

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra etologie a zájmových chovů**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících  
zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s  
ohledem na jejich využití v canisterapii**

**Diplomová práce**

**Bc. Blanka Novotná  
Výživa zvířat**

**doc. Ing. Kristýna Machová, Ph.D.  
Ing. Jakub Mrázek, Ph.D.  
Ing. Chahrazed Mekadim, Ph.D.**

© 2023 ČZU v Praze



## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou diplomovou práci "Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii" 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 neporušil autorská práva třetích osob.

V Praze dne 13.4.2023

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala paní doc. Ing. Kristýně Machové, Ph.D. za vedení mé diplomové práce a cenné rady. Dále bych chtěla poděkovat panu Ing. Jakubovi Mrázkovi, Ph.D. a paní Ing. Chahrazed Mekadim, Ph.D. za pomoc s výzkumnou částí práce a odborný dohled v laboratoři Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky. Poděkování patří i paní Ing. Radce Procházkové, Ph.D. za pomoc se statistickým vyhodnocením dat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala celé mé rodině a mým blízkým za podporu nejen při psaní této práce, ale i v průběhu celého studia.

# Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii

## Souhrn

Diplomová práce se zabývá tématem Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii. Cílem této práce byla realizace výzkumného šetření, které vyhodnocuje výskyt bakterií se zoonotickým potenciálem u psů krmených dle konceptu BARF. Dílčím cílem bylo vyhodnocení dotazníkového šetření, které mapuje metody krmení psů zapojených do canisterapie.

Krmení psů dle konceptu BARF je založené na krmení syrovou potravou a v současné době je velice žádanou metodou krmení u mnoha majitelů psů. BARF strava však může představovat riziko přenosu zoonotických onemocnění, která jsou způsobena především bakteriemi a parazity, ojediněle i viry. Z tohoto důvodu není doporučeno krmit psa v canisterapii krmivem BARF. Pes v canisterapii navštěvuje klienty všech věkových kategorií s různými zdravotními problémy, u kterých může být oslabená imunita či zvýšené riziko infekce. Proto je v canisterapii nezbytná důkladná zoohygiena a prevence proti zoonotickým onemocněním.

Tato studie vyhodnocuje složení střevního mikrobiomu vzhledem k metodě krmení psa. Výzkumná část byla provedena v laboratoři na Akademii věd České republiky. Do výzkumného šetření bylo zapojeno celkem 100 psů (50 psů krmeno BARF stravou a 50 psů krmeno granulami). Složení střevního mikrobiomu bylo hodnoceno na základě izolace DNA z fekálního vzorku. Pro vyhodnocení potenciálních patogenních bakterií (*Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*) byla použita kvantitativní metoda qPCR. První hypotéza, která předpokládala, že u psů krmených dle konceptu BARF se bude vyskytovat signifikantně vyšší množství patogenních bakterií, byla prokázána u bakterií *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*. Výskyt bakterie *Salmonella spp.* byl sice vyšší u psů krmených BARF stravou, ale statisticky se významnost nepotvrdila. Druhá hypotéza předpokládala, že psi žijící venku na zahradě budou mít vyšší počet patogenních bakterií než u psů žijících doma. Tato hypotéza nebyla potvrzena. Pro porovnání rozdílu v kompletním střevním mikrobiomu u psů z hlediska způsobu krmení bylo provedeno pomocí metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE). U psů byl prokázal významný rozdíl ve složení mikrobiomu psů krmených BARF stravou a psů krmených suchou stravou. Překvapivě psi, kteří byli krmeni granulami měli větší výskyt potenciálně patogenních bakterií (konkrétně *Salmonella bongori*, *Escherichia coli* a *Streptococcus sp.*). Tento výsledek by tak mohl posloužit jako námět pro další studie.

Studie byla doplněna dotazníkovým šetřením, které mapovalo metody krmení canisterapeutických psů. Dílčího šetření se zúčastnilo 42 respondentů, z nichž 27 krmilo svého psa tepelně upravenou stravou. I přestože vědecká literatura nedoporučuje krmit psa v canisterapii BARF stravou, 11 respondentů touto metodou svého psa krmí a 4 respondenti

krmí kombinací tepelně upravené stravy a BARF stravy. Navíc většina respondentů uvedla, že je BARF strava vhodná i u canisterapeutických psů a neuvědomují si žádná rizika zoonóz.

Na základě výsledků této studie lze předpokládat, že u psů krmených dle konceptu BARF se vyskytuje vyšší riziko potenciálně patogenních bakterií, které mohou způsobovat zoonotická onemocnění. Jakékoli riziko přenosu zoonotických onemocnění je v canisterapii rozhodně nežádoucí, proto by se neměli do canisterapie zapojovat psi, kteří jsou krmeni touto stravou. Výsledky této studie by tak mohly posloužit jako podklad pro vytvoření kontrolních opatření, která by mohla definovat metodická doporučení krmení canisterapeutických psů.

**Klíčová slova:** zoonózy, AAT, BARF, pes, bakterie, real-time PCR

# Evaluation of the risk of bacteria causing zoonoses in dogs as a result of feeding the BARF concept with regard to their use in canistherapy

## Summary

The diploma thesis is about evaluation of the risk of occurrence of bacteria causing zoonoses in dogs as a result of feeding the BARF concept with regard to their use in canistherapy. The main goal of this work was the implementation of a research investigation that evaluates the occurrence of bacteria with zoonotic potential in dogs fed according to the BARF concept. A secondary goal was the evaluation of a questionnaire survey that maps the methods of feeding the dogs involved to canistherapy.

Feeding dogs according to the BARF concept is based on feeding raw food and is currently a very popular method of feeding among many dog owners. However, the BARF diet may pose a risk of transmission of zoonotic diseases, which are mainly caused by bacteria and parasites, and rarely by viruses. For this reason, it is not recommended to feed a dog in canistherapy with BARF food. In canistherapy, the dog visits clients of all ages with various health problems, who may have weakened immunity or an increased risk of infection. Therefore, thorough animal hygiene and prevention against zoonotic diseases are essential in canistherapy.

This study evaluates the composition of the gut microbiome in relation to the dog's feeding method. The research part has been executed in a laboratory at the Academy of Sciences of the Czech Republic. Overall, 100 dogs were involved in the research (50 dogs fed BARF diet and 50 dogs fed pellets). The composition of the intestinal microbiome was assessed based on the isolation of DNA from a fecal sample. A quantitative qPCR method was used to evaluate potential pathogenic bacteria (*Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringers*). The first hypothesis, which assumed that dogs fed according to the BARF concept would have a significantly higher amount of pathogenic bacteria, was proven for the bacteria *Campylobacter jejuni* and *Clostridium perfringers*. Occurrence of *Salmonella spp.* it was higher in dogs fed the BARF diet, but statistical significance was not confirmed. The second hypothesis assumed that dogs living outside in the garden would have a higher number of pathogenic bacteria than in dogs living at home. This hypothesis was not confirmed. Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) was used to compare the difference in the complete intestinal microbiome in dogs in terms of feeding method. In tested dogs, a research has shown significant difference in the microbiome composition of dogs fed a BARF diet and dogs fed a dry diet was demonstrated. Surprisingly, dogs that were fed pellets had a higher ones the occurrence of potentially pathogenic bacteria (specifically *Salmonella bongori*, *Escherichia coli* and *Streptococcus sp.*). This result could thus serve as a topic for further studies.

The study was supplemented by a questionnaire survey that mapped the methods of feeding canistherapy dogs. 42 respondents took a part in the sub-survey, 27 of whom fed

their dog heat-treated food. Even though the scientific literature does not recommend feeding the dog in canisterapy with BARF food, 11 respondents feed their dog with this method and 4 respondents feed with a combination of heat-treated food and BARF food. In addition, most respondents indicated that the BARF diet is also suitable for canine therapy dogs and they are not aware of any zoonosis risks.

Based on the results of this study, it can be assumed that there is a higher risk of potentially pathogenic bacteria that can cause zoonotic diseases in dogs fed according to the BARF concept. Any risk of transmission of zoonotic diseases is definitely undesirable in canistherapy, therefore dogs that are fed this diet should not participate in canistherapy. The results of this study could serve as a basis for the creation of control measures which could define methodological recommendations for feeding canistherapy dogs.

**Keywords:** zoonoses, AAT, BARF, dog, bacteria, real-time PCR



## Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Vědecká hypotéza a cíle práce</b> .....	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>Literární rešerše</b> .....	<b>3</b>
<b>3.1</b>	<b>Výživa a domestikace psa</b> .....	<b>3</b>
3.1.1	Trávicí soustava psa.....	5
3.1.2	Složení střevního mikrobiomu zdravého psa.....	6
3.1.3	Molekulárně biologické metody pro analýzu střevního mikrobiomu.....	8
3.1.4	Možnosti a způsoby krmení psa.....	11
<b>3.2</b>	<b>Zoorehabilitace se zapojením psů</b> .....	<b>13</b>
3.2.1	Úvod do zoorehabilitace .....	13
3.2.2	Zoohygiena v zoorehabilitaci.....	16
3.2.3	Prevence proti zoonózám v zoorehabilitaci .....	18
<b>3.3</b>	<b>Potenciální zoonózy v zoorehabilitaci v důsledku krmení konceptem BARF</b> .....	<b>19</b>
3.3.1	Bakteriální zoonózy .....	20
3.3.2	Parazitární zoonózy.....	24
3.3.3	Virové zoonózy .....	25
<b>3.4</b>	<b>Krmení psů konceptem BARF</b> .....	<b>26</b>
3.4.1	Kontrolní postupy nezávadnosti BARF stravy .....	27
3.4.2	Přehled publikací zabývajících se výskytem zoonotických bakterií u psů v důsledku krmení konceptem BARF .....	27
<b>4</b>	<b>Metodika</b> .....	<b>30</b>
<b>4.1</b>	<b>Výběr psů pro výzkum</b> .....	<b>30</b>
<b>4.2</b>	<b>Metodika sběru dat a skladování vzorků</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3</b>	<b>Izolace DNA</b> .....	<b>31</b>
<b>4.4</b>	<b>Stanovení mikrobiální diverzity</b> .....	<b>32</b>
4.4.1	Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	32
4.4.2	Kontrola vzorků DNA pomocí agarózové elektroforézy .....	33
4.4.3	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) .....	34
<b>4.5</b>	<b>Sangerovo sekvenování DNA</b> .....	<b>35</b>
4.5.1	PCR reakce a agarózová elektroforéza vybraných úseků .....	35
4.5.2	Purifikace PCR produktů .....	35
4.5.3	Zpracování výsledků ze Sangerova sekvenování .....	36
<b>4.6</b>	<b>Kvantitativní metoda v reálném čase (qPCR)</b> .....	<b>36</b>
<b>4.7</b>	<b>Statistická analýza dat</b> .....	<b>39</b>
<b>4.8</b>	<b>Mapování metod krmení psů zapojených do canisterapie</b> .....	<b>40</b>
<b>5</b>	<b>Výsledky</b> .....	<b>41</b>

<b>5.1</b>	<b>Vyhodnocení bakterií u psů s ohledem na jejich krmení .....</b>	<b>41</b>
5.1.1	Vyhodnocení výskytu potenciálně patogenních bakterií rodu <i>Salmonella spp.</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>Clostridium perfringens</i> .....	41
5.1.2	Stanovení celkové mikrobiální diverzity střevního mikrobiomu psů .....	45
<b>5.2</b>	<b>Vyhodnocení mapování metod krmení psů zapojených do canisterapie ..</b>	<b>48</b>
<b>6</b>	<b>Diskuse.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>55</b>
<b>8</b>	<b>Literatura .....</b>	<b>57</b>
<b>9</b>	<b>Seznam použitých zkratk a symbolů.....</b>	<b>69</b>
<b>10</b>	<b>Samostatné přílohy .....</b>	<b>I</b>

# 1 Úvod

Předkem dnešního psa je vlk obecný (*Canis lupus*). Procesem domestikace a působení selekčních tlaků se pes od svého předka výrazně odlišil, a to jak po morfologické stránce, tak i jeho chováním. Dalším aspektem, který se výrazně změnil, je strava a způsob, jak ji získat. Výběr stravy u dnešního psa závisí především na majiteli. Lovecké schopnosti se postupem času geneticky modifikovaly. V poslední době se někteří majitelé snaží „vrátit“ svému psovi původní stravu a krmí ho stravou založenou na syrových potravinách (tzv. BARF). Tento způsob krmení se v současnosti stal velice oblíbenou a žádanou alternativou.

Zastánci této stravy uvádějí možná pozitiva, u kterých jsou potřeba brát v potaz i určitá rizika, která mohou nastat. Surové maso může být kontaminováno bakteriemi, které jsou odolné i proti vysokému mrazu i sušení. I když pes nejeví žádné zdravotní potíže, může být pouze přenašečem a může vylučovat bakterie do svého okolí. Přenos těchto bakterií je rizikem i pro člověka, jelikož může docházet k zoonotickým onemocněním.

Terapeutičtí psi běžně interagují s klienty, jejichž imunitní systém nemusí fungovat optimálně. Proto je důležité, aby návštěva terapeutického psa neohrozila zdraví klienta. Důležité je psa pravidelně odčervovat a v případě podezření na jakékoli onemocnění psa od klientů izolovat. Zároveň je vhodné také provádět koprologické a bakteriologické vyšetření, které upozorní na případné patogeny. Terapeutičtí psi, kteří jsou krmeni syrovým masem, mohou zvyšovat riziko přenosu zoonóz, a to především u klientů s vysokým rizikem infekce. Dle Lefebvre a kol. (2008) je doporučeno terapeutické psy nekrmit syrovou stravou z výše uvedených důvodů. Rizika platí i u psů chovaných doma, a proto je důležité zhodnotit, jaká forma stravy je pro psa i pro jeho chovatele nejvhodnější.

Cílem této práce je vytvoření náhledu do problematiky spojené s krmením dle konceptu BARF, a to především se zaměřením na zoonotický potenciál psů v rámci canisterapie. Součástí práce je vyhodnocení celkové bakteriální diverzity a výskytu zoonotických bakterií (*Campylobacter jejuni*, *Clostridie perfringens*, *Salmonella* spp.) s ohledem na metodu krmení (BARF strava/granule). Práce je doplněna také anonymním dotazníkovým šetřením, které mapuje způsob krmení psů v canisterapii. Výsledky jsou vyhodnoceny pomocí statistické analýzy.

## 2 Vědecká hypotéza a cíle práce

Cílem práce je vytvořit literární rešerši na dané téma se zaměřením na zoohygienu a zoonotický potenciál psů v rámci canisterapie. Dalším cílem je metodou Real Time PCR vyhodnotit možný výskyt bakterií se zoonotickým potenciálem u psů krmených dle konceptu BARF. Dílčím cílem je také vyhodnocení dotazníku distribuovaného mezi canisterapeuty s cílem zmapovat metody krmení jejich psů zapojených do canisterapie.

### Vědecké hypotézy

**H1:** U psů krmených konceptem BARF bude prokázáno signifikantně vyšší množství testovaných bakterií ve výkalech, protože se tyto bakterie běžně vyskytují v neupraveném syrovém mase.

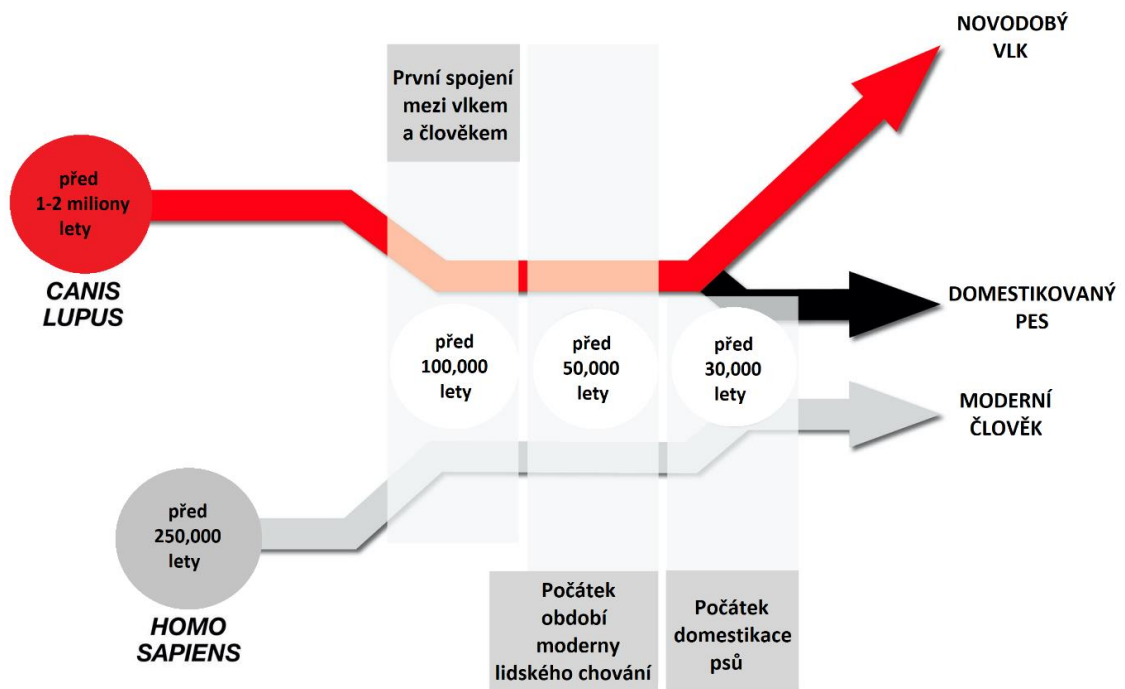
**H2:** V případě pobytu psa na zahradě bude počet patogenních bakterií vyšší než u psů žijících v domě/bytě.

### 3 Literární rešerše

#### 3.1 Výživa a domestikace psa

Pes domácí (*Canis familiaris*) patří do řádu šelem (*Carnivora*) (Bradshaw 2006). Pes je považován za první a za nejunikátnější domestikované zvíře. K domestikaci došlo pravděpodobně v období paleolitu, kdy lidská populace žila v blízkém kontaktu s vlky. Do nedávna se vedly spory ohledně předků psa. Pes je totiž velice fenotypově rozmanitý, a proto se vedly diskuse, zda byl původ dnešních psů z jednoho nebo více divokých druhů. I Darwin navrhoval původ z několika druhů. Díky studiím, které se zaměřovaly na chování, hlasové projevy, morfologii a molekulární biologii psa, se potvrdilo, že vlk obecný (*Canis lupus*) je hlavním a možná i jediným předkem psa (Galibert et al. 2011).

Od kojota se vlk začal odlišovat přibližně před 1-2 miliony lety (viz Obrázek 1). Ke genetické odchylce ale došlo až před 100 000 lety. Na základě analýzy mitochondriální DNA, která porovnávala prehistorické psovité šelmy a moderní psy, se odhaduje počátek domestikace před 18 800 až 32 100 lety. V roce 2010 se na Sibiři našly dokonce 33 000 let staré pozůstatky psů, které se považují za významné archeologické důkazy domestikace (Bowen 2014).



**Obrázek 1:** Krátké shrnutí lidské asociace se psem  
(upraveno dle Bowen 2014)

Procesem domestikace se psi začali stávat součástí lidských příbytků, kde na ně zároveň působily nové selekční tlaky. Psi tak získali společenskou schopnost, tolerantnost a schopnost komunikovat s člověkem. To vše probíhalo na základě výběrového procesu, který podporoval

fyzické a behaviorální charakteristiky mladých i dospělých psů. Psi tak změnili jak chování, tak i vzhled (např. poddajné uši, těžké volné čelisti, zvýšená hravost nebo snížená agresivita). Díky selektivnímu šlechtění na dané vlastnosti (např. společenští nebo pracovní psi) se u psů zvýšila schopnost navázání vztahu s člověkem (Bowen 2014). Dle autorů Racca et al. (2012) vykazují domácí psi a malé děti srovnatelné schopnosti vnímat a zpracovávat informace z výrazu lidské tváře. Tato schopnost však není pozorována u vlků, ani pokud jsou chováni stejným způsobem jako domácí zvířata (Bowen 2014).

Zatímco populace vlků po celém světě čím dál tím víc klesá, populace psů se naopak výrazně zvyšuje. Psi jsou rozšířeni do mnoha plemen různých velikostí, od malé čivavy vážící 1 kg po obrovského mastifa vážícího 100 kg (Wayne & Vonholdt 2012). V dnešní době však skoro všechna čistokrevná plemena psů trpí velkým množstvím genetických onemocnění, která jsou způsobena šlechtěním (např. až 30 % dalmatinů ohluchne nebo 50 % velkých psů trpí dysplazií kyčelního kloubu) (Galibert et al. 2011).

Není jasné, jak začala domestikace, ale existují dvě hlavní teorie. Dle první teorie byli vlci odchyceni do pastí a následně chováni. Druhá teorie tvrdí, že se vlci přiblížili k lidským stavením sami díky příležitosti získat potravu. Tato fáze domestikace mohla nastat v období, kdy byla snížena dostupnost získání kořisti. Uvěznění psi a první domestikovaní psi byli drženi na stravě, která se skládala ze zbytků lidské potravy a obsahovala pouze malé množství kvalitních bílkovin (Bowen 2014). Pro divoká zvířata je získání potravy velmi složitý proces, který začíná lovem potravy, a končí její konzumací (Bradshaw 2006). Potravu dostávali pravidelněji než divocí vlci, což vedlo ke snížení konkurence a zároveň se navázal vztah založený na krmení (Bowen 2014). Lovecké chování bylo u domácích psů během průběhu domestikace výrazně geneticky modifikováno. I divocí psi nezachovávají plně funkční lovecké chování a živí se spíše mrtvými kořistmi, které již sami zahynuli (Bradshaw 2006).

Některá plemena psů jsou schopna velmi rychle spořádat velké množství jídla, což může být následkem konkurenčního způsobu krmení ve smečce vlků. U vlčí smečky se uplatňuje hierarchické krmení, které umožňuje vůdci smečky (tzv. alfa samci) najíst se jako první. Ostatní vlci mezi sebou soutěží o zbytek potravy (Bradshaw 2006).

Na základě rozmanité stravy u vlků je možné usuzovat o tom, že u vlků existují mechanismy pro výběr potravy (Bowen 2014). Výběr krmiva u psů v zájmovém chovu je výrazně ovlivněn volbou jeho majitele (Bradshaw 2006). Domácí psi hodnotí stravu dle vzhledu, vůně, chuti a struktury. U vlků však není známo, zda používají smysly k výběru potravy, tudíž je tento způsob chování zřejmě následkem domestikace (Hewson-Hughes et al. 2013).

Velkým problémem moderních plemen je obezita. Psi, kteří jsou krmeni ad libitum, mají větší šanci stát se obézními. Některá plemena jsou náchylnější k takovému způsobu krmení nežli jiná, a proto je možné říci, že existují značné rozdíly mezi jednotlivými plemeny (Bradshaw 2006).

### 3.1.1 Trávicí soustava psa

Psi jsou fakultativní masožravci, proto je jejich gastrointestinální trakt přizpůsobený stravě s vysokým obsahem bílkovin a tuků. Trávení masožravců je relativně krátké a jednoduché ve srovnání s býložravci, protože retenční čas potřebný k trávení masa je nižší než čas potřebný k trávení trávy (Moon et al. 2018).

Trávicí soustava začíná **dutinou ústní**. Trávení v dutině ústní začíná nejdříve mechanicky pomocí zubů. Pes má celkem 42 zubů. Špičáky dokážou rozdělit pevnou stravu na kousky. Stoličky psa mají větší korunku ve srovnání s lidským chrupem. Stoličky tak umožňují psovi kousat kosti. Chuťových pohárků má pes pouze 2000 (Kararli 1995; Freiche & Hernandez 2010). Průměrné pH slin u psů se pohybuje od 7,3 až do 7,8 (Smeets-Peeters et al. 1998). Žvýkání u psa není zas tak důležité, protože většina psů ve skutečnosti polykají velké části potravy (Kararli 1995).

Po spolknutí jde sousto **jícnem** do žaludku. Délka jícnu je srovnatelná s lidským. Například délka jícnu u středně velkých plemen psů se pohybuje okolo 30 cm (Freiche & Hernandez 2010).

**Žaludek** psa je podlouhlého vaku ve tvaru písmene J. Žaludek se nachází v dutině břišní. Začíná česlem (*cardia*) a končí vrátníkem (*pylorus*). Vrátník je zúžené místo pokračující do dvanáctníku. Žaludek se skládá ze dna (*fundus*), těla (*corpus*) a předsíně (*antrum*) (Kararli 1995). Objem psiho žaludku je 0,5-8 l, což je větší než objem lidského žaludku. Tloušťka žaludeční stěny je 3 až 5 mm. Příchodem sousta do žaludku se spouští sekrece gastrinu, který stimuluje produkci kyseliny chlorovodíkové (HCl) (Kararli 1995, Mahar et al. 2012). Průměrné pH žaludku se pohybuje v rozmezí od 2 do 5,5 (Duysburgh et al. 2020).

Trávení pokračuje do **tenkého střeva**. Tenké střevo se dělí na 3 části: 10 % dvanáctník (*duodenum*), 85 % lačník (*jejunum*) a 5 % kyčelník (*ileum*). Celková délka tenkého střeva se pohybuje od 1 do 3 m. Tloušťka stěny dvanáctníku je 6 mm, ostatní střevní kličky mají okolo 2 až 3 mm (Kararli 1995; Oswald et al. 2015). Do dvanáctníku ústí vývod ze slinivky břišní (*pankreas*), kterým se vylučují pankreatické šťávy. V tenkém střevě dochází k trávení proteinů pomocí enzymů produkovaných slinivkou břišní – trypsinu, chymotrypsinu, elastázy a karboxylázy. Dále pankreatická šťáva obsahuje enzym  $\alpha$ -amylázu, která štěpí sacharidy, a enzymy lipázu a fosfolipázu štěpící lipidy. Součástí pankreatické šťávy jsou i antimikrobiální látky, které v tenkém střevě přispívají k mikrobiální rovnováze. Do dvanáctníku ústí i žlučovody, které odvádí žluč, která je produkovaná v játrech a skladována ve žlučníku (Oswald et al. 2015). V tenkém střevě se pH zvyšuje a přibližuje se k neutralitě. Vyšší pH je díky pankreatickým šťávám a žluči. Rozmezí pH se pohybuje od 6,5 až do 8 a roste od proximální části k distální (Koziolek et al. 2019).

**Tlusté střevo** se skládá z vzestupného tračníku (*colon ascendens*), příčného tračníku (*colon transversum*) a sestupného tračníku (*colon descendens*). Délka celého tlustého střeva je 20 až 80 cm. V tlustém střevě se pH pohybuje od 5 do 6,5. Na tlusté střevo navazuje řitní otvor (Koziolek et al. 2019).

Plemeno a velikost psa ovlivňuje rozmanitost anatomických vlastností. Psi se tedy mohou lišit například délkou a objemem střeva nebo morfologií střevních klků a jejich propustností (Oswald et al. 2015). Tyto rozdíly mohou ovlivnit nejen trávení u psů, ale i další parametry, jako je pH, trávicí sekrece, doba průchodnosti potravy a složení střevního mikrobiomu (Deschamps et al. 2022).

### 3.1.2 Složení střevního mikrobiomu zdravého psa

Střevní mikrobiom se skládá z bakterií, archeí, virů a eukaryotických organismů. Tyto prospěšné organismy sídlí podél gastrointestinálního traktu a tvoří symbiózu se svým hostitelem. Příkladem jsou střevní bakterie produkující mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které tak vyživují střevní epitel, zatímco střevní epitel produkuje hlen, který vyživuje tyto bakterie. Střevní mikrobiom pozitivně působí na metabolické funkce, imunitní systém a chrání hostitele před nežádoucími patogeny. Tyto základní funkce následovně ovlivňují přímo či nepřímo většinu fyziologických funkcí. Pokud je střevní mikrobiom zdravý a stabilní, může působit protizánětlivě, což pomáhá udržet rovnováhu a pohotovou reakci v případě infekce (Pilla & Suchodolski 2020).

