky. Je tedy pravděpodobné, že při časté expozici může být vyvolána částečná imunita. Tento jev je spojován s určitými profesními skupinami (např. farmáři, veterináři, zaměstnanci drůbežích jatek, řezníci aj.), u kterých je kamylobakteriíza považována již za profesní onemocnění.

Na rozdíl od salmonelóz (s 48 hodinovou inkubační dobou) se první příznaky kamylobakteriízy objevují zpravidla dva až pět dnů po nákaze. Výjimečně může doba inkubace dosáhnout až deseti dnů [9]. Kamylobakteriíza typicky probíhá jako hemoragická enterokolitida s horečkou, bolestmi hlavy, nevolností a výrazným průjmem někdy s příměsí krve nebo hlenu. Onemocnění je provázeno bolestmi břicha, které mohou imitovat apendicitidu. Alimentární nákaza může vyústit v sekundární neurologické problémy známé jako Guillain-Barrého syndrom, Reiterův syndrom nebo Miller-Fischerův syndrom [16, 10].

Základním postupem v léčbě, stejně jako u jiných průjmových onemocnění, zůstává stále rehydratace. Podávání antibiotik (erytromycin, tetracyklin, chinoliny) je indikováno jen v těžších případech. Průměrná doba trvání onemocnění je pět až sedm dní a může odeznít i bez terapie. Jsou však známy i krajní případy, kdy onemocnění kamylobakteriízou skončilo smrtí pacienta.

1.2.3 Epidemiologie onemocnění

Onemocnění má řadu shodných epidemiologických charakteristik s infekcí vyvolanou salmonelami. Nejpostiženější skupinou jsou děti mezi 1–4 roky. Vyšší nemocnost byla zaznamenána také u mladých lidí ve věku 15–30 let, která pravděpodobně souvisí se změnou stravovacích návyků v důsledku zvýšené mobility (studijní, pracovní či zahraniční pobyty, atp.). Četnost onemocnění v průběhu roku kolísá se značnou sezónností, přičemž křivka nemocnosti vrcholí v letních měsících [9]. Většina onemocnění má sporadický, případně rodinný

charakter. Epidemie jsou vzácností, pokud se vyskytnou, bývá původcem vzniku zejména sekundární kontaminace již připravených pokrmů. Infekce, podobně jako salmonelóza, představuje významný problém nejen v humánní, ale i v veterinární medicíně, kde vyvolává septické aborty u ovcí či hovězího dobytka.

1.3 Výskyt a přežívání *Campylobacter* sp. v chovech drůbeže

Ačkoliv jsou zdroje infekce a cesty přenosu *Campylobacter* sp. stále předmětem řady debat, epidemiologické údaje zřetelně poukazují na fakt, že kontaminované produkty živočišného původu, zvláště pak drůbež, přispívají nejvýznamnější měrou k výskytu kampylobakterióz. Tuto hypotézu lze demonstrovat na dioxinové krizi v Belgii v roce 1999, na nedávných obavách z nákazy ptačí chřipkou, nebo na příkladu Islandu. Zde stejně jako v jiných severských zemích bylo před rokem 1996 drůbeží maso distribuováno převážně v zmraženém stavu. Nicméně zvýšená spotřebitelská poptávka a trhem řízené tlaky donutily prodejce prodávat drůbež chlazenou. Následovalo zvýšení výskytu kampylobakteriózy u lidí, které v roce 1999 dosáhlo úrovně 116 hlášených případů na 100 000 obyvatel. Podle statistik byla v té době prevalence *Campylobacter* sp. u drůbežího masa určeného k prodeji 62% [10].

Jako nejzávažnější zdroj onemocnění humánní kampylobakteriózou je tedy v současné době považováno drůbeží maso a drůbeží produkty [17, 10, 6]. Ty bývají zpravidla kontaminovány obsahem trávicího traktu asymptomaticky kolonizovaných kuřat a mohou představovat riziko pro konzumenta, jestliže s potravou nevhodně manipuluje nebo ji nedostatečně tepelně opracuje.

Campylobacter sp. se vyskytuje nejčastěji v trávicím traktu drůbeže, kde je běžnou součástí střevní flóry. *Campylobacter* sp. osídluje u drůbeže především dolní část trávicího traktu, zejména slepé střevo, tlusté střevo a kloaku [18]. Důvodem častého výskytu u ptáků může být vyšší tělesná teplota (42 °C) ve srovnání s většinou savců, která je příznivá pro růst tohoto patogena. U žijící drůbeže bývá často zjišťována silná kolonizace střev buňkami *Campylobacter* sp. (10^5 – 10^9 CFU/g střevního obsahu) aniž by byly pozorovány klinické příznaky onemocnění [11, 19]. Takto kolonizovaná drůbež přichází na jatky s vysokými počty *Campylobacter* sp., které v průběhu procesu porážky kontaminují nejen těla porážené drůbeže, ale i prostředí v němž se porážka uskutečňuje [17, 20–22].

1.3.1 Mechanismus šíření *Campylobacter* sp.

Výskyt *Campylobacter* sp. v chovech drůbeže v Evropské unii se pohybuje v rozmezí 35–57 % [17]. V České republice byl v roce 2007 podle Monitoringu zoonóz, původců zoonóz a rezistence vůči antimikrobiálním látkám výskyt termofilních *Campylobacter* sp. 45,1% [26].

Přesný mechanismus šíření *Campylobacter* sp. v chovech zvířat a cesty přenosu ze zvířat (respektive z potravin) na člověka jsou předmětem řady studií a nebyly dosud spolehlivě vysvětleny.

Je pravděpodobné, že různé kmeny *C. jejuni* mají odlišnou patogenitu pro drůbež a pro člověka a také různou schopnost osídlit střevo hostitele. *Campylobacter* sp., na rozdíl od salmonely, neadheruje k epiteliální sliznici střeva, ale díky své pozitivní chemotaxi k mucinu osídluje mukózní vrstvu střeva a pomocí svých bičíků se volně pohybuje [23].

Ke kolonizaci drůbežního střeva dochází pouze výjimečně před sedmým dnem věku, nejčastěji osídlení střev proběhne až mezi druhým a čtvrtým týdnem věku [17, 19]. Podle studie, kterou ve Velké Británii provedl Evans a Sayers [24], je 40 % brojlerů v hejnu kolonizováno *Campylobacter* sp. do čtvrtého týdne věku a až 90 % do sedmého týdne. Také dle dalších studií míra infekce *Campylobacter* sp. v konvenčních chovech vzrůstá lineárně s délkou odchovu brojlerových hybridů [17, 21]. Počty *Campylobacter* sp. poměrně rychle dosahují úrovně 10^6 – 10^7 CFU/g obsahu slepého střeva [19]. Jednou kolonizované kuře zůstává asymptomatickým nosičem až do doby porážky. Dojde-li k výskytu patogenu u minimálního počtu jedinců, dochází díky vysoké koncentraci zvířat na m^2 a vysokým počtům vylučovaných buněk v trusu k rychlému rozšíření infekce mezi ostatní kusy. Postupně dochází k infekci téměř všech, nebo všech brojlerů v hejnu a také ke kontaminaci prostředí, ve kterém se zvířata nacházejí. Stoupající promořenost hejna se pak v okamžiku dosažení tržního věku pohybuje v rozmezí 80–100 % [6, 19]. Rychlé rozšíření může být zapříčiněno koprofagií kuřat, ale na vině může být i voda a krmivo. Roli vektorů mohou sehrávat také drobní hlodavci, hmyz a zejména volně žijící ptáci (pokud mají možnost přístupu do hal). K rozšiřování *Campylobacter* sp. v chovech drůbeže také napomáhá způsob chovu a v neposlední řadě sám člověk (ošetřovatel).

Přenos původce je pravděpodobně způsoben horizontálním transferem z environmentálních zdrojů (např. krmivo, neošetřená voda, ostatní hospodářská zvířata, divoké ptactvo nebo zařízení farmy) [10, 20, 21]. Důvodem pro toto tvrzení jsou subtypizace izolovaných kmenů pomocí molekulárně biologických metod a sérologických metod. Makrorestriční analýza izolátů *C. jejuni* prokázala genetickou variabilitu patogenu mezi jednotlivými farmami, ale vysokou míru

příbuznosti klonů uvnitř farmy. Nicméně v jednotlivých následných hejnech na téže farmě byly potvrzeny nepříbuzné genotypy *C. jejuni* svědčící o různých zdrojích infekce na dané farmě [25]. Možnost vertikálního přenosu *Campylobacter* sp. z nosnic na kuřata prostřednictvím vajec současné studie nepotvrzují [17, 19, 20]. Fakt, že drůbež zpravidla nebývá infikována dříve, než ve druhém týdnu života je jedním z argumentů proti vertikálnímu přenosu.

Ačkoliv naprostá většina brojlerů produkovaných v České republice pochází z konvenčních intenzivních chovů, považují za důležité zmínit studii vědeckého týmu Heuer a kol. [27], ve které se autoři zaměřili na srovnání výskytu *Campylobacter* sp. v rozdílných typech chovů. Četnost *Campylobacter* sp. byla vyšší u ekologických chovů (100%) ve srovnání s extenzivním chovem (49,2%) nebo s konvenčními intenzivními chovy (36,7%). Možným vysvětlením je větší důraz kladený na pohodu zvířat (welfare). Tato zvířata jsou vystavena řadě vlivů, které se v intenzivních chovech daří eliminovat.

Jelikož hlavní zdroj infekce brojlerových hejn nebyl zatím přesně označen, je prevence na farmách velmi obtížná. Protože je přenos *Campylobacter* sp. v hejnech velmi rychlý a není zásadně ovlivněn dobrými nebo špatnými hygienickými podmínkami v chovu, pro úspěšnou eliminaci tohoto patogena na konvenčních drůbežích farmách se jeví jako zásadní prevence kolonizace prvního jedince v hejnu.

1.3.2 Vliv jatečného zpracování na výskyt *Campylobacter* sp. u drůbeže

Velká část kontaminantů mikrobiálního původu přichází do zpracovatelských podniků z prvovýroby (farmy, chovy) [10, 20, 28]. Z toho důvodu kontrola a prevence na úrovni farem představují významný faktor v redukci výskytu *Campylobacter* sp. na opracované drůbeži a drůbežím mase a přispívají tak významnou měrou k eliminaci tohoto patogena v potravinovém řetězci.

Transport živé drůbeže na porážku je dalším rizikovým faktorem zvýšení počtu *Campylobacter* sp. u brojlerů [19, 21]. Při transportu dochází vlivem přepravních podmínek a stresu ke zvýšenému vzájemnému kontaktu zvířat a vyšší produkci trusu a tím vzrůstá kontaminace povrchu těl jednotlivých kusů. Mikrobiologové z Výzkumné zemědělské služby při americkém ministerstvu zemědělství dokonce vyhodnotili úlohu transportních klecí jako jednoho z nejdůležitějších míst v produkčním řetězci drůbeže, kde může docházet ke kontaminaci brojlerů patogenní bakterií *Campylobacter*.

V současné době používané technologie porážení drůbeže jsou vysoce efektivní, ale přispívají k vzájemné křížové kontaminaci poražených kusů. Kontaminace těl brojlerů *Campylobacter* sp. se v průběhu zpracování mění

v závislosti na výrobní operaci. Technologické kroky jako je paření, škubání, kuchání, oplachování a chlazení, počty bakterií mění a může během nich dojít také ke křížové kontaminaci poražených kusů.

Pařicí lázeň mívá zpravidla teploty mezi 50 a 60 °C, což nepřispívá významnou měrou k inaktivaci buněk. Zvláště rizikové je paření při nižších pařicích teplotách. Například při paření vodou o teplotě 50 °C může díky přítomnosti velkého množství organických látek v pařicí vodě (krev, peří, zbytky trusu) dojít k vytvoření „ochranného obalu“ a řada mikroorganismů pak v pařicích vodách přežívá i teploty, které jsou v laboratorních podmínkách devitalizační. Vyšší teploty, které by již devitalizaci způsobily, nejsou používány z důvodu narušování integrity kůže. Přesto je prokázáno, že kontaminace *Campylobacter* sp. se po paření obecně snižuje, je-li použito pařicí vody o teplotě cca 60 °C [17]. Tuto skutečnost dokládá Tab. 2, ve které jsou uvedeny průměrné počty *Campylobacter* sp. v průběhu jatečného zpracování drůbeže v závislosti na jednotlivých technologických operacích.

Tab. 2 Průměrné počty *Campylobacter* sp. (\log_{10} CFU/g kůže v okolí kloaky) ze dvou sledovaných jatek (podnik A – pařicí teplota 58 °C, chlazení vodou; podnik B – pařicí teplota 52 °C, chlazení vzduchem) [19; upraveno]

Technologický proces	Podnik A	Podnik B
Vykrvení	3,08	3,16
Paření	1,04 (58 °C)	1,82 (52 °C)
Škubání	1,97	2,24
Eviscerace	2,54	2,45 (+ promytí)
Chlazení	1,35 (voda)	3,73 (vzduch)

Kontaminace je zvyrazněna procesem škubání, kdy jsou peřové folikuly obnaženy a tím je usnadněno pronikání kontaminované tekutiny. Podle studie Keener a kol. [21] byl *C. jejuni* izolován ze škubacích prstů v 94,4 % a to ve vysokých počtech. Proto se předpokládá, že jde o oblast, ve které může snadno dojít ke křížové kontaminaci. Nejvíce kontaminované bývají zejména četné kožní záhyby v oblasti krku, prsou a pod křídly, kde se může vytvořit vhodné prostředí pro přežívání *Campylobacter* sp.

Kuchání je pravděpodobně nejvíce rizikovou technologickou operací, kdy i minimální množství obsahu slepého střeva způsobuje významné zvýšení počtu *Campylobacter* sp. na povrchu jatečně upraveného těla. Nebezpečí se úměrně zvyšuje, zejména pokud dojde k perforaci střev nebo volete. Uvedená fakta podporují mnohé studie, které dokládají snížení počtu kampylobakterů

po paření, ale naopak signifikantní zvýšení v průběhu škulání a eviscerace [28, 29]. Z toho důvodu se předpokládá, že cékum a tlusté střevo jsou nejpravděpodobnějším zdrojem kontaminace na porážkách, tato skutečnost byla potvrzena molekulární typizací [22].

Další operace zahrnující promývání a chlazení přispívají k redukci počtů mikroorganismů, ale neeliminují je úplně [11]. Chlazení drůbeže vzduchem je v současnosti používáno přednostně před chlazením vodou. Jedná se o progresivnější způsob chlazení, který má význam nejen v zabránění křížové kontaminace, ale také v osušování povrchu drůbeže. Současně se v některých zemích přistupuje ke sprejovému ošetření poražené drůbeže roztokem organických kyselin a to především kyseliny mléčné nebo octové.

Během finálních operací, kdy jsou těla omyta a zchlazena, dochází k výraznému snížení kontaminace (o 50–90 %), přesto však více než čtvrtina chlazené drůbeže zůstává na konci technologického procesu *Campylobacter* sp. pozitivní [30]. Možným vysvětlením je, že počáteční počty bakterií *C. jejuni* se v průběhu jatečného zpracování sice pozvolna snižují, avšak v protikladu s tím stoupá křížová kontaminace [20]. Přesto vše může jatečné zpracování snížit úroveň kontaminace drůbeže kampylobakterem až o několik řádů [11].

1.3.3 Výskyt *Campylobacter* sp. na drůbežím mase

Četné studie uvádějí, že 30 až 100 % drůbežích finálních produktů v obchodní síti je kontaminováno *Campylobacter* sp. [17, 31]. Vyšší úrovně kontaminace (až 100%) se obvykle vyskytují v teplejších měsících (červen–září) a nižší (50%) v měsíci březnu [32]. Výskyt této sezónnosti koresponduje s vrcholem incidence kampylobakteriózy při humánních infekcích, což potvrzuje význam drůbeže jakožto zdroje kampylobakterových infekcí u lidí.

Popisované úrovně *Campylobacter* sp. v čerstvé drůbeži a produktech kolísají mezi 10^2 a $10^5 \log_{10}$ CFU na 100g masa [11, 21]. Častá variabilita v zachytu *Campylobacter* sp. u drůbeže je způsobena počtem vyšetřených vzorků, místem odběru, metodikou vyšetření. Buňky *Campylobacter* sp. jsou také běžně nalezeny v požitelných drobcech, je to ale nejspíše způsobeno sekundární kontaminací během zpracování než infekcí samotných orgánů.

Mělo by být poznamenáno, že mikrobiální kontaminace drůbeže je z velké části povrchovým fenoménem. Je to z toho důvodu, že kůže zpravidla nebývá odstraňována a mnoho kontaminantů se nachází právě na ní [19]. Proto nepřekvapí konstatování, že nižší počty *Campylobacter* sp. byly nalezeny u masa bez kůže [17].

Následné balení drůbeže, které omezuje přístup kyslíku a udržuje vysokou relativní vlhkost, spíše napomáhá k přežívání *Campylobacter* sp. po dobu několika dnů. Stern [33] publikoval dvouletou studii, v jejímž průběhu monitoroval vliv doby skladování a sezonní vlivy na počty *Campylobacter* sp. Shledal, že detekce *C. jejuni* signifikantně poklesla po 10 dnech skladování při 4 °C. Oproti tomu mražením produktů byly počty kampylobakterů okamžitě sníženy přibližně o jeden řád a zůstaly relativně konstantní po celou dobu skladování. Bakterie byly schopny přežít -20 °C po dobu nejméně 3 měsíců, i když při velmi nízkých počtech [11, 34]. Mražení tedy přispívá k výrazné redukci počtu přežívajících buněk *Campylobacter* sp., ale vzhledem k vysokým úrovním kontaminace nelze považovat tuto operaci za spolehlivou pro devitalizaci tohoto patogena [35].

Ostatní typy drůbeže představují srovnatelné riziko onemocnění kampylobakteriózou, pro své nižší zastoupení na trhu potravin, se však míra incidence v těchto případech jeví statisticky méně významná.

Z výše uvedených údajů je patrné, že drůbež přes svoje nesporné dietetické i kulinární přednosti je a s velkou pravděpodobností i bude hlavním zdrojem *Campylobacter* sp.. Proto je zcela na místě snaha objasnit cesty šíření *Campylobacter* sp. v chovech drůbeže a nalézt možnosti eliminace výskytu u živé drůbeže.

1.3.4 Faktory ovlivňující přežívání *Campylobacter* sp. v potravinách

Pravděpodobným důvodem nízkých nálezů *Campylobacter* sp. v potravinách je vysoká citlivost *Campylobacter* sp. v prostředí a prakticky neschopnost pomnožování v potravině, což v konečném důsledku objasňuje skutečnost, proč ve spojitosti s kampylobakteriózou nedochází k explozivním epidemiím.

Campylobacter sp. může přežít především v syrovém mase, mléce popřípadě ve vodě a při nevhodné manipulaci sekundárně kontaminovat již hotové potraviny [5, 6, 36].

Mezi hlavní faktory ovlivňující schopnost přežívání bakterie patří hodnoty pH. Optimální prostředí pro růst *C. jejuni* se pohybuje mezi hodnotami pH 5,5–6,5, nicméně všechny kmeny prosperují v rozmezí pH 5,5–8,0. Je známa úzká vazba mezi růstovým potenciálem *C. jejuni*, hodnotou pH a teplotou prostředí. Bakterie *C. jejuni* totiž vykazují poměrně malé rozmezí teplot růstu (30–47 °C) [10]. Většina termotolerantních *Campylobacter* sp. není schopna růstu při teplotách nižších než 30 °C. Z toho důvodu je pomnožování při pokojových teplotách výrazně omezeno. *Campylobacter* sp. je také velmi citlivý k vysušování, proto je přežívání snadnější při chladnějších teplotách

(např. při 4 °C), než při pokojových (20–25 °C) [19]. Skladování při mrazírenských teplotách snižuje úroveň kontaminace, ale k úplné eliminaci bakteriálních buněk nedochází. Naopak běžné pasterační teploty *Campylobacter* sp. velmi rychle inaktivují. Účinná je i krátkodobá pasterace při 80 °C [11, 37].

Rovněž tzv. aktivita vody (a_w) je schopna ovlivnit nejen rozmnožování, ale i samotnou perzistenci mikrobu v potravinách. *C. jejuni* je velmi citlivý na nízkou hodnotu aktivity vody. Pro svůj růst vyžaduje minimální hodnotu a_w 0,96–0,97 [23]. Při nízkých hodnotách a_w dochází k devitalizaci v závislosti na teplotě prostředí.

Dalším významným růstovým faktorem je koncentrace soli v potravinách. *C. jejuni* je považován za citlivý mikroorganismus vůči působení NaCl. Již prostředí obsahující 2 % NaCl působí na *C. jejuni* toxicky. Optimální koncentrace NaCl pro růst *C. jejuni* je asi 0,5 %, ale je schopen růst ještě při koncentraci 1,5 % NaCl [19, 37].

Jak již bylo uvedeno, *Campylobacter* sp. patří mezi mikroaerofilní mikroorganismy. K růstu vyžaduje sníženou tenzi kyslíku (5 %) a zvýšený obsah oxidu uhličitého (10–15 %). V běžné atmosféře je *C. jejuni* poměrně rychle devitalizován v závislosti na teplotě a vlhkosti prostředí. Podle některých literárních zdrojů může modifikovaná atmosféra nebo vakuové balení potravin paradoxně mírně prodloužit přežívání *C. jejuni*, zejména při uchovávání při chladírenských teplotách [23, 38]. Přestože je toto prodloužení životaschopnosti považováno za nevýznamné, z praktického hlediska je důležité obdobné situace nepodceňovat, s poukazem na výše zmíněné nízké infekční dávky.

1.4 Problém antibiotické rezistence

Antibiotika jsou označována za nejdůležitější objevený lék v historii medicíny. Zpočátku svého objevení účinkovala zcela spolehlivě, zneškodňovala více než 99,9 % mikroorganismů, vůči kterým byla namířena. V současnosti je ztráta účinnosti antibiotik (ATB) alarmující a přístup k antibiotikům musel být přehodnocen. Celosvětově narůstá rezistence významných bakteriálních patogenů k antibiotikům a nekontrolovaně se rozšiřují multirezistentní kmeny patogenních bakterií vyvolávající obtížně léčitelné infekce, které prokazatelně souvisí s nárůstem morbidity a mortality. Vzestup antibiotické rezistence je vyvolán zvýšenou spotřebou antibiotik a zejména jejich zbytečným, nevhodným nebo neoprávněným používáním. Důsledky se pak projevují v selhávání léčby, vyšší mortalitě a značných ekonomických nákladech.

V České republice je problém antimikrobiální rezistence a jejího přenosu prostřednictvím mikroorganismů v potravinách aktuální stejně jako v ostatních státech. Zaznamenány byly rezistentní izoláty mezi indikátorovými mikroorganismy, ale závažnější je zjištění výskytu rezistentních mikroorganismů způsobujících zoonózy (mimo jiné *Campylobacter* sp.).

V souvislosti s těmito patogeny se do popředí zájmu dostává zejména otázka používání fluorochinolonů u zvířat určených k výrobě potravin a s tím související rezistence k těmto látkám. Ta je nejvýznamnější u kampylobakterů a salmonel, což jsou dvě nejčastější příčiny bakteriálních alimentárních infekcí u nás, ale i v Evropské unii [39].

Fluorochinolony lze charakterizovat jako velmi účinná antibiotika se širokým spektrem účinnosti, výhodnými farmakokinetickými a farmakodynamickými vlastnostmi. Poměrně snadný vznik rezistence je však v současnosti řadí mezi vůbec nejrizikovější skupiny antimikrobních léčiv. Získaná rezistence k chinolonům je nejčastěji způsobena mutací genů řídících replikaci a segregaci chromozomální DNA, méně často aktivním efluxem chinolonů z bakteriální buňky [40, 41]. Právě fluorochinolony spolu s makrolidy (erytromycin) jsou lékem volby u těžkých forem gastrointestinálních infekcí způsobených kampylobakterem [42].

V roce 2006 a 2007 byla v České republice prokázána téměř 50% prevalence termotolerantních kampylobakterů u jateční drůbeže, přičemž v roce 2006 byl zjištěn výskyt *C. jejuni* u 46 % vyšetřených vzorků a v následujícím roce u 43 % vzorků. Výsledky testování antibiotické rezistence izolátů *C. jejuni* ve stejném sledovaném období (tj. 2006 a 2007) ukazují na problém vysoké rezistence izolovaných kmenů k chinolonovým antibiotikům. Na kyselinu oxolinovou bylo rezistentních 77 % a na ciprofloxacin 72 % izolátů z drůbeže. Kromě toho 26 % z těchto izolátů *C. jejuni* bylo rezistentních k ampicilinu, 9 % k streptomycinu a 6 % vykazovalo rezistenci k erytromycinu. Ve všech případech (vyjma tetracyklinu) byla prokázána vyšší rezistence veterinárních izolátů *C. jejuni* oproti humánním [43].

Důvodů vzniku rezistentních kmenů *C. jejuni* je několik. Mezi neopomenutelné patří podávání medikovaných krmných směsí zejména v produkci prasat a drůbeže, u kterých je *Campylobacter* sp. přirozenou součástí střevní mikroflóry. Rutinní používání antibiotik ke stimulaci růstu a prevenci onemocnění hospodářských zvířat přispělo k vyselektování rezistentních kmenů a k šíření rezistence mezi bakteriemi [44].

Země, ve kterých bylo používání fluorochinolonů u hospodářských zvířat zakázáno (Austrálie) nebo kde jsou používána střídmo (Švédsko), vykazují velmi nízkou úroveň rezistence k fluorochinolonům. Naopak země, u kterých je používání fluorochinolonů u hospodářských zvířat běžnou praxí (Španělsko,

Čína, USA), je evidována vyšší rezistence veterinárních i humánních izolátů *Campylobacter* sp. [17, 42, 45].

Nárůst rezistence mikroorganismů k fluorochinolonům se datuje přibližně od doby zavedení používání enrofloxacinu ve veterinární medicíně. Přesto však nelze jednoznačně tvrdit, že používání fluorochinolonových přípravků u zvířat je jedinou příčinou nárůstu rezistence. Svůj podíl má i neadekvátní terapie fluorochinolony v humánní medicíně, zejména u nekomplikovaných gastroenteritid.

1.4.1 Alternativy náhrady antibiotik

Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1831/2003 z 22. září 2003 o doplňkových látkách ve výživě zvířat, oznámilo dlouho připravovanou a zásadní změnu v používání doplňkových látek u nás označovaných jako antibiotické stimulatory růstu. Tímto nařízením, které vstoupilo v platnost ve všech zemích Evropské unie od 1. ledna 2006, se tedy žádné antibiotické stimulatory růstu nesmějí používat ani k výrobě premixů nebo krmných směsí, ale ani nesmějí být zkrmovány ve směsích, které byly vyrobeny s použitím těchto látek před 1. lednem 2006 [46, 47]. Důvodem, který vedl k zákazu používání těchto látek, byla zejména možnost vzniku zkřížené rezistence u antimikrobních látek, jež jsou používány v humánní terapii.

Snahou tohoto nařízení je minimalizovat rizika používání veterinárních léčiv s antimikrobiálním účinkem u hospodářských zvířat a souborem dalších opatření zajistit účinné a bezpečné používání antibiotik v humánní i veterinární praxi při maximálním omezení rizika vzestupu antibiotické rezistence. Je však nereálné antimikrobiální látky z používání v živočišné výrobě vyloučit, protože by mohly negativně ovlivnit zdravotní stav zvířat s následnou možností kontaminace produktů živočišné výroby enteropatogenními bakteriemi a tím zvýšit riziko vzniku nemocí z potravin u lidí.

Zákaz antibiotických stimulatorů tak otevírá prostor alternativním látkám, které by mohly pomoci eliminovat případný negativní dopad tohoto nařízení. Jedná se zejména o substituci těchto antimikrobiálních látek alternativními produkty, vůči nimž nejsou hygienické námitky, tj. nezanechávají rezidua ve tkáních a nedochází k přenosu rezistence mezi mikroorganismy a jejímu šíření v prostředí. Dalšími požadavky jsou zejména: snadná aplikace, nízké náklady a silný antibakteriální účinek. K těmto látkám lze počítat i organické kyseliny.

1.5 Organické kyseliny

1.5.1 Obecná charakteristika organických kyselin

Organické kyseliny (OK) nacházejí v dnešní době široké uplatnění v rozličných oblastech zahrnujících zejména potravinářství (potravinářská aditiva, konzervanty, regulátory kyselosti), farmacii, výrobu čisticích prostředků či biodegradovatelných polymerů.

OK přicházející v úvahu patří do skupiny karboxylových kyselin zahrnující jak mastné kyseliny (MK), tak i další sloučeniny. Karboxylové kyseliny, společně se svými solemi tvoří nezbytnou součást všech živých organismů. Jsou to substráty klíčových metabolických dějů. OK vyskytující se v potravě se vyznačují poměrně rozsáhlou strukturní variabilitou.

