

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky



Mikrobiologická kvalita krmiv pro psy

Diplomová práce

Autor práce: Bc. Klára Vlčková

Obor studia: Výživa zvířat a dietetika

Vedoucí práce: prof. Ing. Eva Vlková, Ph.D.

© 2018 ČZU v Praze

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že svou diplomovou práci na téma "Mikrobiologická kvalita krmiv pro psy" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího diplomové práce a s použitím odborné literatury a dalších informačních zdrojů, které jsou citovány v práci a uvedeny v seznamu literatury na konci práce. Jako autorka uvedené diplomové práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13. dubna 2018

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala své vedoucí práce prof. Ing. Evě Vlkové, Ph.D. a Ing. Romanovi Švejtilovi za odborné rady, trpělivost a čas, který mi věnovali při tvorbě této práce. Poděkování patří také mé rodině, která mě po celou dobu ve studiu podporovala.

Mikrobiologická kvalita krmiv pro psy

Souhrn

V posledních letech bylo zaznamenáno několik případů nákazy člověka salmonelou prostřednictvím psa a pamlsků živočišného původu jim určených. Z tohoto důvodu je třeba věnovat zvýšenou pozornost mikrobiologické kvalitě krmiv pro psy.

Cílem mé diplomové práce bylo testovat přítomnost mikroorganismů, zejména bakterií v krmivech a krmných doplňcích pro psy. Hypotézou je, že krmiva a doplňky, které se při výrobě nesterilují, budou obsahovat živé mikroorganismy. Při výrobě těchto produktů jsou používány živočišné bílkoviny, a tak lze očekávat i výskyt hnilobných bakterií, jakými jsou například *Salmonella* sp., *Escherichia coli* a další.

Praktická část mé práce se zabývá testováním suchých granulovaných krmiv, sušených masových pochoutek a konzervy určené psům. Pomocí kultivačních metod byly stanoveny celkové počty mikroorganismů a počty bacilů, klostridií a enterokoků. Kvalitativně byla stanovena ne/přítomnost salmonel dle ČSN EN ISO 6579 (2003). Zjištěné mikroorganismy byly izolovány a dále identifikovány pomocí hmotnostního spektrometru MALDI - TOF. Nejlépe v našem testu dopadlo konzervované krmivo, které bylo sterilní tak, jak požadují veterinární a hygienické normy. O něco horších výsledků dosáhly sušené krmné doplňky a nejhůře dopadla sušená granulovaná krmiva. Nejčastějším kontaminantem detekovaným pomocí MALDI - TOF byla bakterie *Bacillus cereus*.

Legislativa EU v současné době neuvádí limity pro patogenní bakterie, pouze uvádí, že krmiva nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro zdraví zvířete. Přítomnost *Bacillus cereus* může takové riziko představovat.

Klíčová slova: krmiva pro psy, mikroorganismy, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*

Microbiological quality of dog feed mixtures

Summary

In recent years, several human cases of *Salmonella* infection have been reported through the dog and animal goodies, that are intended for them. For this reason it is necessary to pay attention to the microbiological quality of dog food.

The aim of my diploma thesis is to test the presence of microorganisms, especially bacteria, in feed and dog food supplements. The hypothesis is that feedstuffs and supplements, that are not sterilized during the production, will contain live microorganisms. There are animal proteins used in the production of these products so it can be expected, that there will be the presence of spoilage bacteria such as *Salmonella* sp., *Escherichia coli* and others.

The practical part of my work deals with the testing of dry granulated feeds, dried meat products and can food that is intended for dogs. The total number of microorganisms and the numbers of bacilli, clostridia, and enterocci were determined using the cultivation methods. According to ČSN EN ISO 6579 standard (2003) the presence/absence of *Salmonella* was determined qualitatively. Detected microorganisms were isolated and further identified by MALDI – TOF mass spectrometer.

The best result had the canned fodder in our test, that was sterile as it is required by veterinary and hygienic standards. The dried fodder supplements were slightly worse. The dried granulated feed was the worst. *Bacillus cereus* was the most common contaminant detected by MALDI – TOF.

EU legislation currently doesn't set limits for pathogenic bacteria. It just mentions that feed must not contain microorganisms or their toxins or metabolites in quantities that present an unacceptable risk to the animal health. The presence of *Bacillus cereus* may present such a risk.

Keywords: dog food, microorganisms, *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*

Obsah

1 Úvod.....	1
2 Hypotéza a cíl práce	2
3 Literární rešerše.....	3
3.1 Trávicí soustava psa a mikrobiologie trávení.....	3
3.2 Druhy krmiv pro psy	5
3.3 Technologie výroby a zpracování	6
3.4 Mikrobiologie krmiv	10
3.4.1 Mikroorganismy.....	10
3.4.2 Bakterie	11
3.4.3 Redukce patogenu	21
3.5 Probiotika	24
4 Metodika	26
4.1 Testovaný materiál	26
4.2 Postup mikrobiologického rozboru	27
4.2.1 Kultivační média.....	27
4.2.2 Příprava vzorků.....	29
4.2.3 Příprava ředící řady.....	29
4.2.4 Očkování vzorků.....	29
4.2.5 Kultivace	30
4.2.6 Identifikace mikroorganismů	31
4.2.7 Výpočet CFU a statistické šetření.....	31
5 Výsledky	33
5.1 Vyhodnocení kultivace.....	33
5.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF.....	34
5.3 Mikroskopické pozorování.....	35
6 Diskuze.....	37
7 Závěr	41
8 Použitá literatura	42

1 Úvod

Jedním z cílů každého chovatele by mělo být zdravé zvíře v dobré kondici. Zdraví psa může být ovlivněno faktory vnitřními i vnějšími. Jedním z vnějších faktorů je i výživa.

Komerčně vyráběná krmiva pro psy se dělí dle obsahu vody na suchá, polovlhká a vlhká. Dalším specifickým druhem krmiva, který se v posledních letech těší velké oblibě, je syrová potrava, která se označuje jako BARF. Ať už se chovatel rozhodne pro jakoukoliv z těchto možností, důležité je především dbát na kvalitu a zdravotní nezávadnost předkládané potravy.

I přes to, že komerční výroba krmiv pro psy podléhá velmi přísným hygienickým normám, objeví se čas od času v Systému rychlého varování pro potraviny a krmiva RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) zpráva o nalezení patologických mikroorganismů v testovaných krmivech či krmných doplňcích. Vzhledem k hrozícímu nebezpečí přenosu nákazy alimentárními cestami na člověka, zejména pak malé děti, je snaha o maximální zachycení takto kontaminovaných krmiv a jejich včasnou likvidaci.

2 Hypotéza a cíl práce

Hypotézou je, že krmiva a doplňky, které se při výrobě nesterilují, budou obsahovat živé mikroorganismy. Protože při výrobě těchto produktů jsou používány živočišné bílkoviny, lze očekávat i výskyt patogenních bakterií. Cílem této práce je testovat přítomnost mikroorganismů, zejména bakterií v krmivech a krmných doplňcích pro psy.

3 Literární rešerše

3.1 Trávicí soustava psa a mikrobiologie trávení

Bhadra (2014) ve své publikaci uvádí, že potravní preference dospělých savců jsou z velké části ovlivňovány genetickými predispozicemi. Jedním z příkladů je chuť mateřského mléka. Tato chuť ovlivní mládě natolik, že v dospělosti preferuje typ potravy, kterým se stravovala jeho matka. Ačkoli divocí psi předci byli masožravci, vlivem domestikace se pes dokázal adaptovat na život ve společnosti člověka a postupem času se z něj stal všežravec, jak je dokázáno mnoha genetickými analýzami. Pokud má však možnost volby, vždy volí jako první potravu s nejintenzivnější vůní masa.

Trávicí soustava slouží k příjmu potravy, jejímu rozmělnění, zpracování a následnému vstřebání živin a transportu tráveniny. Důležitou součástí trávicího systému jsou také žlázy, které produkují látky podílející se společně se střevní mikroflórou na procesu trávení. Jsou uloženy ve stěně trávicí trubice i mimo ni (Lukáš et al., 2005). Trávicí soustava psů je přizpůsobena pro příjem koncentrované potravy. Jejím charakteristickým znakem je jednoduchý žaludek a krátký střevní trakt (Stevans et Hume, 2004).

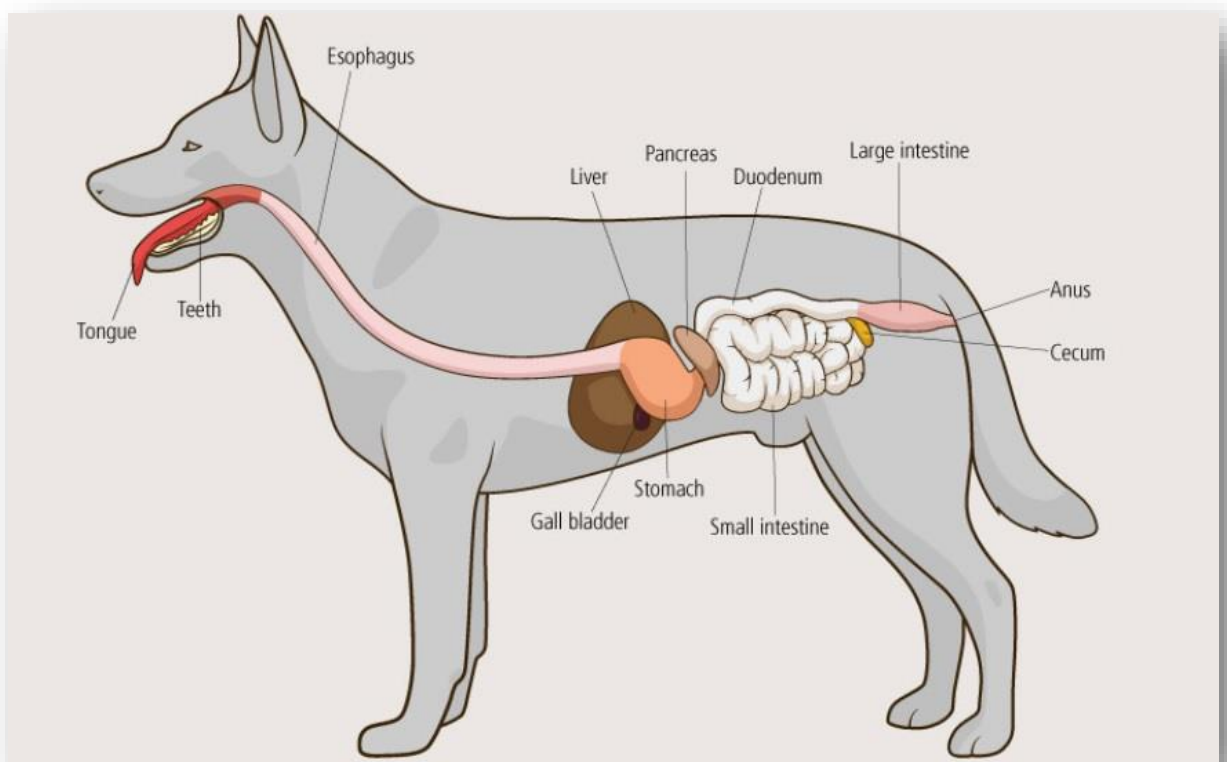
Základem trávicí soustavy je trávicí trubice, k níž náleží ústní dutina, hltan, jícn, žaludek a střeva. Do trávicí trubice kromě drobných žláz, uložených v její stěně, ústí velké žlázy, jako jsou slinné žlázy, játra a slinivka břišní.

Ústní dutina rostrálně začíná ústy, po stranách je ohraničena tvářemi, strop tvoří patro a ke spodině je připojen jazyk, který ji vyplňuje. Pysky ohraničují ústní štěrbinu a spolu s ní tvoří ústa (Marvan et al., 2011). Jazyk je svalový orgán složený ze snopců příčně pruhované svaloviny. Sliznice jazyka vybíhá ve výběžky, zvané papily. Podle tvaru rozlišujeme papily nitkovité, houbovitě, listovité a hrazené (Martínek et Vacek, 2009). Ve sliznici jazyka se nachází chuťový a hmatový orgán (Marvan et al., 2011). Proces trávení je kombinací několika za sebou jdoucích dějů. Jedná se o mechanické, chemické a mikrobiální štěpení složitých látek na látky jednodušší, které je následně tělo schopno efektivně využít. Celý tento složitý proces začíná již v ústní dutině. Při příjmu potravy jsou produkovány sliny ze čtyř párových slinných žláz. Psí sliny jsou slabě zásadité a jejich pH se pohybuje v rozmezí 7,34 - 7,80 (National Research Council, 2006). Slouží především k rozmělnění a zvlhčení potravy (Kalvach et al., 2004). Psi, jako mnoho dalších druhů zvířat, nemají alfa amylázu, která by jim umožnila štěpení škrobu (National Research Council, 2006). Zuby jsou vysoce specializované a mají různé tvary, slouží kromě ukusování a drcení potravy také jako prostředek komunikace

ve smečce. Mléčný chrup psa tvoří 28 zubů, dospělého 42 zubů (Evans et de Lahunta, 2013). Šelmy mají tzv. trhákový komplex, který tvoří P4 v horní čelisti a M1 v dolní čelisti. Tyto mohutné zuby, jak už název napovídá, slouží k trhání masa (Niemiec, 2011). Hltan je společnou částí pro trávicí a dýchací soustavu. Dělí se na tři části: nosní, ústní a hrtanovou část (Evans et Lahunta, 2013). Psí hltan je široký a dlouhý (Najbrt et al., 1980). Potrava z hltanu se dále posouvá do jícnu, který tvoří příčně pruhovaná svalovina, ta podporuje svými stahy rychlejší průchod potravy do žaludku. Přesun sousta z ústní dutiny do žaludku trvá jen pouhých pár sekund (National Research Council, 2006). Pes má jednoduchý jednodukomorový žaludek. Ten slouží masožravcům jako rezervoár potravy. Dochází v něm k rozmělnění a promísení potravy s žaludečními šťávami a ke štěpení bílkovin (Aspinall et Capello, 2015). Vnitřní povrch žaludku pokrývá sliznice s různými typy žaludečních žlázek. Oblast sliznice žaludku zahrnuje prostor sliznice česla (kardia), vlastní žaludeční sliznici a oblast vrátníku (pyloru). Žaludeční žlázy obsahují buňky hlavní, krycí a vedlejší. Buňky hlavní produkují pepsinogen (neaktivní formu pepsinu), krycí buňky kyselinu chlorovodíkovou a vedlejší buňky slabě zásaditý hlen, který stěnu žaludku chrání před natrávením. Pylorické žlázy produkují hormon gastrin. Žaludeční šťáva psovitých je velmi kyselá a její pH se pohybuje od 0,8 do 1,0. Vyprazdňování žaludku začíná 30 - 60 minut po nakrmení. Zcela vyprázdněn je za 6 - 8 hodin po nakrmení (Šebková, 2010). Dále na žaludek navazuje tenké střevo, které začíná vrátníkem a ústí do tlustého střeva. Dělí se na tři úseky: dvanáctník, lačník a kyčelník (Dylevský, 2009). Tenké střevo má v procesu trávení a vstřebávání stěžejní úlohu (Kittnar, 2011). Osidlují ho v hojném množství bakterie. Ve dvanáctníku a lačníku převažují streptokoky a laktobacily, v kyčelníku najdeme *Escherichii coli* a anaerobní bakterie. Tyto bakterie zabraňují osídlení střeva patogenními mikroorganismy (National Research Council, 2006). Nalevo od ohbí dvanáctníku je uložena slinivka břišní nebo-li pankreas, která je nepostradatelná pro fyziologické trávení sacharidů, bílkovin i tuků. Jedná se o poměrně malý, nepárový orgán, který má vnitřní i vnější sekreční činnost (Vránová, 2013). Pankreatická šťáva je neutrální až zásaditá tekutina o pH 7,0 až 8,6 (Šebková, 2010). Největší žlázou v těle jsou játra. Ta produkují žluč, která ústí ze žlučníku do dvanáctníku a emulguje tuky (Reece, 2011). Žlučník psa je velmi dobře vyvinutý, u velkých plemen se za den může vyloučit až 250 ml žluči. Její pH se pohybuje od 5,33 do 7,08 (Šebková, 2010). Dalším úsekem trávicí trubice je tlusté střevo, které se skládá ze slepého střeva, tračníku a konečníku. U psa je poměrně krátké a jeho primární úlohou je resorbce vody a elektrolytů. Dále vytváří optimální prostředí pro střevní mikroflóru (National Research Council, 2006). Natrávená potrava, která po průchodu tenkým střevem vyžaduje další fermentační trávení, vstupuje do slepého střeva. U