Dle vědecké studie se prokázalo, že množství bakterií v gastrointestinálním traktu se čím dál tím víc zvyšuje (Suchodolski et al. 2008). Na základě molekulárních metod se identifikovaly bakterie gastrointestinálního traktu psa a odhaduje se, že se nyní bakterie pohybují mezi  $10^{12}$  a  $10^{14}$  jednotek tvořící kolonie (CFU) na gram obsahu. Střevní mikrobiom se skládá převážně z bakterií kmene Proteobacteria, včetně rodu *Helicobacter spp.*, které mohou být potenciálními patogenními kmeny (Suchodolski 2011; Deschamps et al. 2022). Tenké střevo je kolonizováno směsí aerobních a fakultativních anaerobních bakterií, zatímco tlusté střevo obsahuje pouze anaeroby. Mezi studii, které se zabývají složením střevního mikrobiomu psa, jsou pozorovány rozdíly v jeho složení. Klíčové jsou však bakteriální druhy, které jsou přítomny u zdravých psů. U psů dominují především tři kmeny: Fusobacterium, Bacteroidetes a Firmicutes (Pilla & Suchodolski 2020). Nejhojnějším kmenem je kmen Firmicutes. Tento kmen zahrnuje nejhlavnější taxony, mezi nejpočetnější patří bakteriální třída Clostridia. Ze třídy Clostridia dominují v mikrobiomu například čeledi: Ruminococcaceae, Faecalibacterium prausnitzii, Peptostreptococcaceae, Lachnospiraceae. Dalšími třídami jsou Firmicutes Bacilli a Erysipelotrichi. Třída Bacilli se skládá téměř z řádu Lactobacillales, a to především rody *Streptococcus* a *Lactobacillus*. V rámci třídy Erysipelotrichi jsou nejpočetnější rody *Turicibacter*, *Catenibacterium* a *Coprobacillus* (Garcia-Mazcorro et al. 2011; Handl et al. 2011; Garcia-Mazcorro et al. 2012). Výsledky výzkumů na základě vzorků exkrementů poukazují, že další hojným kmenem je Bacteroidetes. Tento kmen zahrnuje rody *Prevotella*, *Bacteroides* a *Megamonas* (Garcia-Mazcorro et al. 2012; Hand et al. 2013). V rámci kmene Fusobacteria je nejvýznamější rod *Fusobacterium*, který u psů na rozdíl od lidí nevyvolává žádné zdravotní potíže a je součástí zdravého střevního mikrobiomu (Vazquez-Baeza et al. 2016). V tenkém střevě jsou běžné i kmeny Proteobacteria a Actinobacteria, které se za běžných fyziologických podmínek vyskytují v exkrementech pouze v menším množství. Příkladem je fakultativně anaerobní čeleď Enterobacteriaceae (např.



*Escherichia coli*), která využívá kyslík v tenkém střevě. Nárůst této čeledi v exkrementech je spojen s mnoha onemocněními. V tenkém střevě zdravého psa se nachází také čeleď Corynebacteriaceae (např. rod *Corynebacterium spp.*) a Coriobacteriaceae (např. rod *Collinsella spp.*) (Honneffer et al. 2017).

Tabulka 1 poskytuje přehled dostupných údajů o složení mikrobiomu v různých částech gastrointestinálního traktu.

**Tabulka 1:** Složení střevního mikrobiomu v trávicím traktu psa (upraveno dle Deschamps et al. 2022)

Gastrointestinální trakt	Složení zdravého mikrobiomu	
Žaludek	Proteobacteria	<i>Helicobacter spp.</i>
Duodenum, jejunum	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Clostridium</i>	<i>Eubacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Lactobacillus spp.</i>
Ileum	<i>Bacteroides</i> <i>Bifidobacterium</i> <i>Fusobacterium</i>	<i>Clostridium</i> <i>Eubacterium</i> <i>Lactobacillus spp.</i>
Tlusté střevo	<i>Bifidobacterium</i> <i>Fusobacterium</i> <i>Bacteroides</i> <i>Clostridium</i>	<i>Eubacterium</i> <i>Lactobacillus spp.</i> <i>Peptostreptococcus</i>
Krypty tlustého střeva	<i>Helicobacter spp.</i> <i>Escherichia coli</i> <i>Shigella</i>	<i>Akkermansia spp.</i> <i>Faecalibacterium spp.</i>
Výkaly	Actinobacteria <i>Bacteroidetes</i> Firmicutes Fusobacteria	Proteobacteria Ascomycota Basidiomycota Metanogenní archea

Složení střevního mikrobiomu významně ovlivňuje věk, strava a mnoho dalších faktorů životního prostředí, které hrají důležitou roli při udržování zdravého mikrobiomu. Gastrointestinální dysfunkce způsobují střevní onemocnění. U psů se zánětem střev (chronickým i akutním) dochází k výrazným rozdílům ve složení střevního mikrobiomu. Střevní dysbióza nastává, pokud dochází ke změnám nebo nerovnováze mikrobiomu. Následkem dysbiózy může dojít k ovlivnění imunitního systému, což může vést k závažným onemocněním gastrointestinálního traktu. Při užívání antibiotik rychle a výrazně klesá množství, pestrost a vyrovnanost bakteriálního mikrobiomu u psa. Proto je doporučeno k antibiotikům užívat i probiotika a prebiotika. Probiotika sice nejsou schopna kolonizovat

střevo bakteriemi, ale během průchodu gastrointestinálním traktem produkují metabolity, které napomáhají udržovat zdravý střevní mikrobiom. K obnovení střevního mikrobiomu je možné využít i transplantaci fekálního mikrobiomu od zdravého zvířete. Obnovením složení střevního mikrobiomu se nemusí zvíře klinicky uzdravit, ale dlouhodobé následky mohou i nadále přetrvávat (Pilla & Suchodolski 2020).

### **3.1.3 Molekulárně biologické metody pro analýzu střevního mikrobiomu**

Střevní trakt psů obsahuje vysoce komplexní a dynamický mikrobiom, pro jehož stanovení je důležité zvolit vhodnou metodu. Existuje více molekulárně biologických metod pro hodnocení střevního mikrobiomu a dysbiózy. Nelze však jednoznačně říci, jakou metodu je nejlepší používat (Suchodolski 2016). Nejlepším diagnostickým přístupem je kombinace molekulárních metod. Tento přístup zahrnuje PCR amplifikaci genů 16S rRNA pomocí širokých univerzálních bakteriálních primerů, po které by následovala analýza ampliconů sekvenováním nové generace (NGS). Poté se provede kvantifikace specifických bakteriálních taxonů s využitím kvantitativní PCR (qPCR) (Suchodolski 2016).

Dříve se k identifikaci bakterií přítomných ve gastrointestinálním traktu běžně používala tradiční bakteriální kultura. Dnes je však známo, že má metoda nedostatečné rozlišení pro identifikaci převážně anaerobních bakterií, které sídlí ve střevě (Suchodolski 2016).

### **Izolace DNA**

Izolace biomolekul (DNA, RNA a proteinu) je nejdůležitější a nejpoužívanější metodou v molekulární biologii. První izolaci DNA provedl švýcarský lékař Friedrich Miescher už v roce 1869. Počáteční izolaci DNA pomocí centrifugace v hustotním gradientu byla vyvinuta Meselsonem a Stahlem až v roce 1985. Izolace je výchozí bod pro následné zpracování a diagnostiku. DNA, RNA a protein se izolují z jakéhokoli biologického materiálu (tkáň, buňky, virové částice a jiné vzorky pro analytické nebo preparativní účely) (Tan & Yiap 2009).

V minulosti však byla izolace biomolekul a čištění nukleových kyselin velice komplikovaná (náročnost na čas, práci a omezení z hlediska celkového výkonu). Dnes však existuje mnoho specializovaných metod používaných k izolaci čistých biomolekul (protokoly založené na roztoku a na sloupcích). Manuální postupy různých komerčních nabídek zahrnují kompletní sady. Tyto sady obsahují všechny komponenty, které jsou potřebné k izolaci nukleové kyseliny. Manuální postupy obvykle vyžadují opakování některých kroků, jako je centrifugace, odstranění supernatantů (v závislosti vzorku) a mechanické ošetření. V posledních letech se v některých laboratořích rozšířily automatizované systémy. Tyto systémy jsou alternativní náhradou manuálních postupů z mnoha důvodů (zkrácení doby, snížení nákladů, zvýšení bezpečnosti a kvality výsledků) (Tan & Yiap 2009).

## **Stanovení kvality a koncentrace**

Stanovení kvality a koncentrace DNA je důležité pro řadu biologických aplikací založené na DNA (např. PCR). V praxi se běžně používají tři metody: ultrafialová absorbance, fluorescence a difenylaminová reakce (Li et al. 2014). V současnosti je nejvíce využívána metoda absorbance UV světla, která stanovuje koncentraci DNA při 260 nm (Li et al. 2014). Principem této metody je, že nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) obsahují ve svých purinových a pyrimidinových kruzích konjugované dvojné vazby. Tyto vazby mají vrchol absorpce při 260 nm, přičemž intenzita je úměrná koncentraci nukleové kyseliny. To umožňuje stanovit koncentraci nukleové kyseliny ve vzorku (Li et al. 2014).

## **Polymerázová řetězová reakce (PCR)**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je vědecká metoda v molekulární biologii, která se používá k amplifikaci jedné nebo několika kopií DNA v několika řádech, přičemž se vytvoří tisíce až miliony kopií konkrétní sekvence DNA. PCR vyvinul americký biochemik Kary Mullis v roce 1984. V současnosti se stala PCR běžnou a často i nepostradatelnou metodou, která se využívá v lékařských i výzkumných laboratořích. PCR často využívají také forenzní laboratoře, protože je potřeba pouze malé množství původní DNA. Tato metoda se využívá pro detekci nejen lidských genů, ale také genů bakterií a virů (Joshi & Deshpande 2010).

Metoda PCR zahrnuje tři hlavní kroky: denaturaci, hybridizaci a extenzi. V prvním kroku se DNA denaturuje při vysokých teplotách (90 až 97 °C). Ve druhém kroku primery nasedají na vlákna templátu DNA. Tím se aktivuje extenze. Ve třetím kroku dochází k extenzi na konci nasednutých primerů. Extenzí vzniká komplementární kopie řetězce DNA. Tyto tři kroky v cyklu PCR zajistí zdvojnásobení množství DNA (Joshi & Deshpande 2010).

## **Gelová elektroforéza**

Gelová elektroforéza je nejúčinnější způsob separace fragmentů DNA různých velikostí v rozmezí od 100 bp do 25 kb. Agaróza je izolována z mořských řas a skládá se z opakovaných podjednotek agarobiózy (L- a D-galaktóza). Použití elektroforézy na agarózovém gelu způsobilo revoluci v izolaci DNA. Do agarózového gelu se vytvoří jamky, do kterých se nanese DNA a aplikuje proud. Molekula DNA je záporně nabitá, proto v elektrickém poli se fragmenty DNA pohybují na kladně nabitou anodu. Důvodem je stejný poměr hmotnosti a náboje DNA. Rychlost pohybu molekuly DNA přes gel je určena velikostí molekuly DNA, koncentrací agarózy, konformací DNA, napětím, přítomností ethidium bromidu, typem agarózy a elektroforetickým puřem. Po separaci je možné molekuly DNA snímat pod UV světlem (Lee et al. 2012).

## **Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)**

Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) je rychlá metoda, která se využívá pro analýzu mikrobiální diverzity. DGGE je metoda založena na PCR, která má schopnost detekovat pouze dominantní mikrobiální druhy v prostředí. Tato metoda využívá vertikální elektroforézu, jejíž náplň je polyakrylamidový gel, který obsahuje lineárně rostoucí gradient denaturantů rozplétající dvouvláknovou DNA. Guanin a cytosin jsou pevnější páry bází, protože je spojují tři vodíkové můstky. Na rozdíl od adenin a thymin, které jsou spojeny dvěma vodíkovými můstky. Vznikají pásy, které vytváří elektroforetický přehled mikrobiálního osídlení z vyšetřovaného vzorku (Jiang et al. 2018).

## **Real-time PCR (qPCR)**

Real time PCR (kvantitativní PCR, qPCR) je metoda pro detekci, kvantifikaci a typizaci různých mikrobiálních agens. Koncept PCR je relativně jednoduchý, ale musí se dodržovat správná terminologie a definice, pochopit princip PCR, prezentace dat apod. Kvantitativní PCR umožňuje sledování tvorby amplikonu v reálném čase. Rychlost probíhající PCR reakce se rovná koncentraci amplifikovaného genu. V qPCR se monitoruje fluorescence během každého cyklu. Během reakce se do PCR produktů zabudovávají fluorescenční barviva (např. SYBR) (Kralik & Ricchi 2017).

## **Sekvenování nukleových kyselin dle Sangera**

„Původní“ sekvenační metodologie, zvaná sekvenování nukleových kyselin dle Sangera, využívá specificky označené nukleotidy k přečtení templátu DNA během syntézy DNA. Tato metoda vyžaduje specifický primer, který zahájí čtení na specifickém místě podél templátu DNA. Sekvenování nukleových kyselin dle Sangera dokáže přečíst 1000 až 1200 párů bází (Zhang et al. 2011).

## **Sekvenování nové generace**

Sekvenování nové generace dokáže přečíst templáty DNA podél celého genomu. To je dosaženo rozbitím celého genomu na malé kousky DNA a následnou ligací těchto kousků (sekvenování po syntéze). Tato metoda se též nazývá masivně paralelní sekvenování (Zhang et al. 2011).

Délka čtení u sekvenování nové generace je mnohem kratší než délka dosažená Sangerovým sekvenováním. Sekvenování nové generace poskytuje pouze 50 až 500 nepřetržitých čtení základních párů, proto jsou výsledky definovány jako krátká čtení. Pro počet krátkého čtení je důležité pokrytí v rámci specifické genomové oblasti. Dostatečné pokrytí je rozhodující faktor pro přesné sestavení genomové sekvence. Sekvence krátkého čtení je možné sestavit a porovnat s referenční sekvencí (tzv. „mapovatelné čtení“) (Zhang et al. 2011).

### 3.1.4 Možnosti a způsoby krmení psa

Vyráběná krmiva pro domácí zvířata podléhají specifickým nutričním požadavkům tak, aby splňovala podporu růstu, březosti, laktace a udržování hmotnosti zvířete. Cílovými živinami jsou kalorie, bílkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny a minerály. Na tyto živiny se klade velký důraz k udržení života a optimalizace výkonu (Zicker 2008). Psi při detekci a výběru potravy využívají jak chuťové, tak čichové buňky. Kuchyňská sůl (NaCl) však při jejich výběru nehraje až tak velkou roli (Bradshaw 2006). Doporučení, které krmivo je pro psy nejvhodnější, se však liší (Gautam et al. 2018).

Existují tři základní formy komerčních krmiv pro domácí zvířata: suché, polovlhké a vlhké. Hlavním rozdílem mezi těmito formami je obsah vody (Zicker 2008).

**Suchá strava** se řadí mezi hlavní úsek průmyslu krmiv pro domácí zvířata. Tento způsob krmení je oblíbený především díky nenáročnosti na přípravu a snadnému skladování. U výroby této stravy je kladen velký důraz na nutriční a chuťové aspekty, stejně jako ve výrobě potravin pro člověka. Výběr vhodné suché stravy pro konkrétního psa souvisí s řadou faktorů. Mezi tyto faktory patří pohlaví, reprodukce, hmotnost, fyzická zátěž, potravní alergie a mnoho dalších. Hlavní metodou výroby je tzv. extruze. Mezi další procesy výroby patří pečení, vločkování, peletování a drcení. Díky nízkému obsahu vody je suchá strava chráněna proti kažení. Přidáním antioxidantů lze zabránit oxidačnímu kažení. Antioxidanty mohou být přírodní nebo syntetické. Přírodní antioxidanty jsou navíc zdrojem vitamínu E (Zicker 2008).

Extrudované krmivo se vyrábí smícháním surovin a následnou extruzí. Extrudér využívá kombinaci páry, tlaku a teploty. Poté se směs protlačí přes přední desku, kde se extrudovaná směs krájí pomocí rotačního nože do požadovaného granulovaného tvaru. Při extruzi se využívá vysokých teplot v rozmezí 100 až 200 °C a při atmosférickém tlaku 34 až 37 hPa, který je dostatečně vysoký pro proces sterilizace. Vlhkost extrudovaného materiálu je před sušením 25 % a po skončení procesu klesne na 8 až 10 %. Takto snížená vlhkost inhibuje tvorbu plísní (Zicker 2008).

**Polovlhká strava** tvoří menší, ale za to významnou část na trhu krmiv pro domácí zvířata. Tato strava vyžaduje použití zvlhčujících látek a okysovadel, které slouží ke kontrole obsahu vody a inhibici růstu plísní. Polovlhká krmiva mají nízký obsah vlákniny a vyšší obsah cukru, což zlepšuje chutnost, ale snižuje kontrolu nad hmotností. Výrobní proces je stejný jako u extrudovaných krmiv, ale obsah vody je díky přidaným zvlhčovacími látkami výrazně vyšší. Finální produkt obsahuje 25 až 35 % vlhkosti, přičemž roste riziko plísní, bakterií nebo kažení. Výroba je náročná na splnění nutričních cílů a bezpečnost potravy, proto se provádí důkladná kontrola kvality. Oblíbenou formou polovlhkých komerčních krmiv jsou měkké granule, které jsou určeny především pro obtížně krmitelné psy nebo staré psy (bez zubů) (Zicker 2008).

**Vlhká strava** má podstatné místo na průmyslovém trhu vyráběných krmiv, ovšem za poslední dobu se jejich poptávka výrazně snížila. Konzervovaná strava obsahuje 60 až 87 % vody. Aby se dosáhlo požadované konzistence, je potřeba do konzervy přidat želírující činidla (např. škrob). Některé techniky zpracování požadují, aby vlhká strava získala

vzhled kousků masa. To ovšem neznamená, že produkt obsahuje více masa (Zicker 2008). Textura, konzistence a vůně připomínající maso je pro zvíře více atraktivní, proto je tato forma stravy u zvířat oblíbená (Gautam et al. 2018). Ve většině vlhké stravy je vyšší množství masa v porovnání se suchou stravou. Přísady pro výrobu konzerv se nejprve smíchají, poté rozemelou a poté se vaří. Následně je směs přelita do plechovek, jejichž vršek se pomocí páry utěsní a přebytečný vzduch je vytlačen, což zajišťuje anaerobní prostředí. Vlhká strava dále prochází procesem sterilizace při teplotě 121 °C po dobu min. 30 minut. Sterilizace zajišťuje usmrcení patogenních bakterií (např. *Clostridium botulinum*) (Zicker 2008). Uzavřením produktu do plechovky se získá komerčně sterilní produkt, což navyšuje cenu produktu. Po otevření plechovky musí být produkt rychle spotřebován, jelikož hrozí velké riziko mikrobiálního růstu. Vlhké krmivo je možné zakoupit ve formě konzerv, kapsiček, paštik nebo salámů (Gautam et al. 2018).

Kromě výše zmíněných 3 základních forem komerčních krmiv existuje ještě několik typů krmiv, mezi které patří i vařená strava a syrová strava (tzv. BARF).

**Vařená strava** není u majitelů domácích zvířat upřednostňována, ovšem někteří dávají přednost krmení doma vařenou stravou. Recepty na vařenou stravu je možné získat z knih, internetu, od veterinářů, chovatelů nebo odborníků na výživu. Někteří majitelé se neřídí konkrétním receptem. Ovšem je potřeba brát v potaz, že doma sestavované krmivo nemusí odpovídat nutriční dostatečnosti a vyváženosti. Na základě těchto nutričních rizik se doporučuje, aby majitelé domácích zvířat spolupracovali s odborníky na výživu a sestavili zvířeti správnou krmnou dávku (Johnson et al. 2016).

**BARF** je zkratka, kterou je možné přeložit více způsoby jako např. „znovuzrozen krmít syrově“ (Born Again Raw Feeders), „kosti a syrová potrava“ (Bones And Raw Food) nebo jako „biologicky vhodná syrová potrava“ (Biologically Appropriate Raw Foods) (Freeman et al. 2013). Tento koncept krmení se označuje také jako RMBD (Raw Meat Based Diet, v překladu Dieta založená na syrovém mase) (Ahmed et al. 2021).

V současné době je tento způsob krmení velice oblíbený, a to nejen u psů, ale i koček či frettek (Gyles 2017). Strava založená na krmení syrovým masem obsahuje tepelně neupravené ingredience pocházející z domestikovaných nebo divokých druhů zvířat (Freeman et al. 2013). Tento způsob krmení zahrnuje především kosterní svalovinu, vnitřní orgány, kosti (saveců, ryb nebo drůbeže), zeleninu a ovoce (Gyles 2017). Zároveň může obsahovat nepasterizované mléko nebo tepelně neupravená vejce (Freeman et al. 2013). Surová strava může pocházet z několika zdrojů, jako jsou např. zpracovatelské fabriky určené pro lidskou výživu, kafilerie a produkty, které nejsou vhodné pro lidskou spotřebu (Finley et al. 2006). Tato strava však neobsahuje žádné přísady a doplňky, jako jsou konzervační látky, stabilizátory, želírující látky, sladidla, příchutě, vitamíny a minerály (Nüesch-Inderbinnen et al. 2019). Jak již bylo zmíněno, BARF neprochází žádným typem tepelné úpravy, proto zde hrozí riziko nákazy patogeny (bakteriemi a parazity) (Finley et al. 2006).

BARF lze rozdělit dle způsobu přípravy na komerční a doma připravený. Komerční BARF se připravuje podle receptur dané společností (Freeman et al. 2013), musí

však splňovat určité regulační parametry, aby ho výrobci mohli označit jako přírodní (Buff et al. 2014). Komerční syrová strava se nejběžněji prodává čerstvá, mražená nebo lyofilizovaná. Měla by být nutričně kompletní a vyvážená. Sestavení krmné dávky musí splňovat hodnoty odpovídající normám ve výživě, věku a životní fázi domácího zvířete (např. dospělý, březí nebo laktující) (Freeman et al. 2013). Komerčně se vyrábí i různé druhy pamlsků ze syrového masa, které jsou na trhu dostupné již několik let. Mezi nejprodávanější syrové pamlsky patří prasečí uši, hovězí kopyta či syrové kůže. Syrové pamlsky se upravují pomocí mraženého sušení (tzv. lyofilizace) (McKenzie 2019). Pokud se ale majitelé psů rozhodnou připravovat BARF stravu doma sami, recepty na sestavení krmných dávek je možné najít na internetu nebo v knihách (Finley et al. 2006). U doma připravované BARF stravy však hrozí riziko nutriční nevyváženosti, což vede u zvířete k závažným zdravotním potížím (Buff et al. 2014).

## **3.2 Zoorehabilitace se zapojením psů**

Zoorehabilitaci je možné definovat jako interakci se zapojením zvířat (Bert et al. 2016). V současné době se zoorehabilitace stala velice oblíbeným podpůrným programem, který významně působí na lidské zdraví (Grandgeorge & Hausberger 2011). Přítomnost zvířat může pozitivně působit na více oblastí. Zvířata podporují fyzické zdraví, přispívají k fyziologickým, psychickým, sociálním a emočním funkcím člověka (Rodrigo-Claverol et al. 2019). Do zoorehabilitace se mohou zapojit různé druhy zvířat. Nejčastěji se do interakcí zapojuje pes (tzv. canisterapie), který patří mezi nejoblíbenější zvíře při zoorehabilitacích (Budzińska-Wrzesień et al. 2012). Běžně se však do interakcí zapojují i koně (tzv. hiporehabilitace). Méně se pak zapojují i malá zvířata, jako jsou kočky (tzv. felinoterapie), fretky, králíci, morčata, ptáci a ryby. Dokonce se zoorehabilitace rozšířila i o interakce s exotickými zvířaty (např. delfíni) nebo s hospodářskými zvířaty (např. lamy, kozy a ovce) (Gardiánová & Hejrová 2015).

### **3.2.1 Úvod do zoorehabilitace**

První zmínka o zapojení zvířat do zoorehabilitace je datována již v 11. století v Belgii, kde se klienti starali o ptáky (Grandgeorge & Hausberger 2011). Za zakladatele zoorehabilitace je však považován americký psycholog B. M. Levinson, který v 60. letech 19. století upozoroval na pozitivní vliv u dítěte důsledkem přítomnosti jeho psa (Shubert 2012). Levinson byl inspirací pro řadu dalších amerických psychologů, kteří se dále zabývali pozitivními vlastnostmi psů (Grandgeorge & Hausberger 2011). První terapeutický pes, který získal označení terapeutický pes, byla fena yorkshirského teriéra Smoky. Smoky podporovala zraněné vojáky během druhé světové války (McKeon 2016). Největší rozvoj a rozšíření zoorehabilitace přineslo 20. století, kdy se na základě studií potvrdily možné výhody terapií se zapojením zvířat (Koukourikos et al. 2019). Dnes je zoorehabilitace čím dál tím oblíbenější, využívá se především v nemocnicích, pečovatelských zařízeních, školách apod. (Palley et al.

2010). Dokonce se zoorehabilitace rozšířila, a dnes se již běžně využívá, i v integrované záchranné a vojenské sféře (Yap et al. 2017).

V České republice se pro psy v zoorehabilitaci používá termín canisterapie, který pochází z latinského slova *canis*, což v překladu znamená pes. Pes může být pro člověka výborný společník, terapeut či mu může dokonce poskytnout určitou službu (služební psi) (Raquel Lackey & Habnierstock 2019).

Aby mohl psovod se svým psem vykonávat zoorehabilitaci, musí být splněna určitá kritéria. Terapeutický pes musí projít speciálním výcvikem a testováním jeho temperamentu (Moretti et al. 2010). Mezi další požadavky patří poslušnost, inteligence a klidné chování. Pes musí projít kontrolou veterinárním lékařem, včetně očkování a přípravků proti vnějším a vnitřním parazitům. Zároveň musí umět reagovat na povel psovoda. Do zoorehabilitace se nejčastěji zařazují plemena psů jako je labradorský retrívr, zlatý retrívr, australský ovčák, německý ovčák apod. Terapeutičtí psi jsou značeni žlutou vestou s označením (nejčastěji nápisem „Canisterapeutický pes“) (Budzińska-Wrzesień et al. 2012). Psovod musí také splňovat určitá kritéria, mezi která patří minimální věk 18 let a čistý trestní rejstřík. Psovod je zodpovědný za svého psa a je nezbytné, aby dodržoval hygienická opatření (Serpell et al. 2020).

Zoorehabilitace je u klientů velice oblíbeným programem při jejich léčbě, který přináší mnoho pozitivních účinků. Interakcí se zvířetem se mohou účastnit klienti všech věkových kategorií, od batolat po seniory (Grandgeorge & Hausberger 2011). Zoorehabilitace se uplatňuje u klientů s různými zdravotními potížemi (Rodrigo-Claverol et al. 2019). Pozitivní efekty zoorehabilitace byly zaznamenány v oblasti fyzické, sociální, behaviorální, kognitivní a emoční (Grandgeorge & Hausberger 2011; Rodrigo-Claverol et al. 2019). Zoorehabilitace může být cílena buď na jeden nebo i na více aspektů klienta. Psi jsou do terapií zapojováni buď aktivním, nebo pasivním způsobem, v závislosti na potřebách cílového klienta (Hüsgen et al. 2022).