Základní vlastností OK je snížení hodnoty pH prostředí, což se může projevit antimikrobiálními účinky vůči přítomným mikroorganismům. Antimikrobiální účinky vykazují kyseliny monokarboxylové i s více karboxyly, aromatické, hydroxykyseliny, kyseliny nasycené i nenasycené. Ve srovnání s anorganickými kyselinami se jedná o kyseliny slabé, u nichž stupeň disociace závisí na pH prostředí. Hodnota pH tudíž ovlivňuje jejich účinnost [48 - 50]. Antimikrobiální účinek OK však závisí kromě hodnoty pH podstatně také na koncentraci [51]. K dosažení uspokojivých účinků je nutné aplikovat slabé OK v podstatně vyšších dávkách, než je tomu u silných kyselin. Omezením zde však jsou organoleptické vlastnosti.

Inspiraci k využití antimikrobiálních vlastností OK dává sama příroda. Příkladem mohou být MK s 8 a 10 atomy uhlíku, tj. kyselina kaprylová a kaprinová, které jsou obsaženy ve vysoké koncentraci v tuku mléka králíků. Tyto MK významně mění mikrobiální osídlení trávicího traktu sajících králíků, kde zřejmě působí inhibičně vůči enteropatogenním bakteriím a chrání tak mláďata před onemocněním trávicího traktu [52].

Slabé OK nacházejí uplatnění v potravinářském průmyslu a při výrobě krmiv již dlouhou dobu. Mezi běžně používané účinné konzervační prostředky patří zejména tyto kyseliny: sorbová, benzoová, mléčná, octová, citronová, propionová a mravenčí [53]. Ty mohou za určitých okolností vykazovat antimikrobiální účinky vůči přítomným bakteriím, kvasinkám či plísním [54]. Další slabé OK mají význam především jako acidulanty.

Většina používaných organických kyselin patří mezi látky, které se v živých organismech normálně vytvářejí a jsou součástí metabolismu (např. kyselina

mléčná). Tyto látky jsou netoxické a zcela biologicky rozložitelné, proto je v tomto případě bezpředmětná problematika reziduí.

1.5.2 Monoacylglyceroly

Monoacylglyceroly (MAG) jsou parciální estery trojsytného alkoholu glycerolu s vyššími mastnými kyselinami. Jejich molekula má amfifilní povahu a proto se MAG velmi často používají jako neionogenní surfaktanty a emulgátory. Uplatnění nacházejí v potravinářském, kosmetickém, farmaceutickém i textilním průmyslu. MAG různých MK jsou schopny potlačit či zastavit růst širokého spektra mikroorganismů, z toho důvodu jsou v posledních letech intenzivně studovány možnosti jejich využití jako antimikrobních látek.

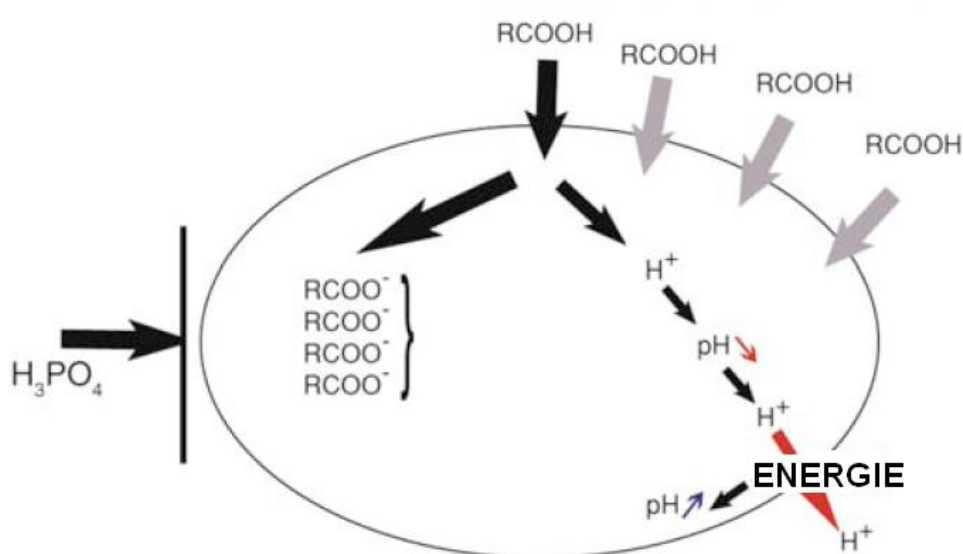
1.5.3 Mechanismus účinku organických kyselin

Ačkoliv mechanismus účinku OK nebyl doposud zcela objasněn, jsou schopny navodit bakteriostatické a baktericidní účinky v závislosti na fyziologickém stavu mikroorganismu a fyzikálně-chemických vlastnostech externího prostředí [55, 56].

Vzhledem k tomu, že obecně jsou OK slabými kyselinami, je hodnota pH považována za primární determinant jejich účinnosti, protože má vliv na vzniklé množství nedisociované formy OK. Na mnoha případech bylo demonstrováno, že právě forma OK (disociovaná, nedisociovaná) je extrémně důležitá pro definování schopnosti OK inhibovat růst bakterií. Platí obecné pravidlo, že je potřeba desetkrát až dvacetkrát více disociované kyseliny k dosažení stejného inhibičního účinku co u nedisociované formy OK [57].

Výše uvedené naznačuje klíčový mechanismus působení OK. Organické kyseliny narušují membránové funkce a energetický metabolismus mikrobiálních buněk v důsledku toho, že prochází membránou v protonované formě. Následně v důsledku styku s vyšší hodnotou pH uvnitř buňky (např. hodnota intracelulárního pH *E. coli* je 7,4 až 7,6 [58]) dochází k disociaci. Vzniklé aniony a protony, které nemohou projít plazmatickou membránou a hromadí se v buňce. Bakterie musí neutrální pH cytoplazmy udržovat na stálé hodnotě, aby nebyly ohroženy funkce makromolekul. Přebytek protonů vytlačuje protonovou pumpou za spotřeby ATP, což buňku zbavuje energie a vyčerpává. Buňkám se pak nedostává energie k plnění základních životních funkcí. Následuje řada jevů, které vedou k potlačení základních metabolických reakcí, porušení homeostázy a akumulaci velkého množství toxických anionů

v buňce [49, 55, 59, 60]. Mechanismus účinku OK na bakterie je schematicky znázorněn na Obr. 3.



Obr. 3 Schematické znázornění mechanismu účinku organických kyselin na bakterie [61]

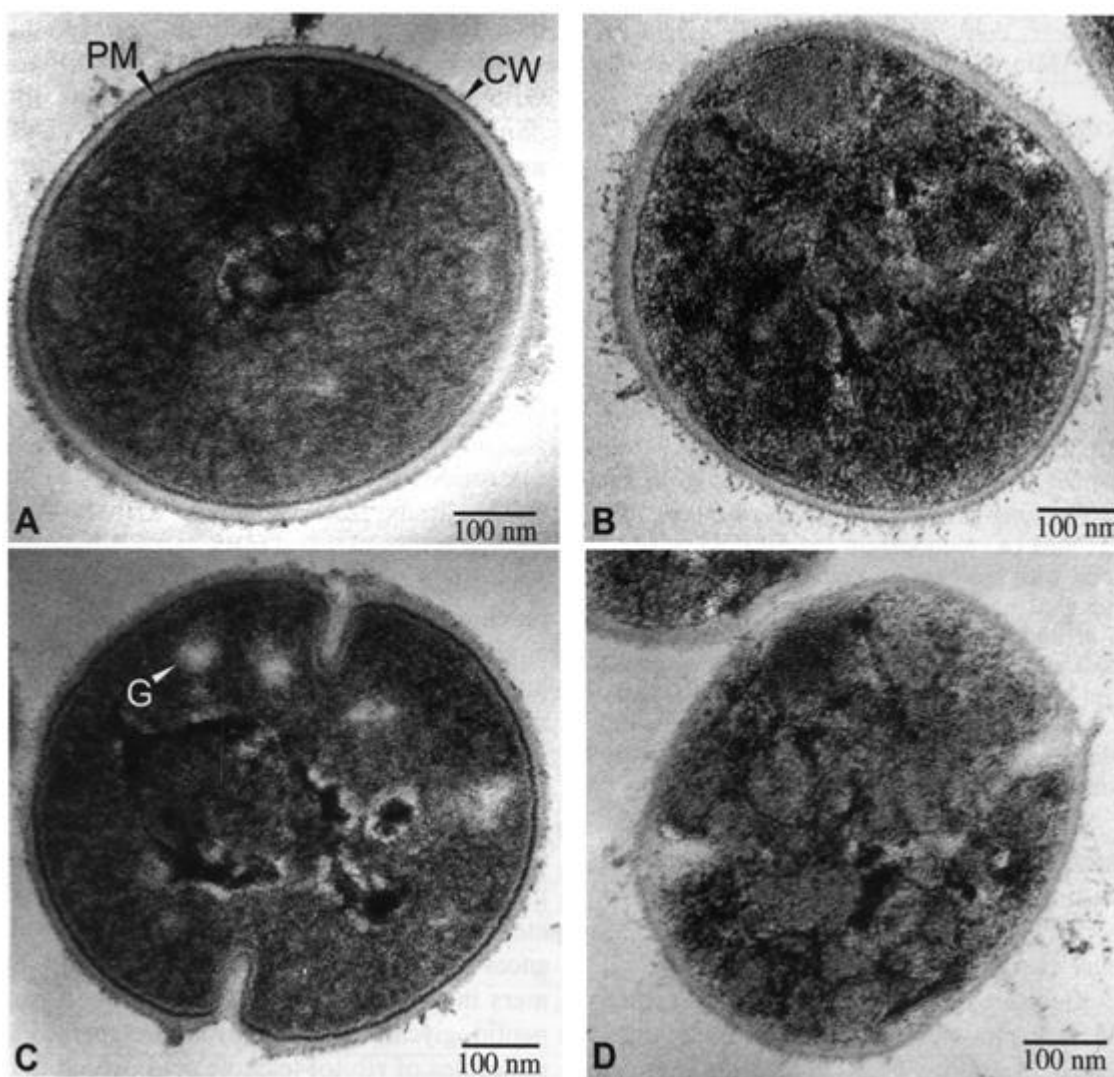
OK mají tedy optimální inhibiční efekt při nízkých hodnotách pH, které podporují nedisociovaný stav molekuly. Této skutečnosti lze využít při inhibici bakterií vnímavých vůči hodnotám pH. Mezi ně se řadí významné patogenní bakterie, zejména *E. coli*, *Salmonella* spp., *C. perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* sp. [50, 51].

Z povahy účinku vyplývá, že OK působí proti aerobním i anaerobním organismům. U aerobních bakterií se účinek OK podobá účinku látek, které rozpojují oxidaci od fosforylace.

Byly navrženy další možné mechanismy účinku, dle kterých k antimikrobiálnímu účinku dochází vlivem porušení integrity cytoplazmatické membrány. Tuto hypotézu potvrzují snímky streptokoka z elektronového mikroskopu pořízené Bergsson a kol. [62], které zřetelně dokumentují změny ultrastruktury bakteriálních buněk (Obr. 4). Spekuluje se, že OK interferují s membránovými strukturami a proteiny, čímž dochází k rozpojení elektronového transportu a následně k poklesu produkce ATP. Další možnou variantou je, že OK slouží jako rozpojovače transportu elektronů a fosforylace, což obecně vede k rozptýlení gradientu pH a elektrického potenciálu napříč buněčnou membránou [55, 63–65].

Russell [65] vyslovil hypotézu, že akumulace aniontů je primárním mechanismem účinku OK a že některé organismy jsou více rezistentní k OK, protože jsou schopny adaptace na pokles intracelulárního pH.

OK jsou přisuzovány také další, vedlejší mechanismy, které zahrnují: inhibici základních metabolických reakcí, poruchy transportních mechanismů, poškození cytoplazmatické membrány, změny permeability vnější membrány, poruchy homeostázy (intracelulární pH), ovlivnění syntézy makromolekulárních látek a inhibice některých enzymů [54, 55].



Obr. 4 Snímky transmisní elektronové mikroskopie streptokoka skupiny B [62]
A, C - kontrolní vzorky (bez ošetření) s neporušenou cytoplazmatickou membránou (PM) a cytoplazmatickými tělísky (G);
B, D - vzorky ošetřené 10 mM monokaprinem po dobu 30 minut

V souvislosti s rozvojem molekulárně biologických metod přichází nové možnosti interpretace mechanismu účinku. Van Immerseel a kol. [66] ve své práci publikoval, že během působení MK na bakterii *Salmonella enteritidis*

došlo ke snížení exprese genu *hilA*, regulátoru patogenity salmonely. Obdobně ve studii Gantois a kol. [67] kyselina máselná měla vliv na snížení exprese SPI1 regulačních genů *hilD* a *invF*.

Mechanismus účinku monoacylglycerolů je podobný účinkům MK. Kontaktním místem je také cytoplazmatická membrána [68, 69].

1.5.4 Antimikrobiální účinky organických kyselin

Přímé hodnocení a porovnávání antibakteriální účinnosti jednotlivých kyselin může být zavádějící, důvodem jsou zejména rozdílné fyzikálně-chemické vlastností látek, bakteriální druhy, růstové podmínky, atd. [55, 60]. Navíc konkrétní projev mikroorganismu *in vitro* se nemusí nutně promítnout do všech *in vivo* možností konkrétního organismu. Uvedené je nutné mít na paměti. Přesto lze shrnout současné poznatky o antimikrobiálním účinku OK do několika obecných zásad.

Kritickými faktory, které determinují účinnost každé antimikrobiální látky vůči určitému mikroorganismu, jsou doba působení a koncentrace [51]. Obecně se antimikrobiální účinek organických kyselin zvyšuje se zvyšující se koncentrací kyseliny a délkou expozice OK [49].

Na rozdíl od antibiotik je antimikrobiální aktivita organických kyselin podmíněna nízkým pH, proto mají OK vliv především na druhy netolerantní vůči nízkým hodnotám pH [70, 50].

Dalším důležitým faktorem ovlivňujícím antibakteriální aktivitu organických kyselin je disociační konstanta kyseliny (pK_a). Eklud [59] sice publikoval data, dle kterých obě formy (disociovaná i nedisociovaná) kyseliny sorbové vykazovaly antimikrobiální účinek, ale obecně přijímaným názorem je, že za více účinnou formu se považuje nedisociovaná kyselina [71–73]. Většina organických kyselin vykazujících antimikrobiální účinek má hodnotu pK_a mezi 3 až 5 [50]. Například disociační konstanta kyseliny mléčné, která se jako přirozený konzervační prostředek vyskytuje v řadě fermentovaných výrobků, je 3,83 při 25 °C. Kyselina octová má pK_a rovno 4,53 (při 25 °C) a nedisociovaná kyselina benzoová (která je asi stokrát účinnější než anion) má pK_a rovno 4,19 (při 25 °C) [74]. pK_a mastných kyselin o střední délce řetězce je v průměru 4,9 [48].

Inhibiční spektrum organických kyselin zahrnuje převážně grampozitivní bakterie. Gramnegativní bakterie jsou pokládány za odolnější vůči účinkům organických kyselin než bakterie grampozitivní, to souvisí se složitější stavbou buněčné stěny a platí pro mnoho jiných antimikrobiálních látek [70, 75].

Z dostupných pramenů nelze jednoznačně usoudit, která OK má největší antimikrobiální aktivitu. Situaci neusnadňuje skutečnost, že v řadě *in vitro* studií byla prokázána rozdílná citlivost jednotlivých patogenů k OK [62, 69, 75]. U MK byly nalezeny vztahy struktura-účinek zahrnující efekt délky uhlíkového řetězce a počet dvojných vazeb [76].

Na základě výsledků mnoha publikovaných experimentů lze vyvodit obecný závěr, že nenasycené MK (např. olejová, linolová a linoleová) jsou účinnější než nasycené [77]. Účinek MK závisí na délce řetězce a přítomnosti dvojných vazeb. Omezený účinek mají MK s krátkým řetězcem (C_2 – C_6), tzv. těkavé MK. Tyto kyseliny působí obvykle pouze při nízkém pH [78]. Antimikrobiální účinek MK s dlouhým řetězcem je rovněž malý, zřejmě z důvodu nepatrné rozpustnosti [79, 80]. Antimikrobiální účinek MK se snižuje s narůstající délkou řetězce. Optimální délka řetězce nasycených MK je kolem 12 atomů uhlíků [73, 81]. Aktivita MK s dlouhým řetězcem byla zvýšena přítomností dvojných vazeb (např. $C_{18:1}$, $C_{18:2}$), přidání třetí dvojných vazby naopak antibakteriální aktivitu snížilo (příp. neovlivnilo) [69, 82]. Přestože přetrvávají určité pochybnosti o vlivu třetí dvojných vazby na antibakteriální aktivitu, obecně platí vztah: $C_{18} < C_{18:1} < C_{18:2} > C_{18:3}$ [73]. Rozvětvené MK jsou mírně aktivnější než MK s lineárním řetězcem o stejném počtu uhlíkových atomů. U nenasycených MK antimikrobiální působení souvisí s geometrickou izomerií. Trans-izomery nenasycených MK byly zpravidla neaktivní [73].

Účinnost MK roste s jejich schopností vstupovat do mikrobiálních membrán, tj. s jejich lipofilním charakterem. Kyselina laurová, která je nejúčinnější ze skupiny nasycených MK, zřejmě vykazuje optimální rovnováhu mezi hydrofobní a hydrofilní skupinou. Branen a kol. [83] publikoval, že hydrofobní část molekuly nasycených MK ovlivňuje antibakteriální aktivitu. Zvýšením hydrofobicity vlivem prodloužení uhlíkového řetězce může negativně ovlivnit rozpustnost ve vodných systémech, a proto na povrchu bakteriální buňky mohou hydrofobní skupiny tenzidů bránit dosažení vhodné koncentrace nutné k interakci s hydrofobními proteiny nebo lipidy [84]. Cílovým místem, kde pravděpodobně dochází k vazbě vyšších MK, je cytoplazmatická membrána, ve které dochází k ireverzibilní inhibici funkce aerobního dýchacího řetězce [68, 77]. Vyšší MK inhibují transport aminokyselin do buněk [77].

Účinnost OK jakožto antimikrobiálních látek se obecně zvyšuje přidáním aniontů, které interferují s disociovanou molekulou kyseliny. Určité specifické kationty mohou také signifikantně zvýšit účinnost OK zvýšením rozpustnosti kyseliny v mikrobiální buněčné membráně [51].

Řadou vědeckých týmů byly sledovány kyseliny C_6 – C_{22} a to jak volné, tak ve formě monoglyceridů. U některých z nich byly zjištěny zajímavé antivirotické účinky (Herpes simplex virus), aktivita vůči řadě patogenních

grampozitivních i gramnegativních bakterií. Velmi významnou aktivitu v tomto směru vykázal monokaprin (1-monoglycerid kapronové kyseliny) a monolaurin (1-monoglycerid laurové kyseliny) [62, 69, 82].

Za pozornost stojí zmínka o antimikrobiální aktivitě kyselin se středně dlouhým řetězcem (MCFA), resp. o kyselině laurové. Ta vykazovala největší inhibiční efekt ze skupiny nasycených MK vůči grampozitivním bakteriím [62, 73, 75]. Obecně MK vykazovaly nízkou inhibiční aktivitu vůči gramnegativním bakteriím, vyjma kyselin o střední délce řetězce [72, 85]. Kyseliny kaprylová a kaprinová mají z hlediska antimikrobiálních vlastností zřejmé výhody proti ostatním MK. Jsou částečně rozpustné ve vodě (na rozdíl od MK s větší molekulovou hmotností) a přitom jsou dostatečně lipofilní, což usnadňuje průchod buněčnou membránou [62, 69]. Na grampozitivní bakterie měla největší vliv z monoenoových MK kyselina palmitolejová ($C_{16:1}$) a z polyenoových MK kyselina linolová ($C_{18:2}$) [72, 75]. Slabý inhibiční účinek vykazovala kyselina palmitová ($C_{16:0}$) a stearová ($C_{18:0}$), zřejmě z důvodu nepatrné rozpustnosti [75]. Kyselina olejová růst některých bakterií inhibovala, růst jiných stimulovala (při nižších koncentracích) [86].

Jak již bylo zmíněno výše, vůči MK nelze mít hygienické námitky, neboť to jsou látky přírodního charakteru. Kyselina kaprylová je například přítomna v mateřském a kravském mléce nebo v mléce kokosových ořechů. Úřadem pro kontrolu potravin a léků (FDA) v USA je všeobecně uznána za bezpečnou látku pro použití v potravinářství (tzv. GRAS 184.1025). Kromě výše uvedeného je účinek antimikrobiálních látek, které interferují s transportem iontů značně stálý [77] a vzhledem k předpokládanému mechanismu účinku MK je velmi nepravděpodobné, že by způsobovaly zkříženou rezistenci mezi mikroorganismy.

1.5.5 Organické kyseliny jako alternativa antibiotik

Doplňkové látky v krmivech (krmná aditiva) jsou fenoménem, který je v posledních letech stále více probírán a vyvolává řadu diskusí. Od roku 1967 (rok publikace zprávy Swannovy komise) bylo používání antibiotik jakožto stimulátorů růstu u hospodářských zvířat zpochybněno. Následně na konci 80. a začátku 90. let, silná regulační opatření odstranila většinu krmných antibiotik z trhu EU. Nařízení Evropského parlamentu a rady č. 1831/2003 z 22. září 2003, které vstoupilo v platnost ve všech zemích Evropské unie od 1. ledna 2006, bylo posledním v sérii opatření. Nová legislativa Evropské unie pro doplňkové látky v krmivech souvisí nejen s konečnou fází vyloučení antibiotik z výživy zvířat, ale má za úkol zaručit, aby ve výživě zvířat byla použita jen aditiva s ověřenou bezpečností a účinností.

Problém je tedy složitější než se na první pohled může zdát. Používání doplňkových látek v krmivech může mít zásadní vliv na bezpečnost krmivového a nakonec potravního řetězce. Není jednoduché nahradit produkty, které byly v posledních 50 letech považovány obecně za účinné. Ačkoliv se nabízí několik alternativ, obecná shoda o účinnosti OK se jeví jakožto alternativa nejlepší. Důvodem je jejich účinnost, technologická a ekonomická proveditelnost.

Zatím největšího uplatnění doznalo použití organických kyselin ve výživě prasat, kde jsou úspěšně používány již po více než 25 let. Tsiloyiannis a kol. [87] zkoušeli několik organických kyselin (mléčnou, propionovou, mravenčí, jablečnou, fumarovou, citronovou) v množství 1,0–1,6% krmné směsi selat. Přídavek organických kyselin snížil výskyt průjmů, enterotoxigenních kmenů *Escherichia coli* a zvýšil přírůstky hmotnosti selat. Pro kontrolu průjmů se nejvíce osvědčila kyselina mléčná. Za zmínku stojí i růstově-stimulační účinky OK, zejména kyseliny mravenčí, fumarové a citronové [88]. Obdobný účinek byl pozorován také u mravenčanu draselného [89].

Mimo přímé účinky na ukazatele užitkovosti (např. konverzi krmiva) byl zejména u časně odstavených selat sledován příznivý vliv na bilanci dusíku, vápníku a fosforu a též na stravitelnost určitých živin (dusíkatých látek a tuků) a energie [50]. Většinu z těchto vedlejších mechanismů účinků však nelze aplikovat na drůbež, protože tyto výsledky byly získány přidáváním extrémních dávek OK, což se u drůbeže neosvědčilo [61].

V menším rozsahu byly OK zkoušeny i u drůbeže, přičemž nejčastěji byla u použita kyselina fumarová. Vogt a kol. [90] zjistili, že kyselina fumarová zvýšila u kuřecích brojlerů konverzi krmiva o 3,5 - 4,0 %. Patten a Waldroup [91] stanovili, že optimální koncentrace kyseliny fumarové z hlediska rychlosti růstu je 0,5 - 1,0 %. Při vyšších koncentracích pozorovali již snížení příjmu krmiva. Výsledky dalších pokusů s kyselinou fumarovou u drůbeže publikovali Skinner a kol. [92] a Runho a kol. [93]. Humphrey a Lanning [94] publikovali, že přídavek 0,5 % kyseliny mravenčí do krmiva brojlerů snížil výskyt salmonely ze 4,1 na 1,1 %. Účinek kyseliny jablečné, sorbové a vinné (0,5 - 2,0 %) v krmné směsi brojlerů studovali Vogt a kol. [95]. Nejlepší výsledky získali s přídavkem 1,12% kyseliny sorbové a 0,33% kyseliny vinné. Přídavek směsi kyselin mravenčí a propionové do krmiva kuřat významně snížil kolonizaci volete a slepého střeva bakterií *Salmonella pullorum* a mortalitu kuřat [96]. Dle studie Padgett a kol. [97] se při výkrmu brojlerů může pozitivně uplatnit kyselina laurová, která působí jako antimikrobiální agens. MCFA mohou fungovat v krmivu pro zvířata nejen jako jeho antimikrobiální složka, ale mají také určité růstově-stimulační vlastnosti. Přestože v případě drůbeže je podstatně méně zkušeností s aplikací OK, lze v současnosti potvrdit, že i zde

jsou OK účinné za předpokladu, že jejich používání je upraveno na základě poznatků o fyziologii a anatomii trávicího traktu drůbeže.

Organická kyselina musí být volena pečlivě, pokud nemá plné antibakteriální účinky, je nutno ji brát jako alternativu. Na rozdíl od jiných látek s antimikrobiálním působením je účinek OK závislý na hodnotě pH prostředí [50]. K dosažení zmíněných účinků je nutné aplikovat OK v podstatně vyšších dávkách, zpravidla 0,5–2,0 % v krmné směsi. Proto je lze považovat spíše za krmné komponenty a nikoliv krmná aditiva v pravém slova smyslu. Pokud nelze do krmivového řetězce aplikovat terapeutické množství těchto doplňkových látek, lze využít synergického efektu s jinými látkami nebo postupy.

1.5.6 Enkapsulace organických kyselin

OK se začaly ve větší míře uplatňovat v chovech prasat, až druhotně v chovech drůbeže. Zde se ujala jiná řešení, převážně na bázi esenciálních olejů, některých oligosacharidů a polysacharidů [98–101]. Důvodem byla hlavně nedostatečná účinnost přidaných OK do krmiv drůbeže. Při průchodu krmiva trávicím traktem dochází k silné disociaci kyselin, a tím k snížení jejich účinnosti. To vše omezuje využití OK jako antimikrobiálních aditiv. S cílem dosáhnout účinku aplikovaných kyselin i v distálních oddílech GIT byl navržen proces zvaný enkapsulace [61, 102]. Enkapsulace zajišťuje stabilitu účinné látky a zachování její účinnosti v premixu nebo ve finálním krmivu. Jedná se o přístup, který poskytuje komplexnější a efektivnější ochrannou bariéru před nežádoucí bakteriální flórou. Navíc použití enkapsulace může zvýši účinnost OK při stejné koncentraci dané OK.

Zapouzdřená látka je v krmivu stabilní a pomaleji se rozpouští v trávicím traktu. Projde žaludkem a uvolní se až v momentě, kdy na ni zapůsobí lipáza, tedy až v tenkém střevě na úrovni duodena. Postupným trávením tukového matrix jsou účinné látky plynule uvolňovány. Po vstupu OK do duodena dochází k jejich resorpci a tím k postupnému snížení účinku. Takto chráněná forma OK pokrývá svým účinkem celé tenké střevo, ale pro dosažení stejného ochranného účinku jako u antibiotik je nutné ještě stabilizovat zadní partie GIT. Pro tuto část trávicího traktu je vhodné použít balastní látky (např. některé oligo- nebo polysacharidy) [103, 104].

2. CÍLE DISERTAČNÍ PRÁCE

Cílem disertační práce je studium antibakteriálního účinku vybraných organických kyselin na bakterii *Campylobacter jejuni*, která je nejčastější příčinou bakteriálních alimentárních infekcí v Evropské unii.