psa je však na rozdíl od býložravců slepé střevo vyvinuto pouze velmi slabě. Kaudálně na něj navazuje tračník, který se rozděluje na vzestupný, příčný a sestupný. Posledním úsekem trávicí trubice je konečník, který je zakončen řitním otvorem (Reece, 2011). Jaber (2012) považuje psí exkrementy za velmi nebezpečné prekurzory patogenních bakterií, především *Escherichie coli* a *Salmonelly*. Jak ukázala jeho studie, tyto bakterie kontaminují zejména půdy lokálních zahrádkářů. Hrozí tedy riziko přenosu patogenních bakterií například do hlávkového salátu nebo jiných plodin.

Obrázek 1: Trávicí soustava psa



<http://www.elmoskitchen.com/dogs-digestive-system/>

3.2 Druhy krmiv pro psy

Průmyslová krmiva pro domácí zvířata se začala vyrábět přibližně před 150 lety. Do té doby se psi živili převážně zbytky od stolu nebo lovem. První nápad dostal v roce 1860 Američan James Spratt, který připlul do Anglie prodávat světelné vodiče (Taranushenko, 2010). Když vystoupil z lodi, tak viděl, jak psi na molu dostávají zbylé suchary z lodí a napadlo ho, že by se mohly vyrábět suchary speciálně pro ně. První sušenky pro psy tvořily

rozdrcené cereálie a zelenina, spojená s masem a krví (Prahl, 2004). V roce 1885 si nechal James Spratt ve Velké Británii registrovat společnost s názvem Spratt's Patent Limited. Svou pozornost věnoval zejména vyvážené stravě, kvalitě použitých surovin a chutnosti krmiva. Napsal knihu, která popisovala technologie výroby krmiv a nutriční potřeby psa (Taranushenko, 2010).

V současné době se chovatelé často veterinárních lékařů a výživových specialistů ptají, čím by měli krmit svého psa (Thompson, 2008). Psi krmiva jsou živočišného původu a proto je zde riziko kontaminace *Salmonellou*, *Escherichii coli* a jinými patogenními bakteriemi (MA Leaders, 2012). Jedním z nejdůležitějších požadavků je rozhodně bezpečnost krmiva (Zicker, 2008). Z tohoto hlediska je nejdůležitější nejprve dobře porozumět jednotlivým komponentům a jejich zpracování. V současné době je výroba krmiv do jisté míry regulována Zákonem č. 91/1996 Sb., o krmivech (Thompson, 2008).

Komerčně vyráběná krmiva pro psy lze rozdělit dle vlhkosti a způsobu zpracování do tří základních kategorií - na suchá, polovlhká a vlhká krmiva. Z celkové nabídky na trhu převažují krmiva suchá (Hand et al. 2010). Obsah vody u suchých krmiv je přibližně 7 - 12 % u vlhkého krmiva je to až 78 % (Case, 2013). Předností suchých krmiv oproti jiným je dobrá skladovatelnost a příznivá cena, což ocení zejména chovatelé velkých plemen nebo větší chovatelské stanice.

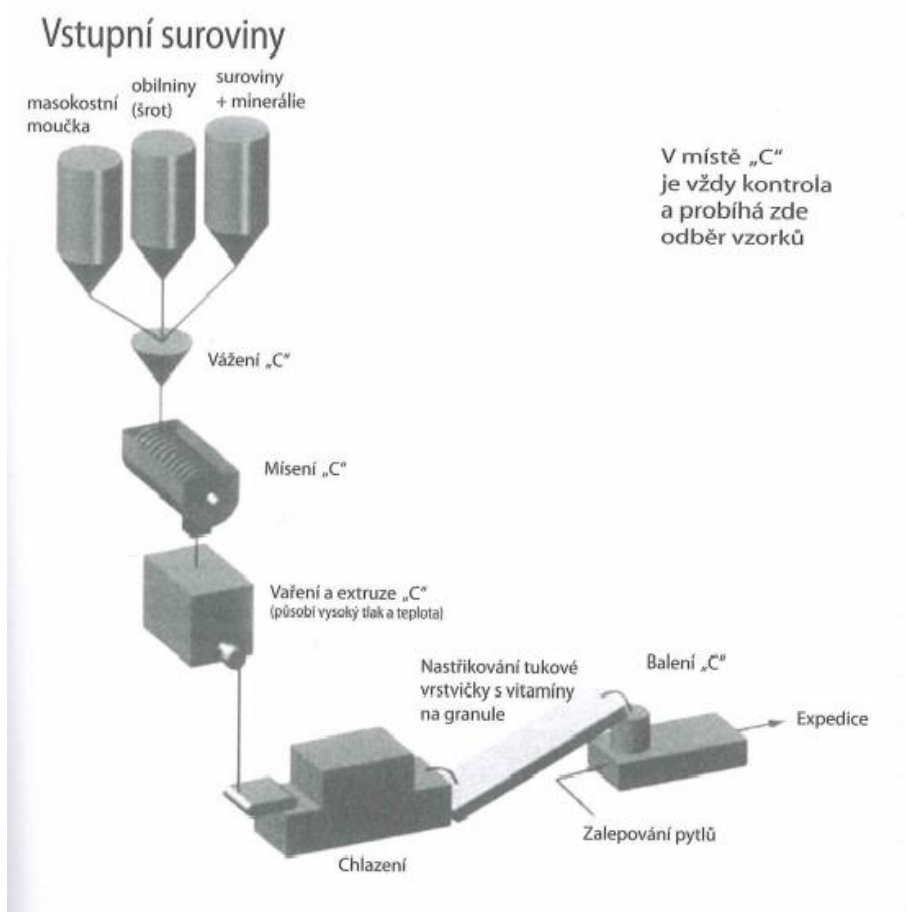
3.3 Technologie výroby a zpracování

Suchá granulovaná krmiva se vyrábí při procesu extruze, kdy nejprve dochází ke smísení jednotlivých komponentů a následně ke krátkodobému zahřátí nad 100 °C za současného působení vysokého tlaku. Vysoká teplota a tlak v extrudéru zničí bakterie, spory a další patogenní organismy. Tento meziprodukt je následně tvarován do požadované velikosti, zchlazen a sušen. Po vysušení se granule tzv. tukují, čímž dochází k jejich zchutnění (Jacobs, 2005). Ačkoliv jsou bakterie vysokou teplotou zničeny, může dojít ke kontaminaci při dochucování nebo při kontaktu s kontaminovaným materiálem (MA Leaders, 2012).

Jak odhalila studie (Oni et Ruth, 2016), velká část chovatelů zalévá suchá krmiva vodou kvůli zlepšení chutnosti. Bylo prokázáno, že opětovná hydratace suchého krmiva podporuje růst salmonel. Takto připravené krmivo by mělo být snědno popřípadě zlikvidováno nejpozději do 2 - 3 hodin po navlhčení.

Obrázek 2: (Šebková a kol., 2008)

Schéma výroby granulovaných krmiv technologií extruze



Další možností výroby suchých krmiv je lisování za studena. Tato metoda je na rozdíl od extruze pomalejší, ale šetrná – nedochází ke zničení vitaminů, enzymů a jiných bioaktivních látek. Jednotlivé komponenty se smísí, přidá se přírodní pojidlo a směs se za studena protlačí přes koncovky lisovacího stroje. Nevýhodou takto zpracovaných krmiv jsou vyšší náklady a kratší trvanlivost (Langer, 2001).

Přírodní sušené pochoutky jako například prasečí uši, slepičí pařáty, ryby aj. mohou být také zdrojem salmonel (MA Leaders, 2012).

V posledních několika letech byly zaznamenány případy nákazy člověka salmonelou v souvislosti s živočišnými pamlsky pro psy. Během jednoho roku (říjen 2008 - září 2009) bylo testováno na přítomnost salmonel 102 prasečích uší. Z celkového počtu kultivace odhalila 24,5 % pozitivních vzorků, metoda PCR 28,4 % pozitivních vzorků (Adley et al., 2011).

Obrázek 3: Suchá granulovaná krmiva

Granule vyrobené termickou extrudací

Za studena lisované krmivo



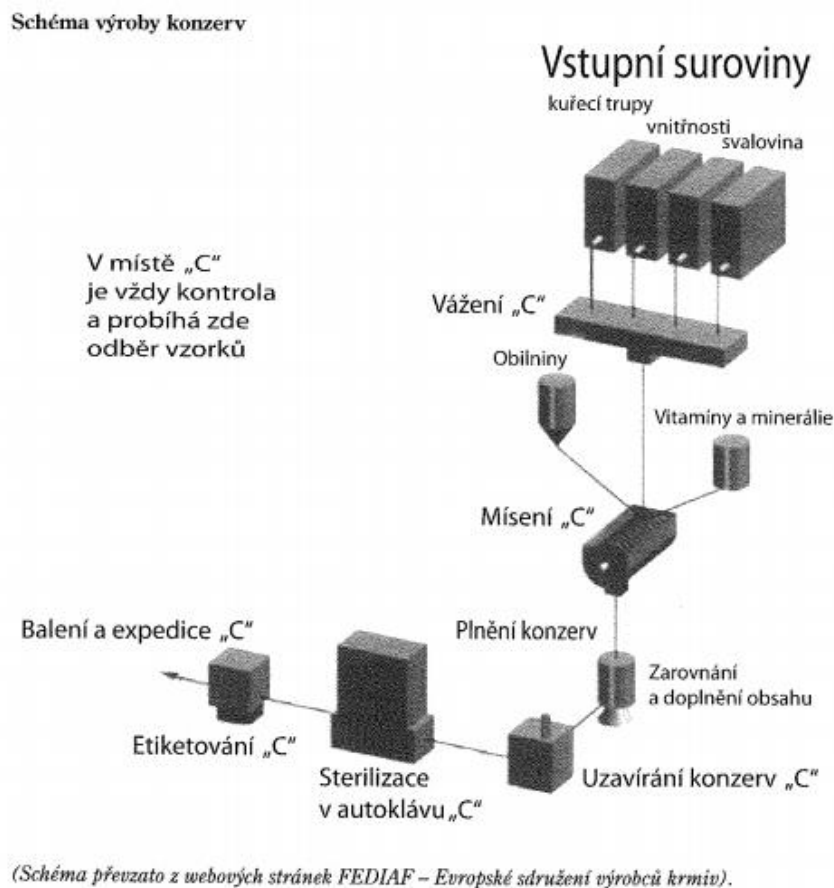
<http://www.baron.cz/pes/prirodni-lekarna/clanky/rozdily-mezi-krmivy/i-0>

Polovlhká krmiva často obsahují stejné krmné komponenty jako suchá, granulovaná krmiva. Navíc se pak přidávají různé látky rozpustné ve vodě, jako jsou jednoduché sacharidy, sůl, deriváty alkoholů aj. (National Research Council, 2006). Jednoduché sacharidy jsou jejich významnou složkou, mají konzervační účinky a díky jejich schopnosti vázat vodu, tvoří bariéru proti mikrobům (Case, 2013). Tento typ krmiv obsahuje přibližně 15 - 35 % vody. Jednotlivé složky krmiva se nejprve pomelou, promísí a poté se vaří při teplotě 93 - 127 °C. Při varu dochází ke zneškodnění mikroorganismů. Poté následuje zchlazení a plnění do obalů (Devahastin, 2010). Tyto výrobky jsou baleny tak, aby nedocházelo ke ztrátě vlhkosti. Jednotlivá balení jsou tak velká, aby došlo po otevření k jejich rychlé spotřebě (National Research Council, 2006). Galvao et al. (2014) se ve své práci zaměřil na mikrobiologickou kvalitu psích pamlsků z exportu. Vzorke testoval na přítomnost salmonel, klostridií, stafylokoků a termostabilních koliformních bakterií. Z celkového počtu 108 analyzovaných vzorků bylo 22 vzorků kontaminováno mikroorganismy. Ačkoliv řízení bezpečnosti potravin zodpovídá a garantuje mikrobiologicky nezávadná krmiva, je stále žádoucí vyvíjet nová a lepší hygienická opatření.

V současné době jsou na trhu dva typy konzervovaných krmiv. Prvním typem je tzv. kompletní nutričně vyvážené krmivo obsahující všechny živiny, vitaminy a minerální látky. Druhým typem jsou masové konzervy. Ty se doporučuje podávat jako doplňkové krmivo ke kompletní krmné dávce, pokud je žádoucí navýšit příjem bílkovin nebo tuků zejména pak při zvýšené fyzické zátěži (Jacobs, 2005). Konzervované krmivo obsahuje velmi vysoký podíl vody, v průměru okolo 75 %. Výhodami těchto krmiv je jejich chutnost, kterou jim dává

vysoký obsah bílkovin a tuků. Dále také dlouhá trvanlivost - každá konzerva prochází procesem sterilizace horkou parou v autoklávu. Nevýhodou je, že jsou ekonomicky nákladnější a díky své chutnosti mohou u nedůsledného chovatele zapříčinit obezitu psa (Case, 2013).