Interakce se zapojením psa může vyvolat i jisté obavy ohledně kontraindikací u cílových klientů. Je nutné posoudit, zda je interakce pro daného klienta prospěšná či naopak, a to vzhledem k jeho fyzickému i psychickému zdravotnímu stavu. Mezi rizika a obavy, která mohou při interakci se psem nastat, patří fobie, infekce, alergie, agresivita psa, nevhodné chování apod. Těmto rizikům lze předejít především striktní hygienou, správnou výchovou psa či informováním o zdravotním stavu klienta (Steed & Smith 2003; Perkins 2020).

## **Metody zoorehabilitace se zapojením psů**

Jednotlivé interakce se mezi sebou liší volbou zvířete (např. pes, kočka nebo kůň), zdravotním stavem klienta (např. klienti s tělesným postižením), délkovou trvání (dlouhodobá či krátkodobá) a místem (např. nemocnice nebo škola) (Grandgeorge & Hausberger 2011). V zoorehabilitaci se využívá řada technik, díky kterým se terapie může uskutečnit



jak individuálně, tak i skupinově. Individuální terapie je u klientů žádanější než skupinová. Zároveň studie prokázala, že individuální terapie má významnější přínos pro klienta než skupinová. Dokonce je možné zúčastnit se rodinné zoorehabilitace (Chandler 2017).

**Interakce za pomoci zvířat (AAI)** pozitivně působí na lidské zdraví. Při těchto interakcích dochází ke zlepšení fyzických, psychických, kognitivních a sociálních aspektů u člověka (Bert et al. 2016). AAI se dále dělí na níže uvedené metody.

**Aktivity za pomoci zvířat (AAA)** zahrnují spontánní proces, během kterého se zlepšuje především motivace klienta a tím se zvyšuje i kvalita života. AAA se zaměřuje na oblast rekreační, vzdělávací i terapeutickou (není však součástí léčebných procesů) (O'Haire et al. 2014). V AAA není stanoven žádný terapeutický cíl a nejsou vedeny záznamy (Kruger 2006). Aktivity se mohou uskutečnit v různých prostředích. Tým je složen ze speciálně vyškoleného psovoda (profesionál nebo i dobrovolník) a vycvičeného psa (Pichot 2012).

**Terapie za pomoci zvířat (AAT)** je metoda, která motivuje klienta k navázání kontaktu s terapeutem (Chandler 2017). První zmínka o AAT pochází z roku 1800, kdy Florence Nightingale pozorovala pozitivní účinky AAT u dětí i dospělých v psychiatrických léčebnách (McKeon 2016). Od roku 1960 se AAT rozšířila do celého světa a stala se nedílnou součástí léčebných procesů (Calcaterra et al. 2015). V AAT je pro každého klienta přesně stanoven cíl. Pokroky a výsledky jsou během terapie zaznamenány a hodnoceny (Kruger 2006). Terapeutická zvířata musí splňovat určitá kritéria a musí být speciálně vycvičená pro AAT (Perkins 2020). AAT je možné využít v různých zařízeních, především v psychiatrických a zdravotnických zařízeních nebo v pečovatelských službách (Calcaterra et al. 2015).

AAT má řadu pozitivních účinků na lidské zdraví. Při terapii se používají různé aktivity, především chůze nebo cviky, kde je kladen důraz na rozsah pohybu (Perkins 2020). Terapie se zvířetem mohou vést ke snížení úzkosti, deprese, frustrace a strachu. Přítomnost zvířete pozitivně přispívá ke zlepšení všech životních funkcí (fyzické, psychické, sociální apod.) (Calcaterra et al. 2015; Schaffer 2008). Zvíře napomáhá klientovi zvítězit nad jeho stěžejními problémy (Grandgeorge & Hausberger 2011).

**Vzdělávání za pomoci zvířat (AAE)** pozitivně působí na kognitivní, emoční a sociální stránky žáků a studentů. Přítomnost zvířete u dítěte během vyučování napomáhá k motivaci a podporuje ho ve vzdělání. Zvíře zároveň obohacuje školní prostředí. Více než 500 pedagogů v Evropě přistoupilo na tuto metodu učení a zapojilo zvířata do výuky. Jedním z významných programů je tzv. školní pes, kdy je na výuce přítomen pes. Program Reading Education Assistance Dogs (READ), který vznikl v roce 1999, podporuje děti ve čtení. Tým AAE je tvořen odborníkem na všeobecnou či speciální pedagogiku a psem. Celý proces je dokumentován a hodnocen (Nakajima 2017).

**Krizová intervence za pomoci zvířat (AACR)** je další forma AAI, která pomáhá klientům v krizových situacích. Jedná se o situace způsobené přírodními, technickými a člověkem zapříčiněnými pohromami. Hlavním cílem je poskytnout útěchu klientům. Klienti díky zvířeti získávají pocit bezpečí, důvěry a klidu. Zároveň přítomnost zvířete dokáže zpříjemnit atmosféru a navodit dojem všednosti (Mims & Waddell 2016). Dle studie Mims

& Waddell (2016) byl při interakci se zvířetem snížen posttraumatický stres až o 82 %. Tým se skládá ze speciálně vyškoleného psovoda a speciálně vycvičeného zvířete. Do AACR se zapojují především psi (Lass-Hennemann et al. 2018).

**Zdraví na pracovišti s podporou zvířat (AAWW)** je metoda interakce se zvířaty, která představuje přítomnost zvířete na pracovišti. Návštěva zvířete na pracovišti může zvýšit morálku, potěšení a produktivitu práce u zaměstnanců. Zvířata na pracovišti, obzvláště psi, podporují emoční i sociální stránku pracovníků. Zvíře však může na pracovišti přinášet i určitá rizika a obavy, a to jak zdravotní (např. alergie), tak i bezpečnostní (Foreman et al. 2017).

### 3.2.2 Zoohygienu v zoorehabilitaci

Účinky zoorehabilitace se využívají u klientů všech věkových kategorií s různým typem onemocnění. Proto mohou interakce se zvířaty vyvolat jisté obavy ohledně přenosu zoonotických onemocnění. Někteří klienti jsou k zoonózám více náchylní, a to především klienti s otevřenými ranami nebo klienti se zvýšeným rizikem infekce (Lefebvre et al. 2008). Zdravotní personál by tedy měl znát možná rizika přenosu zoonotických onemocnění. S tím je spojené i dodržování postupů a kontrola infekcí (viz kapitola 3.4.2 Prevence proti zoonózám v zoorehabilitaci), které by měly snížit rizika případných zoonotických onemocnění (Boyle et al. 2019).

Přenos zoonotických onemocnění může být ovlivněn několika faktory. Aby se předcházelo zoonózám v zoorehabilitaci, je nezbytné těmto faktorům předcházet. Mezi tyto faktory patří: **druh zvířete, plemeno, věk, podmínky chovu, zdravotní stav, strava, geografická oblast a roční období**. Výběr zvířete a celkový monitoring terapeutických zvířat je v zoorehabilitaci velice důležitý. (Lefebvre et al. 2008; Acke 2018).

**Druh zvířete** je jedním z faktorů zoonotických onemocnění. Každý druh může být potenciálním zdrojem různých bakteriálních zoonóz. Hlavním zdrojem bakterie *Clostridium difficile* je pes. Pes může představovat zoonotické riziko také u bakterie rodu *Brucella*. Dále i bakterie rodu *Leptospira* spp. je zoonotickou bakterií u psů (případně krys). Vysoká prevalence *Chlamydia felis* je naopak u koček (Damborg et al. 2016). Prevalence bakterie rodu *Campylobacter* spp. je významně vyšší u psů v porovnání s kočkami (Thépault et al. 2020). *Salmonella* spp. je zoonotická bakterie vyskytující se u mnoha druhů zvířat, konkrétně u psů, koček, hlodavců, plazů a ptáků (Damborg et al. 2016).

**Plemeno** může mít také vliv na výskyt zoonóz u psů. Dle studie Tarafder & Samad (2010) patří mezi nejrizikovější psy kříženci (prevalence nad 30 %). U ostatních plemen (konkrétně greyhound, jezevčík, dobrman, samojed, špic, kokršpaněl a pudl) byla prevalence pod 10 %.

**Podmínky chovu** jsou dalším faktorem ovlivňující zoonózy během zoorehabilitace. Psi žijící v přeplněných podmínkách mají větší pravděpodobnost přenosu zoonóz. Příkladem jsou psi z útulku, kde je větší koncentrace psů oproti psům chovaným doma (Acke 2018). Dále

u toulavých a polodomácích psů v městských oblastech roste riziko přenosu zoonotických onemocnění. Z toho důvodu je nezbytné do zoorehabilitace zapojovat pouze psy, kteří pochází z vhodných podmínek (Ghasemzadeh & Namazi 2015).

**Zdravotní stav** hraje v přenosu zoonóz také velkou roli. Ve většině případů jsou ale přenašeči zdraví psi (Marks et al. 2011). To potvrdila studie autorů Lefebvre et al. (2006), ve které se ukázalo, že u 80 % zdravých terapeutických psů byly izolovány zoonotické bakterie (konkrétně *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Malassezia pachydermatis*, *Clostridium difficile* a multirezistentní *Staphylococcus aureus*).

Dalším faktorem přenosu zoonóz může být **strava**. Jedná se především o nové způsoby krmení dnešních psů, zejména veganská nebo BARF strava. Nejenže je tato strava riziková pro nedostatečné pokrytí živin, ale hrozí i přítomnost zoonotických patogenů (viz kapitola 3.3 Potenciální zoonózy v zoorehabilitaci v důsledku krmení konceptem BARF) (Overgaauw et al. 2020).

**Geografická oblast** je dalším faktorem, který ovlivňuje přenos zoonóz. Psi z městských oblastí mají také vyšší pravděpodobnost výskytu, jsou totiž více vystavováni přímému kontaktu s ostatními domácími mazlíčky, včetně jejich výkalů (Damborg et al. 2004). Rozdílná vyspělost zemí je také důležitý faktor prevalence bakterií. Například v Egyptě je hlášen vysoký výskyt salmonely v syrovém krmivu oproti tepelně zpracovaným krmivům (Azza et al. 2014).

**I sezónnost** je charakteristická pro mnoho zoonotických onemocnění. Onemocnění může být ovlivněno klimatickým pásmem, které ovlivňuje střídání onemocnění spojené s počasím. Dle studie autorů Lal et al. (2012) zoonotická onemocnění způsobená bakteriemi *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.* a *E. coli* vrcholí v létě a klesají v zimě. Zatímco u bakterie *Clostridium difficile* je nejvyšší prevalence v zimě (Rodriguez-Palacios et al. 2009). Studie Lamm et al. (2010) prokázala vyšší výskyt bakterie rodu *Streptococcus sp.* v letních měsících.

Zoonózy ovlivňuje nejen **věk zvířete**, ale také **věk cílového klienta**. U psů obecně platí, že největší prevalence zoonotických onemocnění je u štěňat do věku 1 roku a u starých psů (Marks et al. 2011; Thépault et al. 2020). U lidí patří mezi rizikové věkové kategorie malé děti (do 5 let), starší lidé (nad 65 let), lidé s narušeným imunitním systémem a těhotné ženy. Obecně platí, že u dětí (zejména 3 až 5 let) a jedinců s vývojovým postižením nejsou optimální hygienické návyky (Overgaauw et al. 2020). Dle studie Damborg et al. (2004) je výskyt *Campylobacter jejuni* je významně vyšší u zvířat žijících s dětmi do 17 let než u zvířat žijících se staršími lidmi.

### 3.2.3 Prevence proti zoonózám v zoorehabilitaci

Cílem prevence proti zoonózám v zoorehabilitaci je minimalizovat vylučování infekce zvířetem. Úplná eliminace infekčního agens je u zvířete nejen nepraktická, ale pravděpodobně nemožná. Každé zvíře patrně vylučuje jedno nebo více infekcí v různém časovém rozmezí. Proto je nejdůležitější snížit riziko přenosu infekčních agens pomocí dodržování kontrolních postupů infekce (Lefebvre et al. 2008). Autoři Murthy et al. (2015) vytvořili soubor doporučených pokynů pro zařízení a ošetřovatele terapeutických zvířat. V této studii autoři doporučovali zajišťovat školení pro zdravotnický personál, které by informovalo o potenciálních zoonotických onemocněních a jejich prevenci. Cílem školení je zmírnění rizika zoonóz, především hygiena rukou. Právě hygiena rukou je nejdůležitějším preventivním opatřením k zamezení přenosu zoonóz (Murthy et al. 2015). Hygiena rukou by měla být jak před interakcí se zvířetem, tak i po skončení terapie (Lefebvre et al. 2008). Alternativou k mytí rukou je dezinfekce rukou, což se využívá především ve zdravotních zařízeních (např. nemocnice nebo pečovatelské domovy). Dezinfekce rukou je možné využít u klientů se sníženou mobilitou, u kterých by běžné mytí bylo obtížné. Dezinfekční prostředky na ruce jsou účinné a snižují bakterie až o 90 % (Laustsen et al. 2008). Dalším preventivním opatřením je i celková kontrola zdravotního stavu psa, kam spadá i preventivní ošetření proti vnitřním i vnějším parazitům. Navíc může docházet kontaktem člověka a kontaminovaného zvířete k mezidruhovým přenosům rezistentních bakterií (Santaniello et al. 2020).

Dle Ghasemzadeh & Namazi (2015) by se měli léčit všichni psi vykazující průjemové onemocnění pod dohledem veterinárního lékaře. Majitelé terapeutických psů by měli svého psa krmit pouze tepelně upravovanou stravou, aby se zabránilo infekci bakterií rodu *Campyloacter* spp. a *Salmonella* spp. Syrové maso, vejce i jiná syrová strava by psům neměla být podávána z důvodu vyšší náchylnosti k infekci (Ghasemzadeh & Namazi 2015). Vzhledem k tomu, že doma připravovaný BARF nepodléhá žádnému testování ani regulačnímu dohledu, mělo by se brát v potaz potenciální riziko zoonotických patogenů (Freeman et al. 2013).

Pro snížení rizik zoonóz během zoorehabilitace by každé zařízení mělo vést a uchovávat zdravotnickou dokumentaci, která by monitorovala původce zoonóz (tj. bakterie, viry a parazity) a správné postupy zoorehabilitace. Hlavním cílem těchto kontrol je ochrana zdraví zúčastněných klientů a dobré životní podmínky terapeutických zvířat (Santaniello et al. 2021). Autoři Ghasemzadeh & Namazi (2015) navíc uvádí, že zvýšení znalostí majitelů psů o zoonotických onemocněních a možnostech prevence by mohlo výrazně snížit výskyt zoonotických infekcí v rodinách i ve zdravotnických zařízeních, kam dochází terapeutičtí psi.

### **3.3 Potenciální zoonózy v zoorehabilitaci v důsledku krmení konceptem BARF**

V zoorehabilitaci může docházet k zoonózám, které pro člověka mohou představovat závažné zdravotní problémy. Pes je nejvíce zapojované zvíře v zoorehabilitaci, a to především díky jeho povaze a mezidruhovému vztahu s člověkem. Zároveň ale může představovat riziko přenosu zoonóz, jelikož může sloužit jako vektor několika původců zoonóz. K přenosu zoonóz dochází přímým i nepřímým kontaktem. Při mazlení se klient může přímo nakazit infikovanými slinami nebo aerosoly. Fyzický kontakt se sliznicemi a srstí psa vystavuje pacienta bakteriím, houbám a parazitům. Z tohoto důvodu existují spory o tom, zda zachovat či ne tělesný kontakt se zvířetem během AAT a AAA, aby se předcházelo šíření původců zoonóz. Nepřímo se pak klienti mohou nakazit z kontaminovaného prostředí (kontaminovanou močí nebo výkaly). K přenosu zoonóz může dojít také prostřednictvím hmyzích vektorů, mezi které se řadí blechy, klíšťata apod. (Boyle et al. 2019; Santaniello et al. 2021).

V souvislosti s krmením dle konceptu BARF vznikají jisté obavy ohledně přenosu zoonóz. Syrové maso, ať už prodávané pro lidskou spotřebu nebo jako BARF krmivo, může být kontaminováno řadou patogenů. I přes vysokou opatrnost při zpracování syrového masa může dojít ke kontaminaci. K té může dojít z kůže, peří nebo vnitřností během porážky, vykuchání, zpracování nebo balení masa. Vzhledem k tomu, že zmrazení ani sušení mrazem nezničí všechny patogeny, doma připravovaný BARF i komerční BARF představuje určité riziko kontaminace. Zvíře pozře syrovou stravu s patogeny a stává se potenciálním přenašečem zoonotických onemocnění, i když se jeví zdravě (Freeman et al. 2013).

Z BARF stravy je možné identifikovat patogenní mikroorganismy, které mohou ohrozit zdraví zvířat i lidí (Papadopoulos & Sioutas 2020), což je v zoorehabilitaci nepřipustné. Dle Lefebvre et al. (2008) by se ze zoorehabilitace měla vyloučit všechna zvířata krmena za posledním 90 dní jakýmkoli syrovým masem z důvodu již zmiňovaných zoonóz.

Dle autorů Ghasemzadeh & Namazi (2015) jsou právě psi hlavním rezervoárem zoonotických infekcí, kteří mohou přenášet bakteriální, virové i parazitární onemocnění na člověka. Přehled potenciálních zoonotických patogenů, které mohou představovat riziko v zoorehabilitaci v důsledku krmení dle konceptu BARF, je uveden v Tabulce 2. Velmi nebezpečné jsou především bakterie, protože jsou odolné vůči antimikrobiálním látkám (Finley et al. 2006).

**Tabulka 2:** Přehled potenciálních zoonotických patogenů v zoorehabilitaci (vlastní tabulka)

Zoonotické bakterie	Zoonotičtí parazité	Zoonotické viry
<i>Salmonella</i> spp.	<i>Toxoplasma gondii</i>	Hepatitida typu E
<i>Campylobacter</i> spp.	<i>Neosporucaninum</i>	Vzteklina ( <i>rabies</i> )
<i>Pasteurella</i> spp.	<i>Sarcocystis</i> spp.	<i>Caliciviridae</i>
<i>Cryptosporidium</i> spp.	<i>Cryptosporidium parvum</i>	
<i>Leptospira</i> spp.	<i>Giardia</i> spp,	
<i>Brucella canis</i>	<i>Echinococcus granulosus</i>	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Echinococcus multilocularis</i>	
<i>Malassezia pachydermatis</i>	<i>Taenia hydatigena</i>	
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	<i>Taenia ovis</i>	
<i>Coxiella burnetii</i>	<i>Trichinella</i> spp.	
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>		
<i>Clostridium</i> spp.		
<i>Staphylococcus intermedius</i>		
<i>Escherichia coli</i>		
streptokoky skupiny A		
bakterie skupiny ESKAPE		

### 3.3.1 Bakteriální zoonózy

Jednou z nejobávanější bakteriální zoonózou v zoorehabilitaci je *Salmonella* spp. Tato bakterie patří do čeledi Enterobacteriaceae. Jsou to gramnegativní, pohyblivé, nesporotvorné, fakultativně anaerobní organismy. Rod *Salmonella* se skládá pouze ze 2 druhů, *Salmonella enterica* a *Salmonella bongori*. *S. enterica* se dále dělí na 6 poddruhů: *S. enterica* ssp. *enterica*, *S. enterica* ssp. *salamae*, *S. enterica* ssp. *arizonae*, *S. enterica* ssp. *diarizonae*, *S. enterica* ssp. *houtenae* a *S. enterica* ssp. *indica*. Tyto bakterie jsou všudypřítomné organismy (Marks et al. 2011), jejichž prevalence u psů se odhaduje na 1 % až 35 %. Onemocnění se nazývá salmonelóza (Finley et al 2006). Autorem první dokumentace o výskytu salmonely u psů a koček byl Buxton v roce 1957 (Carter & Quinn 2000).

Potenciální zdroje salmonel se u psů liší. Jeden z hlavních zdrojů může být nedostatečně tepelně opracovaná strava živočišného původu nebo zcela syrová strava (včetně kostí). Surové maso pocházející z kafilérií je často spojováno s rizikem kontaminace salmonely. Salmonelu může obsahovat i syrová zelenina a ovoce, či dokonce obiloviny (Finley et al. 2007). Důležitá je i manipulace se syrovou stravou a přísná hygienická opatření. Za potenciální zdroje nákazy je totiž možné považovat i kuchyňské potřeby (např. nůž nebo prkénko), misku se syrovou potravinou nebo místo, kde je zvíře krmeno. Zároveň může být zdrojem nákazy i tlama zvířete (Joffe & Schlesinger 2002).

Klinické příznaky, které jsou poměrně vzácné, jsou často nejzávažnější u mladých nebo oslabených zvířat (Carter & Quinn 2000). Pokud se příznaky salmonelózy u psů objeví, projevují se horečkou (40 až 41,1 °C), hubnutím, průjmem (může být až krvavý) nebo bolestí břicha (Finley et al. 2006). Zvířata s klinickou salmonelózou obvykle vylučují velké množství bakterií do okolí, což představuje závažné ohrožení osob v jejich bezprostřední blízkosti (Carter & Quinn 2000). U březích fen mohou salmonelózy způsobit aborty (Finley et al. 2006). Infekcí touto bakterií dochází k enterokolitidě (zánětu tenkého a tlustého střeva) nebo septikémii, a následuje endotoxémie. Většina zvířat se sama uzdraví ve 3. až 4. týdnu (Carter & Quinn 2000). Asymptomatictí přenašeči, tzn. jedinci se schopností vylučovat onemocnění bez projevení příznaků, mohou být infekční pro své okolí po dobu 6 týdnů nebo déle (nepřetržitě vylučují 1. týden, poté přerušovaně) (Finley et al. 2006).

Rod *Clostridium spp.* patří mezi potenciální zoonotické bakterie, které produkují největší množství toxinů ze všech typů bakterií. Nejvýznamnějším a nejrozšířenějším druhem je *Clostridium perfringers*, která je součástí mikrobiomu zvířat a lidí (Silva & Lobato 2015). *C. perfringers* je grampozitivní anaerobní bakterie. I přestože je tato bakterie běžným střevním patogenem, patogeneze a predispozice k onemocnění se u hostitelských druhů liší (Sindern et al. 2019). Podle produkce toxinů je *C. perfringers* rozdělena do 4 hlavních kategorií: alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), epsilon ( $\epsilon$ ) a iota ( $\iota$ ) (Silva & Lobato 2015). Většina těchto bakterií je ve střevě hostitele nepatogenní, některé druhy mohou však potenciálně způsobit vážná onemocnění u lidí i zvířat. Například druh *Clostridium difficile* je celosvětovým původcem infekčních průjmů (Marks et al. 2011). Dle studie autorů Schmidt et al. (2018) je výskyt *Clostridium perfringers* významně vyšší u psů, krmených BARF stravou, než u psů krmených tepelně upravenou stravou (např. granulami).

Klinické příznaky se mohou pohybovat od subklinického nosičství až po potenciálně fatální syndrom akutního hemoragického průjmu (Marks et al. 2011). Bakterie *Clostridium perfringers* je běžně detekována u psů právě se syndromem akutního hemoragického průjmu, a to v 67 % (Cave et al. 2002). Neexistují žádné specifické příznaky, které jsou typické pro infekci touto bakterií. Většina zvířat má průjem, který může doprovázet klinické příznaky spojené s onemocněním tenkého střeva či tlustého střeva. U psů může docházet i k zánětu sliznice (Marks et al. 2011).

Další obávanou zoonotickou bakterií v zoorehabilitaci je *Campylobacter spp.* Tento rod zahrnuje 37 druhů a poddruhů, ale většina z nich je považována za nepatogenní. Patogenní druhy, mezi které patří *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, jsou termofilní a mají

schopnost růstu při teplotě 42 °C. Pomocí kvantitativní metody PCR se prokázalo, že psi mohou přirozeně přenášet širokou škálu druhů této bakterie (Marks et al. 2011).

K přenosu alimentárního onemocnění způsobeného původcem rodu *Campylobacter spp.* dochází přímou nebo nepřímou cestou. Mezi přímé zdroje infekce patří strava (např. nedostatečně tepelně upravená strava, syrová strava, voda, nepasterizované mléko apod.). Do nepřímých zdrojů se řadí infekční prostředí nebo kontakt s jinými zvířaty (Acke 2018). Domácí zvířata mohou vylučovat *Campylobacter* po dlouhou dobu (více než 1 rok) (Damborg et al. 2004).

Bakterie *Campylobacter* může u psů způsobit symptomatické i asymptomatické infekce. U štěňat do 6 měsíců nebo u zvířat ve stresu se objevují řídké průjmy až vodnaté či krvavé mukoidní průjmy. Akutní kampylobakteriíza je doprovázena nechutenstvím, zvracením a horečkou. Cílená léčba není ve většině případů nutná, onemocnění samo odezní (Marks et al. 2011).

Dle Acke (2018) se ve výkalech u psů nejčastěji vyskytují druhy jako jsou *C. upsaliensis*, *C. jejuni* a *C. helveticus*. Přehled těchto druhů *Campylobacter spp.* včetně jejich klinických příznaků u psů i lidí je uveden v Tabulce 3.

**Tabulka 3:** Druhy *Campylobacter* prokázané u psů včetně jejich klinických příznaků u psů a člověka (upraveno dle Acke 2018)

Druhy <i>Campylobacter</i>	Klinické příznaky	
	Pes	Člověk
<i>C. Jejuni</i>	žádné, enteritida, bakteriémie, cholangiohepatitida/cholecystitida, potrat, akutní polyradikuloneuritida	enteritida, bakteriémie, myokarditida, meningitida, cholecystitida, infekce močových cest, idiopatické střevní záněty, Guillainův-Barrého syndrom
<i>C. upsaliensis</i>	žádné, enteritida, akutní polyradikuloneuritida	enteritida, bakteriémie, abscesy, placentitida
<i>C. helveticus</i>	žádné nebo enteritida	Enteritida

Bakterie skupiny **ESKAPE** (tj. *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter species*) jsou běžné oportunní patogeny, které jsou spojovány v souvislosti se zdravotnickou péčí (tzv. nozokomiální infekce). Bakterie ESKAPE zvyšují po celém světě morbiditu a mortalitu pacientů. Dle Santaniello et al. (2021) hrozí riziko přenosu všech zoonotických bakterií ESKAPE ze psa na člověka, proto je potřeba provádět zvýšenou mikrobiální kontrolu a dodržovat přísná hygienická pravidla. Velmi důležitá je pravidelná kontrola zdravotního stavu u všech psů zapojených do AAI. Jakýkoli úzký kontakt mezi člověkem a psem zvyšuje riziko



zoonózy, a s tím i možnost přenosu mezidruhově rezistentních bakterií. Spoluprací mezi veterináři, lékaři a epidemiology by se mělo zabránit přenosu těchto bakterií a zároveň se optimalizuje zdraví lidí, zvířat i životního prostředí (Santaniello et al. 2021).

Další bakterií způsobující zoonózy je *Escherichia coli* (*E. coli*). I přestože se *E. coli* běžně vyskytuje ve fekálním mikrobiomu zdravých psů, patří mezi její členy řada oportunních patogenů. Tyto patogeny mohou být vzájemně přenosné mezi psy a jejich majiteli (Moon et al. 2018). Krmiva pro domácí zvířata mohou často obsahovat tyto životaschopné bakterie. *E. coli* je přítomna především ve střevních traktech zdrojů živočišného původu. Ke kontaminaci dochází snadno prostřednictvím výkalů, které mohou kontaminovat prostředí. Vyšší prevalence *E. coli* byla zjištěna také u komerčních syrových krmiv pro domácí zvířata ve srovnání s konvenčně zpracovanými krmivy (Freeman et al. 2013).