Dílčí cíle

V experimentech *in vitro*:

- stanovit inhibiční koncentrace (IC₅₀) sledovaných organických kyselin
- zjistit, které z testovaných kyselin mají nejvýraznější antibakteriální účinek
- sledovat vliv pH a doby inkubace na antibakteriální účinek vybraných organických kyselin
- stanovení antibakteriálního účinku organických kyselin a monoacylglycerolů s využitím molekulárně-biologických metod
- studium mechanismu účinku organických kyselin a monoacylglycerolů

V experimentech *in vivo*:

- ověřit účinek vybraných mastných kyselin v pokusech na zvířatech – experimentální infekce drůbeže
- zaměřit se zejména na vliv přídatku mastných kyselin v krmivu na mikrobiální osídlení trávicího traktu drůbeže infikované *C. jejuni*
- na základě dosažených výsledků posoudit vhodnost použití mastných kyselin jako jedné z možných alternativ náhrady antibiotik ve výživě hospodářských zvířat

Způsob zapojení do výzkumné práce školícího pracoviště

Téma disertační práce bylo řešeno v rámci výzkumných záměrů MZe 0002701403 a MZe 0002701404 ve Výzkumném ústavu živočišné výroby, v.v.i., Praha - Uhřetěves. Téma má nezpochybnitelný význam pro bezpečnost potravin a souvisí proto úzce s problémy, které se řeší na Ústavu technologie a mikrobiologie potravin FT UTB Zlín. Spolupráce obou pracovišť probíhala i v minulosti a je možné očekávat, že výsledky disertace se uplatní nejen v kvalitních publikacích, ale i v praxi.

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3.1 Přehled metod společných pro všechny části disertační práce

3.1.1 Bakteriální kmeny

V experimentech byly použity následující kmeny:

- referenční kmen (lyofilizát) *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CCM 6214^T, který byl získán z České sbírky mikroorganismů při Masarykově univerzitě v Brně (CCM). Ekvivalentem je ATCC 33560 z Americké sbírky mikroorganismů.
- klinický izolát (izolovaný z brojlerů Ross 308) *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CAMP/VFU 612/21 – rezistentní k erytromycinu (viz Tab. 3); poskytnut z Veterinární a farmaceutické univerzity Brno, Fakulty veterinární hygieny a ekologie.

Tab. 3 Citlivost¹ klinického izolátu k vybraným antibiotikům
(poskytnuto prof. Steinhauserovou, VFU Brno)

Označení kmene	Kód vzorku/ Kód chovu	Identifikace	NAL	CIP	ERY	TET	AMP	GEN	CMP
CAMP/VFU	612/21	<i>C. jejuni</i>	S	S	R	S	I	S	S

¹Citlivost k antibiotikům byla určena agarovou diluční metodou + PCR, PCR/RFLP, MAMA-PCR

²NAL = kyselina nalidixová; CIP = ciprofloxacín; ERY = erythromycin; TET = tetracyklin; AMP = ampicilin; GEN = gentamicin; CMP = chloramphenicol

³R = rezistentní kmen; S = senzitivní kmen, I = intermediárně rezistentní kmen

Způsob uskladnění kultur

Kultury byly uchovávány ve tmě při stálé teplotě -70 °C. Do selektivního média byl přidán dimethylsulfoxid (5 %) jako kryoprotektivní činidlo.

3.1.2 Kultivace bakterií rodu *Campylobacter*

Pokud není uvedeno jinak, byla kultivace bakterií rodu *Campylobacter* prováděna dle ČSN EN ISO 10272 (Mikrobiologie potravin a krmiv -

Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Campylobacter* spp.). Použité půdy a reagentie (zakoupené od firmy Oxoid, Velká Británie) jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Seznam půd použitých k selektivní izolaci bakterií rodu *Campylobacter*

Typ půdy	Název výrobku	Označení výrobku (Oxoid)
Tekutá půda bujón podle Prestona	Nutrient Broth No. 2	CM0067
	Campylobacter Growth Supplement	SR0232E
	Preston Campylobacter Selective Supplement	SR0117E
	Laked Horse Blood	SR0048C
Pevná půda modifikovaný agar podle Karmaliho	Campylobacter Agar Base	CM689
	Campylobacter Growth Supplement	SR0232E
	Preston Campylobacter Selective Supplement	SR0117E
	Laked Horse Blood	SR0048C

Tyto půdy určené k selektivní izolaci bakterií rodu *Campylobacter* jsou založeny na principu, kdy toxické prvky, fotochemicky generované v půdě nebo produkované metabolismem bakterií, jsou neutralizovány přidáním lyzované krve. Železité soli, metabisulfit sodný a pyruvát sodný zlepšují aerotoleranci *Campylobacter* sp. Selektivitu je dosaženo přidáním cefoperazonu (omezuje růst gramnegativních druhů, enterobakterií a *Pseudomonas*), vancomycinu (působícím na grampozitivní bakterie) a cykloheximidu (inhibujícího kvasinky) [105, 106].

Protože *Campylobacter* patří mezi mikroaerofilní mikroorganismy, je nutné upravit kultivační prostředí. Pro úpravu atmosféry byl použit generátor plynu CampyGen CN0035 nebo CN0025 (Oxoid, Velká Británie). Tyto vyvíječe jsou určeny přímo pro kultivaci *Campylobacter* sp. a výrobce zaručuje standardní složení atmosféry. Pro úpravu atmosféry v tekutých médiích byla použita předem namíchaná směs plynů - 10 % CO₂, 5 % O₂ a 85 % N₂ (Linde Gas a.s., Česká republika). Pokud není uvedeno jinak, byly oba kmeny inkubovány dle doporučení CCM při 37 °C po dobu 48 hodin.

3.1.3 Testované organické kyseliny

V rámci disertační práce byly testovány organické kyseliny a 1-monoacylglyceroly, uvedené v Tab. 5 až 8. Všechny uvedené chemikálie byly zakoupeny u firmy Sigma-Aldrich spol. s r. o..

Tab. 5 Seznam testovaných nasycených karboxylových kyselin

Triviální název	Systematický název	Funkční vzorec
kyselina octová	ethanová kyselina	CH_3COOH
kyselina propionová	propanová kyselina	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$
kyselina máselná	butanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$
kyselina kapronová	hexanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$
kyselina kaprylová	oktanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$
kyselina kaprinová	dekanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$
kyselina laurová	dodekanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$
kyselina myristová	tetradekanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$
kyselina palmitová	hexadekanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$
kyselina stearová	oktadekanová kyselina	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$
kyselina jantarová	butandiová kyselina	$\text{COOH}(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$

Tab. 6 Seznam testovaných nenasycených karboxylových kyselin

Triviální název	Systematický název	Funkční vzorec
kyselina olejová	cis-9-oktadecenová	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$
kyselina fumarová	trans-butendiová	$\text{COOH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{COOH}$
kyselina sorbová	hexadienová kyselina	$\text{CH}_3\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CHCOOH}$
kyselina benzoová	benzenkarboxylová	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$
kyselina fenylactová	a-toluylová kys	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_2\text{COOH}$

Tab. 7 Seznam testovaných hydroxykarboxylových kyselin

Triviální název	Systematický název	Sumární vzorec
kyselina jablečná	hydroxybutandiová	$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$
kyselina citronová	2-hydroxypropan-1,2,3-trikarboxylová	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$
kyselina mléčná	kyselina 2-hydroxypropanová	$\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3$

Tab. 8 Seznam testovaných 1-monoacylglycerolů

Triviální název	Systematický název	Sumární vzorec
C _{8:0} (monokaprylin)	1-monoacylglycerol kys. kaprylové	C ₁₁ H ₂₂ O ₄
C _{10:0} (monokaprin)	1-monoacylglycerol kys. kaprinové	C ₁₃ H ₂₆ O ₄

3.2 Pokusy *in vitro*

3.2.1 Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin

Inhibiční koncentrace testovaných organických kyselin byla stanovena měřením celkového bakteriálního proteinu pomocí unifikované metody biuretové reakce [107]. Fotometrické stanovení koncentrace proteinů biuretovou metodou je založeno na principu, že proteiny a peptidy poskytují v alkalickém prostředí s měďnatými ionty červenofialově zbarvené komplexy (absorpční maximum 540 nm). Extinkce barevného komplexu je úměrná koncentraci proteinu.

Pro účely tohoto experimentu bylo vyvinuto selektivní pomnožovací médium bez přídavku krve, jehož hlavní složku tvoří kyselina L-glutamová. Složení média je uvedeno v Tab. 9.

Tab. 9 Složení pomnožovacího média s kyselinou L-glutamovou (500ml)

kyselina L-glutamová - 5 g (DORAPIS s, r.o., Česká republika)
kvasničný autolyzát - 5 g (Oxoid Ltd., Velká Británie)
NaCl - 2,5 g
minerály - 0,5 ml
Preston Campylobacter Selective Supplement - 2 ml (Oxoid Ltd., Velká Británie)
Campylobacter Growth Supplement (liquid) -2 ml (Oxoid Ltd., Velká Británie)
H ₂ O - 500 ml

Bakterie *C. jejuni* subsp. *jejuni* CCM 6214^T byly inkubovány v penicilinových lahvičkách ve výše uvedeném pomnožovacím médiu (viz Tab. 4) v přítomnosti všech organických kyselin uvedených v kapitole 3.1 (Tab. 5–7), vyjma kyseliny stearové a olejové. Testované koncentrace kyselin se pohybovaly v rozmezí 0,1 až 10 mg/ml (konkrétně 0,1; 0,2; 0,3; 0,5; 1; 2;

3; 5; 7 a 10 mg/ml). Média obsahující příslušnou koncentraci dané organické kyseliny byla před inokulací bakterií nasycena směsí plynů zajišťující mikroaerobní prostředí - 10 % CO₂, 5 % O₂ a 85 % N₂ (Linde Gas a.s., Česká republika), uzavřena a autoklávována při 110 °C po dobu 45 minut. Po vychladnutí byla média naočkována bakterií *C. jejuni* subsp. *jejuni* CCM 6214^T a inkubována při 37 °C po dobu 48 hodin.

Každé pokusné či kontrolní uspořádání bylo paralelně inkubováno třikrát. Po 48 hodinové inkubaci bylo změřeno množství proteinu v médiu pomocí modifikované biuretové reakce [107]. Absorbance vzorků byla měřena proti slepému pokusu. Z regresní rovnice získané z kalibrační křivky byla vypočítána koncentrace proteinů ve vzorcích. Vlastní inhibiční účinek jednotlivých organických kyselin byl vyjádřen hodnotou střední účinné inhibiční koncentrace (IC₅₀), která představuje koncentraci zkoušené látky, při níž dojde k poklesu bakteriálního proteinu na polovinu, vztaženo ke kontrolnímu vzorku (neošetřen).

3.2.2 Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin

Na základě výsledků z předchozího experimentu (viz kapitola 3.2.1) byly vybrány organické kyseliny vykazující inhibiční účinek (IC₅₀ ≤ 10 mg/ml). U těchto kyselin byl sledován vliv hodnoty pH a doby inkubace na jejich inhibiční účinek vůči bakterii *C. jejuni* subsp. *jejuni* CCM 6214^T.

Narostlá kultura bakterií *C. jejuni* (48 hod při 37 °C) byla vystavena po určitou dobu (5, 10, 20 a 30 min) působení příslušné organické kyseliny (konkrétně kyseliny kapronové, kaprylové, kaprinové, sorbové, benzoové, fenylctové a fumarové). Výsledná koncentrace testovaných kyselin byla 1 mg/ml a 5 mg/ml (s výjimkou kyseliny kaprinové, kde byla vzhledem k jejímu účinku testována také koncentrace 0,5 mg/ml). Kyseliny byly do narostlé kultury přidány v roztoku s dimethylsulfoxidem. Kontrolní vzorky obsahovaly ekvivalentní množství dimethylsulfoxidu.

Současně byl sledován vliv rozdílné hodnoty pH na inhibiční účinek organických kyselin. Celkem byly sledovány tři hodnoty pH (2,4; 4,5 a 6,5), které korespondují s hodnotou pH v jednotlivých částech GIT drůbeže (žaludek, vole a slepé střevo). Hodnota pH média byla upravena pomocí 5 M roztoků NaOH a H₃PO₄.

Po výše uvedené expozici byla bakteriální kultura vyseta na modifikovaný agar podle Karmaliho (viz Tab. 4). Každé pokusné či kontrolní uspořádání bylo paralelně inkubováno třikrát. Petriho misky byly umístěny do anaerostatů a inkubovány za mikroaerofilních podmínek při 37 °C po dobu 48 hodin. Poté

byly odečteny výsledné hodnoty, které byly statisticky vyhodnoceny. Významnost rozdílu ($P < 0,05$) mezi kontrolou a ošetřeným vzorkem byla statisticky vyhodnocena analýzou variance ANOVA, minimální difference Tukey testem s využitím programu SAS 9.1.

3.2.3 Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou

Antibakteriální účinek OK byl sledován rovněž molekulárně-biologickou metodou. Vzhledem k faktu, že *C. jejuni* kolonizuje zejména zadní část GIT drůbeže [18], byly experimenty zaměřeny na sledování inhibičního účinku OK v slabě kyselém prostředí a prostředí blízkém neutrálnímu pH (tj., pH 5,5 a 6,5). Inhibiční účinek OK byl testován na sbírkovém kmeni *C. jejuni* CCM 6214^T a na klinickém izolátu *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21. Byly testovány všechny OK a monoacylglyceroly uvedené v Tab. 5–8.

Izolace DNA

Před samotnou izolací DNA byl asepticky převeden 1 ml narostlé kultury do sterilních mikrocentrifugačních zkumavek a centrifugován při 5000 g po dobu 5 minut. Supernatan byl slit a peleta resuspendována v 0,5 ml TE pufru (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) a opět odstředěna při 5000 g po dobu 5 minut. Tato procedura byla zopakována třikrát. Promytá bakteriální peleta byla použita k izolaci DNA.

K izolaci genomové DNA u kmenů *C. jejuni* byl použit komerční kit DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (QIAGEN Ltd., Velká Británie). Způsob izolace byl proveden dle příslušného protokolu výrobce izolační soupravy. Izolovaná DNA byla následně použita k analýze metodou real-time PCR.

Primery

K namnožení cílové DNA byly použity specifické primery, převzaté z publikace Nogva a kol. [108]. Použitá sada primerů umožňuje amplifikaci fragmentu o délce 86 bp, který zahrnuje oblast 381121 až 381206 publikované genové sekvence *C. jejuni* NCTC 11168 (viz Obr. 5). Sekvence jednotlivých primerů a denaturační teplota je uvedena v Tab. 10. Oligonukleotidové primery byly nasyntetizovány firmou Generi Biotech s.r.o., Česká republika.

```

aagacaatat tattgatcgc agaagctttt ttaaactagg gcttctaggt ggttctgtag 381000
tagcagctag cactataggt ggcggtgctg ttttaaaggc agcagaactt acgcattcgc 381060
atcaagcttc acaaggaaaa tcaaataaaa ttagaggttag aatgtttttt caaactcaaa 381120
ctgaatTTGA taccttaagt gcagTctgtg aaagaattta tctaagat gagcaaggag 381180
aaggTgctat aggttttaggc gtgcctTatt ttatcgataa tcagctagct agtgcttatg 381240
gttataatga tagagaatat atgcaagggc ctttcattgga gggcaaagcc gaacaaggct 381300
atcaaaactcc tatgcaacgc aaagatattt ttttagaagg cgtgcatgct cttgaagaaa 381360
atgctcaaaa gcgttataaa aaatcttttt ctttgcttaa aggtggagat caggataaaa 381420
ttttaagcga ttttgaaaaa ggaaaaatcc aaactacagg ttttaaatct tcttattttt 381480

```

Obr. 5 Umístění specifického primeru v genomu *C. jejuni* NCTC 11168

Tab. 10 Specifické primery určené pro detekci *C. jejuni* [108]

Primer	Směr	Sekvence (5' → 3')	Denaturační teplota (°C)
CAMPFOR	Přímý	CTG AAT TTG ATA CCT TAA GTG CAG C	61,12
CAMPREV	Zpětný	AGG CAC GCC TAA ACC TAT AGC T	57,01

Real-time PCR

Real-time PCR je varianta PCR, která umožňuje přímou kvantifikaci PCR produktu v průběhu reakce.

Všechny reakce proběhly v termocykleru iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA). V reakci byl použit reakční mix iQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad Laboratories, USA), který je optimalizován pro real-time PCR. Složení supermixu je uvedeno v Tab. 11.

Tab. 11 Komponenty supermixu

Reagencie	Koncentrace	Komponenty
iQ TM SYBR [®] Green Supermix	100 mM	KCl
	40 mM	Tris-HCl (pH 8,4)
	0,4 mM	od každého dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
	50 U/ml	iTag DNA polymerasa
	6 mM	MgCl ₂
	20 nM	SYBR Green I
		Fluorescein stabilizátory

Konečný objem reakční směsi byl 25 μ l a obsahoval: 12,5 μ l iQTM SYBR[®] Green Supermix, 0,3 μ l od každého primeru (0,2 μ M), 0,5 μ l templátové DNA. Reakční mix byl doplněn na požadovaný objem DNAsa prostou vodou. Do každé PCR reakce byla zahrnuta negativní a pozitivní kontrola. Reakční mix i vzorky byly připravovány na ledu.

Teplotní profil pro real-time PCR byl převzat z publikace Nam a kol. [109] s několika modifikacemi: predenaturace při 95 °C/3 min, následovalo 40 cyklů (denaturace 95 °C/15 s, annealing 60 °C/15 s, elongace 72 °C/30 s), reakci zakončila finální extenze při 72 °C/5 min. Všechny vzorky byly měřeny minimálně v triplicátech. Pro potvrzení specifity produktu a vyloučení vzniku dimeru primerů byla provedena teplotní denaturace a vytvořena křivka tání.

Pro každý vzorek byly získány hodnoty Ct, které byly hlavním výstupem pro další zpracování výsledků. Výsledky byly vyhodnoceny metodou Δ Ct pro relativní kvantifikaci [110]. Před použitím Δ Ct metody byl proveden validační experiment, který prokázal, že amplifikace u testovaných vzorků probíhá přibližně se stejnou efektivitou.

Gelová elektroforéza

Kontrola přítomnosti a velikosti DNA fragmentů byla prováděna elektroforézou na 2,5% agarozovém gelu. Gel byl připraven rozpuštěním agarózy GTQ (Carl Roth GmbH, Německo) v 1x TAE pufru (50x TAE pufr: 242 g TRIS, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5 M EDTA, 1000 ml H₂O, pH 8,0) a obarven pomocí SYBR[®] safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA). Po ztuhnutí bylo na gel nanášeno 8 μ l PCR produktu spolu s 2 μ l 10x BlueJuiceTM Gel Loading Buffer (Invitrogen, USA). Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu přibližně 120 minut. Gel byl vizualizován na UV transiluminátoru (EC3TM Imaging System, UVP Inc., USA). K odhadu velikosti fragmentů byl použit velikostní marker TrackItTM 50 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA).

3.2.4 Studium mechanismu účinku organických kyselin

Transmisní elektronová mikroskopie

Vliv kyseliny fumarové a kaprinové na morfologii buněčných membrán *C. jejuni*, byl sledován pomocí transmisní elektronové mikroskopie. Narostlá kultura *C. jejuni* CCM 6214^T (inkubace za mikroaerobních podmínek po dobu 48 hod při 37 °C) byla vystavena působení kyseliny fumarové a kaprinové (c = 1 mg/ml). Obě kyseliny byly přidány ve formě roztoku s dimethylsulfoxidem. Kontrolní vzorky obsahovaly ekvivalentní množství

dimethylsulfoxidu. Po 30 minutové expozici za neustálého protřepávání ve vodní lázni (při 37 °C) byly odebrány 2 ml kultury a centrifugovány 10 minut při 1500 g. Supernatant byl slit a peleta byla 1 hodinu fixována v 0,45 ml 5% roztoku glutaraldehydu (v 0,2 M Na-kakodylátovém pufru), 0,45 ml 0,2 M Na-kakodylátového pufru (pH 7,4) a 0,45 ml roztoku rutheniové červeně (1,5 mg/ml v 0,2 M Na-kakodylátového pufru). Po fixaci byl vzorek odstředěn při 1500 g po dobu 3 min a třikrát promyt v 0,1 M Na-kakodylátovém pufru (pH 7,4). Dále bylo přidáno 0,4 ml 4% roztoku OsO₄ (v 0,2 M Na-kakodylátovém pufru) a 0,4 ml roztoku rutheniové červeně (1,5 mg/ml 0,2 M Na-kakodylátového pufru). Vzorek byl fixován 4 hodiny. Následně byl vzorek odstředěn 3 min při 1500 g a třikrát promyt v 0,1 M Na-kakodylátovém pufru (pH 7,4). Poté byly pelety zalaty 0,5 ml 1% agaru (v 0,1 M Na-kakodylátovém pufru) o teplotě 37 °C. Z takto upraveného vzorku byly po ztuhnutí agaru krájeny kostky o velikosti *ca* 2 mm³. Vzorek byl dehydratován stoupající řadou etanolu (o koncentraci 30, 50, 70, 96 a 100%). Následovalo prosycování objektu propylenoxidem a zalévání do pryskyřice (PolyBed 812, Polysciences, Warrington, USA). Poté byla provedena polymerizace bločku v termostatu a na ultramikrotomu byly krájeny tenké řezy pro elektronovou mikroskopii. Vzorky byly prohlíženy na elektronovém mikroskopu JEOL 1200 EX. Celý postup byl proveden za pomoci RNDr. J. Kaňky a p. V. Pecha z Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd v Liběchově. Pro zhotovení podrobnějších snímků byl použit elektronový mikroskop Philips CM 100 (Royal Philips Electronics, Holandsko) s přídatnou digitální kamerou Mega View II (Sis, GmbH, Německo) při 80 kV. Snímky zhotovil RNDr. O. Benada, CSc. z Mikrobiologického ústavu Akademie věd v Praze.

Sledování změn koncentrace K⁺ iontů

Pro posouzení vlivu vybraných antimikrobiálních látek (kyseliny fumarové, kaprinové a monokaprinu) na permeabilitu buněčných membrán byly použity iontově selektivní elektrody (ISE). Technické údaje pro použité iontově selektivní elektrody jsou uvedeny v Tab. 12. Změny v aktivitě iontů byly testovány na sbírkovém kmenu *C. jejuni* subsp. *jejuni* CCM 6214^T.

Tab. 12 Technické údaje pro použité iontově selektivní elektrody

ISE	Referentní elektroda	Měřené koncentrace	Směrnice
K⁺, typ 20-192 (2 THETA)	Argentchloridová typ 10-251	10 ⁻⁶ – 10 ⁻¹ mol/l	55 +/- 3 mV/pK
TPP⁺, typ Kwik-TipTM (WPI, Inc.)	Argentchloridová, typ Dri-Ref TM -5	0.001 – 10 ⁻⁴ mol/l	54 mV

Pro posouzení vlivu vybraných antimikrobiálních látek na permeabilitu cytoplazmatické membrány byla sledována změna koncentrace K⁺ iontů pomocí draslíkové iontově selektivní elektrody 20-192 a referentní argentchloridové elektrody 10-251 (2 THETA ASE, s. r. o., Česká republika). Měření byla provedena na pH/mV metru PHI 04 (Labio a. s., Česká republika). Pro přípravu bakteriální suspenze a následné měření byl použit postup popsáný ve studii Ohmizo a kol. [111] s několika modifikacemi. Bakteriální kultura (v exponenciální fázi růstu) byla asepticky přenesena do sterilních centrifugačních zkumavek a centrifugována při 3000 g/20 min/4 °C. Peleta byla třikrát promyta v pufru obsahujícím 0,1 M cholin chlorid a 0,05 M MOPS-Tris (pH 7,2). Promyté buňky byly opět resuspendovány v pufru, přičemž výsledná koncentrace bakteriálního proteinu byla 4 mg/ml. Bakteriální suspenze byla rozředěná roztokem obsahujícím 0,1 M cholin chlorid, 0,01 M Tris-laktát a 0,05 M MOPS-Tris (pH 7,2). Výsledný objem byl 50 ml a finální koncentrace proteinu byla 0,2 mg/ml. Za neustálého míchání bakteriální suspenze byla přidána testovaná látka (c = 1 mg/ml) ve formě roztoku s dimethylsulfoxidem. Inkubace pokračovala několik následujících minut, poté byl přidán cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) o koncentraci 0,25 mg/ml. CTAB byl použit jakožto pozitivní kontrola (navozuje 100% vyplavení K⁺ iontů z buněk) [112]. Před každým měřením byla elektroda kalibrována řadou standardů (10⁻⁵–10⁻¹ M KCl v 100 mM NaCl). Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě.

Sledování redistribuce TPP⁺ iontů

Souběžně se sledováním změn koncentrace K⁺ iontů byla provedena série pokusů zaměřených na potenciometrické měření propustnosti vnější membrány.

Pro měření redistribuce TPP⁺ iontů byla použita tetrafenylfosfonium (TPP⁺) iontově selektivní elektroda Kwik-TipTM a referentní argentchloridová elektroda Dri-RefTM (World Precision Instruments, Inc., USA). Měření byla provedena na pH/mV metru PHI 04 (Labio a. s., Česká republika). Kalibrace TPP⁺ iontově selektivní elektrody byla provedena řadou kalibračních roztoků v koncentračním

rozmezí od 10^{-6} do 10^{-2} M TPP. Pro zvýšení vodivosti roztoku byl do kalibračních standardů přidán 100 mM NaCl.

Postup při přípravě bakteriální suspenze byl obdobný jako u měření změn koncentrace K^+ iontů. Rozdíl byl pouze v reagentiích posledního pufru, který navíc obsahoval 10 μ M TPP⁺ (důvodem je nastavení počáteční koncentrace TPP⁺ iontů) [111]. Shodně jako u sledování změn K^+ iontů, byly za neustálého míchání k bakteriální suspenzi jednotlivě přidány testované látky (kyselina fumarová, kaprinová a monokaprin) ve formě roztoku dimethylsulfoxidu, výsledná koncentrace byla 1 mg/ml. Následovala několikaminutová inkubace. Poté byl přidán cetyltrimethylamonium bromid (CTAB) o koncentraci 0,25 mg/ml, jehož přídavek způsobil další změny v propustnosti vnější membrány. Všechna měření byla provedena při pokojové teplotě.

3.3 POKUS *in vivo*

3.3.1 Experimentální infekce drůbeže

Experiment byl zaměřen na studium možností snížení výskytu *Campylobacter* spp. u brojlerových kuřat pomocí suplementace krmných směsí mastnými kyselinami, konkrétně kyselinou kaprylovou (C_8) a kaprinovou (C_{10}). Tyto mastné kyseliny o střední délce řetězce v předchozích *in vitro* experimentech prokázaly nejvýraznější antibakteriální aktivitu vůči sledované patogenní bakterii.

Experiment byl uskutečněn ve spolupráci s belgickou firmou Nutrition Sciences N. V. a Ghent University (Department of Veterinary Public Health and Food Safety).

Pokusná kuřata

Do pokusu bylo zařazeno celkem 48 kuřat hybridní kombinace ROSS 308. Zvířata byla získána nákupem z firmy XAVERgen, a.s. Kuřata byla do pokusu zařazena jako jednodenní. Po převzetí byla zvážena a ihned umístěna do odchovné haly. Další individuální vážení se prováděla vždy jednou týdně. Kromě živé hmotnosti kuřat, byly v průběhu pokusu sledovány další základní parametry užitkovosti (tj. spotřeba krmiva, zdravotní stav, úhyn).

Krmné směsi

Koncept výživy (založený na dvoufázové výživě) pro brojlery masného typu ROSS 308 byl postavený tak, aby zajišťoval odpovídající přísun energie a všech

ostatních nepostradatelných živin po celou dobu výkrmu (krmivo neobsahovalo kokcidostatika). Složení krmných směsí jednotlivých diet bylo koncipováno s ohledem na zachování shodné skladby nutričních hodnot. Detailní složení krmných směsí je uvedeno v Tab. 13 a 14. Složení krmných směsí bylo optimalizováno firmou Nutrition Sciences N. V. (Belgie). Finální krmné směsi dodala firma Vitamex N. V. (Belgie).

Tab. 13 Složení startérové směsi (g/kg)

Ingredience	Dieta A – pozitivní a negativní kontrola	Dieta B - pokusná skupina I.	Dieta C - pokusná skupina II.
Extrudovaná kukuřice	26,95	26,70	25,63
Sója	14,70	14,70	14,70
Sojový extrahovaný šrot	23,99	23,99	23,99
Sojový olej	2,51	2,26	1,59
Methionin	0,17	0,17	0,17
Lysin	0,30	0,30	0,30
Threonin	0,14	0,14	0,14
Hydrogenuhličitan sodný	0,07	0,07	0,07
Dihydrogenfosforečnan	0,05	0,05	0,05
Vápenatý monohydrát			
Vápenec	0,08	0,08	0,08
Pšenice (mletá)	28,00	28,00	28,00
Enzym fytáza	0,05	0,05	0,05
Minerální premix	3,00	3,00	3,00
Směs C ₈ /C ₁₀ (volná forma)*	-	0,50	-
Směs C ₈ /C ₁₀ (enkapsulovaná forma)**	-	-	2,23

* Obsahuje C₈ 25 %, C₁₀ 25 % a oxid křemičitý 50 %

** Obsahuje C₈ 5,5 %, C₁₀ 5,5 %, olejnatý potah 30 % a rostlinný nosič 59 %

Do věku 10 dnů byla kuřata krmena startérem, poté se pozvolna přecházelo na dokrmovou směs. Obě kontrolní skupiny byly krmeny standardní krmnou směsí. Krmná směs u pokusných skupin byla obohacena přídatkem mastných kyselin ve formě volné (pokusná skupina I.) nebo enkapsulované (pokusná skupina II.). Rozdělení brojlerů do pokusných skupin včetně uvedení příslušné krmné směsi je schematicky znázorněno na Obr. 6.