Obrázek 4: (Šebková a kol., 2008)



V posledních letech, kdy je trh přesycen velkým množstvím komerčně vyráběných krmiv a je zde možnost vybírat z velkého množství produktů, se chovatelé stále častěji ubírají směrem různým alternativním metod krmení. Velké popularitě se dnes těší tzv. BARF, kdy chovatelé připravují čerstvé jídlo pro své psy doma (Remillard, 2008). Akronym BARF použila jako první Američanka Debbie Trippová a označila jím lidi, kteří krmí své psy syrovou čerstvou potravou, a posléze toto krmivo samotné. BARF vysvětluje několika možnými způsoby – Born Again Raw Feeders (nově zrození „krmiči“ syrovou stravou), Bones and Raw Food (kosti a syrová strava), Biologically Appropriate Raw Foods (biologicky vhodná syrová strava; Simon, 2010). Vzhledem k tomu, že tento typ stravy není nijak technologicky zpracováván, vyvstala otázka, jak je tomu s přítomností patogenních

mikroorganismů. V Kanadě proběhl výzkum, kdy bylo podrobena testování na přítomnost salmonel 166 vzorků mraženého krmiva zakoupeného v obchodech s chovatelskými potřebami. Celková prevalence byla 21 %; kuře mělo pozitivní test na salmonely v 67 % případech. Tato studie demonstruje potencionální riziko krmení syrovým masem (Finley et al., 2008).

Jednu z dalších studií uskutečnili vědečtí pracovníci ve Švédsku. Jejich úkolem bylo zjistit mikrobiologickou kvalitu masa pro psy a přítomnost bakterie *Escherichia coli*. Zjistili, že BARF z prodejen skutečně může být zdrojem *Escherichie coli* a zdůraznili nutnost dodržování hygienických opatření při manipulaci a skladování těchto krmiv (Nilsson, 2015).

Neznamená to však, že jsou komerční krmiva nebezpečná. To, že v některých byla přítomnost těchto bakterií prokázána, bychom měli brát jako varování a neustálé testování svědčí o tom, že je tu snaha tento problém podchytit. Abychom předešli riziku nákazy patogenními bakteriemi, je potřeba předkládané krmivo vždy pečlivě kontrolovat. Krmiva by se neměla uchovávat společně s potravinami pro lidi. Měla by být v neporušeném obalu, nesmí zapáchat, ani mít nezvyklou barvu. Při jejich přípravě je nutné dodržovat hygienické zásady a mýt si ruce (MA Leaders, 2012).

3.4 Mikrobiologie krmiv

3.4.1 Mikroorganismy

Infekční nemoci jsou vyvolávány některými mikroorganismy. Jako mikroorganismus nebo také mikrob se označuje mikroskopický, pouhým okem neviditelný, jednoduchý jednobuněčný nebo podbuněčný (subcelulární) organismus. Mezi mikroby se řadí bakterie, viry, mikroskopické houby a živočišní parazité (Rozsypal et al., 2013).

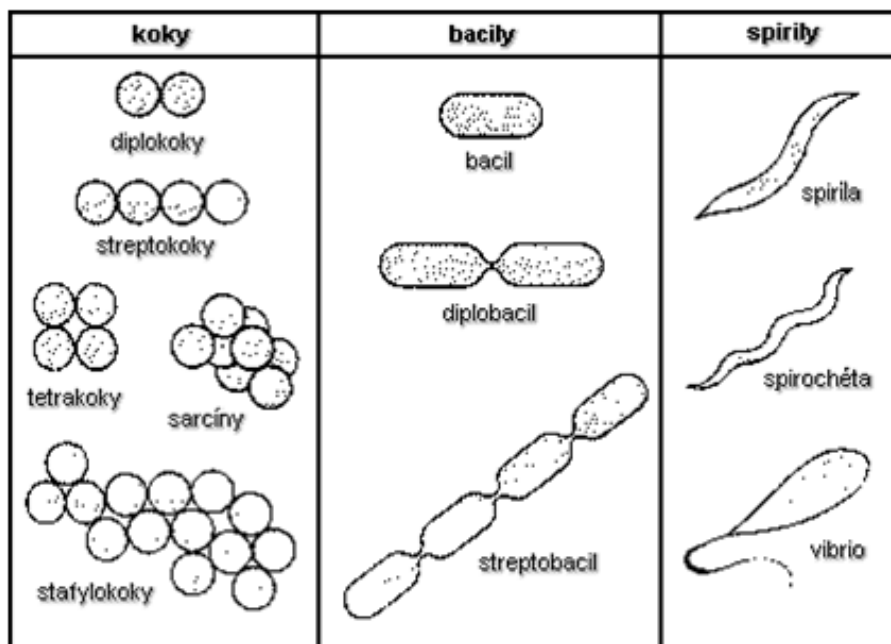
Se spoustou z těchto organismů se setkáváme každý den. Riziko nákazy je však pozoruhodně nízké a to díky imunitě. Imunita je schopnost organismu bránit se vůči patologickým organismům z vnějšího i vnitřního prostředí. (Duvall et Kershner, 2006).

3.4.2 Bakterie

Bakterie jsou nejjednoduššími živými organismy na naší Zemi. Jsou to tzv. prokaryotické organismy, to jsou jednobuněčné organismy, které nemají buněčné jádro (Amyes, 2013). V průběhu evoluce trávající miliony let se bakterie rozrůznily jak ve způsobu života, tak svým tvarem a velikostí. Jejich velikost je od 0,2 μ až po 0,75 mm, některé druhy rostou při 0 °C a jiné při 113 °C, při pH 0,06 a pH 12, při tlaku více než 1000 atm nebo v 32 % nasyceném roztoku NaCl. Vlastnosti bakterií jsou dány charakterem jeho životního prostředí a vlastnostmi hostitele (Schindler, 2014). Tvar bakteriální buňky je různorodý. Mohou se vyskytovat ve tvaru:

- Kulovitým - koky, ve dvojicích-diplokoky, řetězcích-streptokoky a shlucích-stafylokoky
- tyčinkovitým - bacily
- spirálním - vibria, spirily a spirochety (Rozsypal et al., 2013).

Obrázek 5: Tvar bakterií



Obr. Tvary bakterií

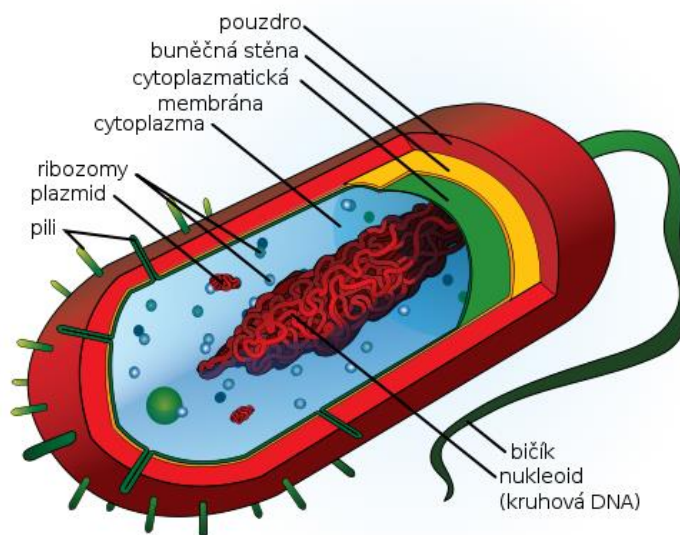
<http://osetrovatelstvi.blog.cz/0910/obecna-mikrobiologie>

Genom bakterií je tvořen dvoušroubovicí DNA, která je uložena v kruhovitém chromosomu. Kruhovitý chromosom je připevněný k buněčné membráně a spolu s proteiny tvoří nukleoid-neohraničenou jadernou oblast. Většina genů bakterie je pouze v jedné kopii. Bakterie mohou mít ještě jednu genetickou informaci, která je uložena v plasmidech.

Plasmidy nesou variabilní genetické informace, například pro vznik rezistence k antibiotikům (Ottová et Mihalová, 2013). Rezistence patogenů k antibiotikům je problém biologický, genetický, epidemiologický i farmakologický (Schindler, 2014). Chemické látky mohou mít na bakterie bakteriostatický (brání růstu bakterií) nebo baktericidní (usmrcující) účinky. Uvnitř druhu se však mohou vyskytnout rezistentní kmeny, které se vyznačují vyšší odolností. K hubení bakterií slouží desinfekce a sterilizace. Spolehlivá sterilizace se provádí v autoklávech působením nasycených vodních par o teplotě 120 °C a zvýšeném tlaku po dobu 20 minut. Suché teplo je pro ničení mikrobů mnohem méně účinné (Rozsypal et al., 2013).

Bakterie získávají energii oxidací tak, že přenášejí elektrony na určitý akceptor. Dle akceptorů se rozlišují bakterie aerobní, fakultativně aerobní a anaerobní. Aerobní bakterie nejsou schopny žít bez molekulárního kyslíku. Bakterie fakultativně aerobní rostou i za absence kyslíku, energii mohou získávat kvašením a jako akceptory elektronů používají jiné molekuly. Anaerobní bakterie se množí za nepřístupu kyslíku. Kyslík je pro ně vysoce toxický. Podmínkou jejich růstu je, aby půda nebo prostředí, ve kterém žijí, mělo nízký redoxní potenciál. Energií získávají fermentací nebo kvašením, při kterém dochází k redukci organických látek na alkoholy a kyseliny (Schindler, 2014).

Obrázek 6: Stavba bakteriální buňky



http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Stromatolites_in_Sharkbay.jpg#mediaviewer/File:Stromatolites_in_Sharkbay.jpg

Pokud potřebuje bakterie překonat nepříznivé období, umožňují jí to tzv. spory. To jsou odolné klidové formy některých bakterií. Vznikají uvnitř bakteriální buňky, proto se

označují jako endospory. Jsou odolné proti vysušení, zvýšené teplotě a desinfekčním prostředkům (Rozsypal et al., 2013).

Bakterie se pěstují na živných půdách v kulatých skleněných nebo plastových miskách. Rostou v kupkách, kterým se říká kolonie. Velikost populace živých i mrtvých bakterií lze sledovat přímo počítáním v určitém objemu mikroskopem, měřením zákalu popřípadě vážením sušiny buněk odebraných z kultivační půdy (Schindler, 2014). Jednou z podmínek kultivace je optimální kultivační teplota, ta je pro bakterie, viry a protozoa 37 °C. Aerobní a fakultativně anaerobní mikroorganismy se kultivují za normální atmosféry, mikroaerofilní bakterie vyžadují zvýšenou tenzi CO₂ (5 %). Anaeroby jsou kultivovány bez přítomnosti kyslíku v anaerostatu. Vlhkost je zabezpečena vysokým obsahem vody v živných půdách a v případě dlouhodobé kultivace mikroorganismů na pevných půdách pomocí odparu vody ze zásobníku v termostatu (Melter et Malgrem, 2014).

Nejčastějšími kontaminanty v krmivech pro psy jsou *Enterococcus* spp., *Salmonella* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp. a *Escherichia coli*. Z tohoto důvodu jsou v mé práci podrobně popsány níže.

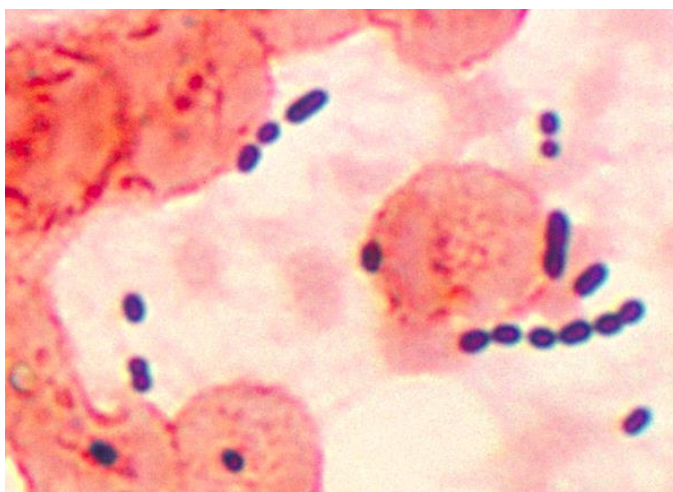
3.4.2.1 *Enterococcus* spp.

Enterokoky jsou grampozitivní koky v řetězcích, nenáročné na kultivační podmínky. Celkem je známo více než 50 druhů enterokoků, z nichž jsou nejčastější a nejvýznamnější *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium* (Schindler, 2014). Enterokoky patří k bakteriím mléčného kvašení a vyskytují se v prostředí, u zvířat, u lidí i v tradičních potravinách, jako jsou sýry nebo fermentované uzeniny. Necílené zatížení enterokoky je považováno za znak špatných hygienických podmínek během výroby a zpracování (Dtsch. Molkerei Ztg, 2002).

Rod *Enterococcus* nebyl až do druhé poloviny 20. století považován za patogenní. Později však bylo prokázáno, že bakterie tohoto rodu jsou nebezpečnými původci onemocnění lidí i zvířat. Mezi tato onemocnění patří enteritidy, infekce močových cest, meningitidy, sepse a choroby žlučníku (Hampl, 1968).

Dnes jsou enterokoky používány například jako indikátory bezpečnosti potravin (Marth et Steele, 2001).

Obrázek 7: *Enterococcus*



https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Enterococcus_histological_pneumonia_01.png

3.4.2.2 *Salmonella* spp.

Za svou dlouhou existenci se bakterie *Salmonella* spp. musela adaptovat na trojí, zcela rozdílný způsob života. Nejprve na drsné podmínky přírodního prostředí, pak na trávicí trakt rozmanitých živočichů a posléze na naprosto odlišné poměry uvnitř některých typů buněk, zejména těch, které zajišťují imunitní funkce organismu (Trebichavský et Šíma, 2001).

V roce 1880 objevil Karl Joseph Eberth původce břišního tyfu – bakterii dnes známou jako *Salmonella typhi*, dříve nesla jméno svého objevitele a tak se jí říkalo *Eberthella typhi* (Zbořil, 2005). V roce 1885 popsal Theobald Smith a Daniel Elmer Salmon bakterii napadající dobytek a pojmenovali ji *Bacillus choleraesuis*. O patnáct let později, v roce 1900 byl na počest veterinárního chirurga D. E. Salmona, který jako první popsal bakterii *Salmonella choleraesuis*, vytvořen rod *Salmonella* (Adams et al., 2016).

Salmonella je celosvětově rozšířenou patogenní bakterií způsobující nebezpečná infekční onemocnění (Barrow et Melthner, 2013). Tato bakterie je nebezpečná pro zvířata i člověka. Patří do rodu gramnegativních fakultativně anaerobních nesporulujících tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae*, které jsou obvykle pohyblivé a mají bičík (Macela, 2006). Do této čeledi patří více než dva tisíce typů bakterií. Rod *Salmonella* se rozděluje na dva druhy: *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. *Salmonella enterica* se dále dělí na šest poddruhů: *S. enterica*, *S. salmonae*, *S. arizonae*, *S. diarizonae*, *S. houteeae*, *S. indica*. Více jak 99 % sérotypů patří do druhu *Salmonella enterica* (Labbé et García, 2013).