*E. coli* zahrnuje 5 kategorií: zahrnuje enterotoxinogenní *E. coli* (ETEC), enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enteroagregativní *E. coli* (EAaggEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC) a Shiga (Vero) toxin produkující *E. coli* (STEC/ VTEC). Ze zoonotického hlediska je STEC nejzávažnější skupinou způsobující závažná onemocnění u lidí. U psů dochází k tzv. Alabama rot (též Alabamská hniloba). Ovšem zvířata mohou být pouze přenašeči bez projevení příznaků (Wasteson 2002).

Zoonotická bakterie *Yersinia enterocolitica* je jednou z častých příčin lidské enteritidy, které mohou způsobit závažné následky. Tato bakterie se běžně vyskytuje v syrovém vepřovém mase, vepřových drobch a zvěřině. Dokáže přežít i zmrazení a rozmrazení. Psi a kočky vylučují lidské patogenní sérotypy (Bucher et al. 2008). Hlavním rizikem lidské yersiniózy je nesprávná manipulace s kontaminovaným masem (včetně vepřových drobů). Jedinec se také může nakazit kontaktem s domácími zvířaty (Fredriksson-Ahomaa et al. 2006).

Mezi další zoonotické bakterie se řadí i některé druhy rodu *Brucella*. Jedná se o *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella canis* a *Brucella suis* (Woldemeskel 2013). *B. suis* je původce brucelózy u divokých prasat. Psi, kteří se běžně setkávají s divokými prasaty nebo konzumují syrové vepřové maso, jsou častěji vystaveni této bakterii. *B. suis* způsobuje klinické ortopedické a reprodukční onemocnění u psů (Mor et al. 2016). Pro člověka je *B. suis* méně infekční a zoonotické onemocnění často získá konzumací masa z volně žijících zvířat. Člověk se od psů může nakazit prostřednictvím sekretů a močí (Woldemeskel 2013).

Rod *Streptococcus sp.* patří mezi bakterie běžně se vyskytující u psů jako součást jejich zdravého mikrobiomu. Zatímco mnoho druhů *Streptococcus sp.* je neškodných, některé mohou způsobovat onemocnění u zvířat i lidí (Lamm et al. 2010). Druh *Streptococcus canis* (*S. canis*) je identifikován jako potenciální zoonotický patogen u psů. *S. canis* způsobuje u psů infekce kůže a měkkých tkání, infekce močových cest a infekce dýchacích cest. U lidí byl *S. canis* hlášen jako příčina široké škály infekcí, včetně infekcí ran. Výskyt *S. canis* je častější u nemocných psů než u zdravých psů. Přestože se jedná o potenciálně zoonotickou bakterii, riziko přenosu na člověka je nízké. Přesto by měla být v zoorehabilitaci přijata opatření, která by zabránila šíření těchto bakterií (Kaczorek-Łukowska et al. 2019).

### 3.3.2 Parazitární zoonózy

V syrovém mase se mohou nacházet prvoci a helminti, kteří mohou být rizikovými faktory infekcí pro zvířata krmená BARF stravou. Parazitární onemocnění ze syrového masa jsou nebezpečná i pro člověka. Člověk se může nakazit od psů, kteří vylučují a rozšiřují parazity do prostředí, nebo manipulací se syrovým masem. Zmrazování syrového masa je běžnou prevencí proti většině výše uvedených druhů parazitů. Účinnost mražení závisí na druhu parazita a podmínkách (především teplota a délka trvání) (van Bree et al. 2018; Davies et al. 2019).

*Toxoplasma gondii* je prvok, který způsobuje parazitární zoonotická onemocnění. Přenáší se syrovým masem a často způsobuje zoonózy. K infekci lidí a zvířat dochází pozřením syrového masa nebo nedostatečně tepelně upraveného masa obsahující parazitické cysty. K nákaze může dojít též požitím ovoce a zeleniny kontaminovanými oocystami z kočičích výkalů (Coelho et al. 2011; Jokelainen et al. 2012). Studie autorů van Bree et al. (2018) detekovala pomocí PCR přítomnost tohoto parazita v 6 % mražené komerční BARF stravy. Zmražení masa na -20 °C po dobu alespoň 3 dnů je nezbytné pro neutralizaci cyst a snížení parazitární nákazy. I přesto je hlavní prevencí proti nákaze vaření masa při teplotě alespoň 67 °C po dobu pár sekund, čímž se ničí cysty. Zároveň je nutné zabránit kontaktu syrového a vařeného masa (Mirza Alizadeh et al. 2018).

U psů krmených dle konceptu BARF může dojít k nákaze prvokem *Sarcocystis spp.* Definitivním hostitelem prvoka jsou psi a kočky, se kterými může docházet k zoonózám. Psi, kteří jsou krmeni striktně syrovým masem, mohou vylučovat oocysty parazitů po dobu několika měsíců. I člověk se může tímto parazitem nakazit, ale klinické onemocnění se projevuje zřídka. Prevencí proti nákaze je mražení nebo vaření při vysokých teplotách, stejně jako u toxoplazmózy (van Bree et al. 2018).

Dalším zoonotickým parazitem může být i *Echinococcus granulosus*. Tato psí tasemnice má nepřímý životní cyklus, jehož definitivním hostitelem je pes (nebo jiný masožravec). Definitivní hostitel je infikovaný dospělou formou parazita, který se nachází v tenkém střevě. Vajíčka jsou vylučována prostřednictvím výkalů do prostředí, kde jsou přijímány mezihostitelem (ovce, kozy, skot nebo prasata), u kterého se vyvíjejí cysty. Vajíčka v prostředí mohou přežívat až několik měsíců. Psi se nakazí pozřením cyst v syrovém mase nebo ve viscerálních orgánech. Psi obvykle nevykazují žádné klinické příznaky a zůstávají asymptomaticí, ale přesto představují značnou hrozbu pro veřejné zdraví. U tohoto parazita hrozí vysoké riziko zoonózy, jelikož je člověk mezihostitelem. U člověka vznikají cysty v játrech a plicích. I přestože neexistují žádné bezpečné pokyny pro zničení cyst v syrovém mase, je doporučováno zmrazení masa na -18 °C po dobu minimálně 6 hodin (Papadopoulos & Sioutas 2020).

Střevní parazit *Giardia spp.* (konkrétně *Giardia duodenalis*) je běžný u lidí i zvířat po celém světě. Bylo identifikováno osm hlavních genetických skupin, z nichž dvě (A a B) se nachází jak u lidí, tak u zvířat. Zatímco zbylých šest skupin (C až H) jsou hostitelsky specifické a pro člověka nejsou infekční. Životní cyklus *Giardie* je přímý a zahrnuje pouze

2 stádia, trofozoit (replikační stádium) a cystu (infekční stádium). K infekci dochází konzumací kontaminovaných potravin či vody, nebo fekálně-orální cestou (kontakt člověk-člověk nebo zvíře-zvíře). Skupina A a B může ovšem představovat zoonotický potenciál mezi psem a člověkem. Onemocnění se nazývá giardiáza a její klinické příznaky jsou značně variabilní. Mezi příznaky patří akutní až chronický průjem, dehydratace, bolest břicha, nevolnost, zvracení nebo úbytek hmotnosti. Jedinec však může být i asymptomatický. Prevalence giardiózy u lidí je ve vyspělých zemích nižší (0,4 až 7,5 %) než v rozvojových zemích (8 až 30 %) (Ryan & Cacciò 2013).

Mezi další významné parazity, které mohou způsobovat zoonózy, patří rody *Trichinella* a *Taenia*. Tito parazité nejsou v komerční syrové stravě identifikováni kvůli závazné evropské legislativě. Surové maso podléhá přísné kontrole a eliminaci jatečně upravených těl infikovaných parazity rodu *Trichinella* (konkrétně *Trichinella spiralis*), a proto se nakažené maso nedostane do potravinového řetězce. *Neospora caninum* a *Cryptosporidium parvum* jsou druhově specifičtější parazité pro psy, proto k zoonotickým nákazám většinou nedochází (Papadopoulos & Sioutas 2020).

### 3.3.3 Virové zoonózy

I přestože existují některé hrozby virových zoonóz v důsledku krmení syrovou stravou, v současnosti není dostatek studií, které potvrdily potenciální nebezpečí (Davies et al. 2019).

Původcem zoonotických onemocnění může být virus **hepatitida typu E**. Tento vir způsobuje závažné lidské onemocnění, tzv. žloutenku. Hepatitida může infikovat tkáň zvířat sloužící jako zdroj syrové potravy. Požitím syrového či tepelně neupraveného infikovaného masa hrozí riziko nejen pro domácí zvířata, ale i pro jejich majitele. Zdrojem mohou být především vepřová játra nebo jelení maso (Meng 2011). Ke kontaminaci viry může dojít i ve zpracovatelském průmyslu, kde se infikovaná potravina upravuje. Tato rizika však nejsou též zcela objasněna, a proto je potřeba provést další studie (Davies et al. 2019).

**Vzteklina** (*rabies*) je akutní virové infekční onemocnění postihující zvířata a lidi (Lavan et al. 2017). I přestože je Česká republika od roku 2004 prohlášena za zemi vztekliny prostou (Matouch et al. 2006), tak celosvětově umře velký počet lidí v důsledku nakažení vzteklinou. Vzteklna je totiž nevyléčitelná nemoc, která má nejvyšší úmrtnost ze všech zoonóz (Lavan et al. 2017). Viry mohou infikovat tkáň zvířete (stejně jako u hepatitidy), což může znamenat potenciální riziko pro konzumenta. I u tohoto viru je zapotřebí provést studie pro objasnění zoonózy v souvislosti se syrovou stravou (Davies et al. 2019).

Dalšími viry, které mohou způsobit zoonózu, je skupina **kalicivirů** (*caliciviridae*). Mezi kaliciviry se řadí i noroviry, u kterých se prokázalo přežití při průchodu psím gastrointestinálním traktem. To by mohlo pro člověka znamenat potenciální zoonotické riziko. Ovšem i u této skupiny virů nebyla jasně prokázána souvislost kontaminace ze syrové stravy. Kočky se mohou navíc proti kalicivirům očkovat (Summa et al. 2012).

### 3.4 Krmení psů konceptem BARF

Nejčastějším důvodem, proč majitelé svá zvířata krmí syrovou stravou je, že se podle nich jedná o „přirozenější“ a „zdravější“ metodu krmení. Taxonomicky jsou psi masožravci (ačkoli funkčně jsou všežravci) a jejich předci, vlci, lovili živou kořist a živili se mršinou. Někteří zastánci syrové stravy tvrdí, že psi a vlci mají podobné anatomické a fyziologické znaky, a tudíž by se měli krmit stejnou stravou jakou se živí vlci ve volné přírodě. Názory jednotlivců se liší, avšak je možné obecně konstatovat, že existuje jistý trend o tomto způsobu krmení, který je pro majitele domácích zvířat zajímavý. Tudíž je volba krmení tímto způsobem stravy založená na ideologii a osobním přesvědčením o syrové stravě (McKenzie 2019).

Zastánci syrové stravy tvrdí, že správně sestavená krmná dávka syrové stravy může být nutričně vhodná a vhodným zacházením lze zamezit i rizikům přenosu patogenů (McKenzie 2019). Jako další zdravotní přínosy uvádí vitalitu psa, správnou funkci trávicího traktu a zlepšení imunity (Nüesch-Inderbinnen et al. 2019). Zastánci této stravy také tvrdí, že má syrová strava pozitivní zdravotní účinky na lepší kvalitu srsti a strukturu i objem výkalů. Dokonce tvrdí, že snižuje riziko torze žaludku, cukrovky, alergie, rakoviny a jiných závažných onemocnění (McKenzie 2019). Kostí v syrové stravě mají také své přínosy. Žvýkání syrových kostí totiž napomáhá k odstranění zubního kamene (Marx et al. 2016). Dalším argumentem zastánců syrové stravy je to, že komerční strava (suchá či konzervovaná) je nutričně nedostatečná a méně zdravá. Také mají obavy ze ztráty živin při zahřívání a z přidávání přísad konzervantů a barviv při zpracování krmiva. Vědecké důkazy o zdravotních přínosech tohoto způsobu krmení jsou však nedostatečné (McKenzie 2019).

Existují však jisté obavy pro domácí zvířata způsobené krmením dle konceptu BARF. Syrové kosti v krmné dávce mohou představovat riziko zlomenin zubů a zároveň poranění gastrointestinálního traktu, které může vést k vážným následkům nebo až ke smrti zvířete. Dokonce i divoce žijící masožravci jsou ohroženi zraněním z kostí a také chronickým opotřebením zubů (McKenzie 2019). Americká veterinární lékařská asociace (AVMA) a Kanadská veterinární lékařská asociace (CVMA) doložily důkazy o tom, že syrová strava může způsobit onemocnění domácích zvířat. Jedním z nejčastějších onemocnění ze syrové stravy jsou salmonelózy u psů a koček (Nüesch-Inderbinnen et al. 2019). Největším rizikem syrové stravy je infekční onemocnění z neupravených potravin. Přestože je zde riziko přenosu těchto onemocnění i z tepelně upravené stravy, riziko u syrových potravin je výrazně vyšší. Zdravá, dospělá zvířata s dobrou imunitou mohou těmto onemocněním do určité míry odolat. Avšak mladá či stará zvířata s narušenou imunitou jsou vystavena vyššímu riziku, stejně tak jejich majitelé. Tyto negativní účinky a rizika ze syrové stravy jsou na rozdíl od přínosů, které jsou teoretické a neprokazatelné, dobře zdokumentovány (McKenzie 2019).

### 3.4.1 Kontrolní postupy nezávadnosti BARF stravy

BARF strava může pocházet z různých živočišných zdrojů, a proto je důležitá kontrola syrového krmiva (van Bree et al. 2018). Zajišťování lidského zdraví i zdraví zvířat je jedním z hlavních cílů potravinového práva. Potravinové právo stanovuje nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002 ze dne 28. ledna 2002. V Evropské unii (EU) musí všichni komerční zpracovatelé a dodavatelé syrového krmiva pro domácí zvířata dodržovat předpisy. Tyto předpisy upravují (mimo jiné) živočišné produkty, které nejsou určeny k lidské spotřebě. Vedlejší produkty, které jsou povoleny v krmivech pro domácí zvířata, spadají do klasifikace „Kategorie 3“. Tato kategorie zahrnuje produkty, které jsou sice vhodné pro lidskou spotřebu, ale nejsou pro ni určeny. Do kategorie 3 se řadí i lidské potraviny, které obsahují živočišné produkty, ale byly z různých důvodů odstraněny z potravinového řetězce (z nichž z žádného nevzniká žádné riziko pro lidské zdraví nebo zdraví zvířat). Kromě toho jsou povoleny také vedlejší produkty, které nejsou vhodné k lidské spotřebě, ale zvíře bylo poraženo na jatkách, po prohlídce před porážkou bylo považováno za vhodné pro lidskou spotřebu a pitva nenalezla důkazy o přenosné nemoci (European Commission 2018.).

Nařízení Komise (EU) č. 142/2011 zahrnuje požadavky na krmivo pro zvířata v zájmovém chovu a některé další získané produkty. Jedná se především o to, aby ve všech fázích výroby, zpracování a distribuce se zajistila bezpečnost zdraví zvířat i lidí. Syrové krmivo pro domácí zvířata musí být baleno do obalu z nepropustného materiálu. Všechny kroky musí zaručit, aby produkt nebyl během výrobního procesu až do okamžiku prodeje vystaven kontaminaci (Commission Regulation (EU) No 142/2011).

### 3.4.2 Přehled publikací zabývajících se výskytem zoonotických bakterií u psů v důsledku krmení konceptem BARF

Syrové maso, které slouží jako krmivo pro zvířata v zájmovém chovu, je sice kontrolováno pomocí požadavků (viz kapitola 3.4.1 Kontrolní postupy BARF stravy), ovšem i přesto jsou zoonotické bakterie detekovány. Níže je uveden přehled publikací prokazujících výskyt zoonotických bakterií u psů spojené s krmením dle konceptu BARF.

#### **Detekce bakterií rodu *Salmonella* spp.**

Jednou z nejčastěji detekovaných bakterií je rod *Salmonella* spp. První izolace salmonely proběhla první izolace již v roce 1976. Autoři Mayer et al. (1976) se zabývali detekcí této bakterie u policejních psů, kteří byli krmeni syrovou stravou. Výzkum se uskutečnil v Německu, kde bylo odebráno 67 vzorků ze psích výkalů. Při prvním odběru byla salmonela izolována u 42 % vzorků, zatímco u druhého odběru dokonce až u 55 % vzorků (Davies et al. 2019).

Průzkumy syrového masa pro krmení domácích zvířat v Severní Americe uvádějí podíl vzorků pozitivních na salmonelu v rozmezí 7,1 % (Strohmeier et al. 2006), 8 % (Nemser et al. 2014), 9 % (Mehlenbacher et al. 2012), 20 % (Weese et al. 2005) a 21 % (Finley et al. 2008). Vzorky byly obvykle zmrazené a získané z komerčních prodejen.

Detekce salmonely byla zaznamenána v mnoha studiích zabývajících se krmením psů syrovou stravou (Joffe & Schlesinger 2002; Finley et al. 2007; Lefebvre et al. 2008; Lenz et al. 2009). Studie potvrdily, že krmení syrovou stravou je hlavní rizikový faktor pro vylučování této bakterie (Leonard et al. 2011; Reimschuessel et al. 2017). Salmonela je vylučována u psů krmených syrovou stravou s totožnou ne-li vyšší frekvencí než požitím kontaminovaného krmiva (Leonard et al. 2011), což může vést až k chronickému nebo zesílenému vylučování salmonely (Davies et al. 2019). Tuto skutečnost potvrzuje i dlouhodobé vylučování salmonely po dobu 1 až 11 dnů ihned po prvním dni krmení komerční syrovou stravou kontaminovanou salmonelou (Finley et al. 2007).

### **Detekce bakterií rodu *Campylobacter* spp.**

Rod *Campylobacter* spp. patří mezi běžné bakteriální patogeny způsobující lidskou gastroenteritidu po celém světě. Nový Zéland je považován za jednu ze zemí, kde jsou hlášeny nejvyšší počty kampylobakterií u lidí ve vyspělém světě (Baker et al. 2007). *Campylobacter* spp. u psů a koček na Novém Zélandu byl detekován u 17 % fekálních vzorků (Mohan 2015). Pozdější studie detekovala *Campylobacter* spp. u 36 %, přičemž nejčastějšími izolovanými druhy jsou *C. jejuni*, *C. upsaliensis* a *C. helveticus*. Součástí této studie byla i izolace *Campylobacter* spp. z komerčního syrového krmiva pro domácí zvířata, kde celková prevalence byla 28 % (Bojanić et al. 2019).

Dle vědecké literatury byl *Campylobacter* spp. izolován přibližně ve 300 vzorcích odebraných ze syrové stravy v USA a Kanadě (Weese et al. 2005; Strohmeier et al. 2006; Lenz et al. 2009).

### **Detekce bakterií rodu *Clostridium* spp.**

Bakterie rodu *Clostridium* spp. je další bakterií, která se může vyskytovat v syrovém masu a způsobit zoonotická onemocnění. Následující vědecké publikace uvádí identifikaci této bakterie v syrovém masu určeném pro domácí zvířata. Druh *Clostridium perfringens* byl izolován ve 26 % komerční syrové stravy pro psy z pěti zemí (Švédsko, Norsko, Finsko, Německo a Spojeného království) (Hellgren et al. 2019). V USA a Kanadě byla hlášena přítomnost *Clostridium difficile* v syrové stravě pro psy a v masu prodávaném pro lidskou spotřebu (Weese et al. 2005; Rodriguez-Palacios et al. 2007; Rodriguez-Palacios et al. 2009).

## Detekce ostatních zoonotických bakterií

Další zoonotickou bakterií vyskytující se v syrovém masu je *Escherichia coli* (*E. coli*). Dle uvedených vědeckých publikací překračuje počet *E. coli* v BARF stravě limity EU pro syrové krmivo pro domácí zvířata. *E. coli* produkující shiga toxin (konkrétně STEC O157:H7) byla detekována v syrové stravě (20 %) v Nizozemsku (van Bree et al. 2018). Dle studií Lenz et al. (2009) a Nemser et al. (2014) však nebyla STEC O157 izolována z celkového počtu 616 vzorků syrové stravy v těchto dvou studiích v USA. Rozdíly v izolaci mohou odrážet odchylky v lokální kontaminaci masa, druhu zdrojového masa a metodách vyšetřovatelů. Ve Spojeném království byly detekovány blízce příbuzné izoláty STEC O157 ze čtyř lidských klinických případů (s jedním úmrtím). I v těchto případech se prokázala souvislost se psy krmenými BARF stravou (Byrne et al. 2018).

*Brucella suis* je další zoonotickou bakterií, jejíž zdrojem infekce je syrové maso. *Brucella suis* byla detekována ve zmrazeném zaječím masu dovezeném z Argentiny do Nizozemska a Spojeného království. Zaječí maso bylo určeno jako BARF strava pro domácí zvířata. Bakterie byla identifikována za základě klinických příznaků nemocného psa (Frost 2017).

Bakteriální druh *Listeria monocytogenes* může způsobovat též zoonotické onemocnění. Uvedené vědecké studie uvádějí detekci této bakterie v BARF stravě. *Listeria monocytogenes* byla izolována u 54 % holandských produktů prodávaných jako mražené syrové krmivo pro domácí zvířata (van Bree et al. 2018). V USA byla detekována u 16 % syrového (převážně mraženého) krmiva pro psy a kočky (Nemser et al. 2014).

## 4 Metodika

### 4.1 Výběr psů pro výzkum

Do studie bylo vybráno celkem 100 psů, od kterých byl následně odebrán fekální vzorek pro vyhodnocení bakteriálního osídlení střevního mikrobiomu. Psi byli vybíráni na základě způsobu krmení (BARF strava/granule). Respondenti z celé České republiky byli osloveni pomocí sociální sítě (Facebook).

U psů krmených BARF stravou (N = 50) bylo podmínkou, aby byli klinicky zdraví (bez příznaků onemocnění) a krmení striktně syrovou stravou po dobu min. 2 týdnů. Do výzkumu nebyli zařazeni psi, kteří užívali antibiotika v méně než 3 týdnech.

Do studie se zapojili psi velkých (N = 26), středních (N = 13) i malých (N = 11) plemen. Průměrný věk psů krmených BARF stravou byl 5.96 let ( $\pm$  4.28 SD). Častěji se vyskytovaly ve studii feny (N = 26) než psi (N = 24). Jedinci byli převážně nekastrování (N = 30). Majitelé svého psa odčervovali většinou 1 až 2× ročně (N = 22), koprologie byla prováděna pouze ojedinele (N = 15). Psi byli chováni nejčastěji uvnitř domu/bytu (N = 40), zřídka pak venku na zahradě (N = 6) či kombinací uvnitř/venku (N = 4). Vzorky byly převážně od psů z města (N = 37) než z vesnice (N = 13). Psi byli nejčastěji chováni ve smečce (N = 30) než sami (N = 20). Většina psů byla krmena BARF stravou už od narození (N = 28). U psů převažovala normální kondice (N = 45).

Podmínkou pro psy, kteří jsou krmeni suchou stravou (granulemi) (N = 50), byl dobrý zdravotní stav a krmení striktně suchou stravou po dobu min. 2 týdnů. Opět byli vybíráni psi, kteří neužívají léčiva, která by mohla mít vliv na složení střevního mikrobiomu a tím i na konečné výsledky.

Studie se zúčastnili psi malých (N = 25), středních (N = 22) i velkých (N = 3) plemen. Průměrný věk psů krmených granulemi byl 5.83 ( $\pm$  4.35 SD). Pevážně se jednalo o feny (N = 33) než o psy (N = 17). Většina psů byla kastovaná (N = 27). Majitelé nejčastěji svého psa odčervovali 2 až 3× ročně (N = 26), koprologii prováděli pouze zřídka (N = 2). Nejčastěji psi žili uvnitř domu/bytu (N = 47), venku na zahradě minimálně (N = 3). Vzorky pocházely od městských psů (N = 47) než od psů žijící ve vesnici (N = 3). Psi žili převážně sami bez přítomnosti jiného psa (N = 36) než ve smečce (N = 14). Pevážná většina psů byla krmena granulemi již od narození (N = 42). Zpravidla se jednalo o psy v normální kondici (N = 44).

### 4.2 Metodika sběru dat a skladování vzorků

Celkem bylo odebráno 100 fekálních vzorků, z čehož 50 psů bylo krmeno BARF stravou a 50 psů bylo krmeno suchou stravou (granule). Sběr proběhl v období únor až říjen 2022. Před odběrem vzorku majitelé vyplnili dotazník, který obsahoval informace o psovi (viz Příloha 1). Přehled všech informací o psech krmených konceptem BARF je k dispozici v Příloze 2 a o psech krmených granulemi v Příloze 3.



Fekální vzorky byly odebírány pomocí sterilní odběrové sady. Sběr vzorku byl proveden ihned po defekaci psa. Každý vzorek byl označen číslem (1 až 100) pro pozdější identifikaci. Vzorky v odběrových sadách byly následně zamrazeny ( $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  až  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Všechny vzorky byly zmrazeny na shodnou teplotu. V mrazáku byly vzorky skladovány až do zpracování v laboratoři.

Analýza vzorků byla provedena v laboratoři Ústavu živočišné fyziologie a genetiky Akademie věd České republiky pod vedením Ing. Jakuba Mrázka, Ph.D.

### 4.3 Izolace DNA

K izolaci DNA byla použita izolační sada QIAamp® PowerFecal® DNA Kit, jejíž součástí bylo vše potřebné k izolaci (včetně podrobného protokolu) (Qiagen 2017). Cílem tohoto kroku bylo izolovat DNA od nečistot a příměsí.

Každý vzorek byl nejprve navážen na množství mezi 150 mg a 250 mg a byl vložen do zkumavky PowerBead Pro Tube. Tato zkumavka obsahuje drobné kuličky, které napomáhají k rychlé a důkladné homogenizaci fekálního vzorku. Vzorek byl ve zkumavce protřepán tak, aby se sediment usadil na dně. Ke vzorku bylo přidáno 800  $\mu\text{l}$  roztoku CD1. Roztok CD1 obsahuje detergent, který způsobí narušení buněčné stěny a denaturaci bílkoviny. Následně byl vzorek vložen do přístroje FastPrep-24™ při rychlosti 6,5 m/s a délce vortexování 2x po 30 s. Poté byly vzorky centrifugovány při 15 000 rcf po dobu 1 minuty. Supernatant byl přenesen do čisté 2 ml zkumavky Microcentrifuge Tube. Následně bylo přidáno 200  $\mu\text{l}$  roztoku CD2. Směs byla následně znovu centrifugována. Supernatant byl přenesen do čisté 2 ml zkumavky Microcentrifuge Tube. K supernatantu bylo přidáno 600  $\mu\text{l}$  roztoku CD3 a po dobu 5 sekund byl vzorek opět promíchán. Roztok CD3 je vysoce koncentrovaný roztok soli, který dokáže navázat DNA, ale neváže organický a anorganický materiál. V dalším kroku bylo přeneseno 650  $\mu\text{l}$  supernatantu do zkumavky MB Spin Columns, která byla opět centrifugována. Tento krok byl proveden ještě jednou. Tím bylo zajištěno, že veškerá tekutina prošla přes křemičitou membránu zkumavky MB Spin Columns, kde byla zachycena celková genomová DNA. Vrchní část zkumavky MB Spin Columns byla vložena do čisté zkumavky Collection Tubes (2 ml). Bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku EA (ethanol) a poté byla zkumavka centrifugována za stejných podmínek (viz výše). Roztok EA obsahuje čistící pufr, který odstraňuje proteiny a další kontaminanty z filtrační membrány zkumavky MB Spin Column. Obsah spodní části byl vyprázdněn a bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  roztoku C5. Roztok C5 slouží jako čistící roztok na bázi ethanolu, který odstraňuje zbytkovou sůl, inhibitory a další kontaminanty, přičemž DNA zůstává navázána na křemičitou membránu. Zkumavka poté byla ještě jednou centrifugována. Obsah dolní zkumavky byl opět vyprázdněn. Následovala centrifugace samotné zkumavky při 16 000 rcf po dobu 2 minut. Centrifugací se zajistilo odstranění veškerého roztoku obsahující ethanol, který by mohl ovlivnit DNA. Horní část zkumavky (MB Spin Columns) se vložil do zkumavky Elution Tubes (1,5 ml) a přidalo se 100  $\mu\text{l}$  roztoku C6. Roztok C6 slouží k úplnému uvolnění DNA z filtrační membrány. Následovala poslední centrifugace. DNA byla izolována u všech 100 vzorků. Izolovaná DNA byla skladována při teplotě  $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Koncentrace izolované DNA byla změřena na přístroji NanoDrop One. Čistota DNA byla vyjádřena absorpcí při vlnových délkách 260 a 280 nm. Hodnota čisté DNA byla vyšší než 1,8 ng/μl (čím vyšší hodnota, tím čistší DNA). Tato hodnota je vyjádřena poměrem mezi absorpčním maximem DNA a bílkovin. Jestliže hodnota čisté DNA byla nižší než 1,8 ng/μl, tak bylo ve vzorku přítomno více bílkovin nebo jiných reagensů. Naměřené hodnoty se nacházely v rozmezí 12,903 ng/μl až 441,8 ng/μl.