Pokusná skupina I. ▶ volná forma MK (0,25 % C ₈ a C ₁₀)	Pokusná skupina II. ▶ enkapsulovaná MK (0,25 % C ₈ a C ₁₀)	Pozitivní kontrola ▶ standardní KS	Negativní kontrola ▶ standardní KS
---	--	--	--

*MK = mastná kyselina; KS = krmná směs

Obr. 6 Rozdělení pokusných skupin

Tab. 14 Složení dokrmové směsi (g/kg)

Ingredience	Dieta A – pozitivní a negativní kontrola	Dieta B - pokusná skupina I.	Dieta C - pokusná skupina II.
Pšenice	23,65	23,40	22,33
Extrudovaná kukuřice	20,00	20,00	20,00
Sója	20,00	20,00	20,00
Sojový extrahovaný šrot	14,31	14,31	14,31
Sojový olej	3,29	3,04	2,38
Methionin	0,17	0,17	0,17
Lysin	0,32	0,32	0,32
Threonin	0,14	0,14	0,14
Chlorid sodný	0,03	0,03	0,03
Hydrogenuhličitan sodný	0,04	0,04	0,04
Pšenice (mletá)	15,00	15,00	15,00
Enzym fytáza	0,05	0,05	0,05
Minerální premix	3,00	3,00	3,00
Směs C ₈ /C ₁₀ (volná forma)*	-	0,50	-
Směs C ₈ /C ₁₀ (enkapsulovaná forma)**	-	-	2,23

* Obsahuje C₈ 25 %, C₁₀ 25 % a oxid křemičitý 50 %

** Obsahuje C₈ 5,5 %, C₁₀ 5,5 %, olejnatý potah 30 % a rostlinný nosič 59 %

Charakteristika pokusu

Pokus probíhal v pokusné akreditované stáji pro kuřata v areálu Výzkumného ústavu živočišné výroby (VÚŽV) v.v.i., Praha – Uhřetěves. Výzkumný experiment vycházel z Projektu pokusu č. 3/2008 (MZe 90081) podle § 11 vyhlášky č. 207/2004 Sb., o ochraně, chovu a využití pokusných zvířat a byl schválen odbornou komisí VÚŽV, v.v.i. a příslušným státním orgánem. Schválení projektu pokusu bylo oznámeno příslušnému orgánu veterinární správy.

Pokus probíhal po celou dobu výkrmu, tj. od 1.–42. dne věku kuřat, struktura pokusu je schematicky znázorněna na Obr. 7. Zvířata byla rozdělena do čtyř skupin po dvanácti, dle schématu: pokusná skupina I., pokusná skupina II., pozitivní kontrola, negativní kontrola. V průběhu prvních dvanácti dnů byla kuřata ustájena po skupinách na podestýlce v klimatizované hale. Od dvanáctého dne věku byla přemístěna do individuálních bilančních klecí. Negativní kontrola byla oddělena plastovou přepážkou.

Dva dny před první infekcí byly vzorky trusu všech kuřat zaslány na mikrobiologickou analýzu do akreditované laboratoře (SVU Lysolaje), za účelem potvrzení nepřítomnosti *Campylobacter* sp.

Čtrnáctý a dvacátý osmý den výkrmu bylo krmivo pozitivní kontroly a obou pokusných skupin kontaminováno kulturou *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* CAMP/VFU 612/21 (0,5 ml, 10^6 CFU/ml). Kontaminace krmiva měla simulovat přirozený průběh infekce kampylobakterem, která obvykle nastává po 14. dni života kuřete. Následující dny byla zvířata krmena příslušnou krmnou směsí (bez bakteriální kultury). Krmná směs byla zkrmována *ad libitum*.

Zvířata byla ustájena individuálně až do ukončení pokusu. V průběhu experimentu byly dvakrát až třikrát týdně odebírány vzorky trusu pro mikrobiologické analýzy. Po ukončení pokusu (utracení přístrojem Anieut G.d.: zařízení na bázi CO₂) byla vybrána kuřata s průměrnou živou hmotností. Těmto kuřatům byly odebrány vzorky obsahu žaludku, tenkého střeva (duodenum, ileum) a slepého střeva za účelem provedení mikrobiologických analýz (sledovány byly počty bakterií z rodu *Campylobacter*, *Lactobacillus* a koliformní bakterie) a dalších nezbytných rozborů (např. genotypová charakterizace kmenů).

Po ukončení pokusu byl veškerý odpad od infikovaných zvířat odborně zlikvidován standardním způsobem (Asavet a.s., Česká republika).

naředěny fyziologickým roztokem a vysety na příslušný selektivní agar. Pro stanovení počtu koliformních bakterií a bakterií rodu *Lactobacillus* byly použity selektivní půdy MacConkey agar a Rogosa agar (Oxoid, Velká Británie). Naočkované půdy byly inkubovány aerobně po dobu 24 hodin při 37 °C (koliformní bakterie), laktobacily byly inkubovány anaerobně po dobu 72 hodin. Vzorky tráveniny naočkované na selektivní agar pro záchyt kampylobakterů (modifikovaný agar podle Karmaliho) byly kultivovány v anaerostatech, za použití komerčně vyráběných generátorů plynů (CampyGen, Oxoid, Velká Británie). Doba inkubace 48 hodin při teplotě 42 °C.

Po uplynutí kultivační doby byly typické kolonie spočítány a počty byly vyjádřeny jako dekadické logaritmy celkového počtu jednotek tvořících kolonie na 1g příslušné tráveniny. Vybrané bakteriální kolonie vyrostlé na selektivním agaru pro kampylobaktery byly izolovány v čisté kultuře a podrobeny genotypové charakterizaci kmenů.

Real-time PCR

Metoda real-time PCR byla použita pro kvantifikaci počtů bakterií rodu *Campylobacter* a to jednak v průběhu experimentu (dvakrát až třikrát týdně byly analyzovány vzorky trusu), ale také po ukončení experimentu, kdy byly analyzovány jednotlivé části trávicího traktu (žaludek, duodenum, ileum a cékum).

Ze vzorků určených pro analýzu bylo asepticky odebráno 200 mg. K izolaci bakteriální DNA byl použit komerčně dostupný kit QIAamp[®] DNA Stool Kit (Qiagen Ltd., Velká Británie), vlastní izolace DNA byla provedena dle instrukcí výrobce.

Použité reagentie a postup při analýze vzorků DNA pomocí real-time PCR byl shodný s postupem uvedeným v kapitole 3.2.3. Všechny vzorky byly měřeny v triplicátech. Po ukončení real-time PCR reakce byla za účelem zjištění povahy produktů PCR analyzována křivka tání. K vyhodnocení výsledků byla použita metoda absolutní kvantifikace, která přímo determinuje výchozí počet kopií cílových molekul. Neznámá koncentrace cílové DNA ve vzorcích byla vypočítána s použitím kalibrační křivky, která byla získána z diluční série standardů o známé koncentraci DNA.

PCR produkty byly detekovány elektroforézou na 2,5% agarozovém gelu obarveném pomocí SYBR[®] safe DNA Gel Stain (Invitrogen, USA). Detailnější postup je uveden v kapitole 3.2.3.

Statistika

Jednotlivé sledované charakteristiky (intenzita růstu, konverze krmiva, atd.) byly vyjádřeny prostým aritmetickým průměrem, který byl charakterizován

střední chybou průměru. Průkaznost rozdílu mezi průměry byla zjišťována programem ANOVA a pro následné testování byl použit Scheffeho test. Obdobně byly vyhodnoceny rozdíly mezi pokusnými skupinami v počtech sledovaných bakterií. Pro statistické zpracování byl použit program SAS 9.1.

PCR-RFLP – subtypizace *Campylobacter* spp.

Vybrané bakteriální kolonie ze selektivního agaru pro *C. jejuni* a *C. coli* byly izolovány v čisté kultuře a následně testovány PCR-RFLP subtypizací.

Z každého vzorku (zvířete) byly izolovány nejméně tři suspektní kolonie. Ty byly až do doby analýzy uchovávány při -70 °C. Před analýzou byly bakteriální buňky vysety na selektivní agar a kultivovány za mikroaerobních podmínek po dobu 48 h při 42 °C. Narostlá kultura byla přenesena kličkou do centrifugační zkumavky obsahující 300 µl DNAsa prosté vody. Vzorek byl pečlivě resuspendován a inkubován po dobu 17 minut při 95 °C, následovalo šokové zmrazení na -20 °C. Poté byl vzorek centrifugován při 13 000 g po dobu 5 minut a supernatan byl použit k dalšímu testování.

Pro specifickou PCR amplifikaci 1700 bp dlouhého PCR produktu byly použity primery rozeznávající sekvenci flagelinového genu A (*flaA*), převzaté z publikace Nachamkin a kol. [113]. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v Tab. 15. Tato sada primerů umožňuje amplifikaci fragmentu, zahrnujícího oblast 1 až 26 *flaA* genu (přímý primer) a oblast 1705 až 1728 *flaA* genu (zpětný primer) [113].

Tab. 15 Použité primery pro PCR typizaci

Primer	Směr	Sekvence (5'→3')
CJUNF	Přímý	GGA TTT CGT ATT AAC ACA AAT GGT GC
CJUNR	Zpětný	CTG TAG TAA TCT TAA AAC ATT TTG

PCR reakce o objemu 50 µl obsahovala následující složky: 0,5 µl 10 mM dNTP (Invitrogen, USA); 5 µl PCR pufru a 3 µl 25 mM MgCl₂ (dodáno spolu s Taq DNA polymerázou; Invitrogen, USA); 0,5 µl primeru CJUNF (1µg/µl; Invitrogen, USA); 0,5 µl primeru CJUNR (1 ug/ul; Invitrogen, USA); 0,4 µl Taq DNA polymeráza (5 U/µl; Invitrogen, USA); 1 µl templátové DNA. Reakční mix byl doplněn na požadovaný objem (50 µl) DNAsa prostou vodou. Do každé PCR reakce byla zahrnuta negativní a pozitivní kontrola. Reakční mix i vzorky byly připravovány na ledu.

PCR reakce byla provedena na termocykleru iCycler iQ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories, Inc., USA) za následujících

amplifikačních podmínek: iniciační denaturace při 94°C/1 min, následovalo 35 amplifikačních cyklů skládajících se z denaturace při 92 °C/15 s, annealingu při 45 °C/45 s a extenze při 72 °C/105 s. Reakci ukončila finální extenze při 72 °C/5 min. Poté byly PCR produkty uchovávány při 4 °C až do doby použití pro elektroforézu.

Výsledné amplifikační produkty byly analyzovány v 1% agarozovém gelu vizualizovaném barvením ethidium bromidem (1 µg/ml) a jeho excitací pod UV zářením na transiluminátoru. Jako standard byl použit TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA). V případě pozitivního vzorku byl detekovatelný amplifikační produkt o velikosti 1700 bp.

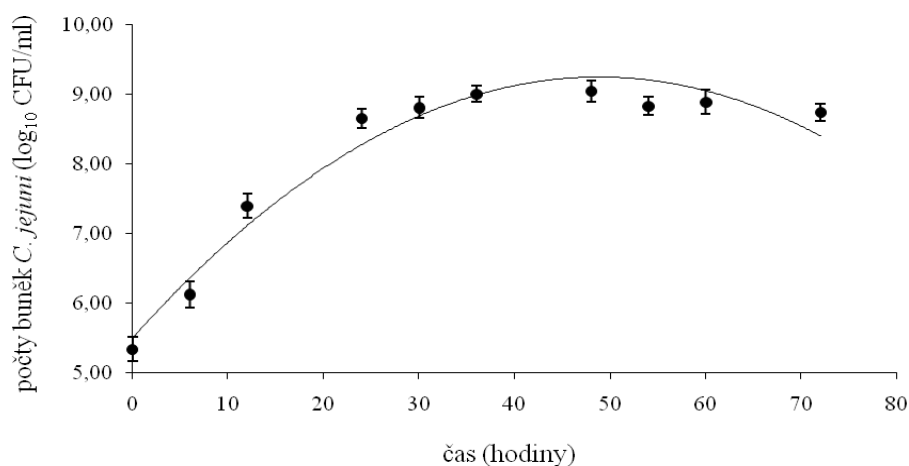
Následující druhové rozlišení bylo provedeno digescí PCR produktu restrikčním enzymem *DdeI* (Invitrogen, USA). Do PCR-RFLP reakčního mixu (20 µl) bylo použito 15 µl PCR produktu a 5 U restrikčního enzymu *DdeI*, 2 µl PCR pufru (dodán spolu s enzymem) a 2,5 µl DNAsa prosté vody. Inkubace probíhala přes noc při 37 °C. Produkty štěpení byly separovány na 3% agarozovém gelu za konstantního napětí 140 V. Gel byl obarven ethidium bromidem a vizualizován UV iluminací. Jako standard byl použit TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (Invitrogen, USA).

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

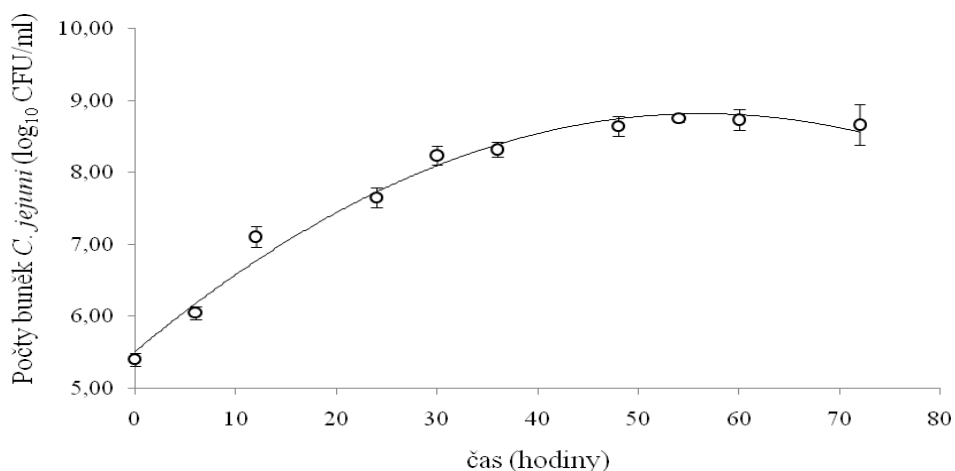
4.1 POKUSY *in vitro*

4.1.1 Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin

Pro účely tohoto experimentu bylo vyvinuto selektivní pomnožovací médium bez přídavku krve, jehož hlavní složku tvoří kyselina L-glutamová. Srovnání růstových křivek bakterie *C. jejuni* CCM 6214^T kultivované v nově vyvinutém médiu a bujónu podle Prestona dokumentují Obr. 8 a 9.



Obr. 8 Růstová křivka *C. jejuni* CCM 6214^T, kultivace v médiu podle Prestona při 37 °C za mikroaerobních podmínek



Obr. 9 Růstová křivka *C. jejuni* CCM 6214^T, kultivace v médiu s kyselinou glutamovou při 37 °C za mikroaerobních podmínek

Tab. 16 Srovnání IC₅₀* testovaných organických kyselin na bakterii *C. jejuni* CCM 6214^T

Organická kyselina	IC₅₀ (mg/ml)
kys. octová	r
kys. propionová	r
kys. máselná	r
kys. kapronová	9,25 ± 0,24
kys. kaprylová	3,24 ± 0,14
kys. kaprinová	0,96 ± 0,01
kys. laurová	r
kys. myristová	r
kys. palmitová	r
kys. sorbová	NS
kys. fumarová	7,10 ± 0,02
kys. jantarová	r
kys. benzoová	8,70 ± 0,07
kys. fenylactová	r
kys. mléčná	r
kys. jablečná	r
kys. citronová	r

* Stanoveno biuretovou metodou; výsledky jsou vyjádřeny v koncentraci kyseliny (mg/ml), při níž dojde k poklesu bakteriálního proteinu na polovinu, vztaženo ke kontrolnímu vzorku; průměr ze tří měření ± SD

r = rezistentní (IC₅₀ > 10 mg/ml)

NS = nebylo stanoveno

Tab. 16 uvádí výsledky vnímavosti bakterie *C. jejuni* CCM 6214^T k testovaným kyselinám. Inhibiční koncentrace byly stanoveny pomocí modifikované biuretové reakce a výsledky jsou vyjádřeny v IC₅₀, tj. v koncentraci kyseliny (mg/ml), při níž dojde k poklesu bakteriálního proteinu na polovinu, vztaženo ke kontrolnímu vzorku (neošetřen). Jako nejefektivnější antimikrobiální látky byly vyhodnoceny kyselina kaprinová

a kyselina kaprylová (IC_{50} 0,96 a 3,24 mg/ml). Slabá inhibice růstu *C. jejuni* byla pozorována také u vzorků ošetřených kyselinou fumarovou, benzoovou a kapronovou. Ostatní testované kyseliny nevykazovaly žádnou nebo pouze mírnou inhibici. Vliv kyseliny sorbové na inhibici růstu *C. jejuni* nebylo možné zvolenou metodou posoudit z důvodu rozrušení charakteristického zbarvení komplexu.

4.1.2 Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin

Vliv hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek vybraných organických kyselin vůči bakterii *C. jejuni* CCM 6214^T je uveden v Tab. 17 až 20. Inhibiční účinek byl zpravidla zvýrazněn aplikací vyšší koncentrace kyselin. Vliv prodloužení doby inkubace na inhibiční účinek kyselin byl marginální. V kyselém prostředí (pH 2,4) byly počty živých buněk u všech testovaných kyselin pod detekčním limitem. Při hodnotě pH 4,5 a koncentraci kyselin 5 mg/ml došlo k signifikantní redukci počtu bakterií u všech testovaných kyselin, vyjma kyseliny fumarové (její účinek se projevil až s prodloužením doby inkubace). V prostředí blízkém neutrálnímu pH (pH 6,5) byl antimikrobiální účinek testovaných kyselin nevýrazný, zvláště při aplikaci nižší koncentrace kyselin. Pouze kyselina kaprinová vykazovala baktericidní účinek i při hodnotě pH 6,5 a koncentraci 1 mg/ml. Nejvýraznější účinek ze všech testovaných kyselin vykazuje kyselina kaprinová následovaná kyselinou kaprylovou. Inkubace *C. jejuni* CCM 6214^T v případě obou kyselin vedla k signifikantnímu snížení počtu bakterií, a to bez ohledu na hodnotu pH prostředí.

Tab. 17 Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml)¹ *C. jejuni* CCM 6214^T po 5 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH

Organická kyselina	Koncentrace (mg/ml)	pH		
		2,4	4,5	6,5
kys. kapronová	0	< 2	9,5 ± 0,23 ^a	10,5 ± 0,23 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	7,7 ± 0,40 ^b
kys. kaprylová	0	< 2	9,8 ± 0,54 ^a	10,9 ± 0,11 ^a
	1	< 2	< 2 ^b	10,1 ± 0,63 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	< 3 ^b
kys. kaprinová	0	< 2	9,2 ± 0,88 ^a	10,2 ± 0,96 ^a
	0,5	< 2	< 2 ^b	3,3 ± 0,03 ^b
	1	< 2	< 2 ^b	2,0 ± 0,32 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
kys. sorbová	0	< 2	9,2 ± 0,30 ^a	10,5 ± 0,55 ^a
	1	< 2	8,5 ± 0,38 ^a	10,5 ± 0,57 ^a
	5	< 2	2,3 ± 0,11 ^b	9,1 ± 0,20 ^b
kys. benzoová	0	< 2	7,6 ± 0,52 ^a	7,9 ± 1,33 ^a
	1	< 2	6,6 ± 0,41 ^b	6,8 ± 0,14 ^a
	5	< 2	< 2 ^c	6,1 ± 0,13 ^a
kys. fumarová	0	< 2	9,1 ± 1,03 ^a	10,3 ± 0,35 ^a
	1	< 2	8,8 ± 0,17 ^a	8,9 ± 0,54 ^b
	5	< 2	9,0 ± 0,31 ^a	6,3 ± 0,15 ^c

¹Životaschopné buňky po expozici organickými kyselinami (průměr ze tří měření ± SD)

^{a, b, c} Hodnoty ve stejném sloupci a sekci s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$).

Tab. 18 Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml)¹ *C. jejuni* CCM 6214^T po 10 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH

Organická kyselina	Koncentrace (mg/ml)	pH		
		2,4	4,5	6,5
kys. kapronová	0	< 2	9,5 ± 0,49 ^a	10,4 ± 0,29 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	6,7 ± 0,24 ^b
kys. kaprylová	0	< 2	10,3 ± 0,09 ^a	10,7 ± 0,53 ^a
	1	< 2	< 2 ^b	9,3 ± 0,25 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 3 ^c
kys. kaprinová	0	< 2	8,9 ± 0,55 ^a	8,8 ± 0,28 ^a
	0,5	< 2	< 2 ^b	2,3 ± 0,10 ^b
	1	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
kys. sorbová	0	< 2	9,3 ± 0,51 ^a	10,6 ± 0,62 ^a
	1	< 2	8,9 ± 0,30 ^a	10,6 ± 0,53 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	9,1 ± 0,18 ^b
kys. benzoová	0	< 2	7,6 ± 0,48 ^a	8,4 ± 1,16 ^a
	1	< 2	5,6 ± 0,10 ^b	7,1 ± 0,29 ^{a,b}
	5	< 2	< 2 ^c	5,9 ± 0,38 ^b
kys. fumarová	0	< 2	9,1 ± 1,13 ^a	10,3 ± 0,69 ^a
	1	< 2	9,0 ± 0,17 ^a	9,6 ± 0,50 ^a
	5	< 2	7,0 ± 0,26 ^b	6,8 ± 0,16 ^b

¹Životaschopné buňky po expozici organickými kyselinami (průměr ze tří měření ± SD)

^{a, b, c} Hodnoty ve stejném sloupci a sekci s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$).

Tab. 19 Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml)¹ *C. jejuni* CCM 6214^T po 20 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH

Organická kyselina	Koncentrace (mg/ml)	pH		
		2,4	4,5	6,5
kys. kapronová	0	< 2	9,6 ± 0,19 ^a	10,6 ± 0,13 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	6,7 ± 0,21 ^b
kys. kaprylová	0	< 2	10,0 ± 0,05 ^a	10,9 ± 0,08 ^a
	1	< 2	< 2 ^b	8,6 ± 0,09 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 3 ^c
kys. kaprinová	0	< 2	8,9 ± 0,45 ^a	9,6 ± 0,52 ^a
	0,5	< 2	< 2 ^b	2,0 ± 0,05 ^b
	1	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
kys. sorbová	0	< 2	9,6 ± 0,29 ^a	10,8 ± 0,42 ^a
	1	< 2	7,6 ± 0,24 ^b	9,8 ± 0,49 ^{a,b}
	5	< 2	< 2 ^c	9,0 ± 0,12 ^b
kys. benzoová	0	< 2	7,6 ± 0,70 ^a	9,8 ± 0,55 ^a
	1	< 2	5,6 ± 0,31 ^b	8,5 ± 0,34 ^b
	5	< 2	< 2 ^c	7,0 ± 0,28 ^c
kys. fumarová	0	< 2	9,2 ± 1,13 ^a	10,6 ± 0,33 ^a
	1	< 2	9,0 ± 0,36 ^a	10,1 ± 0,50 ^a
	5	< 2	6,4 ± 0,08 ^b	6,8 ± 0,08 ^b

¹Životaschopné buňky po expozici organickými kyselinami (průměr ze tří měření ± SD)

^{a, b, c} Hodnoty ve stejném sloupci a sekci s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$).

Tab. 20 Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml)¹ *C. jejuni* CCM 6214^T po 30 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH

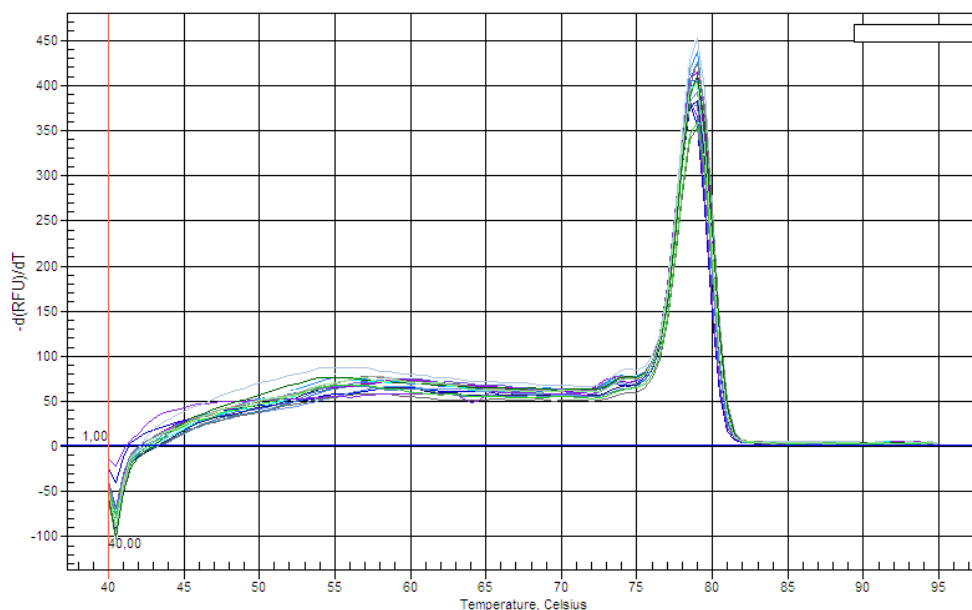
Organická kyselina	Koncentrace (mg/ml)	pH		
		2,4	4,5	6,5
kys. kapronová	0	< 2	9,7 ± 0,11 ^a	10,7 ± 0,21 ^a
	5	< 2	< 2 ^b	6,2 ± 0,31 ^b
kys. kaprylová	0	< 2	10,0 ± 0,09 ^a	10,9 ± 0,09 ^a
	1	< 2	< 2 ^b	9,9 ± 0,49 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 3 ^c
kys. kaprinová	0	< 2	8,9 ± 0,50 ^a	9,5 ± 0,75 ^a
	0,5	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
	1	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
	5	< 2	< 2 ^b	< 2 ^b
kys. sorbová	0	< 2	9,7 ± 0,15 ^a	10,9 ± 0,47 ^a
	1	< 2	8,7 ± 0,42 ^b	9,7 ± 0,51 ^{a,b}
	5	< 2	< 2 ^c	9,5 ± 0,49 ^b
kys. benzoová	0	< 2	8,7 ± 0,49 ^a	9,6 ± 0,72 ^a
	1	< 2	7,8 ± 0,24 ^b	8,6 ± 0,34 ^a
	5	< 2	< 2 ^c	5,3 ± 0,44 ^b
kys. fumarová	0	< 2	9,4 ± 1,23 ^a	10,7 ± 0,33 ^a
	1	< 2	9,9 ± 0,63 ^a	10,3 ± 0,70 ^a
	5	< 2	4,5 ± 0,51 ^b	6,8 ± 0,29 ^b

¹Životaschopné buňky po expozici organickými kyselinami (průměr ze tří měření ± SD)

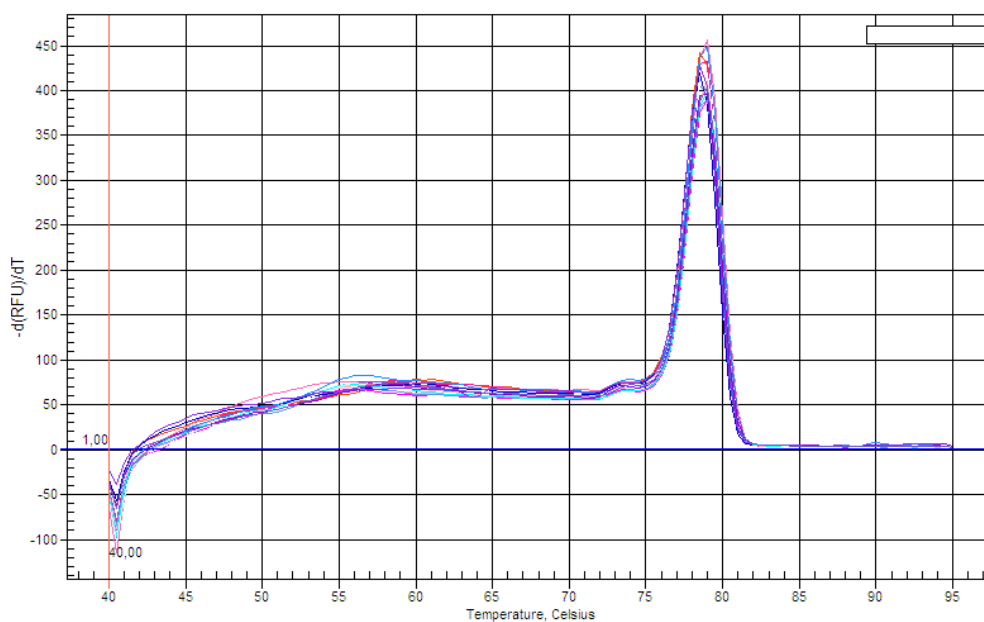
^{a, b, c} Hodnoty ve stejném sloupci a sekci s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$).