Tabulka 1: Taxonomické zařazení *Salmonella* (Dvořáková, 2013)

Doména	Bakterie
Říše	Bakterie
Oddělení	Proteobakterie
Třída	Gamma proteobakterie
Čeleď	<i>Enterobacteriaceae</i>
Rod	<i>Salmonella</i>
Druh	<i>Salmonella enterica</i> , <i>Salmonella bongori</i>
Poddruhy	
	<i>S. enterica subspecies enterica</i>
	<i>S. enterica subspecies salamae</i>
	<i>S. enterica subspecies arizonae</i>
	<i>S. enterica subspecies diarizonae</i>
	<i>S. enterica subspecies houtenae</i>
	<i>S. enterica subspecies indica</i>

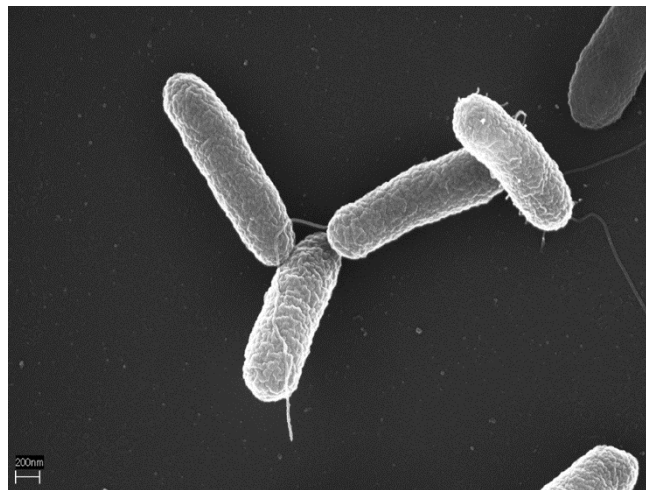
Salmonella se rychle množí v teple a vyskytuje se v syrovém mase, rybách, drůbeži, syrových vejcích, mléku a výrobcích z něj (Turkington et Ashby, 2007). Tepelné optimum této bakterie je 37 °C, ale je schopná růst v teplotním rozsahu 6 až 46 °C. Kromě teploty je pro její růst důležité také pH, to by se mělo pohybovat v rozmezí hodnot 4,1 - 9,0. Optimální hodnota pH je téměř neutrálních hodnot 6,5 - 7,5. Poslední podmínkou růstu a dělení jsou nutriční požadavky, které v těle organismu zajistí například glukóza (Brands et Alcamo, 2006).

Nejčastějšími onemocněními s rozdílnými příznaky jsou salmonelová enteritida běžně označována jako salmonelóza a břišní tyfus (Macela, 2006). Nejnebezpečnějšími typy jsou *S. enteritidis* a *S. typhi*, které jsou zodpovědné za většinu infekcí (Dunkley et al., 2009). *S. typhi* způsobuje břišní tyfus. První příznaky jako horečka, bolest hlavy, kloubů, břicha a ztráta chuti k jídlu se objevují 8 - 14 dní od nákazy. Dalším příznakem jsou červené skvrny na kůži. Nemoc se léčí antibiotiky, dietou a dodržováním klidového režimu (Turkington et Ashby, 2007). *Salmonellou* se může zvíře nebo člověk nakazit pokud pozře kontaminovanou potravu nebo vodu, popřípadě pokud zvíře infikovanou potravu sní a pak člověka například olízne. V nedávné studii bylo prokázáno, že nejvíce je nakažených dětí ve věku 1,5 - 2 roky (Leaders, 2012). Počet salmonelóz však se zavedením hygienických opatření ze strany Evropské unie v

restauracích a chovech drůbeže klesá. Stále převažuje sérotyp *Salmonella enteritidis*, přenášející se zejména vejci a výrobky z nich, před sérotypem *Salmonella typhi murium* (Ambrožová, 2011).

Fylogeneticky nejpříbuznějšími bakteriálními rody salmonel jsou *Escherichia* a *Shigella*. *Salmonella* a *Escherichia* se oddělily asi před 120 až 160 miliony let (Macela, 2006).

Obrázek 8: *Salmonella typhimurium* focena elektronovým mikroskopem (Brinkmann, 2005)



3.4.2.3 Escherichia coli

Escherichia coli byla objevena v roce 1884 německým přírodovědcem a bakteriologem Theodorem Escherichem. Ten zjistil, že tato bakterie je velmi důležitou součástí mikroflóry střevního traktu (Hayhurst, 2004). Znemožňuje průnik patogenům, produkuje koliciny, které jsou pro jiné bakterie toxické. *E. coli* se podílí na tvorbě některých vitaminů, například vitaminu K. Jedná se o podmíněně patogenní bakterii, která může být příčinou infekcí. Ve střevě může způsobit infekci pouze tehdy, pokud je kmen vybaven specifickými faktory virulence. Mimo střevo je vždy patogenní (Bartůněk et al., 2016).

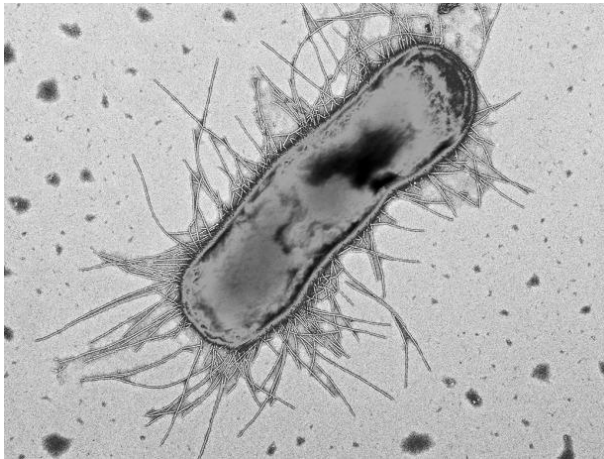
E. coli je koliformní bakterie, řadící se do čeledi *Enterobacteriaceae*. Jedná se o gramnegativní, nesporulující, fakultativně anaerobní bakterii tyčinkovitého tvaru. Její charakteristickou schopností je schopnost štěpit laktózu za vzniku plynů a kyselin. Ačkoli je

tato bakterie dobře přizpůsobená životu ve střevním traktu savců, nejlépe roste za vyšších teplot *in vivo* (Torres, 2010). *E. coli* se také využívá jako indikátor fekálního znečištění vod (ICMSF, 2006).

Dosud je známo pět skupin kmenů *Escherichia coli* patogenních pro střevo, přičemž klinický obraz je určen jednak vlastnostmi jednotlivých původců a také věkem a celkovým stavem pacienta (Muntau, 2014). Dle původce rozlišujeme enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxin produkující *E. coli* (ETEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enterohemoragické *E. coli* (EHEC) a v humánní medicíně také enteroagregační *E. coli* (EAEC) (Yang et al, 2017). Enteropatogenní a enterotoxin produkující kmeny *E. coli* způsobují závažná průjmová onemocnění, enteroinvazivní kmen je původcem úplavice a enterohemoragický kmen způsobuje hemoragické kolitidy a hemolyticko-uremický syndrom (Levine, 1987).

Ve Velké Británii a Nizozemsku byly provedeny testy na přítomnost *E. coli* v psích výkalech a dále bylo zjišťováno, zda je větší riziko nákazy psů touto bakterií při krmení syrovým masem. Výsledky testů ukázaly, že pes je významným rezervoárem *E. coli*. Přítomnost této bakterie, jak se ukázalo, závisí na druhu přijaté potravy. V pozorované skupině psů, byly dvě třetiny jedinců, kteří byli krmeni syrovým kuřecím masem pozitivní na přítomnost *E. coli*. Dalšími testy nebyla prokázána žádná determinace mezi plemenem ani pohlavím na přítomnost bakterií (Wedley et al., 2017).

Obrázek 9: *Escherichia coli*



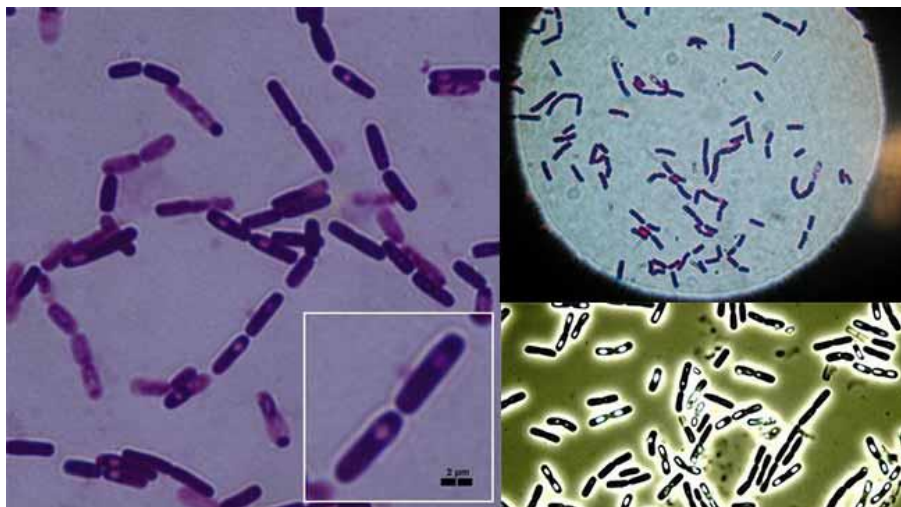
<http://hsnewsbeat.uw.edu/story/pandemic-e-coli-strain-h30-cloaks-its-stealth-strategies>

3.4.2.4 *Bacillus* spp.

Bacillus je grampozitivní tyčinkovitá aerobní nebo fakultativně anaerobní bakterie. Nepříznivá období přečkává ve formě odolných spor (Gruiz et al., 2015). Bakterie *Bacillus cereus* je z hlediska onemocnění z potravin nejvýznamnější zástupce rodu *Bacillus*. Přirozeně se vyskytuje v půdě a ve vodě. Je také známý jako potenciální kontaminant potravin rostlinného i živočišného původu. Do potravin se dostává především kontaminovanými surovinami. V těchto surovinách se vyskytuje ve formě spor, které mu umožňují snášet suché prostředí a přežít i běžné tepelné režimy (např. pasterační teploty) při výrobě potravin. *B. cereus* produkuje dva druhy toxinů – enterotoxin a emetický toxin. Enterotoxin se tvoří v tenkém střevě konzumenta po konzumaci kontaminované potravy. Vyvolává průjemový typ onemocnění spojený s bolestmi břicha, vodnatým průjmem někdy provázený nevolností. Inkubační doba je 8 - 16 h, doba trvání onemocnění 12 - 24 h nebo i více dnů. Enterotoxin je inaktivován již do tří minut při teplotě 65 °C. Emetický toxin je produkován živými buňkami v kontaminované potravíně. Vyvolává nevolnost a zvracení. Inkubační doba je 1-5 h, doba trvání onemocnění 6 - 24 h. Emetický toxin je vysoce termostabilní a vysoce odolný vůči extrémním hodnotám pH (Pobodová, 2014).

Je vysoce pravděpodobné, že mnoho případů gastrointestinálních onemocnění u zvířat bez zjevných příčin způsobuje právě kontaminace krmiv bakterií *Bacillus cereus*. Byl proveden výzkum, ve kterém bylo testováno více jak čtyřicet vzorků suchých granulovaných krmiv na přítomnost této bakterie. Výsledky byly velmi znepokojující, protože všechny pozorované vzorky byly pozitivní (Hofve, 2016).

Obrázek 10: *Bacillus cereus*



<http://bacteriologynotes.com/morphology-of-bacillus-cereus/>

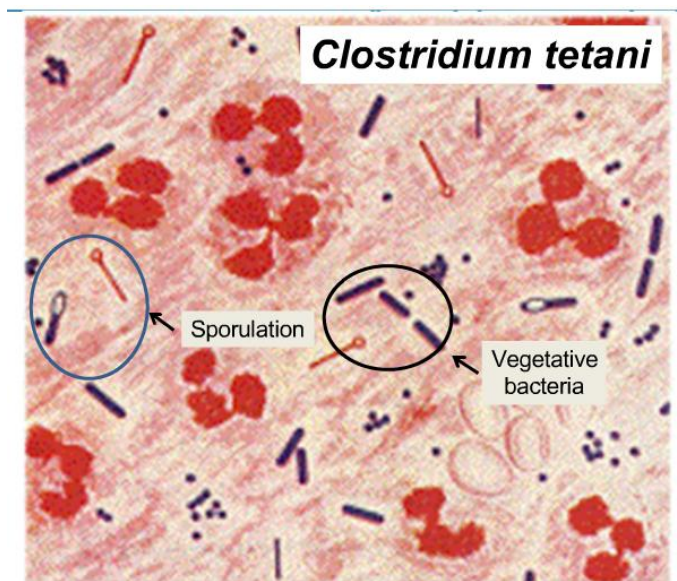
3.4.2.5 *Clostridium* spp.

Rod *Clostridium* byl poprvé popsán v roce 1880 Adamem Prazmowskim. Jedná se o anaerobní, grampozitivní tyčinkovité bakterie, které tvoří spory (Minton et Clarke, 2013). Z hlediska alimentárních intoxikací potravou jsou nejvýznamnějšími druhy *C. botulinum*, *C. perfringens* a *C. difficile* (Schindler, 2014). *Clostridium botulinum* je velmi nebezpečný druh, který produkuje paralytický toxin známý jako botulotoxin (Minton et Clarke, 2013). Onemocnění způsobené tímto toxinem se nazývá botulismus a příznakem jsou akutní paralýzy svalů, které mohou vést ke smrti. *C. perfringens* je aerotolerantní bakterie, která se velmi rychle množí. Vyskytuje se ve výkalech, půdě i potravinách. Hlavním toxinem, který

produkuje je lecitináza. Nákaza se projevuje úpornými průjmy a kolikovými bolestmi. *C. difficile* produkuje enterotoxin a cytotoxin. Toxiny lze prokázat testem ELISA. Tato bakterie způsobuje závažná průjmová onemocnění až sepsi (Schindler, 2014). V roce 2005 byl více jak deset měsíců v USA a Kanadě prováděn výzkum, kdy byla zjišťována přítomnost *C. difficile* v hovězím a vepřovém mletém masu a dalších masových výrobcích. Kontrola potravin byla provedena metodou PCR a výsledky byly překvapivé. V USA bylo mleté hovězí maso v 50 % a vepřové ve 43 % případů pozitivní na *C. difficile*. V Kanadě byly výsledky výzkumu mnohem příznivější. Vzorky byly pozitivní na přítomnost *C. difficile* v hovězím masu v 6,7 % a ve vepřovém v 12,2 % případů (Gould et Limbago, 2010).

Ohrožení klostridii jsou zejména psi, kteří jsou krmeni syrovou stravou (Šoltys, 2016). Kočky jsou oproti psům mnohem náchylnější na onemocnění, které způsobují klostridie. Pokud se jedná o psy, tak největší predispozice k nákaze mají mladí psi velkých plemen a kastrování samci (Wiebe, 2015).

Obrázek 11: *Clostridium tetani*



<http://textbookofbacteriology.net/clostridia.html>

3.4.3 Redukce patogenu

Mezi nejzávažnější rizika zkrmování syrové stravy nejen pro její konzumenty je riziko bakteriálních a parazitárních infekcí. Z více než pěti set testovaných vzorků BARF byla v 53 % zjištěna kontaminace bakterií *Escherichia coli*, v 5,9 % dokonce velmi nebezpečnou *Salmonellou enterica*. Pamlsky z neadekvátně upraveného kuřecího masa měly dokonce u 43 psů na svědomí onemocnění salmonelózou (Šoltys, 2016).