## 4.4 Stanovení mikrobiální diverzity

Stanovení mikrobiální diverzity pomocí PCR-DGGE bylo provedeno pomocí univerzálního detekčního systému mutací DCode<sup>TM</sup> (Bio-Rad). Postupovalo se dle protokolu autorů Muyzer et al. (1993).

### 4.4.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

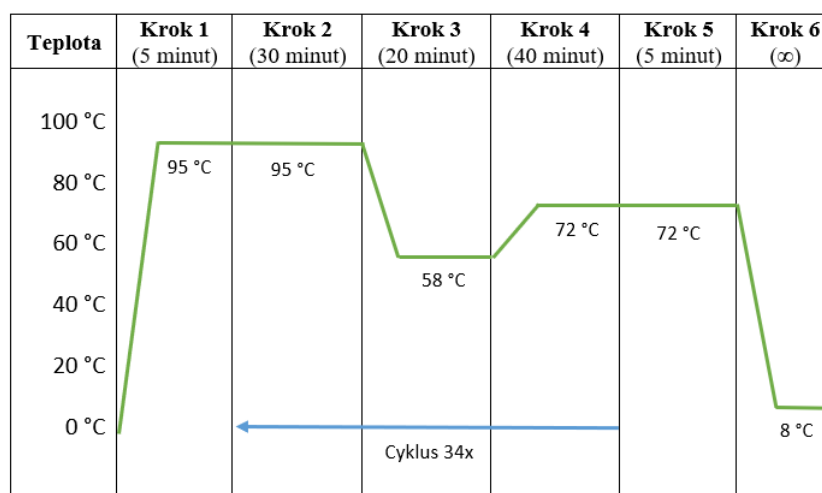
Pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) byly namnoženy (amplifikovány) úseky DNA, ze kterých byly vytvořeny kopie vzorového fragmentu DNA. Amplifikace úseku DNA kódující 16S rRNA byla nezbytná pro stanovení bakteriálního zastoupení ve vzorku. V tomto úseku se nacházely variabilní úseky, které byly charakteristické pro jednotlivé bakterie.

Do mikrokumavky (200 μl) byly smíchány všechny složky uvedené v Tabulce 4. Tento krok byl proveden u všech 100 vzorků.

**Tabulka 4:** Podrobný přehled složek a množství na přípravu PCR reakce 1 vzorku

Složka	Množství
Izolovaná DNA	1 μl
Forward primer (10x zředěný 338GC)	1 μl
Reverzní primer (10x zředěný 534R)	1 μl
dH <sub>2</sub> O	12 μl
PCR mix – OneTaq Quick-Load 2X Master Mix with Standard Buffer	15 μl

Poté bylo všech 100 mikrokumavek vloženo do jamek zahřívacího bloku termocykleru Biometra TAdvanced. Na termocykleru byl zvolen program "PCR-DGGE". Jednotlivé kroky PCR reakce jsou znázorněny na Obrázku 2. Následovala kontrola PCR reakce pomocí agarózové elektroforézy.



**Obrázek 2:** Jednotlivé kroky PCR reakce

#### 4.4.2 Kontrola vzorků DNA pomocí agarózové elektroforézy

Agarózová elektroforéza byla provedena pro kontrolu, zda PCR reakce proběhla úspěšně a je možné se provést DGGE.

Nejprve byl připraven 1,5% agarový gel, jehož složky a množství jsou uvedeny v Tabulce 5. Předpokládaná velikost úseků je 200 pb (párů bází). V kádince byla smíchána agaróza s 0,5% TBE pufrům a na magnetickém míchadle byla úplně rozpuštěna a provařena. Poté byl přidán ethidium bromid, který zvýrazňuje DNA pod UV světlem.

**Tabulka 5:** Podrobný přehled složek a množství pro přípravu agarózového gelu

Složky	Množství
PCR agaróza	1,5 g pufr
0,5% TBE pufr	100 ml
ethidium bromid	3 $\mu$ l

Vychlazený gel (40 až 50 °C) byl vložen do vaničky, do které se následně umístil hřebínek, který vytvořil jamky pro vzorky DNA. Gel byl tuhý přibližně za 20 minut, poté byl vyjmut hřebínek. Gel byl přemístěn do elektroforetické vany, která byla naplněna 0,5% TBE pufrům tak, aby byl gel ponořený. V první jamce bylo pipetou nanášeno 5  $\mu$ l standardu DNA Markeru 200-1500 col. (firma Top-Bio s.r.o.). V dalších jamkách bylo 3  $\mu$ l produktu získaného z PCR reakce.

K elektroforetické vaně byly připojeny elektrody a bylo nastaveno napětí na 100 V po dobu 30 minut. DNA je záporně nabitá, proto nanášené produkty postupovaly ke kladně nabitým elektrodám. Následně byl gel přemístěn do laserové technologie Azure200 Blue light White light UV (Azure Biosystems), která snímá fluorescentní DNA gely. Úspěšnost PCR

reakce byla potvrzena, pokud DNA úseky splňovaly velikost 200 pb. Všech 100 produktů obsahovalo postačující množství DNA, která byla potřebná pro další zpracování.

#### 4.4.3 Denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE)

Během denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE) byly rozděleny geny stejné velikosti podle jejich denaturační schopnosti. V tomto kroku byly získány významné úseky, které byly použity pro Sangerovo sekvenování DNA.

DGGE byla provedena podle protokolu Muyzera et al. (1993) v přístroji DCode™ D|Universal Mutation Detection System. Nejprve byl připraven akrylamidový gel s gradientem, který vznikl smícháním dvou roztoků o různé denaturační síle (viz Tabulka 6). Denaturační síla se pohybovala v rozsahu 35 až 60 %. Přítomností formamidu a močoviny byla DNA postupně denaturována. Molekulová hmotnost gelu ovlivňovala rychlost, kterou se dvouvláknová molekula DNA pohybovala.

**Tabulka 6:** Přehled potřebných složek a množství pro přípravu roztoků

DGGE	25 ml	
	35%	60%
40% akrylamid (ml)	5,560	5,560
50× TAE (ml)	0,500	0,500
formamid (ml)	3,500	6,000
Močovina (g)	3,675	6,300
Voda (ml)	12,250	9,500

Na jeden gel bylo možné nanést pouze 20 vzorků, proto bylo potřeba vytvořit pět gelů. Do přípravných baněk se proto namíchalo pětinašobné množství složek roztoků.

Pro přípravu gelu byla sestavena aparatura, kam byly přečerpány namíchané roztoky. Do každého roztoku bylo přidáno 200 µl 10% peroxidisíranu amonného a 20 µl TEMED. Po přečerpání gelu do aparatury byl vložen hřeben pro vytvoření jamek. Gel tuhl přibližně 50 minut. V gelu během tuhnutí došlo k polymeraci. Poté byla aparatura s gelem vložena do přístroje pro DGGE, který byl naplněný 7 litry pufru (1% TAE pufr) a zahříván na 60 °C. Do každé jamky v gelu bylo následně napipetováno 27 µl produktu získaného z PCR reakce. DGGE je elektroforéza probíhající vertikálně při teplotě 60 °C s napětím 60 V a trvá přibližně 18 hodin.

Po 18 hodinách byl gel vyjmut z přístroje a vložen do plastového boxu, kam bylo přilito 50 ml 1% pufru TAE a přidáno 5 µl SYBR Green (barvivo). Poté byl celý box 30 minut promíchán, čímž bylo docíleno navázání nukleových kyselin s barvivem.

Gel byl přesunut do transiluminátoru Molecular Imager® Gel Doc™ XR System (BIO RAD) a byl zvolen program Image Lab, který gel vyfotil. Z fotky byly vybrány významné

úseky, které byly dále použity. Jednotlivé úseky se vybíraly na základě výraznosti snímku. Čím výraznější úsek, tím vyšší koncentrace DNA a vyšší šance identifikace mikroorganismu. Případně se vybíraly takové úseky, které se v gelu vyskytovaly ojedinelé. Celkem bylo vybráno 48 významných úseků (viz Příloha 4), které byly následně skalpelem vyříznuty pod UV světlem. Následně byly vyříznuté úseky vloženy do 1,5 ml zkumavky a použity pro Sangerovo sekvenování DNA.

## 4.5 Sangerovo sekvenování DNA

Cílem sekvenování dle Sangera bylo získat sekvenci nukleotidů, která byla označena písmeny bází v řadě za sebou. Pomocí sekvence nukleotidů byly identifikovány přítomné bakterie.

### 4.5.1 PCR reakce a agarózová elektroforéza vybraných úseků

Všechny vyříznuté významné úseky byly centrifugovány s 100  $\mu$ l dH<sub>2</sub>O po dobu 10 minut při 10 000 rpm. Významné úseky byly použity jako templát (jednořetězová DNA), který sloužil jako zdroj informací během vytváření kopií nukleových kyselin. Templát byl společně s dalšími složkami (viz Tabulka 7) použit pro PCR reakci. Jednotlivé kroky PCR reakce byly stejné jako na Obrázku 2.

**Tabulka 7:** Podrobný přehled složek a množství na přípravu PCR reakce

Složka	Množství
Templát	4 $\mu$ l
PCR mix – EliZyme™ FAST Taq MIX Red	15 $\mu$ l
forward primer (10 $\times$ 341FP)	1 $\mu$ l
reverse primer (10 $\times$ RP534)	1 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	9 $\mu$ l

PCR reakce byla opět ověřena pomocí agarózové elektroforézy, kde se postupovalo stejným způsobem viz kapitola 4.4.2 Kontrola vzorků DNA pomocí agarózové elektroforézy.

### 4.5.2 Purifikace PCR produktů

Pomocí purifikace byla DNA přečištěna od všech nežádoucích nečistot daného vzorku. Purifikace DNA byla provedena u všech 48 významných PCR úseků pomocí komerčního kitu Monarch® PCR & DNA Cleanup. Součástí balení byl i podrobný návod, podle kterého se postupovalo.

K získanému množství DNA o objemu 27  $\mu$ l bylo přidáno 125  $\mu$ l roztoku Cleanup Binding Buffer (poměr 5:1 pro dsDNA 2 < kb). Vzorek byl promíchán a pipetou vložen do zkumavky s kolonkou obsahující filtrační membránu. Poté byl vzorek centrifugován při 16 000 rcf po dobu 1 minuty. Tekutina byla ze spodní zkumavky vylita (DNA zůstalo na membráně). Do kolonky bylo vloženo 200  $\mu$ l roztoku Wash Buffer (obsahující ethanol), poté byly vzorky opět centrifugovány. Tento krok byl zopakován. Následně byla kolonka přesunuta do 1,5 ml zkumavky. DNA byla z membrány uvolněna po přidání roztoku Elution Buffer (25  $\mu$ l) při centrifugaci 16 000 rcf po dobu 1 minuty. Pomocí těchto kroků byla získána čistá DNA. Koncentrace DNA byla změřena pomocí přístroje NanoDrop One.

Dále byla DNA připravena pro Sangerovo sekvenování. Ze 48 úseků bylo vybráno 23 významných úseků. Úseky byly vybírány na základě množství DNA, čím více DNA tím lépe. Ve 200  $\mu$ l zkumavce bylo smícháno 50 ng DNA, 2,5  $\mu$ l primeru a byla přidána voda do celkového objemu 10  $\mu$ l. Tento postup byl proveden dvakrát. Nejdříve byl použit kódující primer (10 $\times$  341FP), poté nekódující primer (10 $\times$  534RP). Všechny vzorky byly zaslány do komerční firmy SEQme s.r.o, ve které bylo provedeno samotné Sangerovo sekvenování.

#### 4.5.3 Zpracování výsledků ze Sangerova sekvenování

Získané výsledky od firmy SEQme s.r.o. byly zaslány ve více formátech. V této práci byl použit formát ABI, u kterého byla sekvence nukleotidů řazena za sebou a označována písmeny bází. Sekvence každého vzorku byla provedena z obou stran dvakrát (rozdílné primery). S využitím programu Geneious prime byly tyto dvě sekvence na základě komplementarity získaných bází spojeny. V programu Geneious byly vygenerovány chromatogramy, jejichž sekvence nukleotidů byla zapsána písmeny. Zápis byl poté vložen do genetické databáze NCBI a pomocí algoritmu BLAST byl vyhodnocen (dostupný na <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Všechny bakterie byly identifikovány na základě databáze 16S rRNA.

## 4.6 Kvantitativní metoda v reálném čase (qPCR)

Kvantitativní metoda PCR v reálném čase (qPCR) vyhodnocovala množství konkrétní části DNA ve vzorku v reálném čase. Výsledkem qPCR byl počet kopií čisté DNA dané bakterie, který určuje intenzitu výskytu. Množství kopií genu může mít vliv na míru patogenity dané bakterie.

Postup kvantitativní metody v reálném čase byl podobný klasické PCR reakci, ovšem s využitím speciálního cycleru. V této práci byl použit cycler QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System. Cycler zaznamenával v průběhu reakce množství DNA v každém cyklu. Do qPCR metody byla použita 10 $\times$  naředěná izolovaná DNA. Dle Tabulky 8 byla připravena směs (mimo izolovanou DNA), která byla napipetována o objemu 16  $\mu$ l do jamkových destiček. Poté byly do každé jamky přidány 4  $\mu$ l DNA. Objem jedné reakce byl 20  $\mu$ l.

**Tabulka 8:** Podrobný přehled složek a množství na přípravu qPCR reakce

Složka	Množství (20 µl reakce)
Izolovaná DNA	4 µl
PCR mix – EliZyme™ qPCR Mix	10 µl
forward primer dané bakterie	0,8 µl
reverse primer dané bakterie	0,8 µl
dH2O	4,4 µl

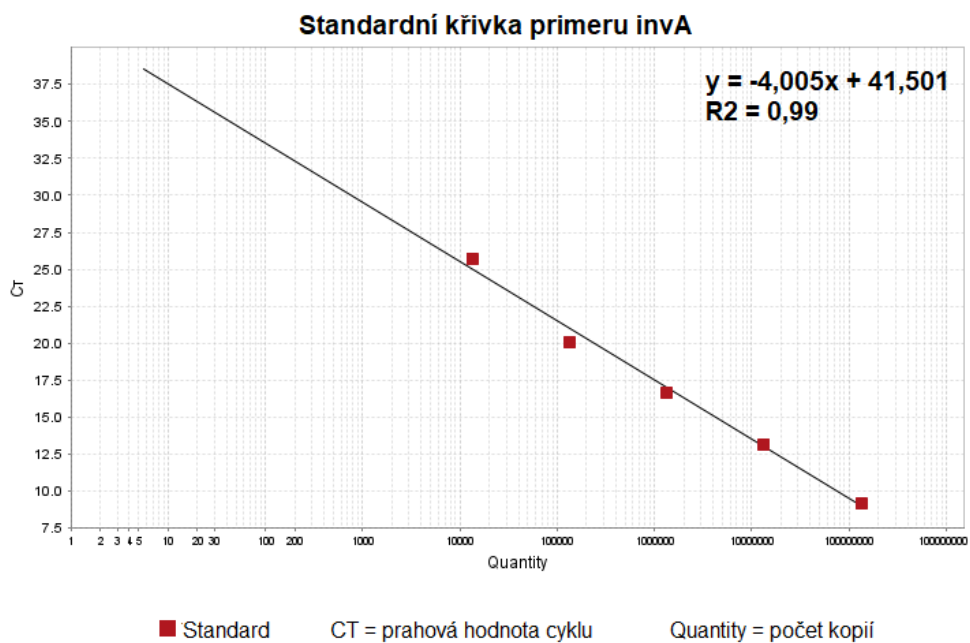
Tato práce se zabývala patogenitou bakterií *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*, podle kterých byly vybrány primery (viz Tabulka 9). V tabulce jsou uvedené také studie, podle kterých byly primery zvoleny. Jednotlivé primery byly 10× naředěny.

**Tabulka 9:** Podrobný přehled jednotlivých primerů v qPCR reakci

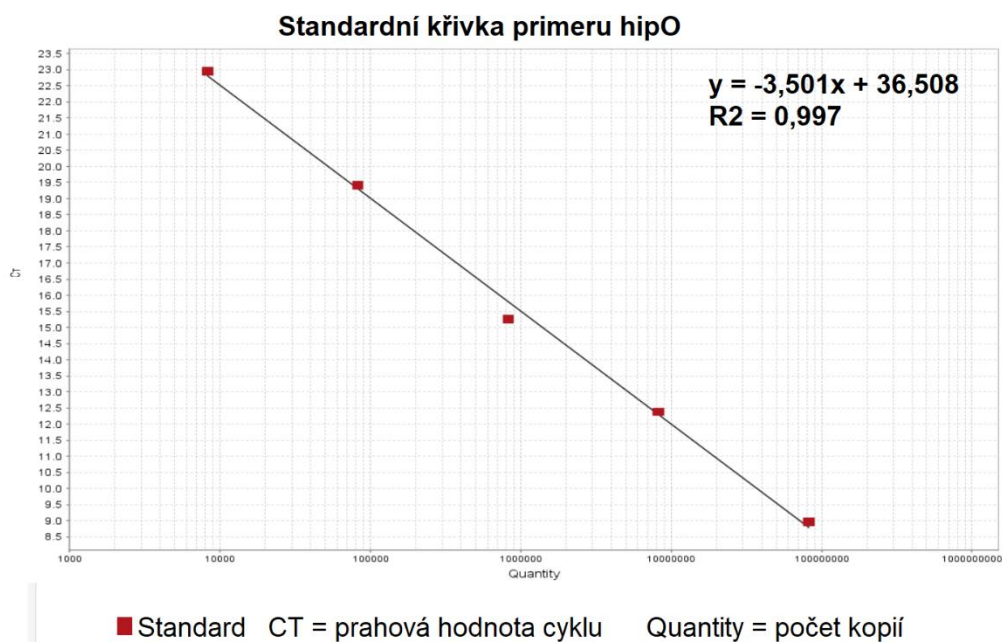
Primer	Specifita	Sekvence	Velikost produktu	Reference
<b>cpa1F</b>	<i>Clostridium perfringens</i>	GCTAATGTTACTGCCGTTGA	324bp	Schlatter et al. (2019)
<b>cpa1R</b>	<i>Clostridium perfringens</i>	CCTCTGATACATCGTGTAAG		
<b>hipO-F</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>	GACTTCGTGCAGATATGGATGCTT	344bp	Persson et al. (2005)
<b>hipO-R</b>	<i>Campylobacter jejuni</i>	GCTATAACTATCCCATCCGAAGAC		
<b>invA_F</b>	<i>Salmonella spp.</i>	GTGTCCTTTGGTATTAATCC	250bp	Schlatter et al. (2019)
<b>invA_R</b>	<i>Salmonella spp.</i>	GTCTGAGCACTTCTTTAAG		

Jamková destička byla zalepena speciální folií, která byla utěsněna pro minimalizaci odparu tekutiny během reakce. Destička byla vložena do cycleru a zvolil se reakční profil. Požadovaná teplota, doba extenze a další parametry reakce byly nastaveny dle reference daného primeru (viz Tabulka 9).

Byla využita absolutní kvantitativní metoda, ze které byl zjištěn počet kopií čisté DNA cílové sekvence vzorku. Pro absolutní kvantifikaci byla použita standardní křivka. Pro vytvoření standardní křivky byly použity standardy o známé koncentraci. Standardní křivky jednotlivých primerů jsou uvedeny na Obrázku 3, 4 a 5. Standardy byly vytvořeny pomocí klasické PCR reakce a purifikace produktů. Jednotlivé počty kopií dané bakterie ve vzorcích o neznámé koncentraci byly porovnány se standardy.

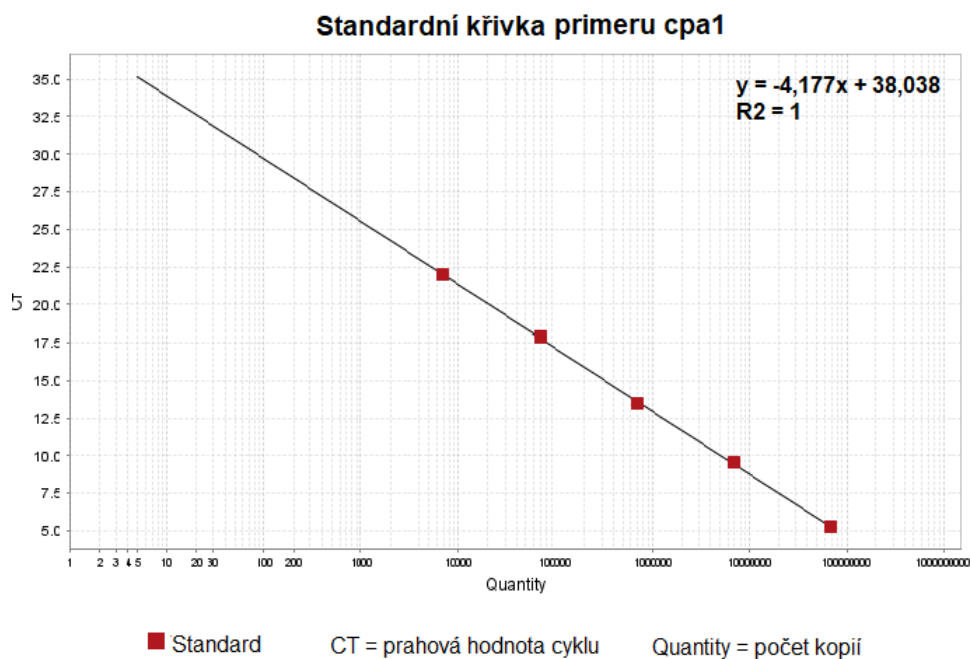


**Obrázek 3:** Standardní křivka pro primer invA (*Salmonella spp.*)



**Obrázek 4:** Standardní křivka pro primer hipO (*Campylobacter jejuni*)





**Obrázek 5:** Standardní křivka pro primer cpa1 (*Clostridium perfringens*)

## 4.7 Statistická analýza dat

Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí programu STATISTICA 12. Ověření normality dat bylo provedeno použitím histogramu. Normální rozdělení dat nebylo potvrzeno. Proto byl statisticky významný rozdíl hodnocen na základě neparametrických testů porovnáním dvou nezávislých skupin pomocí Mann-Whitneyového testu. Rozdíly mezi výskytem potenciálních bakterií a způsobem krmení/způsobem chovu byly hodnoceny na hladině statistické významnosti  $\alpha = 0,05$ . Jestliže hladina  $p$  byla menší než hladina  $\alpha$ , statisticky průkazný rozdíl byl prokázán. Jestliže hladina  $p$  byla vyšší než hladina  $\alpha$ , statisticky průkazný rozdíl nebyl prokázán. Výsledky testu byly prokázány s 95% spolehlivostí. Výsledky byly graficky znázorněny pomocí svorkových grafů, které zobrazují průměry s odchylkami.

## **4.8 Mapování metod krmení psů zapojených do canisterapie**

Dílčím cílem bylo vyhodnotit dotazník, který byl distribuovaný mezi canisterapeuty. prostřednictvím online formuláře (Google Forms). Dotazník byl použit ke zmapování metod krmení psů v canisterapii.

### **Postup dotazníkového šetření**

Dotazník (viz Příloha 5) byl prostřednictvím online formuláře (Google Forms) rozšířen mezi canisterapeuty. Canisterapeuté byli osloveni pomocí sociálních sítí. Sběr dat probíhal 4 měsíce, od září 2022 do prosince 2022.

V hlavičce dotazníku byl respondent seznámen s výzkumem. Poté vyplnil demografické otázky (pohlaví, věk a vzdělání). Následovaly dotazníkové otázky související s canisterapeutickým psem (věk, pohlaví, plemeno, odčervení, koprologie, bakteriologické vyšetření apod.). Otázky byly uzavřené i otevřené. Hlavní otázka tohoto šetření zněla takto: „Jak krmíte Vašeho psa?“ Respondenti mohli volit z uvedených variant nebo dopsat vlastní odpověď.

Celkové výsledky byly zhodnoceny a porovnány. Metody krmení byly znázorněny v grafu.