4.1.3 Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou

Antibakteriální účinek organických kyselin vůči sbírkovému kmeni a klinickému izolátu *C. jejuni* byl sledován rovněž metodou real-time PCR. Pro potvrzení specifity PCR produktu a vyloučení vzniku dimeru primerů byla po každém měření provedena analýza křivky tání. Na Obr. 10 a 11 jsou ukázány křivky tání pro *C. jejuni* CCM 6214^T a *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21.

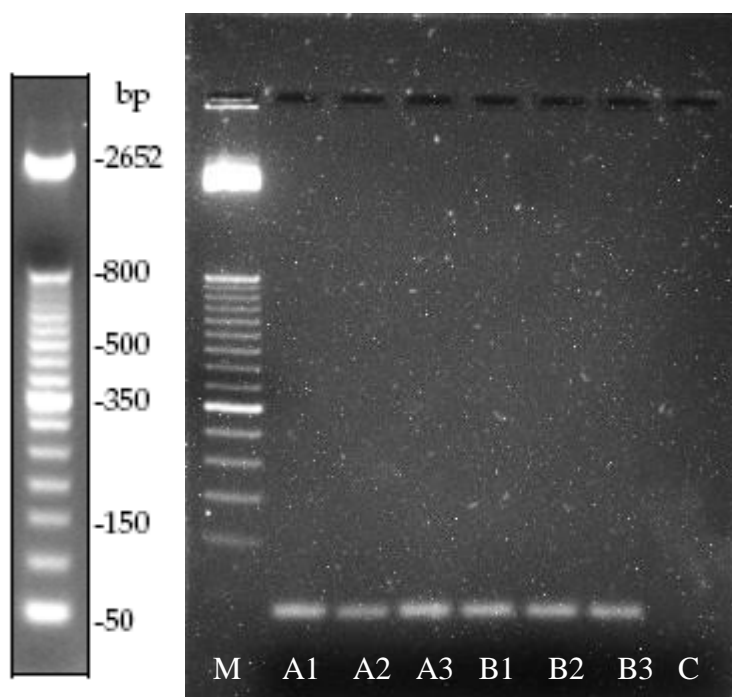


Obr. 10 Křivka tání pro kmen *C. jejuni* CCM 6214^T



Obr. 11 Křivka tání pro kmen *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21

Elektroforézou na 2,5% agarozovém gelu byla ověřena kvalita a specifita PCR reakce. Předpokládaná délka fragmentu podle zdroje Nogva a kol. [108] měla být 86 bp. Zřetelné projasnění pod úrovní méně viditelné zóny 100 bp potvrzuje správnost DNA fragmentu patřícímu *C. jejuni* (viz Obr. 12). Inhibiční účinek testovaných organických kyselin byl vyjádřen hodnotou IC_{50} , tj. koncentrace zkoušené látky, která sníží syntézu bakteriální DNA o 50 %. Před použitím ΔCt metody [110] byl proveden validační experiment, který prokázal, že je efektivita porovnávaných vzorků skutečně srovnatelná ($E = 97 \pm 1 \%$, $R^2 > 0,998$). Efektivita amplifikace byla stanovena ze směrnice kalibrační křivky použitím vzorce $E = 10^{(-1/slope)} - 1$ [114].



Obr. 12 Gelová elektroforéza PCR produktů: (M) 50 bp marker, (A1-3) *C. jejuni* CCM 6214^T, (B1-3) *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21, (C) negativní kontrola

Inhibiční koncentrace testovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči bakterii *C. jejuni* CCM 6214^T a klinickému izolátu *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21 jsou uvedeny v Tab. 21 a 22. Inhibiční účinek byl testován při hodnotách pH 5,5 a 6,5, které korespondují s hodnotami pH zadní části GIT drůbeže.

Z 21 testovaných látek byly jednoznačně nejúčinnější kyselina kaprylová, kaprinová a laurová ($IC_{50} \leq 0,10$ mg/ml). Inhibice růstu se projevila v slabě kyselém prostředí (pH 4,5) výrazněji než při pH blízkém neutrálnímu (pH 6,5).

Tab. 21 Inhibiční koncentrace (IC₅₀)^{*} testovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči bakterii *C. jejuni* CCM 6214^T

Organická kyselina	pH 5,5	pH 6,5
kyselina octová	5,08 ± 1,29	7,07 ± 0,45
kyselina propionová	2,99 ± 0,70	4,82 ± 0,36
kyselina máselná	4,19 ± 0,73	8,87 ± 0,16
kyselina kapronová	1,54 ± 0,35	4,08 ± 1,84
kyselina kaprylová	< 0,1	0,11 ± 0,04
kyselina kaprinová	< 0,1	< 0,1
kyselina laurová	< 0,1	< 0,1
kyselina myristová	0,21 ± 0,16	1,94 ± 0,20
kyselina palmitová	1,41 ± 0,13	3,09 ± 0,54
kyselina stearová	5,44 ± 0,41	r
kyselina jantarová	3,86 ± 0,70	9,01 ± 1,50
kyselina olejová	< 0,1	0,38 ± 0,05
kyselina fumarová	< 0,1	0,74 ± 0,06
kyselina sorbová	0,58 ± 0,29	4,10 ± 0,17
kyselina benzoová	0,68 ± 0,96	2,50 ± 1,70
kyselina fenylactová	3,32 ± 1,14	7,30 ± 0,41
kyselina jablečná	0,14 ± 0,05	0,57 ± 0,15
kyselina citronová	2,25 ± 0,39	5,68 ± 1,06
kyselina mléčná	0,89 ± 0,01	4,60 ± 0,19
monokaprylin	< 0,1	1,57 ± 0,65
monokaprin	0,10 ± 0,01	0,25 ± 0,09

^{*} Stanoveno metodou real-time PCR; výsledky jsou vyjádřeny v koncentraci kyseliny (mg/ml), při níž dojde k poklesu počtu bakterií na polovinu, vztaženo ke kontrolnímu vzorku (neošetřen); průměr ze tří měření ± SD
r = rezistentní (IC₅₀ > 10 mg/ml)

Tab. 22 Inhibiční koncentrace (IC₅₀)* testovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči klinickému izolátu *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21

Organická kyselina	pH 5,5	pH 6,5
kyselina octová	7,04 ± 0,23	r
kyselina propionová	5,22 ± 0,71	r
kyselina máselná	6,33 ± 0,83	r
kyselina kapronová	6,16 ± 1,85	r
kyselina kaprylová	< 0,1	< 0,1
kyselina kaprinová	< 0,1	< 0,1
kyselina laurová	< 0,1	< 0,1
kyselina myristová	< 0,1	0,80 ± 0,12
kyselina palmitová	1,75 ± 0,01	2,67 ± 0,06
kyselina stearová	7,89 ± 0,34	r
kyselina jantarová	5,81 ± 0,06	r
kyselina olejová	< 0,1	0,46 ± 0,12
kyselina fumarová	< 0,1	0,48 ± 0,29
kyselina sorbová	2,40 ± 2,57	7,05 ± 0,51
kyselina benzoová	1,93 ± 0,80	3,76 ± 0,38
kyselina fenylactová	5,54 ± 0,06	6,40 ± 0,27
kyselina jablečná	0,56 ± 0,16	1,90 ± 0,27
kyselina citronová	5,99 ± 0,57	r
kyselina mléčná	0,32 ± 0,12	3,43 ± 0,67
monokaprylin	< 0,1	3,44 ± 0,58
monokaprin	< 0,1	1,8 ± 0,74

* Stanoveno metodou real-time PCR; výsledky jsou vyjádřeny v koncentraci kyseliny (mg/ml), při níž dojde k poklesu počtu bakterií na polovinu, vztaženo ke kontrolnímu vzorku (neošetřen); průměr ze tří měření ± SD
r = rezistentní (IC₅₀ > 10 mg/ml)

Při hodnotě pH 5,5 byla pozorována výrazná inhibice počtu bakterií také u kyseliny myristové, olejové, fumarové a obou monoacylglycerolů. V protikladu s tím, byl antimikrobiální účinek kyseliny octové, máselné a stearové (u obou testovaných kmenů) okrajový. Klinický izolát *C. jejuni* z drůbeže byl méně vnímavý k účinkům testovaných látek ve srovnání se sbírkovým kmenem. V prostředí blízkém neutrálnímu pH vykazoval klinický izolát rezistenci ($IC_{50} > 10$ mg/ml) vůči sedmi testovaným kyselinám.

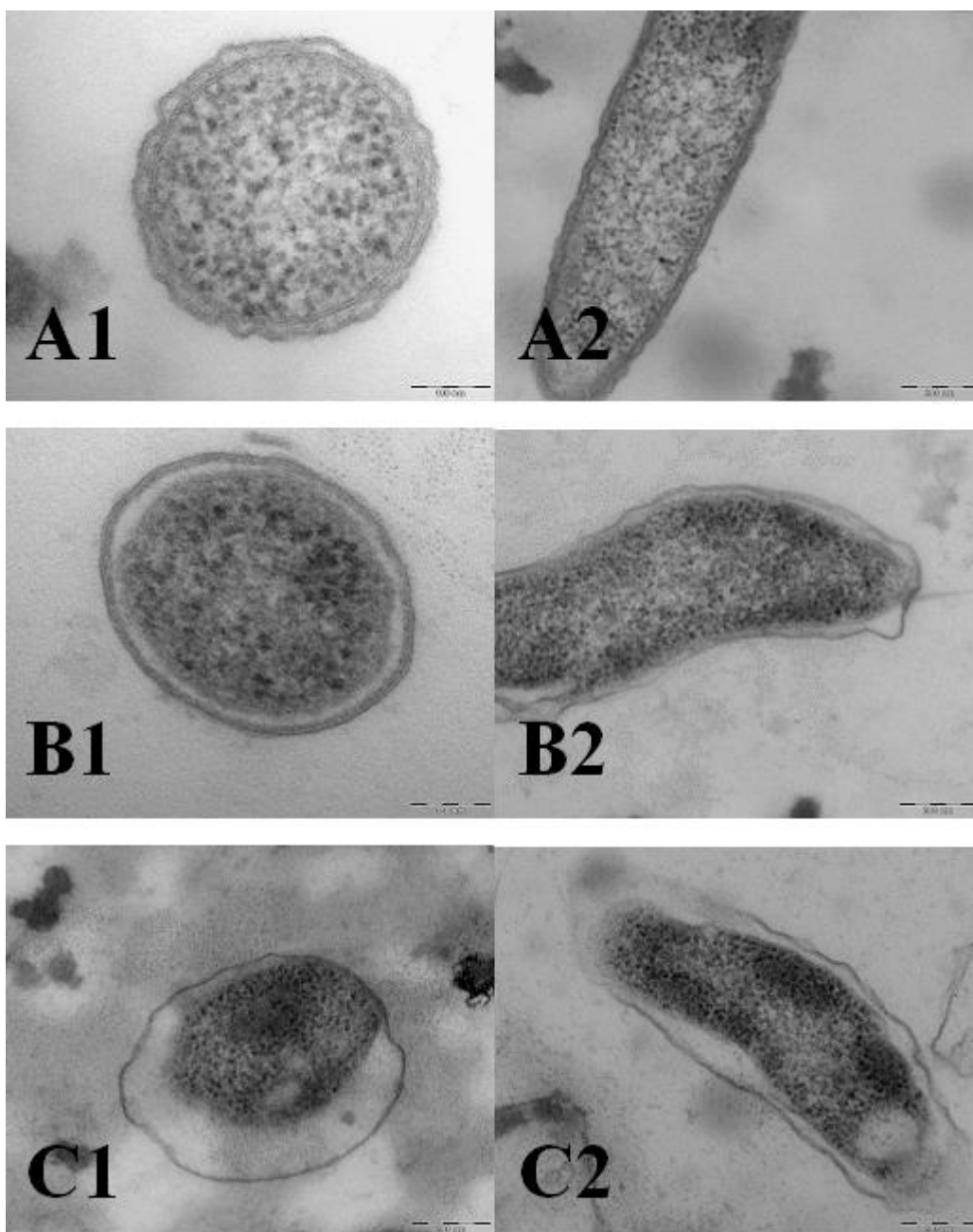
4.1.4 Studium mechanismu účinku organických kyselin

Transmisní elektronová mikroskopie

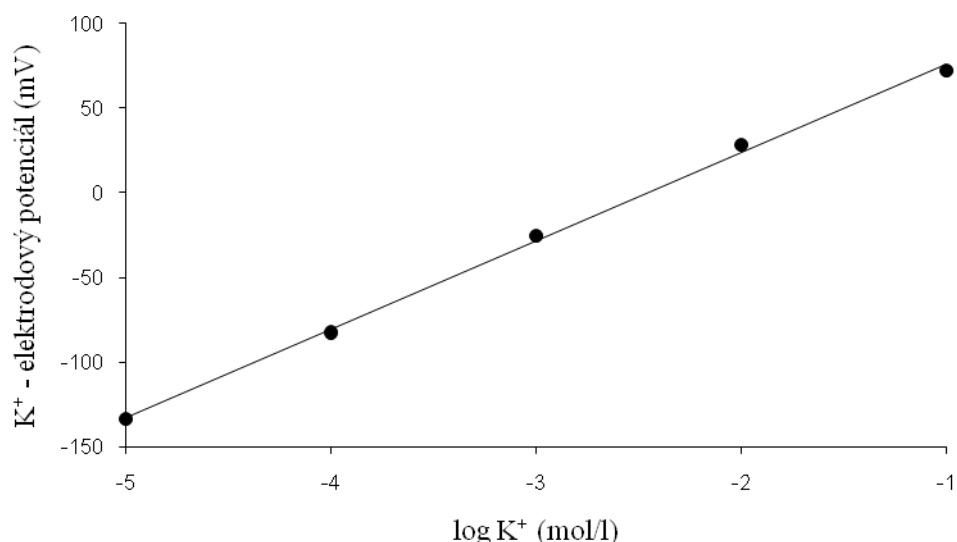
Obr. 13 ilustruje změny morfologie *C. jejuni* CCM 6214^T po 30 minutové inkubaci s kyselinou fumarovou (B1, B2) a kyselinou kaprinovou (C1, C2). Výsledná koncentrace kyselin ve vzorku byla 1 mg/ml. V porovnání s kontrolním vzorkem (A1, A2) vykazují buňky vystavené působení zmíněných kyselin zvětšení periplazmatického prostoru a v některých případech také ztrátu integrity cytoplazmatické membrány. U vzorků ošetřených kyselinou kaprinovou je patrný rozpad buněčných struktur.

Sledování změn koncentrace K^+ iontů

Kalibrační křivka pro draslíkovou iontově selektivní elektrodu je znázorněna na Obr. 14. Obr. 16 (levá strana) prezentuje vliv kyseliny fumarové (a), kyseliny kaprinové (b) a monokaprinu (c) na změnu koncentrace K^+ iontů. Ionty draslíku byly vyplaveny z buněk *C. jejuni* přidávkem cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) a menší měrou rovněž vlivem kyseliny fumarové (1 mg/ml). Po ošetření kyselinou kaprinovou a monokaprinem nebyla zaznamenána aktivita K^+ iontů.



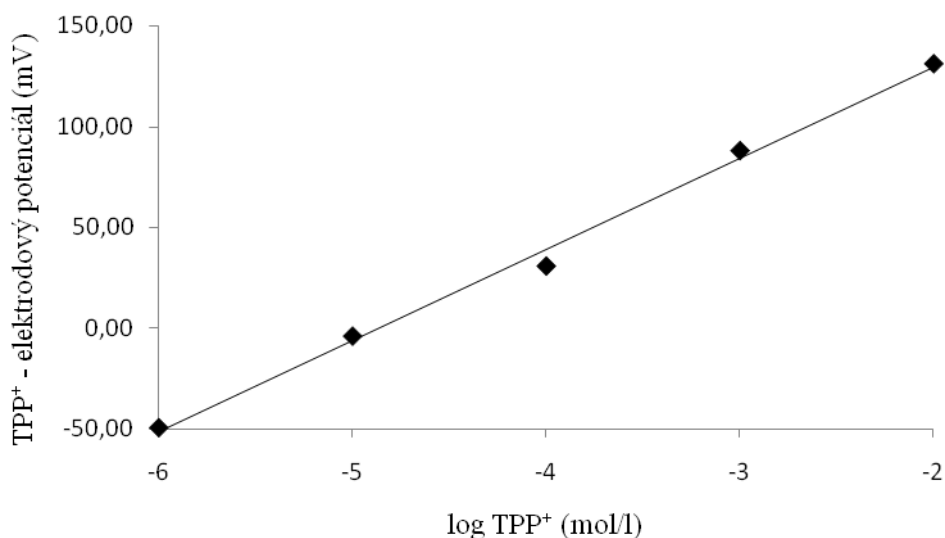
Obr. 13 *Transmisní elektronová mikroskopie buněk *C. jejuni* CCM 6214^T
 A1, A2 - kontrolní vzorky (tj. bez ošetření) příčný a podélný řez buňkami
 B1, B2 - působení kyseliny fumarové ($c = 1 \text{ mg/ml}$; 30 min)
 C1, C2 - působení kyseliny kaprinové ($c = 1 \text{ mg/ml}$; 30 min)*



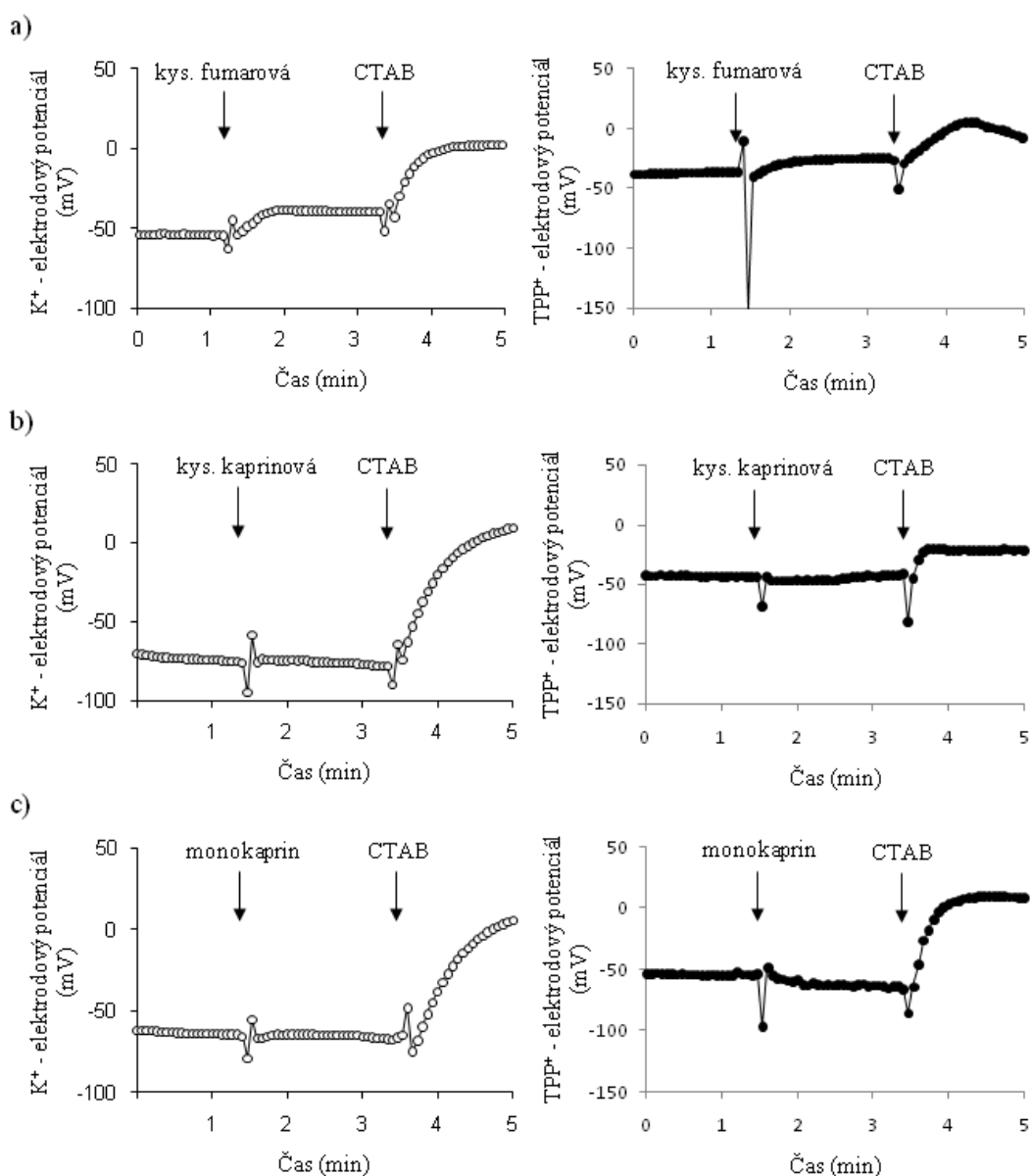
Obr. 14 Kalibrační křivka pro draslíkovou iontově selektivní elektrodu

Sledování redistribuce TPP⁺ iontů

Kalibrační křivka pro TPP⁺ iontově selektivní elektrodu je znázorněna na Obr. 15. Vliv kyseliny fumarové (a), kyseliny kaprinové (b) a monokaprinu (c) na redistribuci TPP⁺ iontů u ošetřených buněk *C. jejuni* je znázorněn na Obr. 16 (pravá strana). Přídavek kyseliny fumarové do bakteriální suspenze obsahující 10 μM TPP chlorid zvýšil potenciál TPP⁺ elektrody o cca 15 mV. Naopak přídavek kyseliny kaprinové a monokaprinu nevyvolal očekávanou odezvu. Přidáním cetyltrimethylamonium bromidu (CTAB) do bakteriální suspenze se potenciál elektrody zvýšil, v přítomnosti kyseliny fumarové však po uplynutí jedné minuty opět klesl.



Obr. 15 Kalibrační křivka pro TPP⁺ iontově selektivní elektrodu



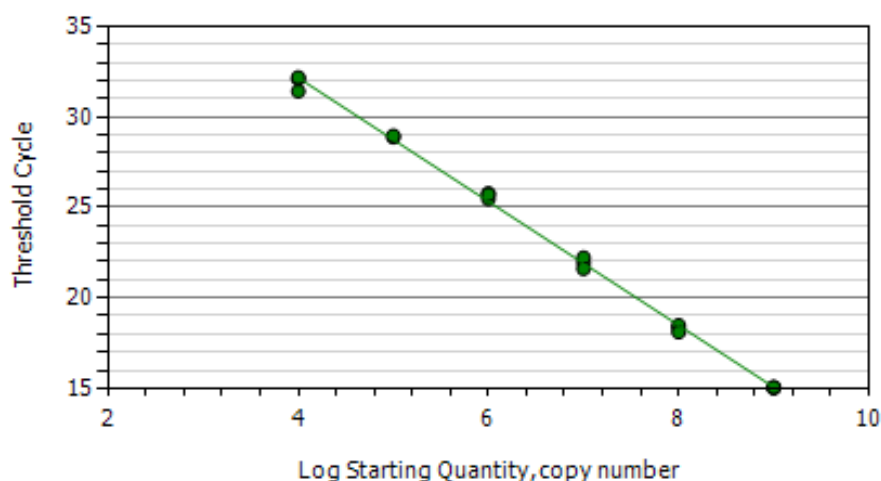
Obr. 16 Změny koncentrace K^+ a TPP^+ iontů měřené pomocí ISE

Buňky *C. jejuni* CCM 6214^T byly ošetřeny kyselinou fumarovou (a), kyselinou kaprinovou (b) a monokaprinem (c); první šipka znázorňuje okamžik přidání testované látky ($c = 1 \text{ mg/ml}$), druhá šipka označuje přidavek CTAB ($c = 0,25 \text{ mg/ml}$)

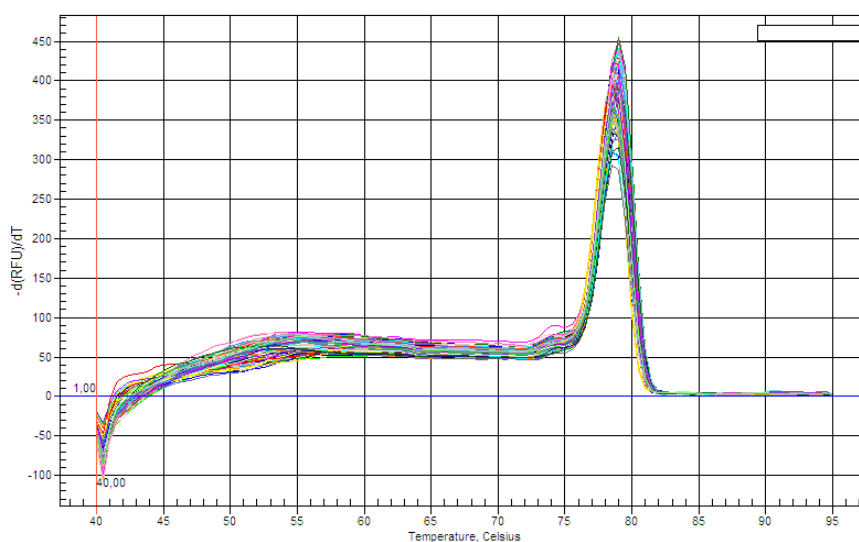
4.2 POKUS *in vivo*

4.2.1 Experimentální infekce drůbeže

Bakteriologická analýza byla zaměřena na zástupce rodů *Campylobacter*, *Lactobacillus* a koliformní bakterie. Počty koliformních bakterií a bakterií rodu *Lactobacillus* byly stanoveny metodou výsevu na selektivní půdy. Pro kvantifikaci počtů bakterií rodu *Campylobacter* byla použita metoda real-time PCR a výsledky byly vyhodnoceny metodou absolutní kvantifikace. Na Obr. 17 je znázorněna standardní křivka ($E = 96,1\%$, $R^2 = 0,988$), která byla získána z diluční série standardů o známé koncentraci DNA. Specifita amplifikace PCR produktů byla ověřena analýzou křivky tání (viz Obr. 18).



Obr. 17 Standardní křivka pro absolutní kvantifikaci (metoda real-time PCR)



Obr. 18 Experimentální infekce: křivka tání pro kmen *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21

Počty bakterií *C. jejuni* izolovaných z trusu brojlerů v průběhu experimentu jsou uvedeny v Tab. 23. Z výsledků je patrné, že první infekce (tj. z 14. dne) se téměř neujala. Z toho důvodu se počty *C. jejuni* pohybovaly až do doby druhé infekce kolem hodnoty 3 log₁₀ CFU/g v případě negativní kontroly byly počty po celou dobu výkrmu pod detekčním limitem (< 3 log₁₀ CFU/g).

Tab. 23 Počty bakterií (log₁₀ CFU/g)¹ *Campylobacter jejuni* v trusu brojlerů (analýzy provedené po infekci klinickým izolátem *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21)

Věk kuřat	Pokusná skupina			
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)
16. den	< DL	< DL	< DL	< DL
18. den	< DL ^a	3,41 ± 0,67 ^b	3,38 ± 0,66 ^b	3,37 ± 0,68 ^b
21. den	< DL	< DL	< DL	< DL
24. den	< DL ^a	3,09 ± 0,20 ^b	3,37 ± 0,90 ^b	3,25 ± 0,45 ^b
28. den	< DL ^a	3,67 ± 0,58 ^b	3,37 ± 0,60 ^b	3,40 ± 0,49 ^b
30. den	< DL ^a	5,31 ± 0,62 ^b	3,09 ± 0,29 ^c	7,24 ± 0,65 ^d
32. den	< DL ^a	6,97 ± 1,06 ^b	6,39 ± 1,65 ^b	8,20 ± 0,49 ^c
35. den	< DL ^a	7,64 ± 0,98 ^b	5,95 ± 1,50 ^c	7,11 ± 0,98 ^b
37. den	< DL ^a	6,29 ± 1,31 ^b	6,56 ± 1,43 ^{bc}	7,51 ± 0,95 ^c
39. den	< DL ^a	5,89 ± 1,55 ^b	6,81 ± 1,54 ^b	6,89 ± 0,72 ^b

¹ Stanoveno metodou real-time PCR (průměr ± SD)

*KS = krmná směs, MK = mastná kyselina, DL = detekční limit (3 Log₁₀ CFU/g)

^{a, b, c} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné (*P* < 0,05)

Dvacátý osmý den výkrmu bylo krmivo pozitivní kontroly a obou pokusných skupin opět kontaminováno kulturou *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Dva dny po nákaze počty bakterií *C. jejuni* u pozitivní kontroly vzrostly na hodnotu 7,24 log₁₀ CFU/g. U pokusných skupin I. a II. došlo oproti pozitivní kontrole k signifikantnímu snížení počtů bakterií, přičemž inhibice počtu bakterií byla výraznější u pokusné skupiny II. Tento trend setrval po následujících 9 dnů, poté se počty *C. jejuni* u pozitivní kontroly a obou pokusných skupin opět vyrovnaly.