Riziko kontaminace bakteriemi však nepřináší pouze krmení syrovou stravou, jak se mnozí mohou domnívat. Nedávno byla dokončena studie určující množství a druh bakterií, které byly obsaženy v suchých komerčních krmivech pro domácí zvířata. Rozšířená kontaminace populárních značek naznačuje, že předkládáním těchto krmiv vystavuje majitel psa mnoha různým bakteriím. Jeden velký výrobce krmiv dokonce na obalu doporučuje, aby během odstavu štěnat bylo suché krmivo navlhčené a přístupné po celý den. Bakterie v navlhčeném krmivu se rychle množí, čili u štěnat, která později zkonsumují toto krmivo je větší pravděpodobnost gastrointestinálních potíží (Strombeck, 2010).

Tabulka 2: Výsledky studie – Bakteriální kontaminace 40 psích krmiv (Strombeck, 2010)

Bakterie	Výskyt v krmivu v %
<i>Bacillus cereus</i> *	83
<i>Bacillus</i> spp. (ostatní druhy) **	45
<i>Enterococcus faecalis</i> ***	25

*způsobuje trávicí potíže

**některé druhy mohou způsobit trávicí potíže

***známka kontaminace fekáliemi

http://dogcathomeprepareddiet.com/commercial_pet_food_contaminatio.html

Většinu střevních bakteriálních infekcí lze prokázat kultivací stolice, někdy je však nutné provést stěr opakovaně, protože záchyt nemusí být stoprocentní. Některé patogeny vyžadují speciální kultivační podmínky (Ambrožová, 2011).

Tenké střevo psa je přirozeně obsazeno různými bakteriemi ve vysokém množství. Bakteriální obsazení má důležitou funkci v ochraně anatomických struktur střeva a zlepšení fyziologických procesů, nezbytných pro správné trávení a vstřebávání krmiva. Tato mikrobiota hraje také důležitou roli v obraně střeva proti obsazení patogenními bakteriemi, vyvolávajícími onemocnění střeva a zlepšení funkce střevního imunitního systému (Gaschen, 2007). Pokud pes trpí průjmovým onemocněním, je dobré zjistit, ve které části střeva průjem vzniká, aby mohla být zahájena efektivní léčba. Průjem je charakterizovaný beztvárovou měkkou stolicí. Obvykle trvá 1 - 3 dny, než se zažívací trakt zklidní. Pokud problém přetrvává déle než 3 dny, může se jednat o závažnější problém (Vinš, 2016). V terapii průjmu se uplatňují čtyři možné kroky, a to rehydratace, realimentace, podání nespecifických protiprůjmových léků a specifická léčba – antibiotika a chemoterapeutika. Množství přijatých tekutin musí být dostatečné nejen k pokrytí bazální potřeby, ale i ztrát způsobených průjmem,

zvracením a horečkou. Nеспецифická terapie zahrnuje několik skupin léků s různým mechanismem účinku. Adsorbenty jako aktivní uhlí nebo Smecta jsou úspěšné hlavně u průjmů vyvolaných toxinem, případně i u virových průjmů (Ambrožová, 2011). Tyto preparáty vytváří suspenzi částecek navazujících na svůj povrch některé bakteriální toxiny, ale i jiné škodlivé látky, obaluje povrch sliznic, ale i obsah střev povlakem – filmem částic. Škodlivé látky poté odchází společně se stolicí (Vinš, 2016). Antibiotická terapie je vhodná pouze u některých průjmů bakteriálního původu, ale u většiny lehkých či středně těžkých onemocnění není obvykle nutná. Pokud ale jiná léčba nebyla účinná a je potřeba k ní přistoupit, je v takovém případě vhodné současně s antibiotiky zařadit i kvalitní probiotika (Ambrožová, 2011).

Další možností léčby nejen gastrointestinálních onemocnění je alternativní metoda transplantace fekálních buněk. Tuto moderní metodu terapie začala u psů používat veterinární lékařka Margo Roman z Bostonu. O této metodě se dozvěděla z článku o lékaři, který léčil pacienta s *Clostridium difficile*, která způsobuje velmi nebezpečnou střevní bakteriální infekci, na kterou ročně zemře v USA asi 29 000 lidí. Podstatou terapie bylo, že nemocnému podal nasogastrickou trubicí stolicí zdravého pacienta. Během několika dnů se pacient plně zotavil. Stejný postup následně provedl s dalšími více než 100 pacienty. Úspěšnost zotavení byla 97 %. Této myšlenky využila již zmiňovaná Dr. Margo Roman k léčbě pudla, který měl těžké gastrointestinální problémy a Addisonovu nemoc. Pes byl při příjmu velmi vyčerpaný a krvácel ze střeva. Byl ošetřen akupunkturou, ozonoterapií a fekální transplantací. Po čase došlo k úplnému uzdravení. Metodu fekální bakterioterapie pak tato lékařka úspěšně aplikovala na další své pacienty. Dárcem fekálií musí být naprosto zdravý jedinec, který je krmen kvalitní syrovou stravou. Mimo to se pro optimální podmínky dodávají probiotika a kolostrum, z těchto důvodů doktorka využívá jako dárce své vlastní psy (Becker, 2015)

3.5 Probiotika

Probiotika se používají při léčbě infekčních průjemových onemocnění, ať už jsou bakteriálního či virového původu. Řecké slovo „probiosis“, které v překladu znamená „pro život“, charakterizuje obecnou vlastnost probiotik. Samotný termín „probiotika“ zavedli do lékařské terminologie v 60. letech 20. století biologové D. M. Lilly a R. H. Stillwell. Jejich využívání v medicíně však prosazoval již řadu let před nimi Ilja Mečnikov, ruský přírodovědec a nositel Nobelovy ceny z roku 1908, který se domníval, že pravidelná konzumace mléčných výrobků obsahujícího probiotické bakterie má příznivý vliv na zdraví člověka (Sýkora, 2011).

Probiotika jsou definována jako živé organismy, které se přidávají do krmiva za účelem zlepšení rovnováhy střevní mikroflóry. Mohou se vyskytovat ve formě monokultur nebo smíšených kultur mikroorganismů. Nachází se zejména v jogurtech, fermentovaných mléčných výrobcích nebo ve výživových doplncích ve formě kapslí. Nejčastějšími rody, které se používají jako probiotika jsou: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* a *Streptococcus* (Zambori et al., 2014).

Mechanismus účinku probiotik je rozmanitý, a to z řady důvodů. Účinek probiotik závisí mimo jiné i na stáří a fyziologickém stavu konzumenta. Mezi nejčastěji zmiňované efekty probiotických bakterií jsou uváděny imunostimulační účinky, vliv na složení střevní mikrobioty, redukce patogenů atd. Probiotika nemají podle platných předpisů v USA statut léčiv a rovněž příslušný panel Evropského orgánu pro bezpečnost potravin (EFSA) dosud žádnému probiotiku neschválil zdravotní tvrzení. Výroba probiotik se proto řídí předpisy pro potraviny (Rada, 2010).

Zařadit probiotika je žádoucí vždy po terapii antibiotiky, které kromě patogenů tlumí v rámci svého spektra účinnosti i přirozenou mikroflóru střeva. Na trhu je k dispozici množství krmiv a přípravků s probiotickým působením. Složku, která by v účinném probiotiku pro psy nikdy neměla chybět, je bakterie druhu *Enterococcus faecium*, která spolupomáhá nastolit poměr vyhovující fyziologické mikrobiální výbavě trávicího traktu psa (Cecava, 2015). Probiotika jsou také velmi důležitá v kritických fázích vývoje a odchovu domácích zvířat, například při odstavu štěňat. Preparáty mohou být v tekuté formě (pasta) – v takovém případě je nutné ji po otevření skladovat v chladničce nebo mohou být sypké

formy, které je nezbytné uchovávat v suchu. Pokud chovatel přimíchává probiotické bakterie do sušeného mléka, musí pro jeho naředění použít vlažnou vodu do 40 °C (Haladejová, 2014).

Tým vědců z České zemědělské univerzity v Praze se zaměřil na výskyt probiotik u pěti produktů určených pro psy a kočky. Testu byly podrobeny následující výrobky: Baby Milk Probiotic, Pro - Kolin +, Probican, Probicol - H a Doggy Care. Všechny tyto potravinové doplňky byly pořízeny u veterinárního lékaře. Výrobci na obalech deklarují obsah živých probiotických mikroorganismů. Cílem výzkumu bylo zjistit, zda tyto údaje odpovídají skutečným hodnotám. Výsledky byly překvapivé. Výrobky Baby Milk Probiotik a Probicol-H obsahovali méně bakterií, než výrobce deklaroval na obale výrobku a jsou tedy hodnoceny jako neuspokojivé. Doplněk stravy Pro - Kolin + obsahoval sice více bakterií, než bylo deklarované množství na obale, ale jednalo se pouze o bakterie jednoho druhu. Pasta Probican splnila množství bakterií deklarovaných výrobcem. Absolutním vítězem testu se stal výrobek Doggy Care, který obsahoval více bakterií, než bylo deklarované množství, a navíc bylo prokázáno více druhů bakterií, což představuje vyšší pravděpodobnost potlačení nežádoucích mikroorganismů způsobující průjmy (Haladejová, 2014).

4 Metodika

4.1 Testovaný materiál

Materiálem, který byl podroben mikrobiologickému testování, byla krmiva a krmné doplňky určené pro psy. Vzorky byly zakoupeny v obchodě a před rozbořem byly zabaleny v původním, nepoškozeném obalu. U výrobků nebyla překročena lhůta minimální trvanlivosti uvedená výrobcem na obalu. Mikrobiologický rozbor byl proveden celkem u 6 různých vzorků krmiv. Všechny tyto vzorky byly živočišného původu.

Přehled použitých krmiv a doplňků a jejich složení:

- **Barking Heads Quackers Grain Free**
 - Suché granulované krmivo
 - Složení: čerstvě připravovaná kachna 33 %, batáty, sušená kachna 14 %, hrách, čočka, čerstvě připravovaný pstruh 5 %, kachní tuk 4 %, vojtěška, kachní koncentrát 1,5 %, mořské řasy, přípravek pro péči o kyčle a klouby (glukosamin 350 mg/kg, MSM 350 mg/kg, chondroitin 240 mg/kg), vitamin A, vitamin D3, vitamin E, minerální stopové prvky
- **Barking Heads Turkey Delight Grain Free**
 - Suché granulované krmivo
 - Složení: čerstvě připravovaná krůta 34 %, batáty, sušená krůta 14 %, čerstvě připravovaný pstruh 5 %, čočka, hrách, krůtí tuk 3 %, krůtí koncentrát 1,5 %, vojtěška, mořské řasy, přípravek pro péči o kyčle a klouby (glukosamin 350 mg/kg, MSM 350 mg/kg, chondroitin 240 mg/kg), vitamin A, vitamin D3, vitamin E, minerální stopové prvky
- **Calibra Dog Salmon & Potato**
 - Suché granulované krmivo
 - Složení: losos (>21 %), brambory, rýže, drůbeží tuk, sušená jablka, pivovarské kvasnice, přírodní chuť, rýžové otruby, rýžový hydrolyzovaný protein, lososový olej, extrakt z juky, minerální látky, DL-metionin, L-lysin, mannan-oligosacharidy, frukto-oligosacharidy, organická měď, organický zinek, organický mangan, organický selen, biotin, niacin, pantotenan vápenatý, kyselina listová, cholinchlorid, vitamín A, vitamín D3, vitamín E (alfa-tokoferol)

- **Brit Petit Chicken & Schrimp**
 - Konzerva
 - Složení: kuřecí maso 40 %, krevety 4,5 %, modifikovaný škrob, rýže, voda

- **Brit Let's Bite Pure Salmon**
 - Sušený krmný doplněk
 - Složení: maso z lososa, tekutý škrob

- **Mapes drůbeží pařáty**
 - Sušený krmný doplněk
 - Složení: kuřecí nebo slepičí nožka bez drápků

4.2 Postup mikrobiologického rozboru

U vzorků byly pomocí kultivačních metod stanoveny:

- celkové počty aerobních a anaerobních mikroorganismů
- počty bacilů, klostridií a enterokoků
- kvalitativně byla stanovena ne/přítomnost salmonel dle ČSN EN ISO 6579 (2003), ta zahrnuje 4 po sobě jdoucí kroky: pomnožení v neselektivní tekuté půdě, pomnožení v tekuté selektivní půdě, nátěr na selektivní pevnou půdu a konfirmaci identity

4.2.1 Kultivační média

- **Reinforced Clostridial Agar CM0151**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Pro kultivaci klostridií.

- **Yeast Extract Agar CM0019**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Pro kultivaci bacilů.

- **Slanetz snad Bartley Medium CM0377**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Pro kultivaci enterokoků.

○ **Nutrient Agar CM0003**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Pro stanovení celkového počtu aerobních mikroorganismů.

○ **Wilkins-Chalgren Anaerobe Agar CM0619**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

S přísávkem:

▪ **Veggie-tones GMO-Free Soya Peptone VG0300**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Množství: 5 g/l

▪ **L- Cysteine hydrochloride monohydrate**

Výrobce: Sigma-Aldrich (Německo)

Množství: 0,5 g/l

▪ **Tween Polysorbate 80 (detergent)**

Výrobce: Scharlau (Španělsko)

Množství: 1ml/l

Použití: Pro stanovení celkového počtu anaerobních mikroorganismů.

○ **Buffered peptone water CM1049 (ISO)**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Tekutá půda pro neselektivní pomnožení mikroorganismů.

○ **Rappaport-Vassiliadis soya peptone broth CM0866 (RVS broth)**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Tekuté selektivní médium k pomnožení salmonel a shigel.

○ **Salmonella Shigella agar CM0099 (SS agar)**

Výrobce: Oxoid (Velká Británie)

Použití: Selektivní médium pro kultivaci salmonel a shigel.

Kultivační média byla připravena podle návodu od výrobce.

Všechna média kromě média na enterokoky byla vysterilizována 121 °C/15 min. Médium na enterokoky bylo povařeno, dokud se nezbarvilo do zlatova (podle návodu od výrobce).

4.2.2 Příprava vzorků

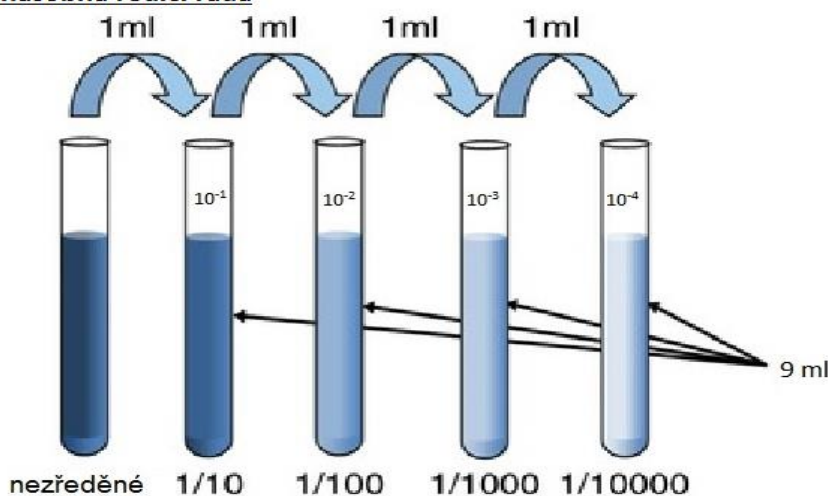
Před samotnými rozbory byly testované vzorky vyjmuty z do té doby neporušeného obalu a asepticky zhomogenizovány v mixéru. Veškerá manipulace a příprava byla provedena v aseptickém prostředí za pomoci sterilních nástrojů a pomůcek.