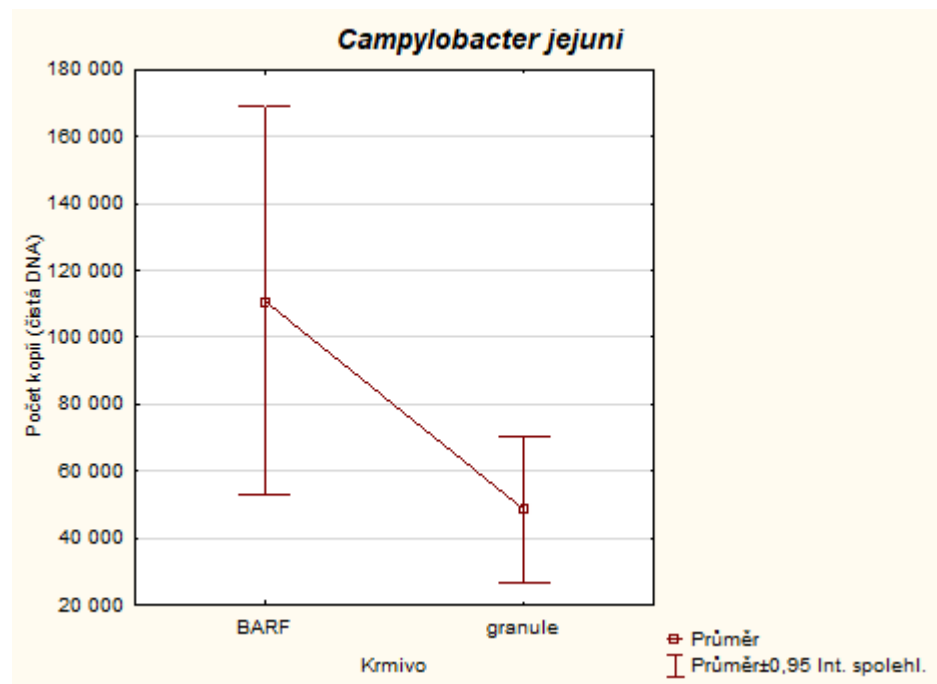
## 5 Výsledky

### 5.1 Vyhodnocení bakterií u psů s ohledem na jejich krmení

#### 5.1.1 Vyhodnocení výskytu potenciálně patogenních bakterií rodu *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*

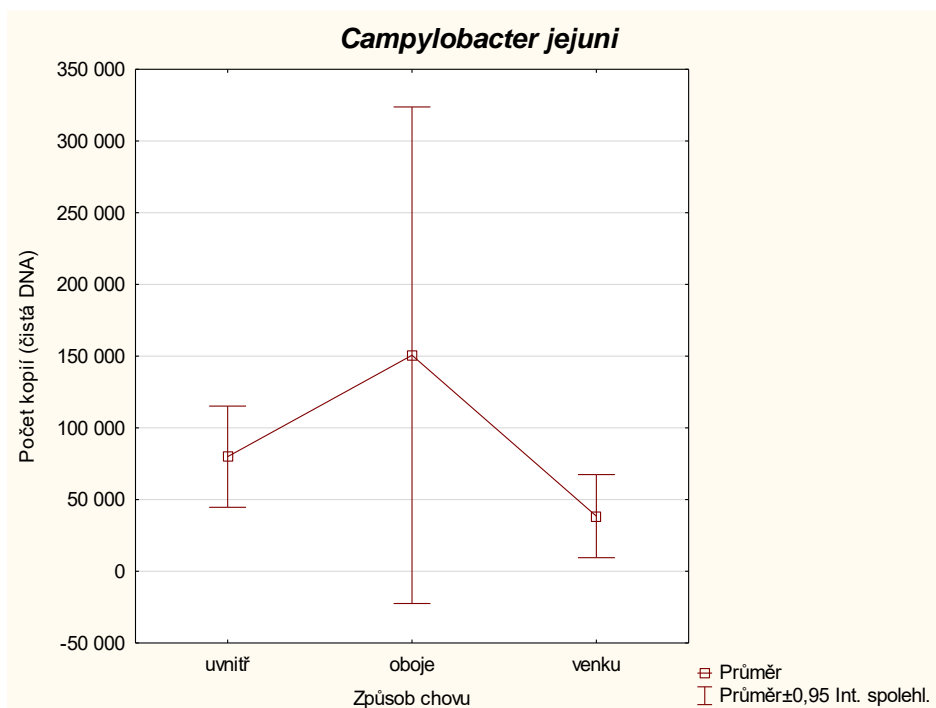
Výzkumná část této studie se zaměřuje na bakterie rodu *Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*. Výskyt bakterií byl porovnáván na základě počtu kopií čisté DNA dané bakterie v závislosti na metodě krmení psa a způsobu chovu. Předpokladem bylo, čím vyšší počet, tím vyšší riziko patogenity dané bakterie. Počet kopií potenciálně patogenních bakterií u jednotlivých zvířat je uveden v Příloze 6, 7 a 8. Podrobné statistické vyhodnocení je uvedeno v Příloze 9.

Bakteriální druh *Campylobacter jejuni* (*C. jejuni*) byl detekován pomocí primeru hipO. Celkem byl *C. jejuni* nalezen u všech 100 psů, z čehož 50 psů bylo krmeno BARF stravou a 50 psů krmeno granulemi. Vyšší výskyt bakterie *C. jejuni* byl u psů krmených BARF stravou (viz Graf 1). Významná diverzita bakterie *C. jejuni* v závislosti na metodě krmení byla statisticky potvrzena ( $p < \alpha$ ) a vyšší výskyt této bakterie byl u psů krmených BARF stravou.



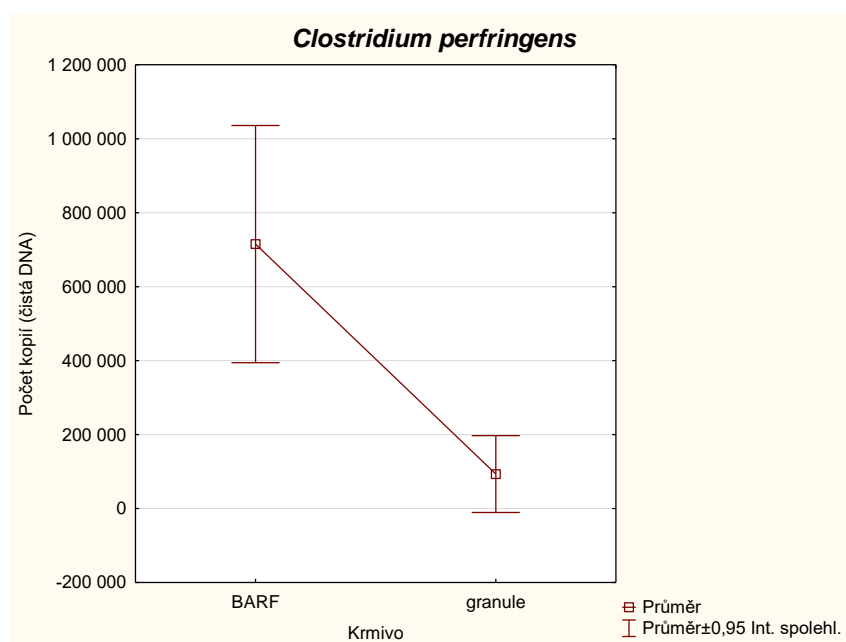
**Graf 1:** Detekce bakterie *Campylobacter jejuni* v závislosti na způsobu krmení

Vyšší detekce bakterie *C. jejuni* byla u psů žijící kombinovaně venku na zahradě a uvnitř domu, v porovnání se psy žijící uvnitř a venku. Nejnižší výskyt byl u psů žijící pouze venku na zahradě (viz Graf 2). Statisticky však nebyly zjištěny žádné průkazné rozdíly mezi výskytem patogenní bakterie *C. jejuni* a způsobem chovu psa ( $p > \alpha$ ).



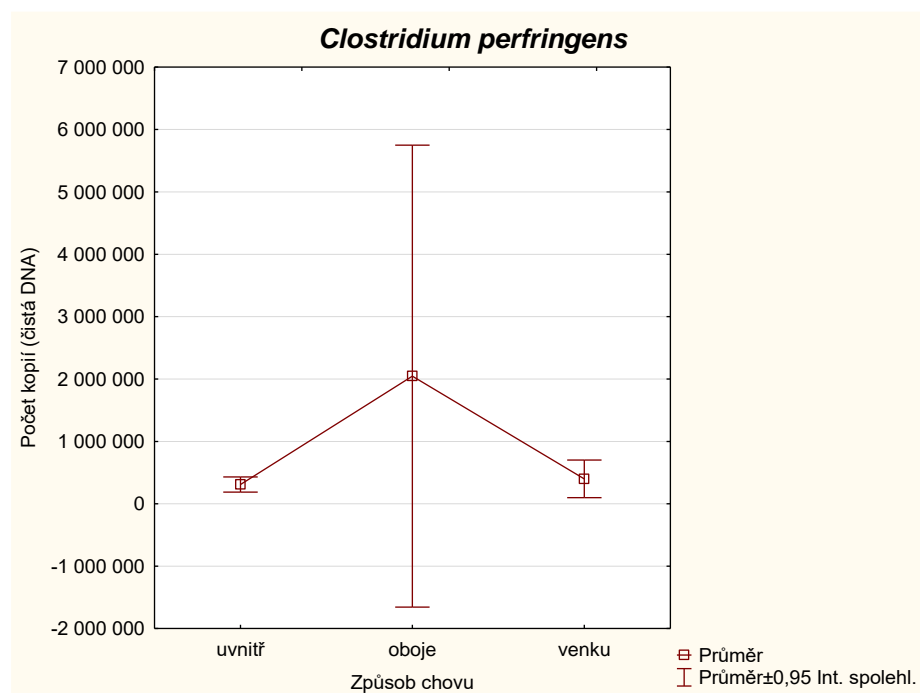
**Graf 2:** Detekce bakterie *Campylobacter jejuni* v zavilosti na způsobu chovu

K detekci bakterie *Clostridium perfringens* (*C. perfringens*) byl použit primer cpa1, který identifikoval tuto bakterii celkem u všech psů (50 psů na granulích a 50 psů na BARF stravě). V Grafu 3 je znázorněn rozdíl výskytu bakterie v závislosti na druhu krmiva. Z grafu je patrné, že výskyt bakterie *C. perfringens* je významně vyšší u psů krmených BARF stravou než u psů krmených granulemi. Tento rozdíl byl statisticky prokázán ( $p < \alpha$ ). Z čehož vyplývá, že existuje statisticky průkazný rozdíl mezi výskytem potenciálně patogenní bakterie *C. perfringens* a metodou krmení.



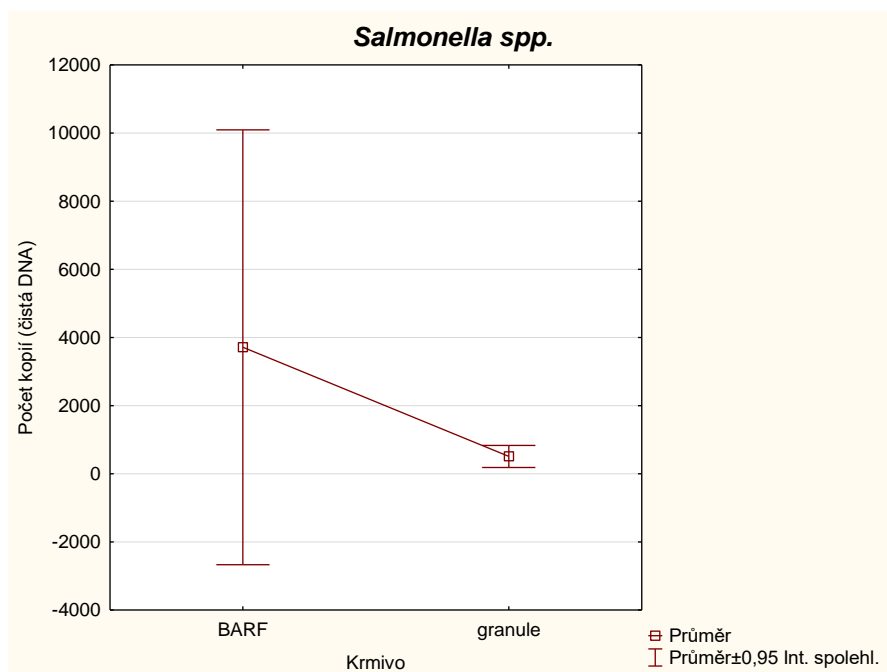
**Graf 3:** Detekce bakterie *Clostridium perfringens* v zavilosti na způsobu krmení

Vyšší výskyt *C. perfringens* byl u psů žijících kombinovaně venku/uvnitř v porovnání se psy žijící pouze uvnitř domu nebo venku na zahradě (viz Graf 4). Dle statistické analýzy existuje průkazný rozdíl v detekci bakterie *C. perfringens* a způsobu chovu ( $p < \alpha$ ), který potvrzuje rozdíl mezi výskytem této bakterie u psů chovaných kombinovaně uvnitř/venku (oboje) v porovnání se psy žijící pouze uvnitř nebo pouze venku.



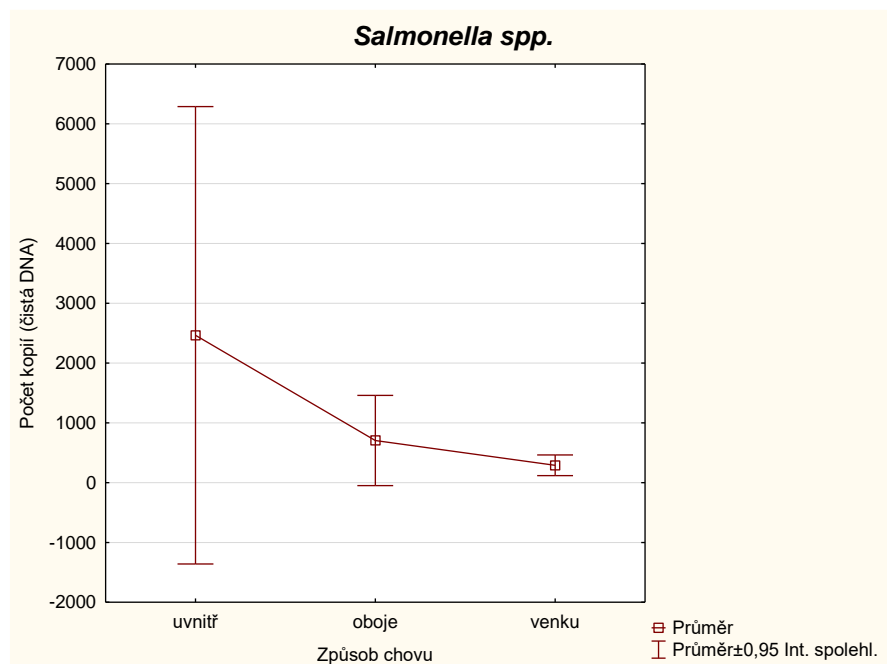
**Graf 4:** Detekce bakterie *Clostridium perfringens* v zavilosti na způsobu chovu

K detekci bakterie *Salmonella spp.* byl použit primer invA. Celkem byla salmonela detekována u 85 vzorků, z čehož 43 psů bylo krmeno BARF stravou a 42 psů krmeno granulemi. Graf 5 znázorňuje intenzitu výskytu bakterie v souvislosti s metodou krmení. Z grafu je možné vidět, že výskyt bakterie u psů na BARF stravě je vyšší než u psů krmených granulemi. Statistickou analýzou však nebyl potvrzen průkazný rozdíl mezi způsobem krmení a výskytem salmonely ( $p > \alpha$ ).



**Graf 5:** Detekce bakterie *Salmonella spp.* v zavilosti na způsobu krmení

Výskyt bakterie rodu *Salmonella spp.* byl nepatrně vyšší u psů žijících uvnitř domu v porovnání se psy chovanými kombinovaně uvnitř/venku nebo pouze venku na zahradě (viz Graf 6). Statisticky významný rozdíl nebyl zjištěn ani pomocí statistické analýzy ( $p > \alpha$ ), z čehož vyplývá, že způsob chovu nemá vliv na výskyt této bakterie.

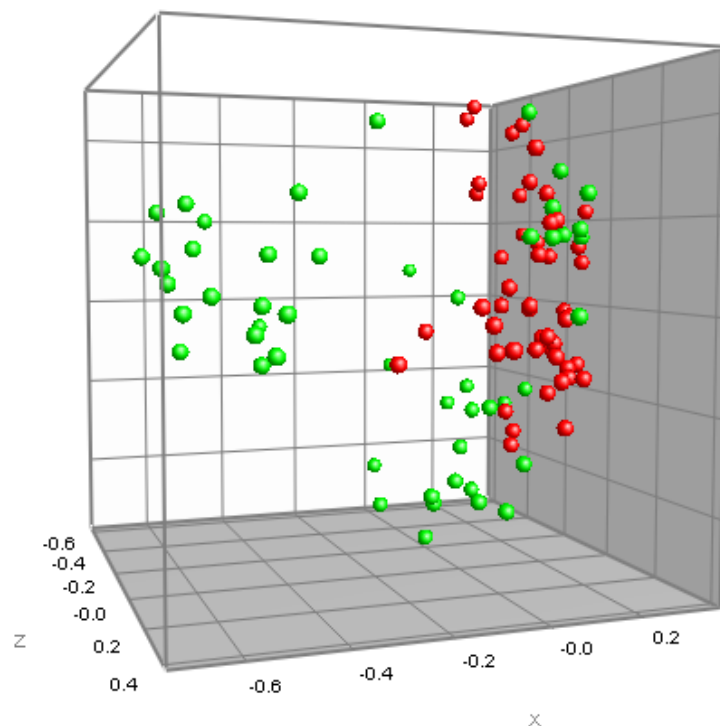


**Graf 6:** Detekce bakterie *Salmonella spp.* v zavilosti na způsobu chovu

První hypotéza předpokládala, že u psů krmených dle konceptu BARF bude signifikantně vyšší výskyt patogenních bakterií. Tato hypotéza se prokázána u bakterií *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringers*. U bakterie *Salmonella spp.* byl sice vyšší výskyt u psů krmených BARF stravou, ale statisticky významný rozdíl nebyl prokázán. Druhá hypotéza, která předpokládala, že psi žijící venku na zahradě budou mít vyšší počet patogenních bakterií než psi žijící doma, nebyla potvrzena.

### 5.1.2 Stanovení celkové mikrobiální diverzity střevního mikrobiomu psů

Tato studie zároveň hodnotila celkového složení střevního mikrobiomu. Na Obrázku 6 je pomocí statistické metody Pearsons Correlation of Principal Coordinate Analysis (PCoA) graficky znázorněna skupinová odchylka mikrobiální diverzity. Červeně jsou označeni jedinci krmeni suchou stravou, zeleně jsou jedinci krmeni BARF stravou. Čím kratší je vzdálenost mezi jednotlivými body, tím jsou si jedinci více podobní (a naopak). Z obrázku je patrné, že celkové složení střevního mikrobiomu se u psů krmených BARF stravou významně liší od psů krmených suchou stravou.



**Obrázek 6:** Skupinová odchylka bakteriální diverzity (PCoA)  
(Červené body – psi krmeni suchou stravou, Zelené body – psi krmeni BARF stravou)

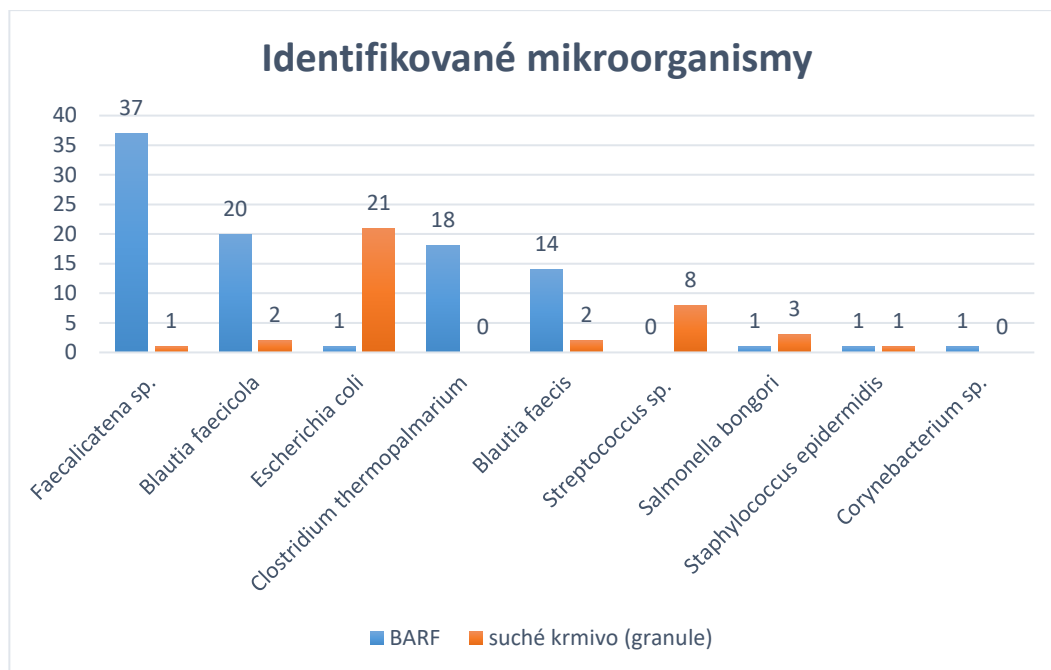
V tabulce 10 je uveden přehled identifikovaných mikroorganismů. Pokud je shoda sekvence větší než **97 %**, považuje se výsledek za dostatečně reprezentativní. Při shodě menší než 96 % není vzorek dostatečně reprezentativní. Některé úseky nebylo možné identifikovat, jelikož došlo k chybě při čtení. Místo písmen, které jsou charakteristické pro stavební jednotku DNA, bylo uvedeno jiné písmeno. Chyba mohla být způsobena nedostatečným přečištěním vzorku. Identifikace vzorku se nepodařila, pokud ve vzorku bylo více chyb. Z 23 úseků nebylo identifikováno 8 úseků.

**Tabulka 10:** Identifikace a taxonomie mikroorganismu dle algoritmu BLAST

Číslo úseku	Identifikace mikroorganismu	Kmen	Shoda (%)
1	<i>Blautia faecicola</i>	Firmicutes	93 %
<b>2</b>	<b><i>Corynebacterium sp.</i></b>	<b>Actinobacteria</b>	<b>100 %</b>
5	<i>Faecalicatena sp.</i>	Firmicutes	89 %
7	<i>Clostridium thermopalmarium</i>	Firmicutes	80 %
12	<i>Salmonella bongori</i>	Proteobacteria	90 %
17	<i>Faecalicatena sp.</i>	Firmicutes	96 %
19	<i>Faecalicatena sp.</i>	Firmicutes	96 %
<b>20</b>	<b><i>Faecalicatena sp.</i></b>	<b>Firmicutes</b>	<b>98 %</b>
<b>22</b>	<b><i>Staphylococcus epidermidis</i></b>	<b>Firmicutes</b>	<b>100 %</b>
<b>24</b>	<b><i>Blautia faecis</i></b>	<b>Firmicutes</b>	<b>99 %</b>
26	<i>Escherichia coli</i>	Proteobacteria	91 %
28	<i>Blautia faecis</i>	Firmicutes	92 %
<b>30</b>	<b><i>Blautia faecis</i></b>	<b>Firmicutes</b>	<b>99 %</b>
33	<i>Streptococcus sp.</i>	Firmicutes	96 %

Graf 7 znázorňuje přehled identifikovaných mikroorganismů (viz Tabulka 10) u všech psů s ohledem na jejich způsob krmení. Mikroorganismy byly u psů detekovány na základě identifikace úseků (viz Příloha 10) za předpokladu, že se stejné bakterie vyskytovaly ve stejné vodorovné linii u více zvířat.





**Graf 7:** Přehled identifikovaných bakterií metodou DGGE  
(Modrá barva – psi krmeni BARF stravou, Oranžová barva – psi krmeni granulemi)

Bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella bongori* a *Streptococcus sp.* jsou potenciální patogenní bakterie (viz kapitola 3.3.1 Bakteriální zoonózy), které byly detekovány především u psů krmených granulemi. Vliv suché stravy na výskyt potenciálně patogenních bakterií by mohl posloužit jako námět pro další studie.

Bakterie rodu *Faecalicatena sp.* a *Blautia sp.* (konkrétně druhy *Blautia faecicola* a *Blautia faecis*) patří do kmene Firmicutes, který se fyziologicky nachází ve zdravém mikrobiomu psa (viz kapitola 3.1.2 Složení střevního mikrobiomu zdravého psa). Tyto bakterie byly významně vyšší u psů krmených BARF stravou.

Bakterie *Clostridium thermopalmarium*, *Staphylococcus epidermidis* a *Corynebacterium sp.* nejsou součástí běžného střevního mikrobiomu psa. Z čehož je možné předpokládat, že fekální vzorek byl kontaminován prostředím.

Příloha 11 obsahuje přehled všech identifikovaných bakterií, které jsou rozděleny dle patogenity na potenciálně patogenní bakterie, bakterie zdravého mikrobiomu a bakterie, kterými byl fekální vzorek kontaminován z prostředí.

## 5.2 Vyhodnocení mapování metod krmení psů zapojených do canisterapie

Dílčího šetření se zúčastnilo celkem 42 respondentů, kteří se se svým psem věnující canisterapii. Následující část vyhodnocuje nejčastější metody, kterými canisterapeuté krmí svého psa.

### Demografické údaje

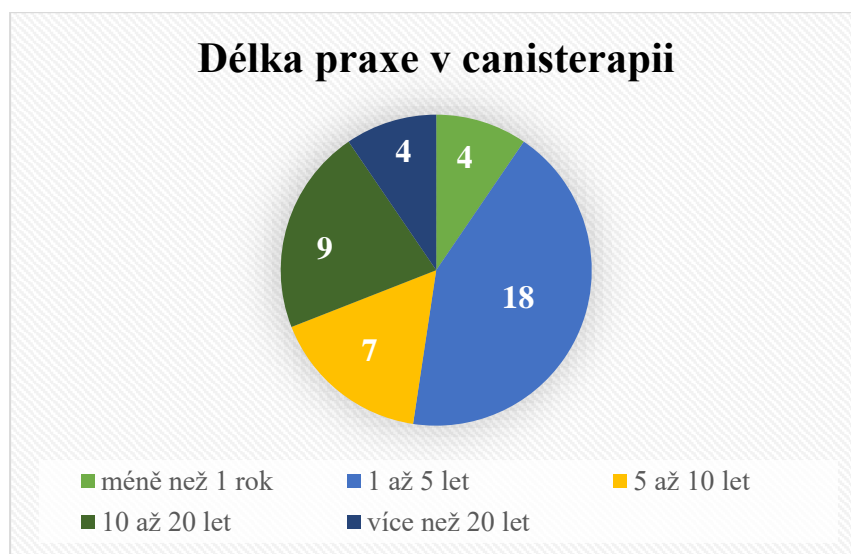
Na demografické otázky odpověděli všichni respondenti. Převážná část respondentů byly ženy (N = 39), zbytek byli muži (N = 3). Průměrný věk respondentů byl 42,76 let ( $\pm 12,47$  SD). Nejvíce respondentů mělo vzdělání střední s maturitou (N = 18) a vysokoškolské (N = 17). Méně respondentů mělo vyšší odborné (N = 4) a střední odborné (N = 3) vzdělání.

Respondenti měli častěji feny (N = 31) než psy (N = 11). Průměrný věk psů byl 6,07 let ( $\pm 3,08$  SD), nejnižší věk byl 4 měsíce a nejvyšší 12 let. Nejčastějším plemenem byli kříženci, zlatí retrívři, border kolie a labradorský retrívři.

### Dotazníkové otázky

Většina respondentů svého psa odčervuje dvakrát za rok. Preventivní parazitologické vyšetření (tzv. koprologii) převážná část respondentů nedělá (N = 24), zbylá část ano (N = 18). Bakteriologické vyšetření je prováděno také velmi málo (N = 6), ostatní respondenti nedělají (N = 36).

Většina respondentů se canisterapii věnuje v rozmezí 1 až 5 let (N = 18), poté 5 až 10 let (N = 7) a 10 až 20 let (N = 9). Méně respondentů se canisterapii věnuje méně než 1 rok (N = 4) nebo naopak více než 20 let (N = 4) (viz Graf 8).



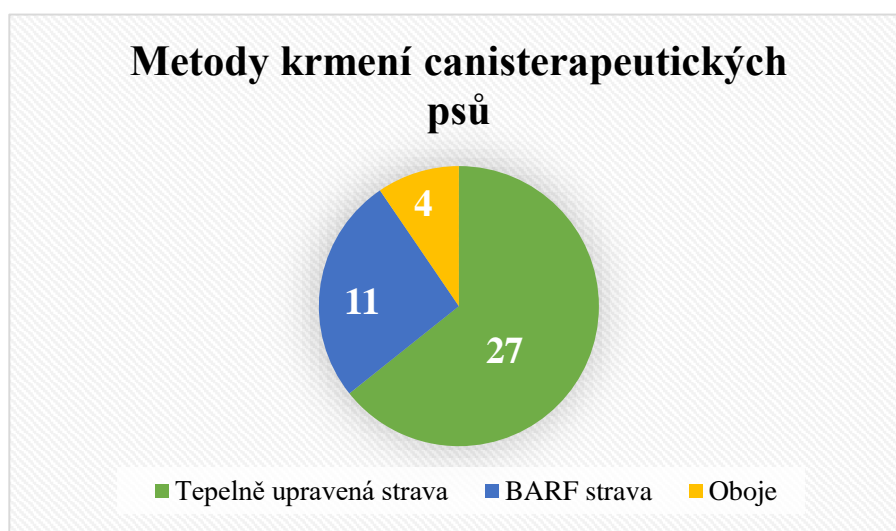
**Graf 8:** Délka praxe v canisterapii

Canisterapeutický pes navštěvuje klienty převážně jednou týdně (N = 11) nebo několikrát do týdne (N = 11). Poměrně velká část respondentů navštěvuje klienty pouze příležitostně (N = 9). Zbytek respondentů navštěvuje klienty jednou za měsíc (N = 5) nebo několikrát do měsíce (N = 6) (viz Graf 9).