Vliv suplementace krmiv MK na počty bakterií *C. jejuni* v jednotlivých částech trávicího traktu je zaznamenán v Tab. 24. U pokusných skupin I. a II. byla pozorována signifikantní inhibice počtu bakterií *C. jejuni*, počty bakterií se pohybovaly zpravidla o jeden řád níže oproti pozitivní kontrole.

Tab. 24 Vliv suplementace krmiv MK na počty bakterií (\log_{10} CFU/g)¹ *Campylobacter jejuni* v jednotlivých částech trávicího traktu

Část GIT	Pokusná skupina			
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)
Žaludek	< DL ^a	4,89 ± 0,36 ^b	4,95 ± 0,73 ^b	4,97 ± 0,23 ^b
Duodenum	< DL ^a	3,97 ± 0,89 ^b	3,80 ± 0,62 ^b	4,76 ± 0,41 ^c
Ileum	< DL ^a	4,33 ± 0,93 ^b	4,28 ± 0,65 ^b	6,02 ± 1,72 ^c
Cékum	< DL ^a	7,06 ± 1,79 ^b	6,85 ± 1,79 ^b	8,93 ± 0,92 ^c

¹ Stanoveno metodou real-time PCR (průměr ± SD)

*KS = krmná směs, MK = masná kyselina, DL = detekční limit (3 \log_{10} CFU/g)

^{a, b, c} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$)

Přídavek mastných kyselin měl zanedbatelný vliv na počty bakterií *Lactobacillus*. Signifikantní rozdíl byl obdržen pouze ve slepém střevě (viz Tab. 25), počty bakterií byly v pokusné skupině I. o necelý řád nižší než u negativní kontroly. Výskyt laktobacilů ve zbývajících částech trávicího traktu nebyl účinkem mastných kyselin významně ovlivněn. Rovněž v případě počtů koliformních bakterií nebyly zaznamenány výraznější rozdíly mezi pokusnými skupinami. Vyjímkou byla pokusná skupina II., ve které došlo k signifikantní inhibici růstu bakterií v duodenu a céku (viz Tab. 26).

Tab. 25 Vliv suplementace krmiv MK na počty bakterií (\log_{10} CFU/g)¹ rodu *Lactobacillus* v jednotlivých částech trávicího traktu

Část GIT	Pokusná skupina			
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)
Žaludek	6,34 ± 0,54	6,30 ± 0,61	5,90 ± 0,58	6,28 ± 0,43
Duodenum	6,86 ± 1,18	7,25 ± 0,81	7,01 ± 0,39	7,42 ± 0,42
Ileum	7,31 ± 1,27	7,88 ± 0,94	7,73 ± 0,64	8,19 ± 0,70
Cékum	9,77 ± 0,51 ^{a, b}	9,45 ± 0,51 ^b	9,92 ± 0,47 ^{a, b}	10,09 ± 0,34 ^a

¹ Stanoveno metodou výsevu na selektivní agar (průměr ± SD)

*KS = krmná směs, MK = masná kyselina, DL = detekční limit (3 \log_{10} CFU/g)

^{a, b} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$)

Tab. 26 Vliv suplementace krmiv MK na počty koliformních bakterií (\log_{10} CFU/g)¹ v jednotlivých částech trávicího traktu

Část GIT	Pokusná skupina			
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)
Žaludek	3.34 ± 1.41	3.14 ± 0.54	3.28 ± 0.83	3.32 ± 0.97
Duodenum	5.11 ± 0.20 ^b	5.84 ± 0.36 ^a	5.27 ± 0.37 ^b	6.09 ± 0.82 ^a
Ileum	7.61 ± 1.63 ^a	7.25 ± 1.09 ^{a, b}	6.08 ± 0.21 ^b	7.32 ± 1.44 ^{a, b}
Cékum	8.68 ± 1.35	7.20 ± 1.23	7.35 ± 1.99	8.47 ± 2.18

¹ Stanoveno metodou výsevu na selektivní agar (průměr ± SD)

*KS = krmná směs, MK = mastná kyselina, DL = detekční limit (3 \log_{10} CFU/g)

^{a, b} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$)

Vliv testovaných diet na základní parametry užitkovosti je uveden v Tab. 27. Sledované parametry užitkovosti v rámci jednotlivých pokusných skupin byly poměrně vyrovnané. Růst brojlerů byl sledován pravidelným vážením v sedmi denních intervalech. Přírůstky hmotnosti odpovídaly růstovým standardům daného hybridu drůbeže, pro který je charakteristická vysoká intenzita růstu (viz Tab. 28). Suplementace krmiv mastnými kyselinami snížila přírůstky živé hmotnosti, rozdíly ale nebyly statisticky významné. Konverze krmiva byla u všech pokusných skupin vyrovnaná, průměrná hodnota se pohybovala kolem 1,6. Za celou dobu výkrmu byla evidována pouze jedna ztráta úhynem (u negativní kontroly).

Tab. 27 Vliv suplementace krmiv MK na základní parametry užitkovosti¹ (g)

Sledovaný parametr užitkovosti	Pokusná skupina				Hladina významnosti (P)
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)	
Počáteční hmotnost	45 ± 1,9	47 ± 4,0	45 ± 3,0	47 ± 3,2	0,1397
Konečná hmotnost	2813 ± 144,9	2644 ± 118,8	2569 ± 327,8	2722 ± 271,1	0,0900
Ø denní přírůstek hm.	66 ± 3,5	62 ± 2,8	60 ± 7,8	64 ± 6,5	0,0867
Konverze krmiva	1,56	1,64	1,66	1,60	0,1775
Mortalita	1/12	0/12	0/12	0/12	-

*KS = krmná směs, MK = mastná kyselina

¹ Průměr ± S D

^{a, b} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$)

Tab. 28 Vliv suplementace krmiv MK na intenzitu růstu¹ brojlerů ROSS 308 (g)

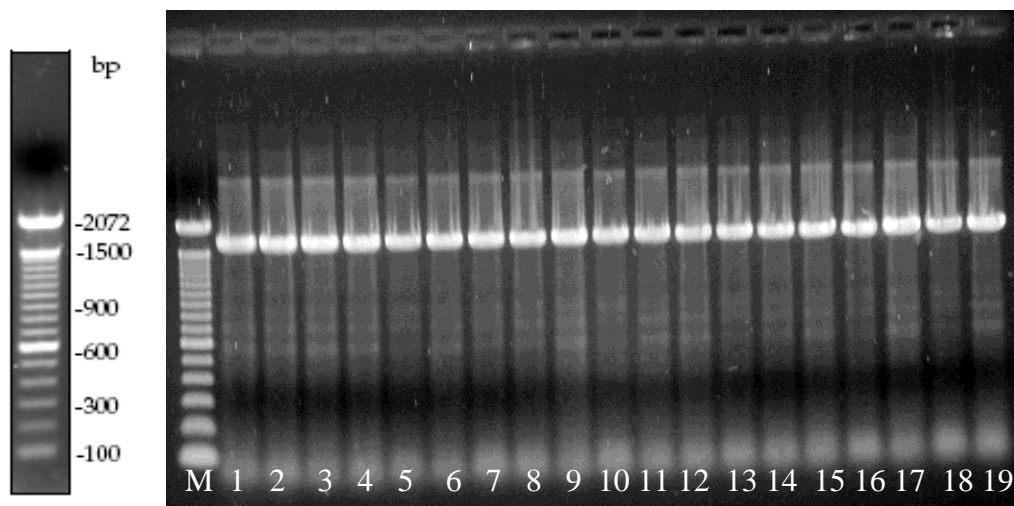
Věk kuřat	Pokusná skupina				Hladina významnosti (P)
	Kontrola (-) (standardní KS)	I. (volná MK)	II. (chráněná MK)	Kontrola (+) (standardní KS)	
0. den	45 ± 1,9	47 ± 4,0	45 ± 3,0	47 ± 3,2	0,1397
7. den	126 ± 11,8 ^a	149 ± 18,8 ^b	139 ± 16,5 ^{a, b}	123 ± 18,9 ^a	0,0014
14. den	344 ± 47,7	351 ± 37,9	327 ± 48,3	343 ± 50,2	0,6280
21. den	804 ± 56,6	762 ± 66,0	704 ± 109,3	783 ± 101,5	0,0402
28. den	1391 ± 113,9	1352 ± 86,3	1304 ± 144,6	1373 ± 144,1	0,3335
35. den	2093 ± 613,7	1980 ± 87,2	1904 ± 230,0	2012 ± 199,1	0,0759
42. den	2813 ± 144,9	2644 ± 118,8	2569 ± 327,8	2722 ± 271,1	0,0900

*KS = krmná směs, MK = mastná kyselina

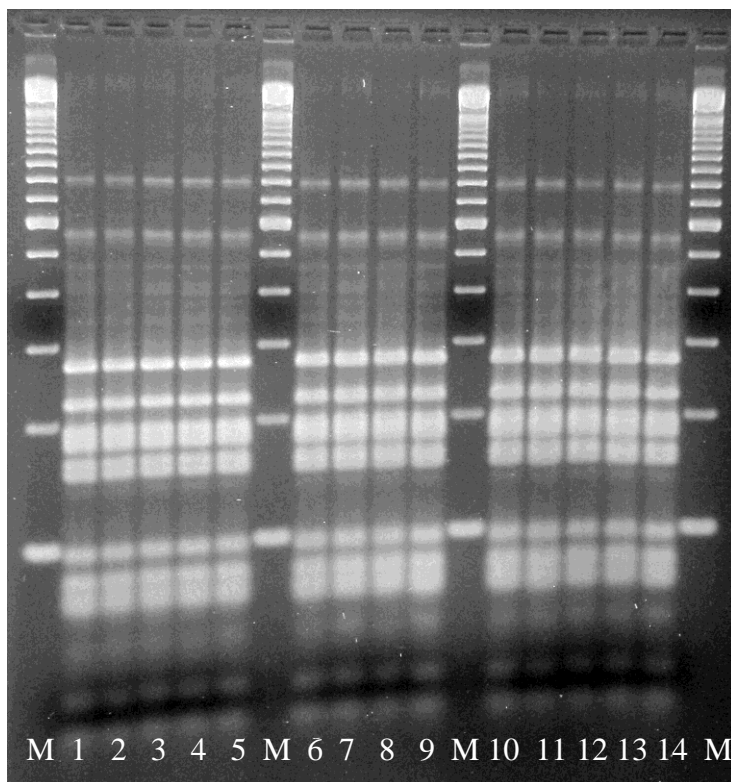
¹ Průměr ± S D

^{a, b} Hodnoty ve stejném řádku s odlišnými indexy jsou signifikantně odlišné ($P < 0,05$)

Subtypizace *Campylobacter jejuni* byla provedena s použitím kombinované metody PCR a analýzy délkových polymorfismů genu pro flagelin (*flaA*). PCR-RFLP profily byly identické u všech vyšetřovaných vzorků (viz Obr. 19 a 20). Výsledky tedy potvrzují, že všechny pokusné skupiny (mimo negativní kontrolu) byly infikovány identickým klonem.



Obr. 19 Vizualizace PCR produktů na 1% agarózovém gelu: (M) 100 bp marker, (1–19) testované vzorky



Obr. 20 Fragменты vzniklé RFLP ampliconů PCR za použití restričního enzymu *DdeI*: (M) marker, (1–14) testované vzorky *C. jejuni*

5. DISKUSE

5.1 POKUSY *in vitro*

5.1.1 Stanovení inhibiční koncentrace organických kyselin

Nabízí se několik metod pro stanovení antibakteriálního účinku různých sloučenin. V případě *Campylobacter jejuni* nebylo možné k sledování růstu plně využít postupy použité v minulosti (např. měření reziduální koncentrace glukózy v médiu nebo měření optické denzity [70], protože bakterie neutilizují glukózu a přidavkem mastných kyselin jsou média zakalená). Problém byl vyřešen vyvinutím selektivního kultivačního média bez přidavku krve, jehož základní složku (zdroj energie) tvoří kyselina L-glutamová. Inhibiční koncentrace OK byla stanovena měřením koncentrace bakteriálního proteinu v kultuře pomocí biuretové metody.

Obdržené výsledky ukazují rozdílnou inhibiční aktivitu testovaných organických kyselin vůči *C. jejuni* CCM 6214^T. Nejvýraznější antibakteriální aktivitu vůči této bakterii vykazovala kyselina kaprinová ($IC_{50} = 0,96$ mg/ml), následovaná kyselinou kaprylovou ($IC_{50} = 3,24$ mg/ml). Výsledky jsou ve shodě se studií, kterou prezentoval Thormar a Bergsson [72]. Tyto kyseliny při nízkých koncentracích inhibovaly také růst bakterií *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. a *Clostridium perfringens* [70], přičemž inhibiční účinek OK byl více patrný u *Cl. perfringens* (tj. u grampozitivní bakterie) než u bakterií gramnegativních. K obdobným závěrům dospěl také Bergsson a kol. [62], který testoval vliv MK na inhibici grampozitivních bakterií. Kaprinová kyselina byla jedinou kyselinou z testovaných MK, která vykazovala vysokou inhibiční aktivitu vůči všem kmenům *S. aureus*.

Antibakteriální účinek kyselin o určité (střední) délce řetězce naznačuje, že inhibice bude ovlivněna jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi. Obě kyseliny (C_8 a C_{10}) mají z hlediska antimikrobiálních vlastností zřejmé výhody oproti ostatním mastným kyselinám. Jsou částečně rozpustné ve vodě a přitom jsou dostatečně lipofilní, což usnadňuje průchod buněčnou membránou.

Slabá inhibice růstu *C. jejuni* byla obdržena také aplikací kyseliny fumarové, benzoové a kapronové, jejich IC_{50} se pohybovala v rozmezí 7,10–9,25 mg/ml. Zajímavý je účinek kyseliny fumarové, který při koncentraci okolo 10 mg/ml vykazoval antimikrobiální aktivitu, avšak při nízkých koncentracích se projevoval spíše růstově stimulační účinek. Obdobný účinek byl pozorován také u některých MK. Nieman [81] popisuje růstově stimulační efekt při aplikaci

nízkých koncentrací MK, přičemž stimulační vlastnosti vykazovaly převážně nenasycené MK s dlouhým řetězcem (C₁₈).

Ostatní testované kyseliny nevykazovaly žádnou nebo pouze mírnou inhibici. Slabý antibakteriální účinek těchto organických kyselin zřejmě souvisí s hodnotou pH média a disociovanou formou kyselin.

Inhibiční účinek kyseliny octové, propionové či citronové vůči *C. jejuni*, jak o něm informují někteří autoři [115, 116], nebyl v této práci pozorován. Rozdíly v dosažených výsledcích lze přičíst zejména rozdílným bakteriálním kmenům a odlišným experimentálními podmínkám.

5.1.2 Stanovení vlivu hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek organických kyselin

Antimikrobiální aktivita testovaných organických kyselin byla do značné míry ovlivněna hodnotou pH, výrazněji se projevovала v prostředí s vyšší aciditou. Tento závěr se shoduje s předchozími výzkumy na *E. coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens* [48, 117] a dalších patogenních bakteriích včetně *C. jejuni* [118].

Bakterie jako je *C. jejuni* nejsou schopny růstu při nízkých hodnotách intracelulárního pH a vysoká acidita prostředí je pro *C. jejuni* naprosto baktericidní [118]. Toto konstatování je zcela v souladu s výsledky získanými v rámci této práce, neboť při hodnotě pH média 2,4 byly počty bakteriálních buněk u všech testovaných kyselin pod detekčním limitem.

Nejvýraznější účinek ze všech testovaných kyselin vykazovala kyselina kaprinová a kaprylová. Aktivita kyseliny kaprinové byla natolik vysoká, že ani v případě aplikace nižších koncentrací nedošlo v prostředí blízkém neutrálnímu pH k jejímu snížení. Oproti tomu byl inhibiční účinek kyseliny kaprylové (c = 1 mg/ml) do značné míry ovlivněn hodnotou pH prostředí. Při hodnotě pH 6,5 byl obdržen poměrně nevýrazný pokles počtu bakteriálních buněk, zatímco v prostředí s hodnotou pH 4,5 byl účinek baktericidní.

Obdobně i u ostatních kyselin měla hodnota pH výrazný vliv na jejich aktivitu. Kyselina sorbová vykazovala při hodnotě pH 4,5 a koncentraci 5 mg/ml téměř baktericidní účinek, naopak při pH blízkém neutrálnímu byla inhibiční aktivita nízká, ale i přesto došlo k redukci o jeden řád.

Rovněž vyšší koncentrace kyseliny benzoové vykazovala při hodnotě pH média 4,5 baktericidní účinek. Zato aplikace stejné koncentrace v prostředí blízkém neutrálnímu nevykazovala statisticky výrazné snížení počtu buněk, to bylo obdrženo až prodloužením doby inkubace.

Inhibiční účinek kyseliny sorbové a benzoové vůči bakterii *C. jejuni* sledoval také Shin a kol. [115]. Aplikací těchto kyselin o finální koncentraci 10 mg/ml při hodnotě pH 5,5 a 6,5 klesly počty *C. jejuni* pod detekční limit. Výsledky této práce tedy korespondují s výše uvedenými.

Kyselina fumarová projevovala nejnižší antimikrobiální účinek z vybraných kyselin. Signifikantní inhibice růstu *C. jejuni* kys. fumarovou byla pozorována teprve v souvislosti s prodloužením doby inkubace (pH 4,5; c = 5 mg/ml).

Pozoruhodné je, že počty buněk *C. jejuni* ošetřené kyselinou fumarovou (c = 1 a 5 mg/ml) a kyselinou benzoovou (c = 1 mg/ml), se mírně zvýšily v průběhu inkubace. Nabízí se vysvětlení, že ošetřené buňky *C. jejuni* získaly částečnou odolnost k působení těchto kyselin, která mohla být zprostředkována efluxní pumpou. Snížení intracelulární koncentrace antimikrobiální látky je rozšířený mechanismus antibiotické rezistence u různých druhů bakterií [119].

Silnou závislost antibakteriálního účinku OK na hodnotě pH popisuje také Chaveerach a kol. [118]. Dle jejich výsledků počty buněk *C. jejuni* ošetřené kyselinou mravenčí, propionovou a octovou při pH prostředí 4,0 klesly pod detekční limit, kdežto při hodnotě pH 5,0 a 5,5 byly počty buněk *C. jejuni* redukovány o dva až tři řády.

Z výsledků je patrné, že inhibiční účinek OK je závislý na hodnotě pH a ustává při neutrální hodnotě pH. Naproti tomu vliv prodloužení doby inkubace na inhibiční účinek OK byl marginální. V případě působení kyseliny kaprinové na *C. jejuni* byla však inhibiční aktivita natolik výrazná, že hodnota pH média zde nehrála výraznou roli. Antimikrobiální působení ostatních kyselin však bylo do značné míry závislé na hodnotě pH (vyšší při nižším pH). Z těchto poznatků lze logicky usoudit, že v případě suplementace krmiv OK lze očekávat větší antibakteriální účinek v žaludku než v tenkém střevě, protože toto prostředí mimo jiné podporuje aktivní, nedisociovanou formu OK.

5.1.3 Stanovení antibakteriálního účinku molekulárně-biologickou metodou

Existuje několik metod pro hodnocení antibakteriálního účinku sledovaných látek. V rámci této disertační práce byly pro sledování účinku OK na bakterii *C. jejuni* zvoleny dvě stěžejní metody - unifikovaná metoda biuretové reakce a real-time PCR. Na základě dosažených výsledků lze konstatovat, že obě metody shodně vyhodnotily mastné kyseliny o střední délce řetězce jakožto nejúčinnější. Nicméně vzhledem k nízké biochemické aktivitě *C. jejuni* a poměrně náročné kultivaci této bakterie se zdá být metoda real-time PCR vhodnější. Tato molekulárně-biologická metoda umožňuje relativně rychlou,

velmi citlivou a specifickou detekci *C. jejuni*, což jsou podstatné důvody k jejímu upřednostnění.

Antimikrobiální aktivita testovaných kyselin vůči *C. jejuni* se ukázala být značně variabilní, důvodem může být omezená schopnost některých kyselin proniknout buněčnou stěnou při hodnotě pH 5,5 a 6,5. Nejvýraznější inhibiční aktivitu vykazovaly kyselina kaprylová, kaprinová a laurová (tj. mastné kyseliny o střední délce řetězce s 8, 10 a 12 atomy uhlíku). Tyto mastné kyseliny vykazovaly baktericidní účinek i za vyšší hodnoty pH prostředí. Citlivost *C. jejuni* k účinkům kyseliny kaprinové dokládají i snímky z transmisního elektronového mikroskopu, které demonstrují ztrátu integrity cytoplazmatické membrány a dezorganizaci cytoplazmy.

Rovněž na základě výsledků dalších publikovaných studií bývá mastným kyselinám o střední délce řetězce přisuzován největší antimikrobiální účinek z běžných organických kyselin. Tyto MK vykazují antimikrobiální aktivitu vůči širokému spektru bakterií. Podle studie Skřivanové a kol. [70], kyselina kaprylová a kaprinová inhibovala růst bakterií *Escherichia coli* a *Salmonella* sp., zatímco kyselina laurová inhibovala růst *Clostridium perfringens*. Studie publikovaná Kabara a kol. [73] rovněž vyhodnotila kys. laurovou jakožto neúčinnější z testovaných nasycených karboxylových kyselin vůči grampozitivním bakteriím. Další studie potvrzují větší vnímavost grampozitivních bakterií vůči působení MK než bakterií gramnegativních [62, 69].

Antibakteriální účinek kyselin o střední délce řetězce naznačuje, že inhibiční aktivita bude ovlivněna jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi [120]. K dosažení antibakteriálního účinku je nutné, aby daná kyselina byla natolik lipofilní, aby byla schopna adsorpce na buněčný povrch. Zároveň však musí být částečně rozpustná ve vodě. Tyto požadavky zřejmě nejlépe splňují kyseliny kaprylová, kaprinová, laurová a myristová (tj. kyseliny s C₈ - C₁₄).

Za pozornost stojí také antimikrobiální aktivita kyseliny olejové a fumarové. Kyselina olejová byla označena za látku, potlačující růst nežádoucí mikroflóry na drůbeží kůži [86].

Kyselina mléčná a citronová, které nacházejí významné uplatnění například při chemické dekontaminaci chlazené drůbeže, patřily mezi středně aktivní kyseliny. Jejich inhibiční aktivita, obdobně jako u dalších testovaných kyselin, byla podpořena nižší hodnotou pH.

Antibakteriální aktivita byla potvrzena i u monoacylglycerolů. Při nižším pH (5,5) byla inhibiční aktivita monokaprylinu i monokaprinu srovnatelná s aktivitou kys. kaprylové nebo kaprinové. Antibakteriální aktivitu MK a monoacylglycerolů vůči bakterii *C. jejuni* sledoval Thormar a kol. [82].

Výsledky této studie označily 1-monoacylglycerol kys. kaprinové za látku s nejvyšší inhibiční aktivitou. Monokaprin byl účinný vůči řadě humánních i veterinárních izolátů *C. jejuni*. V studii Nair a kol. [69] vykazoval monokaprylin inhibiční aktivitu vůči *Escherichia coli* a řadě gram pozitivních bakterií.

Vedle efektu inhibičního byl zaznamenán u některých organických kyselin také účinek stimulační. Tento efekt byl pozorován při aplikaci nízkých koncentrací (0,1 mg/ml) a pouze u některých kyselin (kys. citronová, fumarová, jablečná a jantarová). Sellars a kol. [121] publikoval výsledky, dle kterých kyselina fumarová v prostředí se sníženou tenzí kyslíku stimulovala růst *C. jejuni*. Tento nálezný vysvětluje tím, že kyselina sloužila jako alternativní příjemce elektronů. Zástupci rodu *Campylobacter* získávají energii z aminokyselin nebo meziproductů Krebsova cyklu, nefermentují ani neoxidují sacharidy. Proto určité OK ve vhodných koncentracích nemusí inhibovat, ale místo toho mohou stimulovat bakteriální růst [48, 122].

Klinický izolát *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21 byl méně vnímavý k působení organických kyselin, než sbírkový kmen *C. jejuni* CCM 6214^T.

Obdržené výsledky potvrzují, že antimikrobiální aktivita organických kyselin vůči bakterii *C. jejuni* je rozdílná a suplementace krmiv v některých případech může mít jen zanedbatelný význam. Z testovaných organických kyselin vykazuje potenciál inhibovat růst bakterií *C. jejuni*, v koncentracích jež jsou uplatnitelné také *in vivo*, zejména kyselina kaprylová, kaprinová a laurová.

5.1.4 Studium mechanismu účinku organických kyselin

Snímky z TEM ukazují změnu morfologie buněk *C. jejuni* CCM 6214^T ošetřených kyselinou kaprinovou a v menším rozsahu také kyselinou fumarovou. Zatímco u kontrolních vzorků (bez ošetření) buňky *C. jejuni* vykazovaly typickou morfologii (tj. zakřivené tyčky až spirálky), u vzorků ošetřených OK převládaly kokoidní formy. Opomenout nelze ani výrazné zvětšení periplazmatického prostoru a tendenci rozrušení integrity cytoplazmatické membrány. Obdobné výsledky publikovali také jiní autoři [123, 124, 125], podle nichž změna v kokoidní formu indikuje ztrátu integrity membrány, která představuje degenerativní změny charakteristické pro starší, hladovějící buňky nebo buňky vystavené stresu.

Dle výsledků této práce kyselina fumarová zvýšila permeabilitu vnější membrány, integrita membrán však zůstala zachovaná. Kyselina kaprinová neovlivnila membránovou permeabilitu, přesto dle snímků z transmisní

elektronové mikroskopie byly buňky *C. jejuni* poškozeny ve větším rozsahu než buňky ošetřené kyselinou fumarovou.

Tsuchido a kol. [126] naznačil, že lyze buněk *Bacillus subtilis* indukovaná mastnými kyselinami byla zapříčiněna spíše rozkladnými procesy vyvolanými autolytickými enzymy, nežli rozrušením buněčných membrán MK. Je tedy pravděpodobné (a výsledky této disertační práce tuto představu podporují), že organické kyseliny uplatňují jejich antimikrobiální účinky rozdílnými mechanismy.

Kyselina kaprinová a její monoacylglycerol vykazovaly v experimentech zaměřených na změny membránové permeability téměř shodnou odezvu. Lze tedy vyslovit hypotézu, že rovněž jejich mechanismy účinku by mohly být obdobné nebo založeny na blízkých principech.

5.2 POKUS *in vivo*

5.2.1 Experimentální infekce drůbeže

Omezení výskytu kampylobakterů v chovech drůbeže může mít pozitivní vliv na prevalenci *Campylobacter* sp. u drůbežích produktů a následně přispět k redukci incidence humánních kampylobakterióz. Byla stanovena hypotéza, dle které pokles počtů *C. jejuni* na jatečně upraveném těle o dva řády může přispět až k třicetinásobnému snížení výskytu humánní kampylobakteriózy [127]. Na základě tohoto předpokladu je nejvýznamnějším způsobem, jak omezit šíření infekce u lidí, zamezení kolonizace trávicího traktu brojlerů touto bakterií.

Záměrem experimentální infekce bylo zjistit, zda zvolené mastné kyseliny mohou zabránit infekci kuřat kampylobakterem, nebo ji alespoň částečně eliminovat. Pro *in vivo* testování byly zvoleny dvě formy mastných kyselin – volná forma a enkapsulovaná forma, s níž je spojován předpoklad prodloužení účinnosti MK při průchodu GIT drůbeže. Tento předpoklad byl potvrzen. Enkapsulovaná forma MK, oproti formě volné, signifikantně snížila počty *C. jejuni* v trusu brojlerů. Vyšší inhibiční účinek enkapsulované formy MK je také patrný ve vzorcích z jednotlivých částí trávicího traktu, nicméně rozdíl mezi účinkem enkapsulované a volné formy MK zde nebyl statisticky průkazný.