4.2.3 Příprava ředící řady

Pro kultivaci mikroorganismů je nutné vzorky upravit a zředit tak, aby vyrostlé bakteriální kolonie byly izolované a daly se spočítat. Počet ředění odvozujeme od předpokládaného množství mikroorganismů ve vzorku. Při přípravě se byla použita tzv. desetinásobná ředící řada, při které dochází v každém dalším kroku ke snížení obsahu rozpuštěné látky 10 krát. Získali jsme tedy sadu zkumavek, ve které každá další zkumavka v řadě obsahuje roztok o desetinásobně nižší koncentraci bakterií než zkumavka předcházející.

Obrázek 12: Desetinásobná ředící řada

Desetinásobná ředící řada



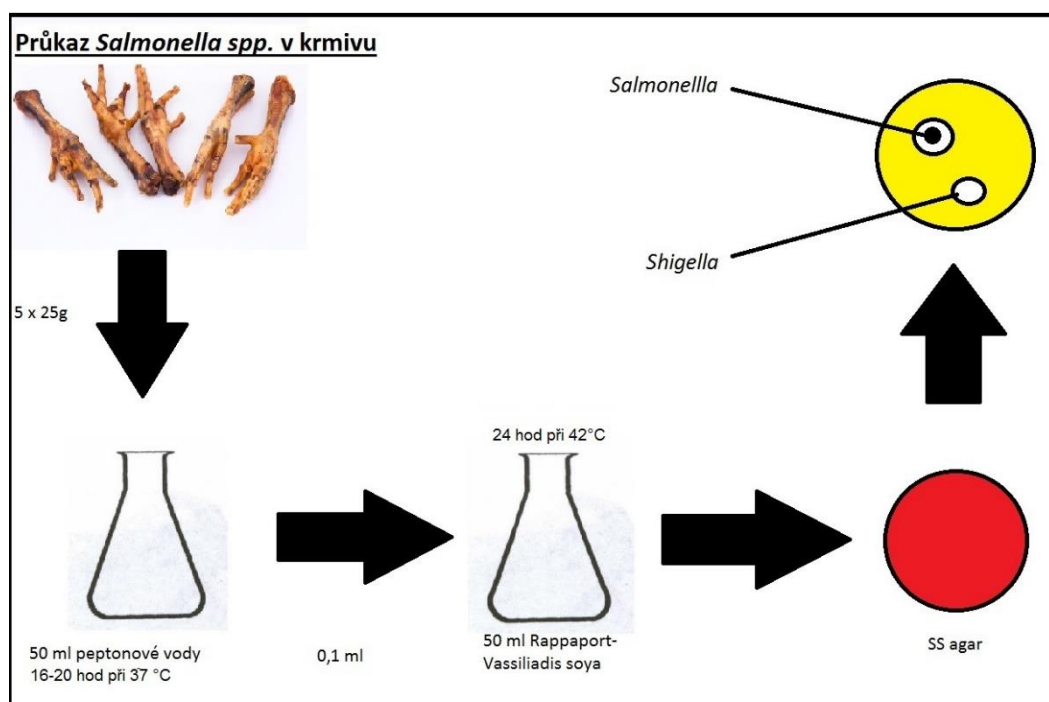
4.2.4 Očkování vzorků

Počty bakterií byly stanoveny kultivační deskovou metodou. Z připraveného ředění byl 1 ml vzorku napipetován do 9 mm Petriho misky, zalit agarem a krouživými pohyby promíchán. Ve chvíli, kdy agar zatuhl, byly vzorky dány na kultivaci.

4.2.5 Kultivace

Pro stanovení bacilů a klostridií byly vzorky pasterovány po dobu 15 min při 80 °C. Pasterizace je proces částečné sterilizace, při níž je usmrcena většina mikroorganismů. V mikrobiologii se používá zejména na oddělení spor od vegetativních buněk. Kultivace vzorků pro stanovení klostridií a celkového počtu anaerobních mikroorganismů probíhala v anaerobní atmosféře vyvinuté systémem AnaerogenPlus (Oxoid). Postup při stanovování salmonel je zcela odlišný od stanovování předchozích mikroorganismů a je vyznačen na následujícím schématickém obrázku.

Obrázek 13: Kvalitativní test na přítomnost *Salmonella* spp. v krmivu



Celková časová náročnost průkazu salmonel ve vzorku jsou 4 dny. Prvním krokem je inokulace vzorku do tekuté půdy pro neselektivní pomnožení a inkubace 16 - 20 hod při 37 °C. Kulturu, kterou jsme získali, jsme přeočkovali do tekuté selektivní půdy. Inkubace probíhá aerobně 24 hod při 42 °C. Následuje očkování do pevné selektivní půdy. A opětovná inkubace vzorků. Kultivace salmonel, bacilů a celkového počtu aerobních mikroorganismů probíhala v termostatu 48 hodin při 37 °C.

4.2.6 Identifikace mikroorganismů

Mikroorganismy byly izolovány a dále identifikovány pomocí mikroskopie a hmotnostního spektrometru MALDI - TOF (Bruker Daltonik GmbH) s použitím softwaru pro identifikaci mikroorganismů MALDI Biotyper RTC. Podstatou detekce mikroorganismů je extrakce pomocí ethanolu a kyseliny mravenčí. Při přípravě vzorku si nejprve do čisté eppendorfské pipetujeme 0,5 ml destilované vody. Z kultivační misky opatrně odebereme biologický materiál, který přeneseme do destilované vody a řádně promícháme. Přidáme 1,5 ml ethanolu (70 % v/v) a opět promísíme. Následně se vzorky odstředí 14 500 ot/min. po dobu 2 minut. Supernatant opatrně slijeme a pelet necháme schnout. Přidáme k němu 15 µl 70% kyseliny mravenčí a promícháme. Přidáme stejné množství 100% acetonitrilu, promícháme a dáme zcentrifugovat. Na čistou MALDI destičku si nakapeme 1 µl supernatantu a necháme schnout. Stejně pole překryjeme 1 µl roztoku matrice. Výběr matric je důležitým faktorem analýzy. Vhodnými matricemi jsou aromatické karboxylové kyseliny, nejčastěji deriváty kyseliny benzoové rozpuštěné ve vodném roztoku acetonitrilu, ethanolu nebo methanolu. Často se navíc roztok okyseluje kyselinou trifluoroctovou. Mezi nejpoužívanější matrice patří kyselina α -kyano-4-hydroxyskořicová (HCCA), 3,5-dimethoxy-4-hydroxyskořicová (sinapová, SA), 2,5-dihydroxybenzoová (gentisová, DHB) a 4-hydroxy-3-methoxyskořicová (ferulová, FA). Rozdílem mezi nimi je, že odlišně krystalizují a ionizují látky. Jakmile matrice úplně zaschne, je možno vložit destičku do přístroje k identifikaci mikroorganismů.

4.2.7 Výpočet CFU a statistické šetření

CFU je zkratka anglického termínu „Colony Forming Units“, tedy v překladu kolonie tvořící jednotky (KTJ). CFU se stanovuje plotnovými metodami, kdy se zkoumaný vzorek nanese na Petriho misku s pevným médiem, a po inkubaci se spočítají vytvořené kolonie. Zjišťování počtu mikroorganismů je nutné při některých biochemických a genetických experimentech. Stanovení počtu mikroorganismů se provádí v daném objemu a přepočítává obvykle na 1 ml původního vzorku dle následujícího vzorce:

$$P = [(P1 + P2) / 11] \times F \text{ (KTJ/ml)}$$

- P1, P2 - počet kolonií na dvou po sobě jdoucích počitatelných plotnách
- F - převrácená hodnota vyššího ředění
- celé číslo je nutno zlogaritmovat dekadickým log

Na závěr bylo provedeno statistické vyhodnocení pomocí jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA) s použitím Scheffého testu.

5 Výsledky

V praktické části diplomové práce byly zjišťovány celkové počty aerobních i anaerobních mikroorganismů, následovala jejich identifikace a statistické vyhodnocení. Také byly stanoveny počty bacilů, klostridií a enterokoků. Klostridie sice byly v malém množství potvrzeny, ale identifikace na MALDI-TOF jejich přítomnost neprokázala. Enterokoky nebyly kultivačními metodami potvrzeny. Taktéž byla ve vzorcích kvalitativním testováním vyloučena přítomnost salmonel.

5.1 Vyhodnocení kultivace

Tabulka 3: Výsledky kultivace

vzorek	celkové počty aerobní	celkové počty anaerobní	bacily	enterokoky	salmonely
	$\bar{x} \pm \sigma^{\text{statistické}} \text{vyhodnocení}$	$\bar{x} \pm \sigma^{\text{statistické}} \text{vyhodnocení}$	\bar{x}	\bar{x}	Pozitivní / negativní nález
Barking Heads Quackers Grain Free	$5,44 \pm 0,28^{\text{F}}$	$3,89 \pm 0,72^{\text{D}}$	3,37	< 1,00	ND
Barking Heads Turkey Delight Grain Free	$4,57 \pm 0,16^{\text{DE}}$	$2,82 \pm 0,52^{\text{C}}$	2,72	< 1,00	ND
Calibra Dog Salmon & Potato	$4,65 \pm 0,06^{\text{DE}}$	$2,17 \pm 0,13^{\text{BC}}$	2,78	< 1,00	ND
Brit Petit Chicken & Schrimp	$< 1,00 \pm 0,00^{\text{A}}$	$< 1,00 \pm 0,00^{\text{A}}$	< 1,00	< 1,00	ND
Brit Let's Bite Pure Salmon	$3,61 \pm 0,14^{\text{BC}}$	$2,21 \pm 0,05^{\text{BC}}$	< 1,00	< 1,00	ND
Mapes drůbeží pařáty	$3,68 \pm 0,13^{\text{BC}}$	$1,94 \pm 0,16^{\text{B}}$	< 1,00	< 1,00	ND

Výsledky jsou uvedeny v log KTJ/g krmiva. Hodnoty u celkových počtů aerobních i anaerobních jsou průměry tří měření \pm směrodatná odchylka. Bacily a enterokoky byly

analyzovány pouze v jednom opakování, salmonely byly stanovovány kvalitativně (ND = negativní detekce). Horní indexy (A, B, C, D, E, F) značí statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) mezi jednotlivými krmivými.

Statistickým porovnáním vzorků (viz. Tabulka 1) bylo zjištěno, že celkově nejméně mikroorganismů bylo prokázáno v konzervě Brit Petit Chicken & Schrimp, u které nenarostly žádné bakterie. Nejvíce kolonií bylo naopak v suchém granulovaném krmivu Barking Heads Quackers Grain Free. Dle analýzy rozptylu s použitím Scheffého testu se u celkového počtu aerobních mikroorganismů navzájem shodují vzorky Brit Let's Bite Salmon s Mapes drůbežími pařáty a také suchá granulovaná krmiva Barking Heads Turkey Delight Grain Free s Calibra Dog Salmon & Potato. Největší statisticky významný rozdíl můžeme pozorovat mezi konzervovaným krmivem Brit Petit Chicken & Schrimp a extrudovanými krmivými Barking Heads Quackers Grain Free, Barking Heads Turkey Delight Grain Free a Calibra Dog Salmon & Potato. Největší směrodatnou odchylku má Barking Heads Quackers Grain Free a nejmenší po Brit Petit Chicken & Schrimp krmivo Calibra Dog Salmon & Potato. Z hlediska celkového počtu anaerobních mikroorganismů je největší statisticky významný rozdíl mezi konzervovaným krmivem Brit Petit Chicken & Schrimp a extrudovaným krmivem Barking Heads Quackers Grain Free. Shoda nastala u vzorku Mapes drůbeží pařáty se vzorkem Brit Let's Bite Salmon. Zároveň se vzorek Brit Let's Bite Salmon shoduje s Calibra Dog Salmon & Potato a Calibra Dog Salmon & Potato vykazuje shodu s krmivem Barking Heads Turkey Delight Grain Free. I v tomto případě je největší směrodatná odchylka u suchého krmiva Barking Heads Quackers Grain Free a nejmenší u konzervy Brit Petit Chicken & Schrimp a sušených krmných doplňků Brit Let's Bite Pure Salmon. V následující tabulce si také můžeme všimnout, že nejvíce bacilů bylo přítomno v suchých granulovaných krmivech.

5.2 Identifikace pomocí MALDI-TOF

Tabulka 4: Výsledky četností mikroorganismů dle MALDI-TOF

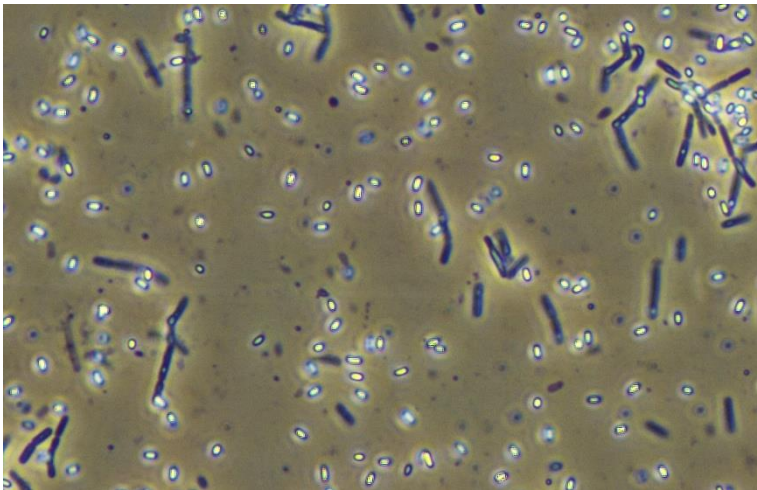
Vzorek	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Barking Heads Quackers Grain Free	4	0
Barking Heads Turkey Delight Grain Free	4	0
Calibra Dog Salmon & Potato	4	0
Brit Petit Chicken & Schrimp	0	0
Brit Lets Bite Salmon	3	0

Byla provedena identifikace u izolátů z médií pro celkové počty aerobních i anaerobních bakterií. Celkem bylo podrobena analýze 19 vzorků, z nichž v 18 byla identifikována bakterie *Bacillus cereus*, jak je možno vidět v následující tabulce. Kromě konzervovaného krmiva Brit Petit Chicken & Schrimp, ve kterém nebyly nalezeny žádné bakterie, byla tato bakterie identifikována ve všech ostatních vzorcích. Kromě *B. cereus* byl jednou identifikován *Enterococcus faecalis*, a to u produktu Mapes drůbeží pařáty.