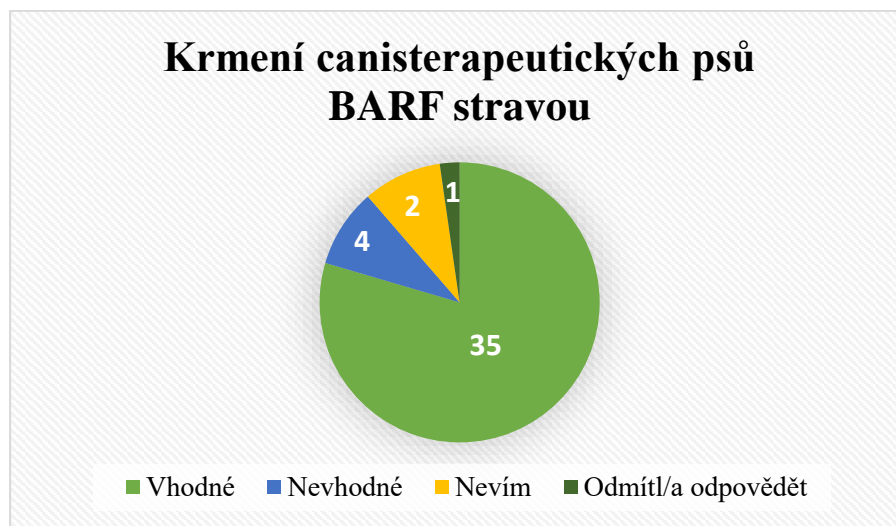
**Graf 9:** Četnost návštěv terapeutického týmu u klientů

Převážná část respondentů krmí svého canisterapeutického psa tepelně upravenou stravou (N = 27), tj. suchá (granule), vařená a konzervovaná strava. Ovšem i BARF strava (N = 11) je u respondentů poměrně významnou metodou krmení canisterapeutických psů. Zbytek respondentů krmí kombinací tepelně upravenou stravou a BARF stravou (N = 4) (viz Graf 10).



**Graf 10:** Metody krmení canisterapeutických psů

Na otevřenou otázku „**Je podle Vás krmení syrovou stravou (BARF) vhodné v canisterapii?**“ odpovědělo 41 respondentů, 1 respondent odmítl odpovědět. Podle většiny respondentů (N = 35) je BARF strava vhodnou metodou v canisterapii. Zbytek respondentů odpovědělo ne (N = 4) nebo nevím (N = 2) (viz Graf 11).



**Graf 11:** Krmení canisterapeutických psů BARF stravou

Na otevřenou otázku „**Jaká jsou možná rizika zoonóz v důsledku krmení syrovou stravou (BARF)?**“ odpovědělo 36 respondentů, 6 respondentů odmítlo odpovědět. Většina respondentů (N = 17) nejčastěji zmiňovala bakterie, parazity a viry. Zároveň uváděli, že krmení BARF konceptem je nepraktické. Poměrně velká část respondentů (N = 11) uvedla, že nevidí žádná nebo minimální rizika zoonóz. Zbytek respondentů odpovědělo, že neví (N = 8).

## 6 Diskuse

Diplomová práce se zabývá hodnocením složení střevního mikrobiomu u psů. Cílem této práce bylo nejen vytvoření literární rešerše zaměřené na zoohygienu a zoonotický potenciál psů v rámci canisterapie, ale i realizace výzkumu vyhodnocující možný výskyt bakterií se zoonotickým potenciálem u psů krmených dle konceptu BARF. Dílčím cílem bylo dotazníkové šetření distribuované mezi canisterapeuty, které mapuje metody krmení psů zapojených do canisterapie.

### Potenciálně patogenní bakterie psů

Salmonelóza patří mezi nejobávanější onemocnění, které je možné získat nejen důsledkem manipulace nebo konzumace kontaminovaných potravin, ale i kontaktem s domácími zvířaty (Joffe & Schlesinger 2002; Finley et al. 2006). Syrové maso pro domácí zvířata je dalším potenciálním zdrojem bakterií rodu *Salmonella spp.*, u kterých hrozí riziko zoonózy (Finley et al. 2006). Skutečnost, že syrová strava je jedním z hlavních faktorů vylučování salmonel, byla potvrzena v mnoha studiích zabývajících se krmením psů syrovou stravou (Joffe & Schlesinger 2002; Finley et al. 2007; Leonard et al. 2011; Lenz et al. 2009; Reimschuessel et al. 2017). I v této studii byl vyšší výskyt salmonely u psů krmených BARF stravou v porovnání se psy krmenými granulami. Statistické rozdíly mezi krmivy však v této studii nebyly potvrzeny. Klinické příznaky salmonelózy u psů jsou poměrně vzácné, proto mohou být psi asymptomatictí přenašeči (Carter & Quinn 2000). To se potvrdilo i v této studii, kdy během odběru nejevil žádný zúčastněný pes jakékoli příznaky salmonelózy, a přesto u 85 % psů byla tato bakterie detekována. Při stanovení celkové mikrobiální diverzity pomocí metody DGGE byl detekován konkrétní druh salmonely, *Salmonella bongori*. Bakterie *Salmonella bongori* byla detekována u čtyřech psů (3 psi krmení granulami a 1 pes krmen BARF stravou). Autoři Moon et al. (2018) uvádí, že ačkoli patří rod *Salmonella spp.* mezi oportunní patogeny, některé její druhy se běžně vyskytují ve zdravém fekálním mikrobiomu psa. Průzkumy založené na 16S rRNA ukázaly, že množství kopií genu se u psů pohybovalo v širokém rozmezí. Stejně tomu tak bylo i v této studii, kdy byla využita kvantitativní metoda v reálném čase. Je tedy možné předpokládat, že množství kopií genu má vliv na míru patogenity této bakterie (Moon et al. 2018).

Bakterie rodu *Campylobacter spp.* patří mezi další obávanou bakterii, která může způsobovat zoonotická onemocnění (Marks et al. 2011). U psů může představovat zvýšené riziko nakažení touto bakterií i BARF strava (Acke 2018). I přestože nakažení psi většinou nejeví žádné klinické příznaky, mohou být přenašeči kamylobakterií nejen mezi zvířaty, ale i mezi lidmi (Marks et al. 2011). Přestože v této studii nejevil žádný pes příznaky onemocnění, výsledky kvantitativní metody prokázaly výskyt druhu *Campylobacter jejuni* u všech zúčastněných psů, tj. 100% výskyt této bakterie. Autoři Moon et al. (2018) uvádí, že *Campylobacter spp.* se fyziologicky vykytuje ve zdravém fekálním mikrobiomu psů, ačkoli patří tento rod mezi oportunní patogeny. V tomto výzkumu byl potvrzen vliv stravy na množství kopií genu bakterie, kdy signifikantně vyšší množství bylo u psů krmených BARF

stravou v porovnání se psy na granulích. Tyto výsledky se shodují se studií autorů Runesvärd et al. (2020), ve které byl prokázán vyšší výskyt bakterie rodu *Campylobacter spp.* u psů, kteří byli krmeni syrovou stravou.

Bakteriální druh *Clostridium perfringens* je jednou z nejvýznamnější a nejrozšířenější bakterií střevního mikrobiomu zvířat a lidí (Silva & Lobato 2015). I v této studii byl potvrzen 100% výskyt této bakterie. I přestože je tato bakterie běžným střevním patogenem, může být v případě vyššího výskytu vyvoláno onemocnění (Sindern et al. 2019). Dle autorů Marks et al. (2011) rod *Clostridium spp.* může představovat riziko závažných onemocnění u lidí i zvířat, proto se tato bakterie řadí mezi zoonotické. Dle studie Schmidt et al. (2018) je výskyt potenciálně patogenní bakterie *Clostridium perfringens* vyšší u psů, kteří jsou krmeni syrovou stravou, oproti ostatním metodám krmení (Schmidt et al. 2018). Výsledky této studie se shodují se studií Schmidt et al. (2018). Detekce bakterie *Clostridium perfringens* byla významně vyšší u psů krmených BARF stravou než u psů krmených granulími.

Bakterie *Escherichia coli* se běžně vyskytuje ve zdravém fekálním mikrobiomu psa, ale některé kategorie patří mezi oportunní patogeny (Moon et al. 2018). Vyšší prevalence této bakterie byla zjištěna v komerčních syrových krmivech pro domácí zvířata v porovnání s tepelně upravenými krmivy (Freeman et al. 2013). To se potvrdilo i ve studii Schmidt et al. (2018), kde byl zvýšený výskyt bakterie *Escherichia coli* u psů, kteří byli krmeni dle konceptu BARF. Výsledky této studie se proto neshodují se studií Schmidt et al. (2018). V tomto výzkumu byla bakterie *Escherichia coli* detekována pomocí metody DGGE převážně u psů krmených granulími (N = 21) než u psů krmených BARF stravou (N = 1). Podrobnější identifikace *Escherichia coli* však nebyla zjištěna, tudíž není jednoznačné, zda bakterie u psů působila patogenně či ne. Výskyt bakterie *Escherichia coli* u psů krmených granulími by mohl posloužit jako námět pro další studie.

Bakterie rodu *Streptococcus sp.* jsou běžně se vyskytující bakterie střevního mikrobiomu zdravých psů (Lamm et al. 2010). Zatímco mnoho druhů této bakterie je neškodných, řada z nich patří mezi oportunní patogeny zvířat i lidí (Kaczorek-Łukowska et al. 2019). V této studii byl *Streptococcus sp.* identifikován pomocí metody DGGE u osmi psů, kteří byli krmeni granulími. Psi však nejevili žádné známky infekce, proto nelze jednoznačně říci, zda bakterie na psa působila patogenně. Zároveň nebyl detekován přesný druh, podle kterého bychom mohli míru patogenity hodnotit.

### **Bakterie zdravého mikrobiomu psů**

Bakteriální rod *Faecalicatena sp.* patří do čeledi Lachnospiraceae. Tato čeleď se nachází ve střevním mikrobiomu zdravých psů (Isaiah et al. 2017). Bakterie tohoto rodu byla detekována u 38 % psů, a to převážně krmených BARF stravou. Výsledky této studie se shodují s autory Isaiah et al. (2017). I přestože nebyly identifikovány konkrétní druhy bakterií, je možné předpokládat, že detekované bakterie působily u psů nepatogenně.

Bakterie rodu *Blautia sp.* je běžnou anaerobní bakterií střevního mikrobiomu u savců, která má probiotické a antibakteriální účinky (Liu et al. 2021). Vyšší výskyt bakterie *Blautia sp.* je u stravy živočišného původu (Bolte et al. 2021). I v této studii se bakterie rodu *Blautia sp.* (konkrétně druhy *Blautia faecicola* a *Blautia faecis*) detekovala pomocí metody DGGE převážně u psů krmených dle konceptu BARF. Výsledky této studie se tedy shodují se studií Bolte et al. (2021). Lze tedy předpokládat, že bakterie rodu *Blautia sp.* působily u těchto psů nepatogenně a pozitivně přispívaly k jejich zdravému střevnímu mikrobiomu, tak jak je uvedeno ve studii Liu et al. (2021).

### **Mikrobiální diverzita**

Složení fekálního mikrobiomu se liší mezi psy krmenými BARF stravou a psy krmenými komerční stravou (Schmidt et al. 2018). Výsledky této studie se shodují se studií Schmidt et al. (2018). Mikrobiální diverzita psů se významně lišila v závislosti na metodě krmení (BARF strava a suchá strava). U psů krmených BARF stravou byl pomocí kvantitativní metody qPCR prokázán významně vyšší výskyt potenciálně patogenních bakterií. Celková mikrobiální diverzita stanovená metodou DGGE se u obou skupin psů též lišila. Při stanovení celkové mikrobiální diverzity byl nejčastěji detekován kmen Firmicutes. Dle vědecké studie Garcia-Mazcorro et al. (2011) je tento kmen nejhojnějším kmenem střevního mikrobiomu psů. V malé míře byly detekovány i bakterie kmene Proteobacteria a Actinobacteria. Tyto bakterie jsou dle studie Honneffer et al. (2017) běžnými kmeny v tenkém střevě, které se za běžných fyziologických podmínek v menším množství vyskytují i v psích výkalech. Studie Sandri et al. (2016), Algya et al. (2018) a Schmidt et al. (2018) navíc uvádí, že BARF strava zvyšuje výskyt bakterií kmene Proteobacteria. Výsledky této studie se neshodovaly s autory uvedených studií. Výskyt bakterií kmene Proteobacteria (konkrétně druhy *Escherichia coli* a *Salmonella bongori*) byl vyšší u psů, kteří byli krmeni granulami než u psů krmených BARF stravou.

### **Možné faktory ovlivňující výsledky mikrobiomu**

Výsledky fekálního mikrobiomu mohou být ovlivněny několika faktory. Do této studie byli zapojeni psi různých plemen, tzn. kříženci i čistokrevná plemena. Dle studie Tarafder & Samad (2010) představují kříženci vyšší riziko přenosu zoonotických onemocnění než čistokrevná plemena. V této studii byla detekce u potenciálně patogenních bakterií vždy vyšší u čistokrevných psů než u kříženců. Do výzkumného šetření se zapojili převážně čistokrevní psi (N = 75), ve výrazně menším množství pak kříženci (N = 25). Dále může být studie ovlivněna věkem psů, jelikož se jednalo o psy různého věku. Obecně platí, že nejvyšší prevalence zoonotických bakterií je u štěňat do 1 roku věku (Marks et al. 2011; Thépault et al. 2020). V této studii byl výskyt patogenních bakterií vyšší u psů starších než 1 rok než u štěňat. Studie se však zúčastnili převážně dospělí psi (N = 90), štěňata pouze ojediněle (N = 10).

Odběr vzorů probíhal od jara (únor) do podzimu (říjen), proto mohou být výsledky ovlivněny též sezónností bakterií. Například bakterie rodu *Campylobacter spp.*, *Streptococcus spp.* a *Salmonella spp.* se vyskytují převážně v létě (Lamm et al. 2010; Lal et al. 2012). Dalším faktorem může být i místo chovu, tj. město nebo vesnice. Dle studie Azza et al. (2014) představují psi z městských oblastí vyšší riziko zoonóz, jelikož jsou v bližším kontaktu s ostatními psi (včetně jejich výkalů). Výsledky této studie však nelze porovnávat se studií Azza et al. (2014). Do této studie totiž bylo zapojeno více psů z městských částí (N = 83) než z vesnic (N = 17). Dále počet psů v chovu může ovlivňovat výskyt bakterií. Studie Acke (2018) uvádí, že psi žijící ve smečce mají vyšší pravděpodobnost výskytu zoonotických bakterií než psi žijící sami bez přítomnosti dalšího psa. Výsledky studie Acke (2018) se shodují s výsledky této studie. I v této studii byl vyšší výskyt potenciálně patogenních bakterií (konkrétně *Clostridium perfringens* a *Campylobacter jejuni*) u psů žijících ve smečce než u psů žijících sami.

Výsledky mohly být ovlivněny též pozřením kontaminovaného materiálu, jako jsou například výkaly jiných zvířat nebo odpadky, v době, kdy majitel psa nepozoroval. V této studii se vyskytly bakterie *Staphylococcus epidermidis* a *Corynebacterium sp.*, které jsou součástí běžného mikrobiomu kůže u psů (Malik et al. 2006; Frischmann et al. 2012). Na základě uvedených studií je možné předpokládat, že se fekální vzorek mohl infikovat prostřednictvím kůže při defekaci. Identifikovaná bakterie *Clostridium thermopalmarium* není též součástí střevního mikrobiomu u psů (Poehlein et al. 2018). Lze tedy předpokládat, že vzorek mohl být kontaminován prostředím.

## **Krmení psů v zoorehabilitaci**

Canisterapeutičtí psi často interagují s lidmi jejichž imunitní systém je oslaben nebo u nich hrozí zvýšené riziko infekce. Proto by se během zoorehabilitace mělo zamezit přenosu zoonotických patogenů (Lefebvre et al. 2006; Lefebvre et al. 2008). Psi se mohou z BARF stravy nakazit patogeny způsobující zoonotická onemocnění (Papadopoulos & Sioutas 2020). Podle výsledků této studie je vyšší výskyt potenciálních zoonotických bakterií *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens* u psů krmených dle konceptu BARF. Tyto zoonotické bakterie mohou psi přenášet asymptomaticky (Carter & Quinn 2000; Marks et al. 2011). Proto Lefebvre et al. (2008) provedli studii, na základě které uvádí, že by se měla vyloučit všechna zvířata, která byla za posledním 90 dní krmena jakýmkoli syrovým masem. Součástí této studie bylo i mapování krmení psů v canisterapii. Až 26 % respondentů krmí svého canisterapeutického psa BARF stravou, a to i v době, kdy pes aktivně vykonává interakce s klienty. Dále 10 % respondentů krmí kombinací BARF stravy a tepelně upravené stravy. Většina z nich navíc uvedla, že BARF strava je vhodnou metodou krmení psů v canisterapii se žádnými nebo minimálními riziky zoonóz. Autoři Lefebvre et al. (2008) svou studii podporují zákaz krmení psů syrovými nebo nezpracovanými živočišnými produkty, a to zejména u klientů, kteří jsou vysoce náchylní k infekcím. I tato studie se připojuje k podpoře zákazu krmení canisterapeutických psů. Proto by tato studie mohla sloužit jako zdroj pro vytvoření zoohygienických postupů, zejména přípustných metod krmení psů v canisterapii.



## 7 Závěr

Tato diplomová práce se zabývá tématem Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii. Literární rešerše byla porovnána s vlastním výzkumným šetřením, ve kterém byl sledován fekální psí mikrobiom. Dílčím dotazníkovým šetřením bylo mapování metod krmení psů v canisterapii.

Vědecká literatura uvádí, že krmením psa dle konceptu BARF vzniká riziko přenosu zoonotických onemocnění způsobené bakteriemi a parazity, ojediněle i viry. Zatímco parazity lze eliminovat vysokým mrazem, bakterie jsou odolné. V canisterapii je jakékoli riziko přenosu zoonotických onemocnění nepřijatelné. Pes často navštěvuje klienty, kteří mají oslabenou imunitu nebo zvýšené riziko infekce. Z těchto důvodů je během zoorehabilitace nutné dodržovat striktní zoohygienická opatření, díky kterým nedojde k případným kontraindikacím. Z těchto důvodů je doporučeno nekrmit canisterapeutického psa syrovou stravou.

Součástí práce bylo porovnání střevního mikrobiomu psů krmených dle konceptu BARF se psy krmených granulemi. Kvantitativní metoda qPCR hodnotila výskyt potenciálně patogenních bakterií, konkrétně bakterie *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*. Detekce všech potenciálně patogenních bakterií byla vyšší u psů krmených dle konceptu BARF než u psů krmených granulemi. První hypotéza, která předpokládala, že u psů krmených dle konceptu BARF se bude vyskytovat signifikantně vyšší množství patogenních bakterií, byla prokázána u bakterií *Campylobacter jejuni* a *Clostridium perfringens*. Výskyt bakterie *Salmonella spp.* byl sice vyšší u psů krmených BARF stravou, ale statisticky významný rozdíl nebyl prokázán. Druhá hypotéza předpokládala, že psi žijící venku na zahradě budou mít vyšší počet patogenních bakterií než psi žijící doma. Tato hypotéza nebyla potvrzena.

Celková mikrobiální diverzity se posuzovala pomocí metody DGGE, která prokázala významný rozdíl mezi mikrobiomem psů krmených BARF stravou a mikrobiomem psů krmených granulemi. U psů krmených BARF stravou byly nejčastěji detekovány bakterie rodu *Faecalibacterium sp.* a *Blautia sp.*, které jsou součástí zdravého střevního mikrobiomu. Zatímco potenciálně patogenní bakterie *Escherichia coli*, *Salmonella bongori* a *Streptococcus sp.* byly identifikovány častěji u psů, kteří byli krmeni granulemi. Vliv suché stravy (granulí) na výskyt potenciálně patogenních bakterií by mohl posloužit jako námět pro další studie.

Diplomová práce byla doplněna malým dotazníkovým šetřením mapující metody krmení u canisterapeutických psů. I když se krmení BARF stravou v canisterapii nedoporučuje, poměrně velká část respondentů svého psa krmí touto metodou nebo kombinací tepelně upravené stravy s BARF stravou. Většina respondentů navíc tvrdí, že BARF strava je vhodná i pro psa v canisterapii a nejsou si vědomi žádných potenciálních rizik zoonóz.

Tato studie detekovala vyšší výskyt všech potenciálně patogenních bakterií u psů krmených BARF stravou v porovnání se psy na granulích. Jakékoli riziko přenosu zoonóz je v zoorehabilitaci nepřijatelné, proto by se mělo zvážit, zda psy krmené BARF stravou

zařazovat do canisterapie. Tato studie by mohla posloužit jako podklad pro vytvoření zoohygienických požadavků, které by mohly definovat pravidla přípustných metod krmení u canisterapeutických psů.

## 8 Literatura

- Acke E. 2018. Campylobacteriosis in dogs and cats: a review. *New Zealand veterinary journal* **66**:221-228.
- Ahmed F, Cappai MG, Morrone S, Cavallo L, Berlinguer F, Dessì G, Tamponi C, Scala A, Varcasia A. 2021. Raw meat based diet (RMBD) for household pets as potential door opener to parasitic load of domestic and urban environment. Revival of understated zoonotic hazards? A review. *One Health* **13**:100327.
- Algya KM, Cross TWL, Leuck KN, Kastner ME, Baba T, Lye L, de Godoy MRC, Swanson KS. 2018. Apparent total-tract macronutrient digestibility, serum chemistry, urinalysis, and fecal characteristics, metabolites and microbiota of adult dogs fed extruded, mildly cooked, and raw diets. *Journal of animal science* **96**:3670-3683.
- Azza SM, Abuelnaga AA, Samy MA, Bakry AS. 2014. Bacteriological assay for the Egyptian currency collected from veterinary field. *International Journal of Microbiological Research* **5**:48-53.
- Baker MG, Sneyd E, Wilson NA. 2007. Is the major increase in notified campylobacteriosis in New Zealand real?. *Epidemiology & Infection* **135**:163-170.
- Bert F, Gualano MR, Camussi E, Pieve G, Voglino G, Siliquini R. 2016. Risks and threats of social media websites: twitter and the proana movement. *Cyberpsychology, Behavior, and Social Networking* **19**:233-238.
- Bojanić K, Midwinter AC, Marshall JC, Rogers LE, Biggs PJ, Acke E. 2017. Isolation of *Campylobacter* spp. from client-owned dogs and cats, and retail raw meat pet food in the Manawatu, New Zealand. *Zoonoses and public health* **64**:438-449.
- Bolte LA, Vila AV, Imhann F, Collij V, Gacesa R, Peters V, Wijmenga C, Kurilshikov A, Campmans-Kuijpers MJE, Fu J, Dijkstra G, Zhernakova A, Weersma RK. 2021. Long-term dietary patterns are associated with pro-inflammatory and anti-inflammatory features of the gut microbiome. *Gut* **70**:1287-1298.
- Bowen J. 2014. Canine feeding behavior. *Veterinary Focus* **24**:8-15.
- Boyle SF, Corrigan VK, Buechner-Maxwell V, Pierce BJ. 2019. Evaluation of Risk of Zoonotic Pathogen Transmission in a University-Based Animal Assisted Intervention (AAI) Program. *Frontiers in Veterinary Science* **6**:167.
- Bradshaw JW. 2006. The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs (*Canis familiaris*) and cats (*Felis catus*). *The Journal of nutrition* **136**:1927-1931.

- Budzińska-Wrzesień E, Wrzesień R, Jarmuż-Pietraszczyk J, Świtacz A. 2012. Therapeutic role of animals in human life—examples of dog and cat assisted therapy. *Ecological Chemistry and Engineering. A* **19**:1375-1381.
- Buff PR, Carter RA, Bauer JE, Kersey JH. 2014. Natural pet food: A review of natural diets and their impact on canine and feline physiology. *Journal of Animal Science* **92**:3781–3791.
- Bucher M, Meyer C, Grötzbach B, Wacheck S, Stolle A, Fredriksson-Ahomaa M. 2008. Epidemiological data on pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Southern Germany during 2000–2006. *Foodborne pathogens and disease* **5**:273-280.
- Byrne L, Dallman TJ, Adams N, Mikhail AF, McCarthy N, Jenkins C. 2018. Highly pathogenic clone of Shiga toxin–producing *Escherichia coli* O157: H7, England and Wales. *Emerging infectious diseases* **24**:2303.
- Calcaterra V, Veggiotti P, Palestrini C, De Giorgis V, Raschetti R, Tumminelli M, Mencherini S, Papotti F, Klersy C, Albertini R, Ostuni S, Pelizzo G. 2015. Post-operative benefits of animal-assisted therapy in pediatric surgery: a randomised study. *PloS ONE* 10 (e0125813) DOI: 10.1371/journal.pone.0125813.
- Carter ME, Quinn PJ. 2000. Salmonella infections in dogs and cats. *Salmonella in domestic animals* **14**:231-244.
- Cave NJ, Marks SL, Kass PH, Melli AC, Brophy MA. 2002. Evaluation of a routine diagnostic fecal panel for dogs with diarrhea. *JOURNAL-AMERICAN VETERINARY MEDICAL ASSOCIATION* **221**:52-59.
- Coelho WMD, do Amarante, AFT, Apolinário, JDC, Coelho NMD, de Lima VMF, Perri SHV, Bresciani KDS. 2011. Seroepidemiology of *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum*, and *Leishmania* spp. infections and risk factors for cats from Brazil. *Parasitology research* **109**:1009-1013.
- Commission Regulation (EU) No 142/2011 of 25 February 2011. Implementing Regulation (EC) No 1069/2009 of the European Parliament and of the Council laying down health rules as regards animal by-products and derived products not intended for human consumption and implementing Council Directive 97/78/EC as regards certain samples and items exempt from veterinary checks at the border under that Directive.
- Damborg P, Broens EM, Chomel BB, Guenther S, Pasmans F, Wagenaar JA, Weese JS, Wieler LH, Windahl U, Vanrompay D, Guardabassi L. 2016. Bacterial zoonoses transmitted by household pets: state-of-the-art and future perspectives for targeted research and policy actions. *Journal of comparative pathology* **155**:27-40.
- Damborg P, Olsen KE, Møller Nielsen E, Guardabassi L. 2004. Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:1363-1364.