Možný mechanismus účinku MK na bakterii *C. jejuni* byl zmíněn již v literárním přehledu. Nejčastěji je uváděna představa chemiosmotická (tj., MK v nedisociované formě prochází do buňky, kde při hodnotě intracelulárního pH *ca* 7,2 uvolňuje proton, jehož export spotřebuje energii, která se pak nedostává k dalším účelům), nicméně je pravděpodobné,

že na redukci *C. jejuni* se podílejí také další mechanismy. MK mohou negativně ovlivnit vnější membránové funkce bakterie potřebné pro kolonizaci hostitelského organismu (např. snížení adheze) nebo mohou mít přímý inhibiční vliv na expresi faktorů virulence nezbytných pro kolonizaci [66, 128].

Experimentální infekce drůbeže ukázala, že testované MK nejeví růstově stimulační účinek, ale suplementace krmiv těmito MK do jisté míry ovlivňuje mikrobiální osídlení trávicího traktu drůbeže. Provedený experiment dále poukázal na skutečnost, že inhibiční účinek mastných kyselin se v distálních oddílech trávicího traktu snižuje. Z toho důvodu by bylo vhodné obdržet účinek enkapsulované formy MK doplnit o další synergický přístup zaměřený na stabilizaci zadní části GIT. V úvahu připadají zejména balastní látky, které se ve vysokém podílu dostanou až do tlustého střeva, kde jsou metabolizovány bifidobakteriemi a laktobacily. Na základě tohoto principu je podporována laktogenní mikroflóra, a tím snižováno riziko trávicích poruch bakteriálního původu [104, 129].

Suplementace krmiv 0,25 % MK neměla negativní vliv na základní parametry užítkovosti ani na mortalitu. V navazujících experimentech by bylo vhodné optimalizovat koncentraci aplikovaných kyselin tak, aby byl v ideálním případě zvýšen účinek OK a současně nedocházelo ke snížení příjmu krmiva.

Zaznamenala jsem pouze dvě studie zabývající se aplikací MK o střední délce řetězce do krmiv brojlerů za účelem snížení výskytu *Campylobacter* sp. Tyto studie v loňském roce publikoval Santos a kol. [128, 130]. Dospěl k závěru, že určité koncentrace kyseliny kaprylové mají potenciál snížit kolonizaci GIT drůbeže kamylobakterem. Jakožto nejvhodnější koncentraci vyhodnotil 0,7% kys. kaprylovou, vyšší koncentrace měly negativní vliv na příjem krmiva a užítkovost. Na rozdíl od této studie, kde byl sledován vliv přídatku MK do desátého dne věku kuřat, trval námi provedený experiment po celou dobu klasického výkrmu brojlerů (42 dnů). Tento přístup bezesporu poskytuje ucelenější obraz o vlivu přídatku MK na kolonizaci trávicího traktu brojlerů kamylobakterem a taky o základních parametrech užítkovosti, které nelze opomíjet. V druhé studii byla testována terapeutická suplementace krmiv po dobu 72 hodin před porážkou. Tento způsob aplikace kys. kaprylové o koncentraci 0,7 a 1,4 % snížil kolonizaci slepého střeva kamylobakterem o tři až čtyři řády.

Další nedávno publikovaná studie Van Deun a kol. [131] byla zaměřena na aplikaci MK s krátkým řetězcem. Dle jejich výsledků enkapsulovaná forma kyseliny máselné neuspěla v potlačení kamylobakterové infekce u drůbeže, přestože *in vitro* vykazovala baktericidní účinek vůči *C. jejuni*. Kyselina máselná v *in vitro* pokusech provedených v rámci této disertační práce

vykazovala slabý inhibiční účinek a z toho důvodu nebyla zvažována možnost její aplikace *in vivo*.

Účinek monokaprinu na eliminaci kampylobakterové infekce u drůbeže sledoval Hilmarsson a kol. [132]. Dle závěrů této studie přidavek monokaprinu do vody nebo krmiva dva až tři dny před porážkou drůbeže může signifikantně přispět ke snížení počtů *C. jejuni*. Na rozdíl od MK, může být překážkou rutinního využití monokaprinu jeho vysoká pořizovací cena.

Obdobné snahy použití organických kyselin lze nalézt také ve výživě prasat, kde vědecké práce dokládají snížení výskytu průmů enterotoxigenních kmenů *E. coli* a zvýšené přírůstky hmotnosti selat [56, 87]. Pozornost zasluhuje publikace Marounek a kol. [133], ve které bylo kromě růstově stimulačního efektu MK zaznamenáno také zpoždění vylučování oocyst kryptosporidií.

Zkoušen byl také vliv MK na růst a mortalitu brojlerových králíků. Přídavek kyseliny kaprylové v množství 5 g/kg granulovaného krmiva neměl významný vliv na přírůstky živé hmotnosti, statisticky významně však snížil úhyn králíků z 16,7 % na nulu [134]. Dle studie Skřivanové a kol. [135] suplementace krmiv kyselinou kaprylovou a monoacylglyceroly snížila u brojlerových králíků výskyt enteropatogení *E. coli* O103. OK tedy mohou nalézt uplatnění při náhradě antibiotik používaných k prevenci průjemových onemocnění zvířat po odstavu.

Organické kyseliny byly rovněž navrženy jako prostředek snižující kontaminaci povrchu jatečně opracované drůbeže patogeny [86]. Dekontaminace povrchových vrstev masa postřikem OK ovšem přichází v úvahu pouze za předpokladu, že OK neovlivňují negativně sensorické vlastnosti produktu.

Použití MK k suplementaci krmiv má dobré předpoklady být akceptováno jak producenty drůbeže a tak i zpracovateli, protože nemá negativní vliv na parametry užitkovosti, ani na mortalitu drůbeže. Navíc obě testované kyseliny jsou všeobecně považovány za bezpečné (GRAS) a v neposledí řadě jsou dostupné.

Výsledky této práce, obdobně jako další studie [128, 130] potvrzují potenciál MK o střední délce řetězce jakožto alternativy krmných aditiv, nicméně je nezbytné provést další experimenty zaměřené na srovnávací krmné a bilanční pokusy. Rovněž by bylo potřebné detailnější sledování vlivu přídatku MK na komensální střevní mikroflóru drůbeže.

6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Z poznatků shrnutých v literárním přehledu vyplývá, že zákaz používání krmných antibiotik v chovech hospodářských zvířat může negativně ovlivnit zdravotní stav zvířat s následným rizikem kontaminace produktů živočišné výroby enteropatogenními bakteriemi a tím zvýšit nebezpečí vzniku nemocí z potravin u lidí. Vzniklá situace vytváří potřebu hledat alternativní krmná aditiva, která by alespoň z části nahradila účinek antibiotik.

Cílem předkládané práce bylo sledování účinku vybraných organických kyselin na bakterii *Campylobacter jejuni*, která je nejčastější příčinou bakteriálních alimentárních infekcí v Evropské unii.

Přínos pro vědu:

- stanovení inhibičních koncentrací a objasnění vlivu dalších faktorů (pH, doba inkubace) na antimikrobiální účinek sledovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči bakterii *C. jejuni*
- bylo navrženo nové médium pro kultivaci *Campylobacter* spp. bez přídavku krve
- příspěvek k poznání mechanismu účinku organických kyselin a monoacylglycerolů, který není v současné době zcela objasněn
- ucelený podklad pro navazující studium antimikrobiálního účinku organických kyselin a jejich uplatnění jakožto náhrady krmných antibiotik
- výsledky disertační práce jsou a budou publikovány v odborném tisku, v mezinárodních vědeckých časopisech a prezentovány na tuzemských a zejména zahraničních vědeckých konferencích

Přínos pro praxi:

- průkaz možnosti náhrady krmných antibiotik organickými kyselinami a ověření v podmínkách experimentální infekce
- podklad pro kontrolu přenosu *Campylobacter* sp. z drůbeže na člověka - stanovení zásad používání organických kyselin jako alternativy krmných antibiotik s antimikrobiálním účinkem vůči *C. jejuni*

7. ZÁVĚR

Mapováním a prevencí alimentárních nákaz se zabývá mnoho vědeckých týmů po celém světě. Sledování antimikrobiálních vlastností nejrůznějších látek ještě získalo na aktuálnosti zákazem používání doplňkových látek ve výživě zvířat, který začal platit ve všech zemích Evropské unie od 1. ledna 2006.

V současné době je proto značná potřeba nalézt a zkoušet takové antimikrobiální látky, vůči nimž nejsou hygienické námitky, tj. nezanechávají rezidua ve tkáních a nedochází k přenosu rezistence mezi mikroorganismy a jejímu šíření v prostředí. Organické kyseliny, které jsou předmětem této práce, výše uvedené požadavky splňují.

Dosud dostupné studie neposkytují potřebný ucelený přehled o antibakteriálních účincích organických kyselin vůči *C. jejuni*. V publikovaných vědeckých pracích bylo zpravidla testováno pouze omezené množství organických kyselin. Situaci neulehčuje ani fakt, že experimenty byly provedeny za rozdílných podmínek. Z toho důvodu je pak následné srovnávání účinku testovaných látek velice složité, ne-li nemožné. Jeden z přínosů předkládané práce spočívá v nápravě tohoto nedostatku. V experimentech byla testována většina organických kyselin, které se uplatňují v potravinářství či krmivářství a které mají předpoklad inhibovat růst bakterií.

V rámci předložené disertační práce byly pro sledování inhibičních účinků organických kyselin na bakterii *C. jejuni* zvoleny dvě základní metody – unifikovaná metoda biuretové reakce a real-time PCR. Obě použité metody shodně vyhodnotily mastné kyseliny o střední délce řetězce, jakožto nejúčinnější. Nicméně řada studií, tuto nevyjímaje, shledává real-time PCR metodu jako relativně rychlou, velmi citlivou a se specifickou detekcí, což jsou podstatné důvody k její preferenci.

Antimikrobiální aktivita testovaných kyselin a monoacylglycerolů vůči *C. jejuni* se ukázala být značně variabilní. Nejvýraznější inhibiční aktivitu v *in vitro* pokusech prokázaly kyselina kaprylová, kaprinová a laurová (tj. kyseliny o střední délce řetězce s 8, 10 a 12 atomy uhlíku). Tyto mastné kyseliny vykazovaly baktericidní účinek bez ohledu na hodnotu pH prostředí. Citlivost *C. jejuni* k účinkům kyseliny kaprinové dokládají i snímky z transmisního elektronového mikroskopu. Antibakteriální účinek kyselin o střední délce řetězce naznačuje, že inhibiční aktivita bude ovlivněna jejich fyzikálně chemickými vlastnostmi.

Výraznou inhibiční aktivitu prokázaly také další kyseliny – myristová, olejová, fumarová a jablečná. Antibakteriální aktivita byla potvrzena i u monoacylglycerolů. Ostatní testované kyseliny patřily mezi středně aktivní

případně nevykazovaly inhibiči. Slabý antibakteriální účinek těchto organických kyselin zřejmě souvisí s hodnotou pH média a disociovanou formou kyselin.

Vedle efektu inhibičního byl u některých kyselin zaznamenán také účinek stimulační. Tento efekt byl pozorován pouze při aplikaci nízkých koncentrací kyselin, které jsou součástí Krebsova cyklu (tj. kys. citronová, fumarová, jablečná a jantarová).

Klinický izolát *C. jejuni* CAMP/VFU 612/21 byl méně vnímavý k působení organických kyselin, než sbírkový kmen *C. jejuni* CCM 6214^T.

Na základě výsledků experimentů ve kterých byl sledován vliv hodnoty pH a doby inkubace na inhibiční účinek lze potvrdit, že účinek organických kyselin je hodnotou pH ovlivněn do značné míry. Výrazněji se projevuje v prostředí s vyšší aciditou. Oproti tomu vliv prodloužení doby inkubace na inhibiční účinek kyselin byl marginální.

Součástí disertační práce byl také *in vivo* pokus – experimentální infekce drůbeže. Záměrem tohoto experimentu bylo zjistit, zda zvolené mastné kyseliny mohou zabránit infekci kuřat kampylobakterem, nebo ji alespoň částečně eliminovat. Pro *in vivo* testování byla vybrána kyselina kaprylová a kaprinová. Zvolené kyseliny byly aplikovány do krmiv ve volné nebo enkapsulované formě. Z výsledků je patrné, že enkapsulovaná forma mastných kyselin, oproti formě volné, významně snížila počty *C. jejuni*. Experiment dále poukázal na skutečnost, že inhibiční účinek mastných kyselin se v distálních oddílech trávicího traktu snižuje (a to i v případě enkapsulované formy). Z toho důvodu by bylo vhodné obdrženy účinek enkapsulované formy doplnit o další synergický přístup zaměřený na stabilizaci mikroflóry zadní části GIT.

Výsledky *in vivo* experimentu potvrzují potenciál mastných kyselin o střední délce řetězce jakožto alternativy stávajících krmných aditiv. Jejich použití k suplementaci krmiv má dobré předpoklady být akceptováno jak producenty drůbeže a tak i zpracovateli, protože nemá negativní vliv na základní parametry užitkovosti, ani na mortalitu drůbeže. Navíc obě testované kyseliny jsou všeobecně považovány za bezpečné (GRAS) a v neposlední řadě mají přijatelnou pořizovací cenu.

Předložená disertační práce poskytuje podklady pro kontrolu přenosu *Campylobacter* sp. z drůbeže na člověka. Dle obdržených výsledků se organické kyseliny řadí vedle probiotik, rostlinných extraktů a bakteriocinů mezi alternativy krmných antibiotik, jejichž používání bylo nařízením Evropského parlamentu a rady č. 1831/2003 zakázáno.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 1998–2001* [online]. Zprávy Centra epidemiologie a mikrobiologie, Státní zdravotní ústav Praha, 2009 [cit. 2009-08-11]. Dostupné z <<http://www.szu.cz/publikace/data/infekce-v-cr>>.
- [2] ON, S.L.W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: Current status, future prospects and immediate concerns. *J. Appl. Microbiol.* 2001, vol. 90, p. 1S-15S.
- [3] VANDAMME, P., DEWHIRST, F.E., PASTER, B.J., ON, S.L.W. Genus *Campylobacter*. In GARRITY, G.M.(ed) *Bergey's manual of systematic bacteriology, Volume two: The Proteobacteria*. 2nd Ed. New York: Springer Science Business Media, Inc., 2005, p. 1147-1160. ISBN-10: 0-387-24145-0.
- [4] CHOWDHURY, M. A. R., RAVEL, J., HILL, R. T., HUQ, A., COLWELL, R. R. Physiology and molecular genetics of viable but nonculturable microorganisms. In *Biotechnology Risk Assessment: USEPA/USDA Environment Canada, University of Maryland, College Park, Maryland*. 1994, p. 105-122.
- [5] SNELLING, W. J., MATSUDA, M., MOORE, J.E., DOOLEY, J.S.G. Under the microscope - *Campylobacter jejuni*. *Lett. Appl. Microbiol.* 2005, vol. 41, no. 4, p. 297-302.
- [6] MOORE, J.E., CORCORAN, D., DOOLEY, J.S.G., FANNING, S., LUCEY, B., MATSUDA, M., MCDOWELL, D.A., MEGRAUD, F., MILLAR, B.C., O'MAHONY, R., O'RIORDAN, L., O'ROURKE, M., RAO, J.R., ROONEY, P.J., SAILS, A., WHYTE, P. *Campylobacter*. *Vet. Res.* 2005, vol. 36, no. 3, p. 351-382.
- [7] PARKER, C.T., MILLER, W.G., HORN, S.T., LASTOVICA, A.J. Common genomic features of *Campylobacter jejuni* subsp *doylei* strains distinguish them from *C. jejuni* subsp. *jejuni*. *BMC Microbiol.* 2007, vol. 7, no. 50, 9 p.
- [8] *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007* [online]. EFSA, 2009 [cit. 2009-08-11]. Dostupné z <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902269834.htm>.
- [9] BUTZLER, J.P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clin. Microbiol. Infect.* 2004, vol. 10, no. 10, p. 868-876.

- [10] HUMPHREY, T., O'BRIEN, S., MADSEN, M. Campylobacters as zoonotic pathogens: A food production perspective. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, vol. 117, no. 3, p. 237-257.
- [11] JACOBS-REITSMA, W. *Campylobacter* in the food supply. p. 467-481. In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [12] FRIEDMAN, C. R., NEIMANN, J., WEGENER, H. C., TAUXE, R.V. Epidemiology of *Campylobacter jejuni* infections in the United States and other industrialized nations. p. 121-138 In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [13] MANDRELL, R.E., HARDEN, L.A., BATES, A., MILLER, W.G., HADDON, W.F., FAGERQUIST, C.K. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2005, vol. 71, no. 10, p. 6292-6307.
- [14] VELLINGA, A., VAN LOOCK, F. The dioxin crisis as experiment to determine poultry-related *Campylobacter* enteritid. *Emerg. Infect. Dis.* 2002, vol. 8, no. 1, p. 19-22.
- [15] SKIRROW, M. B., BLASER, M. J. Clinical aspects of *Campylobacter* infection. p. 69-88. In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [16] NACHAMKIN, I. ALLOS, B.M., HO, T.W. *Campylobacter jejuni* infection and the association with Guillain-Barré syndrome. p. 155-175. In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [17] PADUNGTON, P., KANEENE, J.B. *Campylobacter* spp. in human, chickens, pigs and their antimicrobial resistance. *J. Vet. Med. Sci.* 2003, vol. 65, no. 2, p. 161-170.
- [18] BEERY, J.T., HUGDAHL, M.B., DOYLE, M.P. Colonization of gastrointestinal tracts of chicks by *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 1988, vol. 54, no. 10, p. 2365-2370.
- [19] CORRY, J.E.L., ATABAY, H.I. Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2001, vol. 90, p. 96S-114S.
- [20] JONES, F.T., AXTELL, R.C., RIVES, D.V., SCHEIDELER, S.E., TARVER, F.R., WALKER, R.L., WINELAND, M.J. A survey

- of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing systems. *J. Food Prot.* 1991, vol. 54, no. 4, p. 259-262.
- [21] KEENER, K.M., BASHOR, M.P. CURTIS, P.A., SHELDON, B.W., KATHARIOU, S. Comprehensive review of *Campylobacter* and poultry processing. *Compr. Rev. Food. Sci. Food Saf.* 2004, vol. 3, no. 2, p. 105-116.
- [22] NEWELL, D.G., SHREEVE, J.E., TOSZEGHY, M., DOMINGUE, G., BULL, S., HUMPHREY, T., MEAD, G. Changes in the carriage of *Campylobacter* strains by poultry carcasses during processing in abattoirs. *Appl. Environ. Microbiol.* 2001, vol. 67, no. 6, p. 2636-2640.
- [23] STEINHAUSEROVÁ, I. *Campylobacter sp. v prostředí a v potravinách živočišného původu*. 1st ed. Brno: Vydavatelství potravinářské literatury. 1998, 112 p., ISBN 80-900260-5-2.
- [24] EVANS, S.J., SAYERS, A.R. A longitudinal study of *Campylobacter* infection of broiler flocks in Great Britain. *Prev. Vet. Med.* 2000, vol. 46, no. 3, p. 209-223.
- [25] BOŘILOVÁ, G., SVOBODOVÁ, I., STEINHAUSEROVÁ, I., GALLAS, L. Výskyt vybraných intestinálních patogenů u jatečných kuřat. *Veterinářství*. 2008, vol. 58, p. 721-725.
- [26] *Czech Republic – Trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in humans, foodstuffs, animals and feedingstuffs in 2007* [online]. EFSA, 2009 [cit. 2009-08-11]. Dostupné z <http://www.efsa.europa.eu/cs/BlobServer/DocumentSet/Czech_Republic_2007.pdf?ssbinary=true>.
- [27] HEUER, O.E., PEDERSEN, K., ANDERSEN, J.S., MADSEN, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, vol. 33, no. 4, p. 269-274.
- [28] BERRANG, M.E., DICKENS, J.A. Presence and level of *Campylobacter* spp. on broiler carcasses throughout the processing plant. *J. Appl. Poult. Res.* 2000, vol. 9, no. 1, p. 43-47.
- [29] BERRANG, M.E., NORTHCUTT, J.K., DICKENS, J.A. The contribution of airborne contamination to *Campylobacter* counts on defeathered broiler carcasses. *J. Appl. Poult. Res.* 2004, vol. 13, no. 1, p. 1-4.
- [30] HERMAN, L., HEYNDRICKX, M., GRIJSPEERDT, K., VANDEKERCHOVE, D., ROLLIER, I., DE ZUTTER, L. Routes for *Campylobacter* contamination of poultry meat: Epidemiological

- study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiol. Infect.* 2003, vol. 131, no. 3, p. 1169-1180.
- [31] KOTULA, A.W., STERN, N.J. The importance of *Campylobacter jejuni* to the meat industry: A review. *J. Anim. Sci.* 1984, vol. 58, no. 6, p. 1561-1566.
- [32] WILLIS, W.L., MURRAY, C. *Campylobacter jejuni* seasonal recovery observations of retail market broilers. *Poult. Sci.* 1997, vol. 76, no. 2, p. 314-317.
- [33] STERN, N. J. Influence of season and refrigerated storage on *Campylobacter* spp. contamination of broiler carcasses. *J. Appl. Poult. Res.* 1995, vol. 5, no. 3, p. 235-238.
- [34] GEORGSSON, F., PORKESSON, A.E., GEIRSDOTTIR, M., REIERSEN, J., STERN, N.J. The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.* 2006, vol. 23, no. 7, p. 677-683.
- [35] LAKE, R.J., BAYNE, G., CRESSEY, P., HUDSON, J.A., VAN DER LOGT, P. Quantitative risk model: *Campylobacter* in poultry in New Zealand. *Zoonoses Public Health.* 2007, vol. 54, p. 15-15.
- [36] FROST, J.A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *J. Appl. Microbiol.* 2001, vol. 90, p. 85S-95S.
- [37] SOLOMON, E.B., HOOVER, D.G. *Campylobacter jejuni*: A bacterial paradox. *J. Food Saf.* 1999, vol. 19, no. 2, p. 121-136.
- [38] MURPHY, C., CARROLL, C. JORDAN, K.N. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *J. Appl. Microbiol.* 2006, vol. 100, no. 4, p. 623-632.
- [39] *The community summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006* [online]. EFSA, 2009. [cit. 2009-08-12]. Dostupné z <http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1178671312912.htm>.
- [40] *Konsensus používání antibiotik III – Chinolony*. Vypracováno členy Subkomise pro antibiotickou politiku a Komise pro lékovou politiku a kategorizaci léčiv ČLS JEP. Farmakoterapeutické informace. 2006, vol. 12, p. 1-4. ISSN 1211-0647.
- [41] TRIEBER, C., TAYLOR, D.E. Mechanisms of antibiotics resistance in *Campylobacter*. p. 441-454. In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J.

- (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000. 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [42] SMITH, K.E., BENDER, J.B., OSTERHOLM, M.T. Antimicrobial resistance in animals and relevance to human infections. p. 483-495. In NACHAMKIN, I., BLASER, M.J. (eds) *Campylobacter*. 2nd ed. Washington, D. C.: ASM Press, 2000, 545 p. ISBN: 1-55581-165-5.
- [43] BARDON, J., KOLAR, M., CEKANOVA, L., HEJNAR, P., KOUKALOVA, D. Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses Public Health*. 2009, vol. 56, no. 3, p. 111-116.
- [44] WEGENER, H.C., AARESTRUP, F.M., GERNER-SMIDT, P., BAGER, F. Transfer of antibiotic resistant bacteria from animals to man. *Acta Vet. Scand.* 1999. vol. 92, p. 51-57.
- [45] DIBNER, J.J., RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poult. Sci.* 2005, vol. 84, no. 4, p. 634-643.
- [46] NAŘÍZENÍ EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY (ES) č. 1831/2003, ze dne 22. září 2003, o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat. *Úř. Věst.* 2003, L 268, p. 29.
- [47] FISCHEROVÁ, J. Antibiotické stimulatory růstu zakázány. *Krmivářství*. 2006, vol. 1, p. 18.
- [48] HSIAO, C.P., SIEBERT, K.J. Modeling the inhibitory effects of organic acids on bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, vol. 47, no. 3, p. 189-201.
- [49] CANIBE, N., ENGBERG, R.M., JENSEN, B.B. An overview of the effect of organic acids on gut flora and gut health. In Alternatives to feed antibiotics and coccidiostats in pigs and poultry meat production: proceedings of the workshop AFAC, 13-16 October, 2001 Oslo, Norway [cit. 2009-08-11] Dostupné z <<http://www.afac.slu.se/Workshop%20Norge/Proceedings%20Oslo.html>>.
- [50] DIBNER, J.J., BUTTIN, P. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *J. Appl. Poult. Res.* 2002, vol. 11, no. 4, p. 453-463.
- [51] OJO, O.O., FALEGAN, C.R., FEMI-ALA, T.O., NWOBI, C.D. Evaluation of antimicrobial activities of some organic acids on bacteria. *Discov. Innov.* 2005, vol. 17, no. 1-2, p. 22-26.

- [52] CANAS-RODRIGUEZ, A., SMITH, H. W. The identification of the antimicrobial factors of the stomach contents of sucking rabbits. *Biochem. J.* 1966, vol. 100, no. 1, p. 79-82.
- [53] KYZLINK, V. Teoretické základy konzervace potravin. 1. vyd. Praha: SNTL, 1998, 512 p.
- [54] BRUL, S., COOTE, P. Preservative agents in foods - Mode of action and microbial resistance mechanisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1999, vol. 50, no. 1-2, p. 1-17.
- [55] RICKE, S.C. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. *Poult. Sci.* 2003, vol. 82, no. 4, p. 632-639.
- [56] DIERICK, N.A., DECUYPERE, J.A., MOLLY, K., VAN BEEK, E., VANDERBEKE, E. The combined use of triacylglycerols (TAGs) containing medium chain fatty acids (MCFAs) and exogenous lipolytic enzymes as an alternative to nutritional antibiotics in piglet nutrition - II. *In vivo* release of MCFAs in gastric cannulated and slaughtered piglets by endogenous and exogenous lipases; effects on the luminal gut flora and growth performance. *Livest. Prod. Sci.* 2002, vol. 76, no. 1-2, p. 1-16.
- [57] PRESSER, K.A., RATKOWSKY, D.A., ROSS, T. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, vol. 63, no. 6, p. 2355-2360.
- [58] PADAN, E., ZILBERSTEIN, D., SCHULDINER, S. pH homeostasis in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1981, vol. 650, no. 2-3, p. 151-166.
- [59] EKLUND, T. The antimicrobial effect of dissociated and undissociated sorbic acid at different pH level. *J. Appl. Bacteriol.* 1983, vol. 54, no. 3, p. 383-389.
- [60] CHERRINGTON, C.A., HINTON, M. MEAD, G.C., CHOPRA, I. Organic acids: Chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Adv. Microb. Physiol.* 1991, vol. 32, p. 87-108.
- [61] GAUTHIER, R. D. V. M. Organic acids and essential oils, a realistic alternative to antibiotic growth promoters in poultry. I Forum Internacional de Avicultura 17-19 August, 2005 Foz do Iguacu, Brazil [cit. 2009-08-11] Dostupné z <<http://www.jefo.ca/pdf/avicola/AnaisAveExpo-R.Gauthier.pdf>>.

- [62] BERGSSON, G., ARNFINNSSON, J., STEINGRIMSSON, O., THORMAR, H. Killing of Gram-positive cocci by fatty acids and monoglycerides. *APMIS*. 2001, vol. 109, no. 10, p. 670-678.
- [63] AXE, D.D., BAILEY, J.E. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, vol. 47, no. 1, p. 8-19.
- [64] FREESE, E., SHEU, C.W., GALLIERS, E. Function of Lipophilic Acids as Antimicrobial Food Additives. *Nature*. 1973, vol. 241, no. 5388, p. 321-325.
- [65] RUSSELL, J.B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. *J. Appl. Bacteriol.* 1992, vol. 73, no. 5, p. 363-370.
- [66] VAN IMMERSEEL, F., DE BUCK, J., BOYEN, F., BOHEZ, L., PASMANS, F., VOLF, J., SEVCIK, M., RYCHLIK, I., HAESEBROUCK, F., DUCATELLE, R. Medium-chain fatty acids decrease colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens with *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, vol. 70, no. 6, p. 3582-3587.
- [67] GANTOIS, I., DUCATELLE, R., PASMANS, F., HAESEBROUCK, F., HAUTEFORT, I., THOMPSON, A., HINTON, J.C., VAN IMMERSEEL, F. Butyrate specifically down-regulates *Salmonella* pathogenicity island 1 gene expression. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, no. 1, p. 946-949.
- [68] COUTELLE, C. H., SCHEWE, T. Fattsäuren und Monoglyceride aus Homogenaten von Froscheiern und Kaulquappere als Hemmstoffe der Atmungskette. *Acta. Biol. Med. Germ.* 1970, vol. 25, p. 47-63.
- [69] NAIR, M.K.M., JOY, J., VASUDEVAN, P., HINCKLEY, L., HOAGLAND, T.A., VENKITANARAYANAN, K.S. Antibacterial effect of caprylic acid and monocaprylin on major bacterial mastitis pathogens. *J. Dairy Sci.* 2005, vol. 88, no. 10, p. 3488-3495.
- [70] SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BENDA, V., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. and *Clostridium perfringens* to organic acids and monolaurin. *Vet. Med.* 2006, vol. 51, no. 3, p. 81-88.
- [71] SOFOS, J.N., BUSTA, F.F. Antimicrobial activity of sorbate. *J. Food Prot.* 1981, vol. 44, no. 8, p. 614-622.
- [72] THORMAR, H., BERGSSON, G. Antimicrobial effects of lipids. *Recent Devel. Antiviral Res.* 2001, vol. 1, p. 157-173.