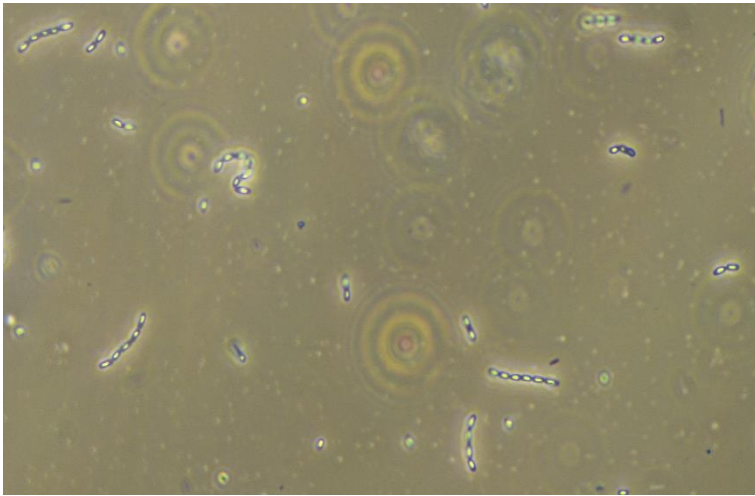
5.3 Mikroskopické pozorování

Při mikroskopickém pozorování jednotlivých vzorků bylo možno potvrdit výskyt bacilů (tyčinek) a jejich spor.

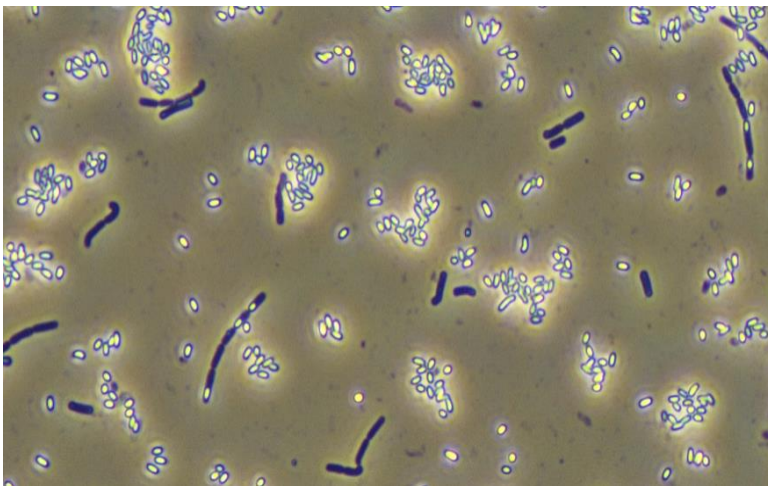
Obrázek 14: Izolát z aerobní kultivace na neselektivním médiu z Barking Heads Quackers Grain Free



Obrázek 15: Izolát z média pro izolaci bacilů z Barking Heads Quackers Grain Free



Obrázek 16: Izolát z aerobní kultivace na neselektivním médiu z Brit Let's Bite Salmon



6 Diskuze

Výroba krmiv je regulována zákonem č. 91/1996 Sb., o krmivech. Jedním z hlavních požadavků chovatelů na krmivo je zejména jeho bezpečnost.

Kontaminace krmiv mikroorganismy může mít různé příčiny. Může k ní dojít již před samotným procesem jejich výroby, a to například při nevhodném skladování surovin a jejich následném použití ve výrobě. Další kritické body, které mohou ovlivnit mikrobiologickou čistotu krmiva, nastávají při procesu výroby. Při něm je nutné dbát zejména na dodržování hygienických zásad. Velké riziko sekundární kontaminace nastává při manipulaci s produkty na znečištěném povrchu linky nebo v obalových materiálech. Ke znehodnocení krmiv dochází nejčastěji prostřednictvím spor, které se vyskytují ve vzduchu. Posledním zdrojem možné kontaminace u výrobce jsou balicí stroje, na kterých mohou ulpět zbytky po předchozích výrobních procesech, či jiné nečistoty (MA Leaders, 2012).

Vědecké studie z celého světa už mnohokrát prokázaly přítomnost velmi nebezpečných patogenních mikroorganismů v krmivech pro psy. Nejčastěji se jedná zejména o *Salmonelly* spp., *Escherichia coli* a další, u kterých hrozí potenciální riziko přenosu ze zvířete na člověka (Adley et al., 2011).

V praktické části mé diplomové práce jsme se zabývali testováním krmiv a krmných doplňků pro psy, na přítomnost nejčastějších bakteriálních kontaminantů. Výsledky testů v mém případě nepotvrdily přítomnost salmonel, ale odhalily jiné potenciálně nebezpečné patogenní mikroorganismy.

Důvodem, proč žádný ze vzorků nebyl pozitivní na přítomnost salmonel, může být nízký počet testovaných vzorků. Ve vědeckých studiích zmiňovaných v literární rešerši této práce, bylo ve všech případech testováno více než sto vzorků, přičemž prevalence byla vyšší než 20 %. V těchto studiích se vědci zabývali především případy nákazy člověka salmonelou v souvislosti s živočišnými pamlsky pro psy. Během jednoho roku (říjen 2008 - září 2009) bylo testováno na přítomnost salmonel 102 prasečích uší. Z celkového počtu kultivace odhalila 24,5 % pozitivních vzorků, metoda PCR 28,4 % pozitivních vzorků (Adley et al., 2011). Galvao et al. (2014) se ve své práci zaměřil na mikrobiologickou kvalitu psích pamlsků z exportu. Vzorky testoval na přítomnost salmonel, klostridií, stafylokoků a termostabilních koliformních bakterií. Z celkového počtu 108 analyzovaných vzorků bylo 22 vzorků kontaminováno mikroorganismy.

Výsledky našeho testování se neshodují s poznatky Galvao et al. (2014), protože ti u většiny pamlsků kontaminaci nenalezli. V našem případě byly naopak patogenní

mikroorganismy nalezeny ve všech vzorcích kromě konzervovaného krmiva.

V Kanadě proběhl výzkum, ve kterém bylo podrobena testování na přítomnost salmonel 166 vzorků mraženého krmiva zakoupeného v obchodech s chovatelskými potřebami. Celková prevalence byla 21 %; kuře mělo pozitivní test na salmonelu dokonce v 67 % případů. Tato studie demonstruje potenciální riziko krmení syrovým masem (Finley et al., 2008).

Při testování našich vzorků jsme předpokládali, že nejvíce patogenních mikroorganismů bude přítomno v sušených kuřecích pařátech a sušených pamlscích z lososa. Menší kontaminaci jsme předpokládali v suchých granulovaných krmivech a nejméně v konzervě, která by dle veterinárních a hygienických norem měla být sterilní. Naše domněnka o kontaminaci produktů vyplývá z technologického procesu výroby krmiv.

Při sušení masa je velmi důležité dbát na zásady hygieny a dodržet správný technologický postup. Při procesu sušení je stěžejním krokem dodržení teploty 75 °C na minimálně 15 - 20 minut, aby došlo ke zničení všech potenciálně nebezpečných mikroorganismů a poté snížení teploty na 55 °C a sušit pozvolna 9 - 24 hodin. Při stanovení bacilů a klostridií u sušených krmných doplňků Mapes drůbeží pařáty a Brit Let's Bite Salmon nedošlo k nárůstu žádné kolonie, ačkoli při kultivaci celkového počtu aerobních i anaerobních mikroorganismů k nárůstu na médiích došlo. Rozhodujícím faktorem se stal pravděpodobně proces pasterace, který byl uskutečněn při kultivaci bacilů a klostridií, nikoliv při stanovení celkových počtů. Bacily pasteraci nepřežily, pravděpodobně se v krmivu nevyskytovaly ani žádné spory, které by proces sušení přečkaly. Na druhou stranu ale víme, že bacily v krmivu přítomny byly, protože byly detekovány přístrojem MALDI - TOF.

U suchých granulovaných krmiv je předpoklad zničení veškerých mikroorganismů během procesu extruze, který probíhá za velmi vysoké teploty a tlaku. Ačkoli by se mohlo zdát, že tato krmiva budou prostá mikroorganismů, hrozí zde sekundární kontaminace sporami ze vzduchu a výrobních linek (Jacobs, 2005). K tomu také s velkou pravděpodobností došlo u námi testovaných vzorků. Ve všech suchých krmivech byly stanoveny bacily. Proces pasterace přečkaly ve formě odolných spor.

Při výrobě konzervovaných krmiv dochází ke konzervaci produktu sterilací horkou parou v autoklávu. Díky tomuto technologickému postupu a hermeticky uzavřenému obalu mají tato krmiva oproti ostatním výrazně delší trvanlivost. Konzervované krmivo uspělo v testu nejlépe, protože bylo prosté jakýchkoliv mikroorganismů.

Ze zjištěných kontaminantů vykazoval při detekci MALDI-TOF největší četnost druh *Bacillus cereus*, který byl detekován ve všech vzorcích kromě konzervy a jeho přítomnost

potvrdila i mikroskopie izolátů. V padesátých letech dvacátého století byl *B. cereus* zařazen mezi mikroorganismy, které vyvolávají otravu potravinami (Hauge, 1955). Jedná se o grampozitivní, fakultativně anaerobní tyčinku, schopnou růstu v širokém teplotním rozmezí 8 – 55 °C (optimum 28 – 35 °C) a při pH v rozmezí 4,9 – 9,3. Na běžných půdách tvoří 3 – 8 mm velké kolonie s nepravidelnými okraji (Votava, 2003). Konzumace potravin kontaminovaných bakteriemi *B. cereus* může vyústit ve dvě různé formy alimentárních onemocnění – průjemový a emetický syndrom. Průjemová onemocnění, která doprovází bolesti břicha vyvolává enterotoxin, který se tvoří v tenkém střevě konzumenta po požití kontaminované potravy. Inkubační doba je 8 - 16 hod, doba trvání onemocnění 12 - 24 hod nebo i více dnů. Enterotoxin je inaktivován již do tří minut při teplotě 65 °C. Emetický toxin je produkován živými buňkami v již kontaminované potravine. Vyvolává nevolnost, zvracení, malátnost. Inkubační doba je 1 - 5 hod, doba trvání onemocnění 6 - 24 hod. Emetický toxin je vysoce termostabilní, byl prokázán i po 1 hod při působení velmi vysokých teplot. Je také odolný i vůči extrémním hodnotám pH (Pobodová, 2014).

To, že je kontaminace krmiv aktuálním problémem dokázal Hofve (2016), který ve své studii uvádí, že výzkum, který se zabýval testováním vzorků na přítomnost bakterie *B. cereus* ve více než čtyřiceti vzorcích suchých granulovaných krmiv, vyšel pozitivní ve všech případech, což je pro chovatele velmi znepokojující informace.

Další těžká kontaminace krmných doplňků bakterií *B. cereus* byla prokázána ve Finsku. Z pěti výrobků měly dva vzorky pozitivní nález. Výzkum ukázal, že k rozšíření bakterie došlo prostřednictvím spor, které přežili proces pasterizace (Raevuori et Pekkanen, 1976).

Pokud tyto výsledky porovnáme s výsledky testů, které byly provedeny v praktické části mé diplomové práce, můžeme vidět, že z šesti testovaných produktů byla v pěti detekována tato bakterie. Naše poznatky z testování o kontaminaci krmiv bakterií *B. cereus* se shodují s názory Hofve (2016).

V současné době legislativa EU neuvádí limity pro tento druh bakterie, pouze uvádí, že krmiva nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro zdraví. Pro chovatele to ale neznamená, že by se museli obávat o zdraví svých psů, protože (Steinhauser, 1995) uvádí, že k vyvolání onemocnění je třeba velkého množství bakterií, zpravidla 10^6 buněk na 1 g potravin. Léčba enterotoxikóz je symptomatická. Obecně u všech průjemových onemocnění je problém s dehydratací organismu, která je způsobena náhlou a nadměrnou ztrátou tekutin. Při větších ztrátách vody se vyskytuje malátnost, časté jsou také křeče v končetinách, proto je nutné

neustále tekutiny doplňovat (Farková, 2012). U některých citlivých jedinců může vést pozření kontaminované potravy touto bakterií až ke smrti (Zadeh, 2012).

Pokud bychom chtěli docílit inhibice růstu *Bacillus cereus*, mohli bychom ji vyvolat přidavkem kyseliny sorbové (0,26 %) nebo kyseliny octové (0,1 %). Jedná se o bakteriostatické látky, které mají silné konzervační účinky. Nejúčinnější jsou v silně kyselém prostředí, které potlačuje jejich disociaci, a tím zvyšuje jejich difuzi cytoplazmatickou membránou buněk (Šilhánková, 2002).

Pro chovatele, který by chtěl zcela minimalizovat riziko bakteriálních nákaz, se jeví nejlepším řešením krmit psy konzervovaným krmivem. Za předpokladu, že nedojde k poškození obalu nebo k pochybení při uskladnění nehrozí, že by mikroorganismy výrobní proces přežily, jak je vidět i v našem případě při testování konzervy Brit Chicken & Schrimp. O něco méně bezpečná jsou krmiva a krmné doplňky zpracovávána při různých technologických procesech. Největšímu nebezpečí jsou vystavováni psi a jejich majitelé, kteří zkrmují syrové maso. Vzhledem k tomu, že nedochází k žádnému technologickému procesu úpravy krmiva, je zde mnohem větší riziko bakteriálních nákaz (Dubé, 2018).

7 Závěr

Cílem této diplomové práce bylo testování přítomnosti mikroorganismů, zejména bakterií v krmivech a krmných doplňcích pro psy.

Hypotéza, že produkty, které se při výrobě nesterilují, obsahují živé mikroorganismy, se testováním potvrdila. Krmiva, které jsou vyrobena z živočišných bílkovin, jsou často kontaminována hnilobnými bakteriemi. Ani v jednom z námi zakoupených vzorků nebyla potvrzena přítomnost salmonel nebo enterokoků. Klostridie byly kultivační metodou odhaleny pouze u suchých granulovaných krmiv. Nejčastěji detekovanou bakterií byl *Bacillus cereus*. Celkově v testu nejlépe dopadlo krmivo v konzervě, následně sušené krmné doplňky a nejhůře suchá granulovaná krmiva.

Skutečnost, že v některých produktech jsou přítomny patogenní mikroorganismy, bychom měli brát jako varování. Ke kontaminaci může dojít různými způsoby. Neustálé testování krmiv však svědčí o tom, že je tu snaha tento problém podchytit. Pokud chce chovatel minimalizovat riziko nákazy patogenními bakteriemi, je potřeba vždy krmivo pečlivě zkontrolovat před jeho servírováním. Krmiva není vhodné uchovávat společně s potravinami určenými pro lidi. Zakoupené produkty by neměly mít porušený obal, nesmí zapáchat a ani mít nezvyklou barvu. Při jejich přípravě je nutné dodržovat hygienické zásady a mýt si ruce. Nejvhodnějšími krmivy se z hlediska mikrobiologické kvality podle očekávání jeví konzervovaná krmiva.

8 Použitá literatura

Adams, M. R., Moss, M. O., McClure, P. 2016. Food Microbiology. Royal Society of Chemistry. UK. p. 562. ISBN: 1782627626.

Adley, C., Dillon, C., Morris, C. P., Delappe, N., Cormican, M. 2011. Prevalence of Salmonella in pig ear pet treats. Food Research International. 44(1). 193 - 197.

Ambrožová, H. 2011. Akutní infekce trávicího traktu. Interní Med. 13(7,8). 288 - 291.

Amyes, S. G B. 2013. Bacteria. OUP Oxford. UK. p. 152. ISBN: 0199578761.

Aspinall, V., Capello, M. 2015. Introduction to Veterinary Anatomy and Physiology Textbook. Elsevier Health Sciences. p. 286. ISBN: 0702057339.

Barrow, P. A., Methner, U. 2013. Salmonella in Domestic animals. CABI. UK. p. 547. ISBN: 1845939026.

Bartůněk, P., Jurásková, D., Heczková, J., Nalos, D. 2016. Vybrané kapitoly z intenzivní péče. Grada. Praha. p. 752. ISBN: 8027193281.

Bhadra, A. 2014. Preference for meat is not innate in dogs. Journal of Ethology. 32(1). 15 - 22.

Botsaris, G., Taki, A. 2014. Effect of High- Pressure Processing on the Microbial Quality throughout the Shelf Life of Vacuum-Packed Sliced Ham and Frankfurters. Food Processing and Preservation. 39(6). 840 - 845.

Brands, D. A., Alcamo, I. E. 2006. Salmonella. Infobase Publishing. Philadelphia. p. 102. ISBN: 1438101651.

- Brinkmann, V., 2005. Mining Approach Systematically Links Genes to Traits. *PLoS Biology*. 3(5).
- Case, L. P. 2013. *The Dog: Its Behavior, Nutrition, and Health*. Blackwell Pub. Iowa. p. 497. ISBN: 1118701232.
- Devahastin S. 2010. *Physicochemical Aspects of Food Engineering and Processing*. CRC Press. Boca Raton. p. 354. ISBN: 9781420082418.
- Dubé, D. E. 2018. Don't feed your pet raw meat foods – it's dangerous for both pets and humans, experts warn. *GlobalNews*. 1(12).
- Dunkley, K. D., Callaway, T.R., Chalova V. I., McReynolds, J. L., Hume, M. E., Dunkley, C. S., Kubena, L. F., Nisbet, D. J., Ricke, S. C. 2009. Foodborne Salmonella ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe*. 15(1 - 2). 26-35.
- Duvall, B., Kershner, R. M. 2006. *Ophthalmic Medications and Pharmacology*. Slack Incorporated. USA. p. 130. ISBN: 1556427506.
- Dvořáková, I. 2013. Průkaz Salmonel v biologickém materiálu. Bakalářská práce. UK. Hradec Králové. 70 s.
- Dylevský, I. 2009. *Funkční anatomie*. Grada. Praha. 532 s. ISBN: 978-80-247-3240-4.
- Evans, H. E., Lahunta, A. 2013. *Miller's anatomy of the dog*. Elsevier. Missouri. p. 850. ISBN: 978-143-7708-127.
- Farková, B. 2012. Patogenní mikroorganismy v masných výrobcích. Bakalářská práce. Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. 44 s.
- Finley, R., Reid-Smith, R., Ribble, C., Popa, M., Vandermeer, M., Aramini, J. 2008. The Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Salmonellae isolated from Commercial Available Canine Raw Food Diets in Three Canadian Cities. *Zoonoses Public Health*. 55. 8 - 10
- Galvao, J. A., Yamatogi, R. C., Teixeira Souza, L. C., Joaquim, J. F., Rodrigues, M. V., Baldini, E. D., Pinto, J. P. 2014. Quality and Safety of Pet Treats: Assessment of the Microbial Safety and Quality of pet treats. *Journal of Food*. 39(6). 1201 - 1205.

Gould, L. H., Limbago, B. 2010. Clostridium difficile in Food and Domestic Animals: A New Foodborne Pathogen? Clinical Infectious Diseases. 51(5). 577 - 582.

Gruiz, K., Meggyez, T., Fenyvesi, E. 2015. Engineering Tools for Environmental Risk Management: 2. Environmental Toxicology. CRC Press. UK. p. 566. ISBN: 9781315778778.

Haladejová, N. 2014. Stanovení probiotik v krmivu pro domácí zvířata. Bakalářská práce. ČZU. Praha. 55s.

Hampl, B. 1968. Potravinářská mikrobiologie. Státní nakladatelství technické literatury. Praha. 276 s.

Hand, M. S., Thatcher, C. D., Remillard, R. L. 2010. Small animal clinical nutrition. Mark Morris Institute. Topekka. p. 1192. ISBN: 06-152-9701-3.

Hauge, S. 1955. Food poisoning caused by aerobic spore forming bacilli. Journal of Applied Microbiology. 18. 591 - 595.

Hayhurst, Ch. 2004. E. coli. The Rosen Publishing Group. NY. p. 64. ISBN 9780823942015.
International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2006. Microorganisms in Foods 6: Microbial Ecology of Food Commodities. Springer Science & Business Media. NY. p. 764. ISBN: 9780387288017.

Jacobs, J. 2005. Performance dog nutrition: optimize performance with nutrition. MI: Sno Shire Publications. Sanford. p. 210. ISBN: 09-759-6340-6.

Jaber, S. A. 2012. Canine faeces: The Microbiology of an environmental health problem. Molecular Biology and Biotechnology. The University of Sheffield. p. 241.

Kalvach, Z., Zadák, Z., Jirák, R., Zavázalová, H., Sucharda, P. 2004. Geriatrie a gerontologie. Grada. Praha. 864 s. ISBN: 8024770385.

Kittnar, O. 2011. Lékařská fyziologie. Grada. Praha. 790 s. ISBN: 8024730685.

Labbé, R. G., García, S. 2013. Guide to Foodborne Pathogens. John Wiley & Sons. UK. p. 488. ISBN: 9781118684832.

Levine, M. M. 1987. Escherichia coli that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. The Journal of Infectious Diseases. 155(3). 377 - 389.

Lukáš, K. 2005. Gastroenterologie a hepatologie pro zdravotní sestry. Grada. Praha. 287 s. ISBN: 8024712830.

Macela, A. 2006. Infekční choroby a intracelulární parazitismus bakterií. Grada, Praha. 215 s. ISBN: 8024706644.

Marth, E. H., Steele, J. L. 2001. Applied dairy mikrobiology. Dekker. NY. p. 744. ISBN: 0-8247-0536-x.

Martínek, J., Vacek, Z. 2009. Histologický atlas. Grada. Praha. 134 s. ISBN: 9788024723938.

Marvan, F., Hampl, A. 2011. Morfologie hospodářských zvířat. Brázda. Praha. 303 s. ISBN: 978-80-213-2188-5.

Melter, O., Malmgrem, A. 2014. Principy a praktika lékařské mikrobiologie. Karolinum press. Praha. 140 s. ISBN: 9788024624143.

Minton, N. P., Clarke, D. J. 2013. Clostridia. Springer Science & Business Media. UK. p. 304. ISBN: 9781475797183.

Muntau, A. C. 2014. Pediatrie. Grada. Praha. 608 s. ISBN: 8024745887.

Najbrt, R., Červený, Č., Kaman, J., Mikyska, E., Štarha, O., Štěrba, O. 1980. Veterinární anatomie 1. Státní zemědělské nakladatelství. Praha. 524 s. ISBN: 07-097-80.

National Research Council, 2006. Nutrient requirement of dogs and cats. National Academies Press. Washington D. C. p. 424. ISBN: 978-030-9086-288.

Niemiec, B. A. 2011. Stomatologie psa a kočky. Medicus Veterinarius. San Diego. 272 s. ISBN: 8087537009.

Nilsson, O. 2015. Hygiene quality and presence of ESBL-producing *Escherichia coli* in raw food diets for dogs. *Infection Ecology & Epidemiology*. 5(0). 1 - 4.

Oni, R. A., Lambertini, E., Buchanan, R. L. 2016. Assessing the potential for *Salmonella* growth in rehydrated dry dog food. *International Journal of Contamination*. doi.org/10.1186/s40550-016-0043-5

Ottová, B., Mihalová, R. 2013. Základy biologie a genetiky člověka. Karolinum press. Praha. 228 s. ISBN: 8024621096.

Pobodová, J. 2014. Výskyt *Bacillus cereus* v potravinách. Bakalářská práce. Masarykova univerzita. Přírodovědecká fakulta. 50 s.

Rada, V. 2010. Využití probiotik, prebiotik a synbiotik. *Interní medicína*. 12(2). 92 - 97.

Raeuori, M., Pekkanen, T. J. 1976. The occurrence of *Bacillus cereus* in Finnish dog food sausages; a microbiological and physiochemical survey. *Nord Vet Med*. 28(6). 309 - 15.

Reece, W. O. 2011. Fyziologie a funkční anatomie domácích zvířat. Grada. Praha. 473 s. ISBN: 80-247-3282-3.

Remillard, R.,L. 2008. Homemade diets: attributes, pitfalls, and a call for action. *Top Companion Anim Med*. 23(3). 137 - 142.

Rozsypal, H., Holub, M., Kosáková, M. 2013. Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči. Karolinum press. Praha. 396 s. ISBN: 8024621975.

Schindler, J. 2014. Mikrobiologie: Pro studenty zdravotnických oborů. Grada. Praha. 248 s. ISBN: 8024792753.

Simon, S. 2010. Zdravá výživa pro starého nebo nemocného psa: syrová strava BARF. Grada. Praha. ISBN: 978-80-247-3241-1

Steinhauser, L. 1995. Hygiena a technologie masa. LAST. Tišnov. 643 s. ISBN: 80-900260-4-4.

Stevens, C. E., Hume, I. D. 2004. Comparative Physiology of Vertebrate Digestive System. Cambridge University press. NY. p. 399. ISBN: 0521617146.

Sýkora, J. 2011. Prospěšná v každém věku. Pacientské listy. 2011(1)

Šilhánková L. 2002. Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology. Academia. Praha. 363 s. ISBN: 80-200-1024-6.

Taranushenko, Y. 2010. Historie výroby krmiv pro psy a kočky. Zdroj Propesko – Partner in Pet Food CZ, s.r.o.

Thompson, A. 2008. Ingredients: Where Pet Food Starts. Topics in Companion Animal Medicine. 23(3). 127 - 132.

Torres, A.G. 2010. Pathogenic Escherichia Coli in Latin America. Bethan Science Publishers.USA. p. 264. ISBN: 9781608051922.

Turkington, A., Ashby, B. 2007. The Encyclopedia of Infectious Diseases. Infobase Publishing. NY. p. 412. ISBN: 9780816075072.

- Votava, M. 2003. Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun. Brno. 495 s. ISBN: 80-902896-6-5.
- Vránová, D. 2013. Chronická onemocnění a doporučená výživová opatření. ANAG. Olomouc. 183 s. ISBN: 9788072637881.
- Wedley, A. L., Dawson, S., Maddox, T. W., Coyne, K. P., Pinchbeck, G. L., Clegg, P., Nuttall, T., Kirchner, M., Williams, N. J. 2017. Carriage of antimicrobial resistant *Escherichia coli* in dogs: Prevalence, associated risk factors and molecular characteristics. *Veterinary Microbiology*. 199. 23 - 30.
- Wiebe, V. J. 2015. Drug Therapy for Infectious Diseases of the Dog and Cat. John Wiley & Sons.UK. p. 328. ISBN: 9781118557471.
- Yang, S. C., Lin, C. H., Aljuffali, I. A., Fang, J. Y. 2017. Current pathogenic *Escherichia coli* foodborne outbreak cases and therapy development. *Archives of mikrobiology*. 199(6). 811 - 825.
- Zadeh, H. S. 2012. Can *Bacillus cereus* Food Poisoning Cause Sudden Death? *Clin Microbiol. Nov.* 50(11). 3816. doi: 10.1128/JCM.00059-12.
- Zambori, C., Cumpănașoiu, C., Moț, D., Huțu, I.,Gurban, C., Tîrziu, E. 2014. The Antimicrobial Role of Probiotics in the Oral Cavity in Humans and Dogs. *Animal Science and Biotechnologies*. 47 (1). 126.
- Zbořil, V. 2005. Mikroflóra trávicího traktu. Grada. Praha. 156 s. ISBN: 8024762102.
- Zicker, S. C. 2008. Evaluating Pet Foods: How Confident Are You When You Recommend a Commercial Pet Food?.*Topics in Companion Animal Medicine*. 23(3). 121 - 126.

Internetové zdroje

Becker, R. 2015. Fecal Transplant: An Amazing Cure You've Probably Never Heard Off. HealthyPets.[online].[cit.2018-01-22].Dostupné:

<https://healthypets.mercola.com/sites/healthypets/archive/2015/12/13/fecal-transplants.aspx>

Cecava, J. 2015. Probiotika a prebiotika: pro lepší trávení. Pet Health Care. [online]. [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: <https://pethealthcare.cz/probiotika-a-prebiotika-pro-lepsi-traveni/>

Dtsch. Molkerei Ztg. 2002. Rozporuplné enterokoky. [online]. [cit. 2017-10-28]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/rozporuplne-enterokoky.aspx>

Gaschen, F. 2007. Průjem vznikající v tenkém střevě. [online]. [cit. 2018-01-15]. Dostupné z: <http://www.veterina-info.cz/odborne-clanky/prujem-vznikajici-v-tenkem-streve-275.html>

Hofve, J. 2016. Pet Foog Contaminants. Dogs Nutrition. [online]. [cit. 2018-01-15]. Dostupné z: <http://www.littlebigcat.com/nutrition/pet-food-contaminants/>

Leaders, M. A. 2012. Salmonella: Dry pet Foods and Pet Threats (FAQ). AVMA. [online]. [cit. 2018-01-15]. Dostupné z: <https://www.avma.org/KB/Resources/FAQs/Pages/Dry-Pet-Foods-and-Salmonella-FAQs.aspx>

Prahl, F. Historie krmiva pro kočky. [online]. [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <http://www.modrykocour.cz/stranka.php?id=416> 2004

Šoltys, V. 2016. Syrová strava pro psy a kočky. Veterinární klinika v Jičíně a Nové Pace. [online]. [cit. 2017-12-28]. Dostupné z: <http://www.jicinvet.cz/2016/03/syrova-strava-pro-psy-a-kocky/>

Vinš, M. 2016. Průjem u psa. ČeskáVeterina.cz. [online]. [cit. 2018-01-15]. Dostupné z: <https://www.ceskaveterina.cz/prujem-u-psa-cvt-1127-8962.html>

Použité normy

ČSN EN ISO 6579 (2003) Mikrobiologie potravinového řetězce - Horizontální metoda průkazu, stanovení počtu a sérotypizace bakterií rodu Salmonella - Část 1: Průkaz bakterií rodu Salmonella. Český normalizační institut. 68 s.