- [73] KABARA, J.J., SWIECZKOWSKI, D.M., CONLEY, A.J., TRUANT, J.P., Fatty acids and derivatives as antimicrobial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1972, vol. 2, no. 1, p. 23-28.
- [74] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I.* 2. vyd. Tábor: OSSIS, 2002. 344 p. ISBN 80-86659-00-3.
- [75] OUATTARA, B., SIMARD, R.E., HOLLEY, R.A., PIETTE, G.J.P., BEGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, vol. 37, no. 2-3, p. 155-162.
- [76] MCGAW, L.J., JAGER, A.K., VAN STADEN, J. Antibacterial effects of fatty acids and related compounds from plants. *S. Afr. J. Bot.* 2002, vol. 68, no. 4, p. 417-423.
- [77] GALBRAIT, H., MILLER, T.B. Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *J. Appl. Bacteriol.* 1973, vol. 36, no. 4, p. 659-675.
- [78] CHERRINGTON, C.A., HINTON, M. CHOPRA, I. Effect of short chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 1990, vol. 68, no. 1, p. 69-74.
- [79] HARFOOT, C.G., CROUCHMAN, M.L., NOBLE, R.C., MOORE, J.H. Competition between food particles and rumen bacteria in uptake of long-chain fatty acids and triglycerides. *J. Appl. Bacteriol.* 1974, vol. 37, no. 4, p. 633-641.
- [80] MACZULAK, A. E., DEHORITY, B. A., PALMQUIST, D. L. Effects of long-chain fatty acids on growth of rumen bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 1981, vol. 42, no. 5, p. 856-862.
- [81] NIEMAN, C. Influence of trace amounts of fatty acids on the growth of microorganisms. *Bacteriol. Rev.* 1954, vol. 18, no. 2, p. 147-163.
- [82] THORMAR, H., HILMARSSON, H., BERGSSON, G. Stable concentrated emulsions of the 1-monoglyceride of capric acid (monocaprin) with microbicidal activities against the food-borne bacteria *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2006, vol. 72, no. 1, p. 522-526.
- [83] BRANEN, A.L., DAVIDSON, P.M, KATZ, B. Anti-microbial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technol.* 1980, vol. 34, no. 5, p. 42-50.

- [84] WANG, L.L., JOHNSON, E.A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. *Appl. Environ. Microbiol.* 1992, vol. 58, no. 2, p. 624-629.
- [85] SPRONG, C.R., HULSTEIN, F.E., VAN DER MEER, R. Bactericidal activities of milk lipids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001, vol. 45, no. 4, p. 1298-1301.
- [86] HINTON, A., INGRAM, K.D. Use of oleic acid to reduce the population of the bacterial flora of poultry skin. *J. Food Protect.* 2000, vol. 63, no. 9, p.1282-1286.
- [87] TSILOYIANNIS, V.K., KYRIAKIS, S.C., VLEMMAS, J., SARRIS, K. The effect of organic acids on the control of porcine post-weaning diarrhoea. *Res. Vet. Sci.* 2001, vol. 70, no. 3, p. 287-293.
- [88] PARTANEN, K.H., MROZ, Z. Organic acids for performance enhancement in pig diets. *Nutr. Res. Rev.* 1999, vol. 12, no. 1, p. 117-145.
- [89] WINDISCH, W.M., GOTTERBARM, G.G., ROTH, F.X. Effect of potassium diformate in combination with different amounts and sources of excessive dietary copper on production performance in weaning piglets. *Arch. Anim. Nutr.-Arch. Tierernahr.* 2001, vol. 54, no. 2, p. 87-100.
- [90] VOGT, H., MATTHES, S., HARNISCH, S., RISTIC, M. Fumaric acid in broiler rations. *Arch. Geflugelkd.* 1979, vol. 43, no. 2, p. 54-60.
- [91] PATTEN, J.D., WALDROUP, P.W. Use of organic acids in broiler diets. *Poult. Sci.* 1988, vol. 67, no. 8, p. 1178-1182.
- [92] SKINNER, J.T., IZAT, A.L., WALDROUP, P.W. Research note: Fumaric acid enhances performance of broiler chickens. *Poult. Sci.* 1991, vol. 70, no. 6, p. 1444-1447.
- [93] RUNHO, R.C., SAKOMURA, N.K., KUANA, S., BANZATTO, D., JUNQUEIRA, O.M., STRINGHINI, J.H. Use of an organic acid (fumaric acid) in broiler rations. *Rev. Soc. Bras. Zootecn.* 1997. vol. 26, no. 6, p. 1183-1191.
- [94] HUMPHREY, T.J., LANNING, D.G. The vertical transmission of *Salmonellas* and formic acid treatment of chicken feed – a possible strategy for control. *Epidemiol. Infect.* 1988, vol. 100, no. 1, p. 43-49.
- [95] VOGT, H., MATHES, S., HARNISCH, S. The effect of organic acids on the performances of broilers. *Arch. Geflugelkd.* 1982, vol. 46, no. 5, p. 223-227.

- [96] AL-TARAZI, Y.H., ALSHAWABKEH, K. Effect of dietary formic and propionic acids on *Salmonella pullorum* shedding and mortality in layer chicks after experimental infection. *J. Vet. Med. Ser. B-Infect. Dis. Vet. Public Health*. 2003, vol. 50, no. 3, p. 112-117.
- [97] PADGETT, T., HAN, I.Y., DAWSON, P.L. Effect of lauric acid addition on the antimicrobial efficacy and water permeability of corn zein films containing nisin. *J. Food Process Preserv.* 2000, vol. 24, no. 5, p. 423-432.
- [98] GRIGGS, J.P., JACOB, J.P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. *J. Appl. Poult. Res.* 2005, vol. 14, no. 4, p. 750-756.
- [99] LEE, K.W., EVERTS, H., KAPPERT, H.J., FREHNER, M., LOSA, R., BEYNEN, A.C. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. *Br. Poult. Sci.* 2003, vol. 44, no. 3, p. 450-457.
- [100] IJI, P.A., TIVEY, D.R. Natural and synthetic oligosaccharides in broiler chicken diets. *Worlds Poult. Sci. J.* 1998, vol. 54, no. 2, p. 129-143.
- [101] CHAMBERS, J.R., SPENCER, J.L., MODLER, H.W. The influence of complex carbohydrates on *Salmonella typhimurium* colonization, pH, and density of broiler ceca. *Poult. Sci.* 1997, vol. 76, no. 3, p. 445-451.
- [102] PIVA, A. Non-conventional feed additives. *J. Anim. Feed Sci.* 1998, vol. 7, p. 143-154.
- [103] OYARZABAL, O.A., CONNER, D.E. *In vitro* fructooligosaccharide utilization and inhibition of *Salmonella* spp. by selected bacteria. *Poult. Sci.* 1995, vol. 74, no. 9, p. 1418-1425.
- [104] PATTERSON, J.A., ORBAN, J.I., SUTTON, A.L., RICHARDS, G.N. Selective enrichment of bifidobacteria in the intestinal tract of broilers by thermally produced kestoses and effect on broiler performance. *Poult. Sci.* 1997, vol. 76, no. 3, p. 497-500.
- [105] BOLTON, F.J., COATES, D., HUTCHINSON, D.N. The ability of *Campylobacter* media supplements to neutralize photochemically induced toxicity and hydrogen-peroxide. *J. Appl. Bacteriol.* 1984, vol. 56, no. 1, p. 151-157.
- [106] POTTURI-VENKATA, L.P., BACKERT, S., LASTOVICA, A.J., VIEIRA, S.L., NORTON, R.A., MILLER, R.S., PIERCE, S., OYARZABAL, O.A. Evaluation of different plate media for direct cultivation of *Campylobacter* species from live broilers. *Poult. Sci.* 2007, vol. 86, no. 7, p. 1304-1311.

- [107] HERBERT, D., PHIPPS, P.J., STRANGE, R.E. Chemical analysis of microbial cells. p. 209-344. In NORRIS, J.R., RIBBONS, D.W. (eds) *Methods in Microbiology*, vol. 5B. London: Academic Press, 1971. ISBN: 0-12-5215452.
- [108] NOGVA, H.K., BERGH, A., HOLCK, A., RUDI, K. Application of the 5'-nuclease PCR assay in evaluation and development of methods for quantitative detection of *Campylobacter jejuni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, vol. 66, no. 9, p. 4029-4036.
- [109] NAM, H.M., SRINIVASAN, V., MURINDA, S.E., OLIVER, S.P. Detection of *Campylobacter jejuni* in dairy farm environmental samples using SYBR green real-time polymerase chain reaction. *Foodborne Pathog. Dis.* 2005, vol. 2, no. 2, p. 160-168.
- [110] BOOKOUT, A.L., MANGELSDORF, D.L. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. *Nucl. Recept. Signal.* 2003, vol. 1, no. e012, p. 1-7.
- [111] OHMIZO, C., YATA, M., KATSU, T. Bacterial cytoplasmic membrane permeability assay using ion-selective electrodes. *J. Microbiol. Meth.* 2004, vol. 59, no. 2, p. 173-179.
- [112] YASUDA, K., OHMIZO, C., KATSU, T. Potassium and tetraphenylphosphonium ion-selective electrodes for monitoring changes in the permeability of bacterial outer and cytoplasmic membranes. *J. Microbiol. Meth.* 2003, vol. 54, no. 1, p. 111-115.
- [113] NACHAMKIN, I., BOHACHICK, K., PATTON, C.M. Flagellin gene typing of *Campylobacter jejuni* by restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993, vol. 31, no. 6, p. 1531-1536.
- [114] DENMAN, S.E., MCSWEENEY, CH.S. Quantitative (real-time) PCR. p. 105-115. In MAKKAR, H.P.S., MCSWEENEY, CH.S. (ed) *Methods in Gut Microbial Ecology for Ruminants*. Netherlands: Springer, 2005, 225 p. ISBN: 978-1-4020-3790-0.
- [115] SHIN, S-Y., HWANG, H-J., KIM, W.J. Inhibition of *Campylobacter jejuni* in chicken by ethanol, hydrogen peroxide, and organic acids. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2001, vol. 11, no. 3, p. 418-422.
- [116] KIM, W.J., SHIN, S.Y., HWANG, H.J. Inhibitory effects of acetic acid and temperature on growth of *Campylobacter jejuni* ATCC 33291. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2001, vol. 11, no. 6, p. 934-939.

- [117] SKŘIVANOVÁ, E., SAVKA, O.G., MAROUNEK, M. *In vitro* effect of C₂ - C₁₈ fatty acids on salmonellas. *Folia Microbiol.* 2004, vol. 49, no. 2, p. 199 – 202.
- [118] CHAVEERACH, P., KEUZENKAMP, D.A., URLINGS, H.A.P., LIPMAN, L.J.A., VAN KNAPEN, F. *In vitro* study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. *Poult. Sci.* 2002, vol. 81, no. 5, p. 621-628.
- [119] WILLIAMS, J.B. Drug efflux as a mechanism of resistance. *Br. J. Biomed. Sci.* 1996, vol. 53, no. 4, p. 290-293.
- [120] GALBRAITH, H., MILLER, T.B., PATON, A.M. THOMPSON, J.K. Antibacterial activity of long chain fatty acids and the reversal with calcium, magnesium, ergocalciferol and cholesterol. *J. Appl. Bacteriol.* 1971, vol. 34, no. 4, p. 803-813.
- [121] SELLARS, M.J., HALL, S.J., KELLY, D.J. Growth of *Campylobacter jejuni* supported by respiration of fumarate, nitrate, nitride, trimethylamine-N-oxide, or dimethyl sulfoxide requires oxygen. *J. Bacteriol.* 2002, vol. 184, no. 15, p. 4187-4196.
- [122] HINTON, A. Growth of *Campylobacter* on media supplemented with organic acids. *J. Food Protect.* 2006, vol. 69, no. 1, p. 34-38.
- [123] BUCK, G.E., PARSHALL, K.A., DAVIS, C.P. Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*. *J. Clin. Microbiol.* 1983, vol. 18, no. 2, p. 420-421.
- [124] TANGWATCHARIN, P., CHANTHACHUM, S., KHOPAIBOOL, P., GRIFFITHS, M.W. Morphological and physiological responses of *Campylobacter jejuni* to stress. *J. Food Prot.* 2006, vol. 69, no. 11, p. 2747-2753.
- [125] NG, L-K., SHERBURNE, R., TAYLOR, D.E., STILES, M.E. Morphological forms and viability of *Campylobacter* species studied by electron microscopy. *J. Bacteriol.* 1985, vol. 164, no. 1, p. 338-343.
- [126] TSUCHIDO, T., HIRAOKA, T., TAKANO, M. SHIBASAKI, I. Involvement of autolysin in cellular lysis of *Bacillus subtilis* induced by short-chain and medium-chain fatty acids. *J. Bacteriol.* 1985, vol. 162, no. 1, p. 42-46.
- [127] ROSENQUIST, H., NIELSEN, N.L., SOMMER, H.M., NORRUNG, B. CHRISTENSEN, B.B. Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, vol. 83, no. 1, p. 87-103.

- [128] DE LOS SANTOS, F.S., DONOGHUE, A.M., VENKITANARAYANAN, K., REYES-HERRERA, I., METCALF, J.H., DIRAIN, M.L., AGUIAR, V.F., BLORE, P.J., DONOGHUE, D.J. Therapeutic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chicks. *Appl. Environ. Microbiol.* 2008, vol. 74, no. 14, p. 4564-4566.
- [129] RADA, V., DUŠKOVÁ, D., MAROUNEK, M., PETR, J. Enrichment of bifidobacteria in the hen caeca by dietary inulin. *Folia Microbiol.* 2001, vol. 46, no. 1, p. 73-75.
- [130] DE LOS SANTOS, F.S., DONOGHUE, A.M., VENKITANARAYANAN, K., DIRAIN, M.L., REYES-HERRERA, I., BLORE, P.J., DONOGHUE, D.J. Caprylic acid supplemented in feed reduces enteric *Campylobacter jejuni* colonization in ten-day-old broiler chickens. *Poult. Sci.* 2008, vol. 87, no. 4, p. 800-804.
- [131] VAN DEUN, K., HAESEBROUCK, F., VAN IMMERSEEL, F., DUCATELLE, R., PASMANS, F. Short-chain fatty acids and L-lactate as feed additives to control *Campylobacter jejuni* infections in broilers. *Avian Pathol.* 2008, vol. 37, no. 4, p. 379-383.
- [132] HILMARSSON, H., THORMAR, H., THRAINSSON, J.H., GUNNARSSON, E. Effect of glycerol monocaprate (monocaprin) on broiler chickens: An attempt at reducing intestinal *Campylobacter* infection. *Poult. Sci.* 2006, vol. 85, no. 4, p. 588-592.
- [133] MAROUNEK, M., SKŘIVANOVÁ, E., SKŘIVANOVÁ, V. A note on the effect of caprylic acid and triacylglycerols of caprylic and capric acid on growth rate and shedding of coccidia oocysts in weaned piglets. *J. Anim. Feed Sci.* 2004, vol. 13, no. 2, p. 269-274.
- [134] SKŘIVANOVÁ, V., MAROUNEK, M. Effects of caprylic acid on performance and mortality of growing rabbits. *Acta Vet. Brno.* 2002, vol. 71, no. 4, p. 435-439.
- [135] SKŘIVANOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M. Effects of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Vet. Microbiol.* 2008, vol. 126, no. 4, p. 372-376.

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1	Fylogenetický strom jednotlivých druhů rodu <i>Campylobacter</i> odvozený na základě podobnosti sekvence 16S rRNA.....	08
Obr. 2	Dynamika výskytu kampylobakteriózy a salmonelózy v ČR v letech 1999 – 2008.....	11
Obr. 3	Schematické znázornění mechanismu účinku organických kyselin na bakterie	25
Obr. 4	Snímky transmisní elektronové mikroskopie streptokoka skupiny B	26
Obr. 5	Umístění specifického primeru v genomu <i>C. jejuni</i> NCTC 11168... ..	39
Obr. 6	Rozdělení pokusných skupin.....	44
Obr. 7	Struktura <i>in vivo</i> pokusu	47
Obr. 8	Růstová křivka <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T , kultivace v médium podle Prestona při 37 °C za mikroaerobních podmínek.....	51
Obr. 9	Růstová křivka <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T , kultivace v médiu s kyselinou glutamovou při 37 °C za mikroaerobních podmínek.....	51
Obr. 10	Křivka tání pro kmen <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T	58
Obr. 11	Křivka tání pro kmen <i>C. jejuni</i> CAMP/VFU 612/21.....	58
Obr. 12	Gelová elektroforéza PCR produktů	59
Obr. 13	Transmisní elektronová mikroskopie buněk <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T ..	63
Obr. 14	Kalibrační křivka pro draslíkovou iontově selektivní elektrodu.....	64
Obr. 15	Kalibrační křivka pro TPP ⁺ iontově selektivní elektrodu.....	64
Obr. 16	Změny koncentrace K ⁺ a TPP ⁺ iontů měřené pomocí ISE.....	65
Obr. 17	Standardní křivka pro absolutní kvantifikaci (metoda real-time PCR)	66
Obr. 18	Experimentální infekce: křivka tání pro kmen <i>C. jejuni</i> CAMP/VFU 612/21.....	66
Obr. 19	Vizualizace PCR produktů na 1% agarózovém gelu	71
Obr. 20	Fragmenty vzniklé RFLP amplikonů PCR za použití restričního enzymu <i>DdeI</i>	71

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Diagnostické znaky termotolerantních druhů <i>Campylobacter</i> sp....	10
Tab. 2	Průměrné počty <i>Campylobacter</i> sp. (\log_{10} CFU/g kůže v okolí kloaky) ze dvou sledovaných jatek.....	17
Tab. 3	Citlivost klinického izolátu k vybraným antibiotikům.....	33
Tab. 4	Seznam půd použitých k selektivní izolaci bakterií rodu <i>Campylobacter</i>	34
Tab. 5	Seznam testovaných nasycených karboxylových kyselin.....	35
Tab. 6	Seznam testovaných nenasycených karboxylových kyselin.....	35
Tab. 7	Seznam testovaných hydroxykarboxylových kyselin.....	35
Tab. 8	Seznam testovaných 1-monoacylglycerolů.....	36
Tab. 9	Složení pomnožovacího média s kyselinou L-glutamovou.....	36
Tab. 10	Specifické primery určené pro detekci <i>C. jejuni</i>	39
Tab. 11	Komponenty supermixu.....	39
Tab. 12	Technické údaje pro použité iontově selektivní elektrody.....	42
Tab. 13	Složení startérové směsi (g/kg).....	45
Tab. 14	Složení dokrmové směsi (g/kg).....	46
Tab. 15	Použité primery pro PCR typizaci.....	50
Tab. 16	Srovnání IC_{50} testovaných organických kyselin na bakterii <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T	52
Tab. 17	Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml) <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T po 5 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH.....	54
Tab. 18	Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml) <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T po 10 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH.....	55
Tab. 19	Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml) <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T po 20 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH.....	56
Tab. 20	Počty živých buněk (\log_{10} CFU/ml) <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T po 30 min inkubaci s vybranými organickými kyselinami při rozdílných hodnotách pH.....	57

Tab. 21	Inhibiční koncentrace (IC ₅₀) testovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči bakterii <i>C. jejuni</i> CCM 6214 ^T	60
Tab. 22	Inhibiční koncentrace (IC ₅₀) testovaných organických kyselin a monoacylglycerolů vůči klinickému izolátu <i>C. jejuni</i> CAMP/VFU 612/21.....	61
Tab. 23	Počty bakterií (log ₁₀ CFU/g) <i>Campylobacter jejuni</i> v trusu brojlerů (analýzy provedené po infekci klinickým izolátem <i>C. jejuni</i> CAMP/VFU 612/21).....	67
Tab. 24	Vliv suplementace krmiv MK na počty bakterií (log ₁₀ CFU/g) <i>Campylobacter jejuni</i> v jednotlivých částech trávicího traktu.....	68
Tab. 25	Vliv suplementace krmiv MK na počty bakterií (log ₁₀ CFU/g) <i>Lactobacillus</i> v jednotlivých částech trávicího traktu.....	68
Tab. 26	Vliv suplementace krmiv MK na počty koliformních bakterií (log ₁₀ CFU/g) v jednotlivých částech trávicího traktu	69
Tab. 27	Vliv suplementace krmiv MK na základní parametry užitkovosti...	70
Tab. 28	Vliv suplementace krmiv MK na intenzitu růstu brojlerů ROSS 308.....	70

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AMP	ampicilin
ATB	antibiotika
ATP	adenosintrifosfát
a_w	vodní aktivita
bp	počet nukleotidů či párů bází
C_{10}	kyselina kaprinová
C_8	kyselina kaprylová
CCM	Česká sbírka mikroorganismů
CFU	počet jednotek tvořících kolonie
CIP	ciprofloxacín
CMP	chloramfenikol
C_t	prahový detekční cyklus
CTAB	cetyltrimethylamonium bromid
$C_{x:y}$	mastná kyselina s x počty uhlíků a y počtu dvojných vazeb
DdeI	restrikční enzym
DL	detekční limit
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
E	efektivita amplifikace
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ERY	erytromycin
FDA	úřad pro kontrolu potravin a léků v USA
flaA	gen kódující flagelin
GEN	gentamicin
GIT	gastrointestinální trakt
GRAS	Všeobecně považovaný za bezpečný
IC_{50}	polovina maximální inhibiční koncentrace
ISE	iontově selektivní elektrody
K^+	ionty draslíku
K_a	disociační konstanta kyseliny
KS	krmná směs
log	dekadický logaritmus
MAG	monoacylglycerol
MCFA	mastné kyseliny o střední délce řetězce
MK	mastná kyselina
NAL	kyselina nalidixová
OK	organické kyseliny
P	hladina významnosti
PCR	polymerázová řetězová reakce

pH	vodíkový potenciál
pK _a	log ₁₀ K _a
R ²	korelační koeficient
real-time PCR	kvantitativní PCR v reálném čase
RFLP	délkový polymorfismus restrikčních fragmentů
SD	standardní odchylka
TEM	transmisní elektronová mikroskopie
TET	tetracyklin
TPP	tetrafenylfosfonium
WHO	Světová zdravotnická organizace

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Publikace v odborných časopisech mezinárodních

DOLEŽALOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z., BUŇKA, F., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Effect of organic acids on growth of chilled chicken skin microflora. *J. Food Saf.* 2009, in press. (manuscript ID: JFS-Dec-08-OA-0248.R1)

SKŘIVANOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., SKŘIVANOVÁ, V., MAROUNEK, M. Inhibitory activity of rabbit milk and medium-chain fatty acids against enteropathogenic *Escherichia coli* O128. *Vet. Microbiol.* 2009, vol. 135, no. 3-4, p. 358-362.

VLKOVÁ, E., RADA, V., TROJANOVÁ, I., KILLER, J., ŠMEHILOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z. Occurrence of bifidobacteria in faeces of calves fed milk or a combined diet. *Arch. Anim. Nutr.* 2008, vol. 62, no. 5, p. 359-365.

SKŘIVANOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M. Effect of caprylic acid and triacylglycerols of both caprylic and capric acid in rabbits experimentally infected with enteropathogenic *Escherichia coli* O103. *Vet. Microbiol.* 2008, vol. 126, no. 4, p. 372-376.

Publikace v oponentním řízení

MOLATOVÁ, Z., SKŘIVANOVÁ, E., MACIAS, B., MCEWAN, N.R., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to organic acids and monoacylglycerols. *Folia Microbiol.*

Přehled ostatních publikací uchazečky

MOLATOVÁ, Z., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Termofilní *Campylobacter* – (ne)známá bakterie? *Potravinářská Revue.* 2009, no. 4, p. 16-19.

TOMÁNKOVÁ, E., RADA, V., ŠMEHILOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z. Výskyt bifidobakterií v trávicím traktu telat v závislosti na složení krmné dávky. *Náš chov.* 2008, vol. 68, p. 87-90.

SAMEK, R., MOLATOVÁ, Z., HARTMANOVÁ, L. Rise of the Czech food sector. *Czech Focus.* Magazine of the Association for Foreign Investment. 2006, no. 2, p. 2-5.

AKTIVNÍ ÚČAST NA KONFERENCÍCH

Aktivní účast na mezinárodních konferencích

19th ECCMID – European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Helsinki, Finland, 2009

MOLATOVÁ, Z., SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BŘEZINA, P. *In vitro* susceptibility of *Campylobacter jejuni* to organic acids and monoacylglycerols. Conference proceedings, p. 111.

poster, publikovaný abstrakt

SKŘIVANOVÁ, E., MATĚNOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M. A note on the effect of medium-chain fatty acids on arcobacters. Conference proceedings, p. 112.

poster, publikovaný abstrakt

Food Micro – the 21st International ICFMH Symposium “Envolving Microbial Food Quality and Safety”, Aberdeen, UK, 2008

MOLATOVÁ, Z., MACIAS, B., SKŘIVANOVÁ, E., MCEWAN., N. R. MAROUNEK, M. Application of quantitative real-time PCR for evaluation of susceptibility of *Campylobacter jejuni* to fatty acids. Conference proceedings, p. 329.

poster, publikovaný abstrakt

6th INRA-RRI Symposium, Gut Microbiome – Functionality, Interaction with the Host and Impact on the Environment, Clermont-Ferrand, France, 2008

SKŘIVANOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., MATĚNOVÁ, M., SKŘIVANOVÁ, V. Susceptibility of arcobacters to organic acids. Conference proceedings, p. 96-97.

poster, publikovaný abstrakt

14th International Workshop on Campylobacter, Helicobacter and Related Organisms. Rotterdam, The Netherlands, 2007

SKŘIVANOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M., BŘEZINA, P. *In vitro* effect of fatty acids on *Campylobacter jejuni*. *Zoonoses Public Health*. 2007, vol. 54, p. 122-123.

poster, publikovaný abstrakt

5th International Symposium of Anaerobic Microbiology. Ljubljana-Domžale, Slovenia, 2007

MOLATOVÁ, Z., SKŘIVANOVÁ, E., MAROUNEK, M., BŘEZINA, P. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* to organic acids. Conference proceedings, p.19.

přednáška, publikovaný abstrakt

Aktivní účast na domácích konferencích a seminářích

XVIII. Tomáškovy dny - konference mladých mikrobiologů, Brno, 2009

MOLATOVÁ, Z., SKŘIVANOVÁ, E., BŘEZINA, P., MAROUNEK, M. Antibakteriální účinek vybraných organických kyselin na bakterii *Campylobacter jejuni*. Sborník XVIII. Tomáškovy dny, p. 31-32.

přednáška, publikovaný abstrakt

58. sjezd Asociací českých a slovenských chemických společností, Ústí nad Labem, 2006

JANALÍKOVÁ, M., LUKÁŠKOVÁ, E., MOLATOVÁ, Z., ŠTEKLOVÁ, V., MAROUNEK, M. Aplikace organických kyselin na povrch chlazené drůbeže a jejich vliv na mikroflóru. *Chem. Listy*. vol. 100, p. 735, ISSN 0009-2770.

poster, publikovaný abstrakt

XV. Tomáškovy dny - konference mladých mikrobiologů, Brno, 2006

JANALÍKOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M. Inhibice bakteriální flóry povrchu chlazených kuřat kyselinou citronovou. Sborník XV. Tomáškovy dny, p. 18-19.

poster, publikovaný abstrakt

Bezpečnost' a kontrola potravin, Nitra, 2006

JANALÍKOVÁ, M., MOLATOVÁ, Z., MAROUNEK, M., ČECHOVÁ, L., KRAMÁŘOVÁ, D. Testování účinků kyseliny citronové na mikroflóru povrchu chlazených kuřat. Sborník Bezpečnost' a kontrola potravin, p. 340-343, ISBN 80-8069-682-9.

poster, publikovaný abstrakt