- Davies RH, Lawes JR, Wales AD. 2019. Raw diets for dogs and cats: a review, with particular reference to microbiological hazards. *Journal of Small Animal Practice* **60**:329-339.
- Deschamps C, Denis S, Humbert D, Zentek J, Priymenko N, Apper E, Blanquet S. 2022. In vitro models of the canine digestive tract as an alternative to in vivo assays: Advances and current challenges. *ALTEX-Alternatives to animal experimentation* **39**:235-257.
- Duysburgh C, Ossieur WP, De Paepe K, Van den Abbeele P, Vichez-Vargas R, Vital M, Pieper DH, Van de Wiele T, Hesta M, Prosemiers S, Marzorati M. 2020. Development and validation of the Simulator of the Canine Intestinal Microbial Ecosystem (SCIME). *Journal of Animal Science* **98**:357.
- European Commission. 2018. Guidelines for the feed use of food no longer intended for human consumption. *Official Journal of the European Union C* **133**:2-18.
- Finley R, Reid-Smith R, Ribble C, Popa M, Vandermeer M, Aramini J. 2008. The occurrence and antimicrobial susceptibility of salmonellae isolated from commercially available canine raw food diets in three Canadian cities. *Zoonoses and public health* **55**:462-469.
- Finley R, Reid-Smith R, Weese JS, Angulo FJ. 2006. Human health implications of Salmonella-contaminated natural pet treats and raw pet food. *Clinical Infectious Diseases* **42**:686-691.
- Finley R, Ribble C, Aramini J, Vandermeer M, Popa M, Litman M, Reid-Smith R. 2007. The risk of salmonellae shedding by dogs fed Salmonella-contaminated commercial raw food diets. *The Canadian Veterinary Journal* **48**:69.
- Foreman AM, Glenn MK, Meade BJ, Wirth O. 2017. Dogs in the workplace: A review of the benefits and potential challenges. *International journal of environmental research and public health* **14**:498.
- Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Korkeala H. 2006. Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **47**:315-329.
- Freeman LM, Chandler ML, Hamper BA, Weeth LP. 2013. Current knowledge about the risks and benefits of raw meat-based diets for dogs and cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **243**:1549-1558.
- Freiche V, Hernandez J. 2010. Intestin grêle. *Gastro-entérologie canine et féline* 161.
- Frischmann A, Knoll A, Hilbert F, Zasada AA, Kämpfer P, Busse HJ. 2012. Corynebacterium epidermidicanis sp. nov., isolated from skin of a dog. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* **62**:2194-2200.
- Frost A. 2017. Feeding of Brucella suis-infected meat to dogs in the UK. *The Veterinary Record* **181**:484.

- Galibert F, Quignon P, Hitte C, André C. 2011. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. *Comptes rendus biologiques* **334**:190-196.
- Garcia-Mazcorro JF, Dowd SE, Poulsen J, Steiner JM, Suchodolski JS. 2012. Abundance and shortterm temporal variability of fecal microbiome in healthy dogs. *Microbiology Open* **1**:340–347.
- Garcia-Mazcorro JF, Lanerie DJ, Dowd SE, Paddock CG, Grützner N, Steiner JM, Ivanek R, Suchodolski JS. 2011. Effect of a multi-species synbiotic formulation on fecal bacterial microbiota of healthy cats and dogs as evaluated by pyrosequencing. *FEMS microbiology ecology* **78**:542-554.
- Gardiánová I, Hejrová P. 2015. The use of small animals–mammals, birds, fish in zootherapy. *Kontakt* **17**:171-176.
- Gautam A, Govil K, Thakur D, Kumar A, Saini KSP. 2018. Scientific dog feeding for good health and its preparation: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* **6**:1683-1689.
- Ghasemzadeh I, Namazi SH. 2015. Review of bacterial and viral zoonotic infections transmitted by dogs. *J. Med. Life* **8**:1–5.
- Grandgeorge M, Hausberger M. 2011. Human-animal relationships: from daily life to animal-assisted therapies. *Ann Ist Super Di Sanita`* **47**:397–408.
- Gyles C. 2017. Raw food diets for pets. *The Canadian Veterinary Journal* **58**:537.
- Hand D, Wallis C, Colyer A, Penn CW. 2013. Pyrosequencing the canine faecal microbiota: breadth and depth of biodiversity. *PloS ONE* **8** (e53115) DOI: 10.1371/journal.pone.0053115.
- Handl S, Dowd SE, Garcia-Mazcorro JF, Steiner JM, Suchodolski JS. 2011. Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS microbiology ecology* **76**:301-310.
- Hellgren J, Hästö LS, Wikström C, Fernström LL, Hansson I. 2019. Occurrence of Salmonella, Campylobacter, Clostridium and Enterobacteriaceae in raw meat-based diets for dogs. *Veterinary Record* **184**:442-442.
- Hewson-Hughes AK, Hewson-Hughes VL, Colyer A, Miller AT, Hall SR, Raubenheimer D, Simpson SJ. 2013. Consistent proportional macronutrient intake selected by adult domestic cats (*Felis catus*) despite variations in macronutrient and moisture content of foods offered. *Journal of Comparative Physiology B* **183**:525-536.
- Honneffer JB, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. 2017. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics* **13**:1-20.

- Hüsgen CJ, Peters-Scheffer NC, Didden R. 2022. A Systematic Review of Dog-Assisted Therapy in Children with Behavioural and Developmental Disorders. *Advances in Neurodevelopmental Disorders* 1-10.
- Chandler CK. 2017. *Animal assisted therapy in counseling*. 3rd ed. Routledge, New York.
- Isaiah A, Parambeth JC, Steiner JM, Lidbury JA, Suchodolski JS. 2017. The fecal microbiome of dogs with exocrine pancreatic insufficiency. *Anaerobe* **45**:50-58.
- Jiang H, Huang L, Yang J, Wu G. 2018. *A Microbial Analysis Primer for Biogeochemists*. Page Environmental Geochemistry: Site Characterization, Data Analysis and Case Histories: Second Edition, 2nd edition.
- Joffe DJ, Schlesinger DP. 2002. Preliminary assessment of the risk of Salmonella infection in dogs fed raw chicken diets. *The Canadian Veterinary Journal* **43**:441.
- Johnson LN, Linder DE, Heinze CR, Kehs RL, Freeman LM. 2016. Evaluation of owner experiences and adherence to home-cooked diet recipes for dogs. *Journal of Small Animal Practice* **57**:23-27.
- Jokelainen P, Simola O, Rantanen E, Näreaho A, Lohi H, Sukura A. 2012. Feline toxoplasmosis in Finland: cross-sectional epidemiological study and case series study. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **24**:1115-1124.
- Joshi M, Deshpande JD. 2010. Polymerase chain reaction: methods, principles and application. *International Journal of Biomedical Research* **2**:81-97.
- Kaczorek-Łukowska E, Kizerwetter-Świda M, Rzewuska M. 2019. *Streptococcus canis* as a potential zoonotic agent: current state of knowledge. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* **26**:499-504.
- Kararli TT. 1995. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition* **16**:351-380.
- Koukourikos K, Georgopoulou A, Kourkouta L, Tsaloglidou A. 2019. Benefits of animal assisted therapy in mental health. *International Journal of Caring Sciences* **12**:1898.
- Koziolok M, Grimm M, Bollmann T, Schäfer KJ, Blattner SM, Lotz R, Boeck G, Weitschies W. 2019. Characterization of the GI transit conditions in Beagle dogs with a telemetric motility capsule. *Eur J Pharm Biopharm* **136**:221-230.
- Kralik P, Ricchi M. 2017. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Frontiers in microbiology* **8**:108.
- Kruger KA. 2006. *Animal-Assisted Interventions in Mental Health: Definitions and Theoretical Foundations*. Academic Press.

- Lal A, Hales S, French N, Baker MG. 2012. Seasonality in human zoonotic enteric diseases: a systematic review. *PLoS one* 7 (e31883) DOI: 10.1371/journal.pone.0031883.
- Lamm CG, Ferguson AC, Lehenbauer TW, Love BC. 2010. Streptococcal infection in dogs: a retrospective study of 393 cases. *Veterinary pathology* **47**:387-395.
- Lass-Hennemann J, Schäfer SK, Römer S, Holz E, Streb M, Michael T. 2018. Therapy Dogs as a Crisis Intervention After Traumatic Events? – An Experimental Study. *Frontiers in Psychology* 9:1627.
- Laustsen S, Lund E, Bibby BM, Kristensen B, Thulstrup AM, Møller JK. 2008. Effect of correctly using alcohol-based hand rub in a clinical setting. *Infection Control & Hospital Epidemiology* **29**:954-956.
- Lavan RP, King AIM, Sutton DJ, Tunceli K. 2017. Rationale and support for a One Health program for canine vaccination as the most cost-effective means of controlling zoonotic rabies in endemic settings. *Vaccine* **35**:1668-1674.
- Lee PY, Costumbrado J, Hsu CY, Kim YH. 2012. Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)* 62 (e3923) DOI: 10.3791/3923.
- Lefebvre SL, Golab GC, Christensen E, Castrodale L, Aureden K, Bialachowski A, Gumley N, Robinson J, Peregrine A, Benoit M, Card ML, Van Horne L, Weese JS. 2008. Guidelines for animal-assisted interventions in health care facilities. *American Journal of Infection Control* **36**:78–85.
- Lefebvre SL, Peregrine AS, Golab GC, Gumley NR, Waltner-Toews D, Weese JS. 2008. A veterinary perspective on the recently published guidelines for animal-assisted interventions in health-care facilities. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **233**:394–402.
- Lefebvre SL, Waltner-Toews D, Peregrine AS, Reid-Smith R, Hodge L, Arroyo LG, Weese JS. 2006. Prevalence of zoonotic agents in dogs visiting hospitalized people in Ontario: implications for infection control. *Journal of Hospital Infection* **62**:458–466.
- Lenz J, Joffe D, Kauffman M, Zhang Y, LeJeune J. 2009. Perceptions, practices, and consequences associated with foodborne pathogens and the feeding of raw meat to dogs. *The Canadian veterinary journal* **50**:637.
- Leonard EK, Pearl DL, Finley RL, Janecko N, Peregrine AS, Reid-Smith RJ, Weese JS. 2011. Evaluation of pet-related management factors and the risk of *Salmonella* spp. carriage in pet dogs from volunteer households in Ontario (2005–2006). *Zoonoses and public health* **58**:140-149.



- Li X, Wu Y, Zhang L, Cao Y, Li Y, Li J, Zhu L, Wu G. 2014. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical biochemistry* **451**:18-24.
- Liu X, Mao B, Gu J, Wu J, Cui S, Wang G, Zhao J, Zhang H, Chen W. 2021. *Blautia*—a new functional genus with potential probiotic properties?. *Gut microbes* **13**:1875796.
- Mahar KM, Portelli S, Coatney R, Chen EP. 2012. Gastric pH and gastric residence time in fasted and fed conscious beagle dogs using the Bravo® pH system. *Journal of pharmaceutical sciences* **101**:2439-2448.
- Malik S, Coombs GW, O'Brien FG, Peng H, Barton MD. 2006. Molecular typing of methicillin-resistant staphylococci isolated from cats and dogs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **58**:428-431.
- Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. 2011. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: diagnosis, epidemiology, treatment, and control. *Journal of veterinary internal medicine* **25**:1195-1208.
- Marx FR, Machado GS, Pezzali JG, Marcolla CS, Kessler AM, Ahlstrøm Ø, Trevizan L. 2016. Raw beef bones as chewing items to reduce dental calculus in Beagle dogs. *Australian veterinary journal* **94**:18-23.
- Matouch O, Vitasek J, Semerad Z, Malena M. 2006. Elimination of rabies in the Czech Republic. *Developments in biologicals* **125**:141-143.
- McKenzie BA. 2019. Debating raw diets. *Vet Pract News* **30**:31.
- McKeon GM. 2016. *Health and Happiness: Dogs and Their Therapeutic Value*.
- Mehlenbacher S, Churchill J, Olsen KE, Bender JB. 2012. Availability, brands, labelling and *Salmonella* contamination of raw pet food in the Minneapolis/St. Paul area. *Zoonoses and Public Health* **59**:513-520.
- Meng XJ. 2011. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus research* **161**:23-30.
- Mims D, Waddell R. 2016. Animal Assisted Therapy and Trauma Survivors. *Journal of Evidence-Informed Social Work* **13**:452-457.
- Mirza Alizadeh A, Jazaeri S, Shemshadi B, Hashempour-Baltork F, Sarlak Z, Pilevar Z, Hosseini H. 2018. A review on inactivation methods of *Toxoplasma gondii* in foods. *Pathogens and global health* **112**:306-319.
- Mohan V. 2015. Faeco-prevalence of *Campylobacter jejuni* in urban wild birds and pets in New Zealand. *BMC research notes* **8**:1-7.

- Moon CD, Young W, Maclean PH, Cookson AL, Bermingham EN. 2018. Metagenomic insights into the roles of Proteobacteria in the gastrointestinal microbiomes of healthy dogs and cats. *Microbiologyopen* 7 (e00677) DOI: 10.1002/mbo3.677.
- Mor SM, Wiethoelter AK, Lee A, Moloney B, James DR, Malik R. 2016. Emergence of *Brucella suis* in dogs in New South Wales, Australia: clinical findings and implications for zoonotic transmission. *BMC veterinary research* 12:1-9.
- Moretti F, De Ronchi D, Bernabei V, Marchetti L, Ferrari B, Forlani C, Negretti F, Sacchetti C, Atti AR. 2010. Pet therapy in elderly patients with mental illness. *Psychogeriatrics* 11:125–129.
- Murthy R, Bearman G, Brown S, Bryant K, Chinn R, Hewlett A, George BG, Goldstein EJC, Holzmann-Pazgal G, Rupp ME, Wiemken T, Weese JC, Weber DJ. 2015. Animals in healthcare facilities: recommendations to minimize potential risks. *infection control & hospital epidemiology* 36:495-516.
- Muyzer G, De Waal EC, Uitterlinden AG. 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and Environmental Microbiology* 59:695–700.
- Nakajima Y. 2017. Comparing the effect of Animal-Rearing education in Japan with Conventional Animal-Assisted education. *Frontiers in veterinary science* 4:85.
- Nemser SM, Doran T, Grabenstein M, McConnell T, McGrath T, Pamboukian R, Smith AC, Achen M, Danzeisen G, Kim S, Liu Y, Robeson S, Rosario G, Wilson KM, Reimschuessel R. 2014. Investigation of *Listeria*, *Salmonella*, and toxigenic *Escherichia coli* in various pet foods. *Foodborne pathogens and disease* 11:706-709.
- Nüesch-Inderbilen M, Treier A, Zurfluh K, Stephan R. 2019. Raw meat-based diets for companion animals: a potential source of transmission of pathogenic and antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae. *Royal Society open science* 6:191170.
- O’Haire ME, McKenzie SJ, McCune S, Slaughter V. 2014. Effects of Classroom Animal-Assisted Activities on Social Functioning in Children with Autism Spectrum Disorder. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine* 20:162–168.
- Oswald H, Sharkey M, Pade D, Martinez N. 2015. Canine gastrointestinal physiology: Breeds variations that can influence drug absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 97:192-203.
- Overgaauw PA, Vinke CM, van Hagen MA, Lipman LJ. 2020. A one health perspective on the human–companion animal relationship with emphasis on zoonotic aspects. *International journal of environmental research and public health* 17:3789.

- Palley LS, O'Rourke PP, Niemi SM. 2010. Mainstreaming animal-assisted therapy. *ILAR journal* **51**:199-207.
- Papadopoulos E, Sioutas G. 2020. Parasites and BARF: The raw truth. *Hellenic Journal of Companion Animal Medicine* **9**:118-123.
- Perkins A. 2020. The benefits of pet therapy. *Nursing made Incredibly Easy* **18**:5-8.
- Persson S, Olsen KE. 2005. Multiplex PCR for identification of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from pure cultures and directly on stool samples. *Journal of medical microbiology* **54**:1043-1047.
- Pichot T. 2012. *Animal assisted brief therapy: a solution-focused approach*. 2nd ed. Brunner-Routledge, New York.
- Pilla R, Suchodolski JS. 2020. The role of the canine gut microbiome and metabolome in health and gastrointestinal disease. *Frontiers in veterinary science* **6**:498.
- Poehlein A, Hettwer E, Mohnike L, Daniel R. 2018. First Insights into the Genome Sequence of *Clostridium thermopalmarium* DSM 5974, a Butyrate-Producing Bacterium Isolated from Palm Wine. *Genome Announcements* **6** (e00338-18) DOI: <https://doi.org/10.1128/genomeA.00338-18>.
- Qiagen. 2017. QIAamp ® PowerFecal ® DNA Kit Handbook. Tutirialis e Manuais.
- Racca A, Guo K, Meints K, Mills DS. 2012. Reading faces: differential lateral gaze bias in processing canine and human facial expressions in dogs and 4-year-old children. *PLoS one* **7** (e36076) DOI: [10.1371/journal.pone.0036076](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036076).
- Raquel Lackey CPA, Haberstock G. 2019. *Animal-Assisted Crisis Response: Offering Opportunity for Human Resiliency During and After Traumatic Incidents*. Pages 373-394 in Tedeschi P, Jenkins M, editors. *Transforming Trauma: Resilience and Healing Through Our Connections with Animals*. Purdue University Press, West Lafayette.
- Reimschuessel R, Grabenstein M, Guag J, Nemser SM, Song K, Qiu J, Clothier KA, Byrne BA, Marks SL, Cadmus K, Pabilonia K, Sanchez S, Rajeev A, Ensley S, Frana TS, Jergens AE, Chappell KH, Thakur S, Byrum B, Cui J, Zhang, Erdman MM, Rankin SC, Daly R, Das S, Ruesch L, Lawhon SD, Zhang S, Baszler T, Diaz-Campos D, Hartmann F, Okwumabua O. 2017. Multilaboratory survey to evaluate *Salmonella* prevalence in diarrheic and nondiarrheic dogs and cats in the United States between 2012 and 2014. *Journal of Clinical Microbiology* **55**:1350-1368.
- Rodrigo-Claverol M, Casanova-Gonzalvo C, Malla-Clua B, Rodrigo-Claverol E, Jové-Naval J, Ortega-Bravo M. 2019. Animal-assisted intervention improves pain perception in polymedicated geriatric patients with chronic joint pain: a clinical trial. *International journal of environmental research and public health* **16**:2843.

- Rodriguez-Palacios A, Reid-Smith RJ, Staempfli HR, Daignault D, Janecko N, Avery BP, Martin H, Thompsen AD, McDonald LC, Limbago B, Weese JS. 2009. Possible seasonality of *Clostridium difficile* in retail meat, Canada. *Emerging infectious diseases* **15**:802.
- Rodriguez-Palacios A, Staempfli HR, Duffield T, Weese JS. 2007. Isolation of bovine intestinal *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus acidilactici* with inhibitory activity against *Escherichia coli* O157 and F5. *Journal of applied microbiology* **106**:393-401.
- Runesvärd E, Wikström C, Fernström LL, Hansson I. 2020. Presence of pathogenic bacteria in faeces from dogs fed raw meat-based diets or dry kibble. *Veterinary record* 187 (e71) DOI: <https://doi.org/10.1136/vr.105644>.
- Ryan U, Cacciò SM. 2013. Zoonotic potential of *Giardia*. *International journal for parasitology* **43**:943-956.
- Sandri M, Dal Monego S, Conte G, Sgorlon S, Stefanon B. 2016. Raw meat based diet influences faecal microbiome and end products of fermentation in healthy dogs. *BMC veterinary research* **13**:1-11.
- Santaniello A, Sansone M, Fioretti A, Menna LF. 2020. Systematic Review and MetaAnalysis of the Occurrence of ESKAPE Bacteria Group in Dogs, and the Related Zoonotic Risk in Animal-Assisted Therapy, and in Animal-Assisted Activity in the Health Context. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**:3278.
- Santaniello A, Varriale L, Dipineto L, Borrelli L, Pace A, Fioretti A, Menna LF. 2021. Presence of *Campylobacter jejuni* and *C. coli* in Dogs under Training for Animal-Assisted Therapies. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **18**:3717.
- Serpell JA, Kruger KA, Freeman LM., Griffin JA, Ng ZY. 2020. Current Standards and Practices Within the Therapy Dog Industry: Results of a Representative Survey of United States Therapy Dog Organizations. *Frontiers in veterinary science* **7**:35.
- Shubert J. 2012. *Dogs and Human Health/Mental Health: From the Pleasure of their Company to the Benefits of their Assistance*.
- Schaffer CB. 2008. Enhancing Human–Animal Relationships through Veterinary Medical Instruction in Animal-Assisted Therapy and Animal-Assisted Activities. *Journal of Veterinary Medical Education* **35**:503-510.
- Schlatter DC, Paul NC, Shah DH, Schillinger WF, Bary AI, Sharratt B, Paulitz, TC. 2019. Biosolids and tillage practices influence soil bacterial communities in dryland wheat. *Microbial ecology* **78**:737-752.
- Schmidt M, Unterer S, Suchodolski JS, Honneffer JB, Guard BC, Lidbury JA, Steiner JM, Fritz JA, Kölle P. 2018. The fecal microbiome and metabolome differs between dogs fed Bones

and Raw Food (BARF) diets and dogs fed commercial diets. *PloS one* 13 (e0201279) DOI: 10.1371/journal.pone.0201279.

- Silva ROS, Lobato FCF. 2015. *Clostridium perfringens*: a review of enteric diseases in dogs, cats and wild animals. *Anaerobe* **33**:14-17.
- Sindern N, Suchodolski JS, Leutenegger CM, Mehdizadeh Gohari I, Prescott JF, Proksch AL, Mueller RS, Busch K, Unterer S. 2019. Prevalence of *Clostridium perfringens* netE and netF toxin genes in the feces of dogs with acute hemorrhagic diarrhea syndrome. *Journal of veterinary internal medicine* **33**:100-105.
- Smeets-Peeters M, Watson T, Minekus M, Havenaar R. 1998. A review of the physiology of the canine digestive tract related to the development of in vitro systems. *Nutrition research reviews* **11**:45-69.
- Steed HN, Smith BS. 2003. Animal assisted activities for geriatric patients. *Activities, Adaptation & Aging* **27**:49-61.
- Strohmeyer RA, Morley PS, Hyatt DR, Dargatz DA, Scorza AV, Lappin MR. 2006. Evaluation of bacterial and protozoal contamination of commercially available raw meat diets for dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **228**:537-542.
- Suchodolski JS, Camacho J, Steiner JM. 2008. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS microbiology ecology* **66**:567-578.
- Suchodolski JS. 2011. Intestinal microbiota of dogs and cats: a bigger world than we thought. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice* **41**:261-272.
- Suchodolski JS. 2016. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal* **215**:30-37.
- Summa M, von Bonsdorff CH, Maunula L. 2012. Pet dogs—A transmission route for human noroviruses?. *Journal of clinical virology* **53**:244-247.
- Tan SC, Yiap BC. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*.
- Tarafder M, Samad MA. 2010. Prevalence of clinical diseases of pet dogs and risk perception of zoonotic infection by dog owners in Bangladesh. *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine* **8**:163-174.
- Thépault A, Rose V, Queguiner M, Chemaly M, Rivoal K. 2020. Dogs and cats: reservoirs for highly diverse *Campylobacter jejuni* and a potential source of human exposure. *Animals* **10**:838.

- van Bree FP, Bokken GC, Mineur R, Franssen F, Opsteegh M, van der Giessen JW, Lipman LJ, Overgaauw PA. 2018. Zoonotic bacteria and parasites found in raw meat-based diets for cats and dogs. *Veterinary Record* **182**:50-50.
- Vazquez-Baeza Y, Hyde ER, Suchodolski JS, Knight R. 2016. Dog and human inflammatory bowel disease rely on overlapping yet distinct dysbiosis networks. *Nat Microbiol* **1**:16177.
- Wasteson Y. 2002. Zoonotic *Escherichia coli*. *Acta Veterinaria Scandinavica* **43**:1-6.
- Wayne RK, Vonholdt BM. 2012. Evolutionary genomics of dog domestication. *Mammalian Genome* **23**:3-18.
- Weese JS, Rousseau J, Arroyo L. 2005. Bacteriological evaluation of commercial canine and feline raw diets. *The Canadian Veterinary Journal* **46**:513.
- Woldemeskel M. 2013. Zoonosis due to *Bruella suis* with special reference to infection in dogs (Carnivores): A brief review.
- Yap E, Scheinberg A, Williams K. 2017. Attitudes to and beliefs about animal assisted therapy for children with disabilities. *Complementary Therapies in Clinical Practice* **26**:47-52.
- Zhang J, Chiodini R, Badr A, Zhang G. 2011. The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of genetics and genomics* **38**:95-109.
- Zicker SC. 2008. Evaluating pet foods: how confident are you when you recommend a commercial pet food?. *Topics in companion animal medicine* **23**:121-126.

## 9 Seznam použitých zkratek a symbolů

**AAA** – Aktivity za pomoci zvířat (Animal-Assisted Activity)

**AACR** – Krizová intervence za pomoci zvířat (Animal-Assisted Crisis Response)

**AAE** – Vzdělávání za pomoci zvířat (Animal-Assisted Education)

**AAI** – Intervence za pomoci zvířat (Animal-Assisted Intervention)

**AAT** – Terapie za pomoci zvířat (Animal-Assisted Therapy)

**AAWW** – Zdraví na pracovišti s podporou zvířat (Animal-Assisted Workplace Well-being)

**apod.** – a podobně

**atd.** – a tak dále

**BARF** – Biologicky vhodná syrová strava (Biologically appropriate raw food)

**č.** – číslo

**DGGE** – denaturační gradientová gelová elektroforéza

**dH<sub>2</sub>O** – destilovaná voda

**DNA** – deoxyribonukleová kyselina

**dsDNA** – dvouvláknová molekula DNA

**FP** – přední primer (forward primer)

**g** – gram

**ml** – mililitr

**mm** – milimetr

**např.** – například

**ng** – nanogram

**nm** – nanometr

**PCR** – polymerázová řetězová reakce

**qPCR** – kvantitativní polymerázová řetězová reakce

**př. n. l.** – před naším letopočtem

**pb** – párů bází

**rcf** – centrifugační síla (relative centrifugal force)

**RP** – zadní primer (reverse primer)

**rpm** – otáčky za minutu (Revolutions per minute)

**rRNA** – ribozomální ribonukleová kyselina

**sp.** – druh (latinsky *species*)

**spp.** – poddruh (latinsky *subspecies*)

**TAE** – tris-acetát-EDTA

**tj.** – to je

**tzv.** – takzvaný

**UV** – ultrafialové

**μl** – mikrolitr



## 10 Samostatné přílohy

### Příloha 1: Dotazník údajů o psovi pro vyhodnocení střevního mikrobiomu

Datum odběru:

Číslo vzorku:

#### Dotazník k diplomové práci na téma

#### „Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii“

Vážení respondenti,

Jsem studentka magisterského studia České zemědělské univerzity v Praze, oboru Výživa zvířat. Tímto bych Vás ráda požádala o vyplnění následujícího dotazníku, který obsahuje důležité informace k vyhodnocení bakteriálního osídlení v gastrointestinálním traktu Vašeho psa.

Dotazník je zcela anonymní. Vyplněné dotazníky poslouží pouze ke statistickému zpracování výsledků v diplomové práci nebo jako s jejich publikací ve vědeckých časopisech.

Děkuji Vám za ochotu a čas  
Blanka Novotná

**Věk psa:**

**Plemeno:**

**Váha:**

**Pohlaví:**

Fena

Pes

**Kastrace:**

Ano

Ne

**Krmivo:**

BARF

Granule

Jak dlouho je Váš pes krmen touto stravou? .....

Bral Váš pes v posledních 3 týdnech antibiotika?

Ano

Ne

Datum odběru:

Číslo vzorku:

Kde pes žije?

- V bytě/domě
- Venku

Obojí

Lokalita:

Město

Vesnice

Jak často odčervujete Vašeho psa? .....

Necháváte dělat preventivní parazitologické vyšetření (tzv. koprologii) u Vašeho psa?

Ano

Ne

Další poznámky:

S veškerými informacemi se bude pracovat na základě Zákona o ochraně osobních údajů č. 101/2000 Sb. pouze pro daný výzkum k diplomové práci.

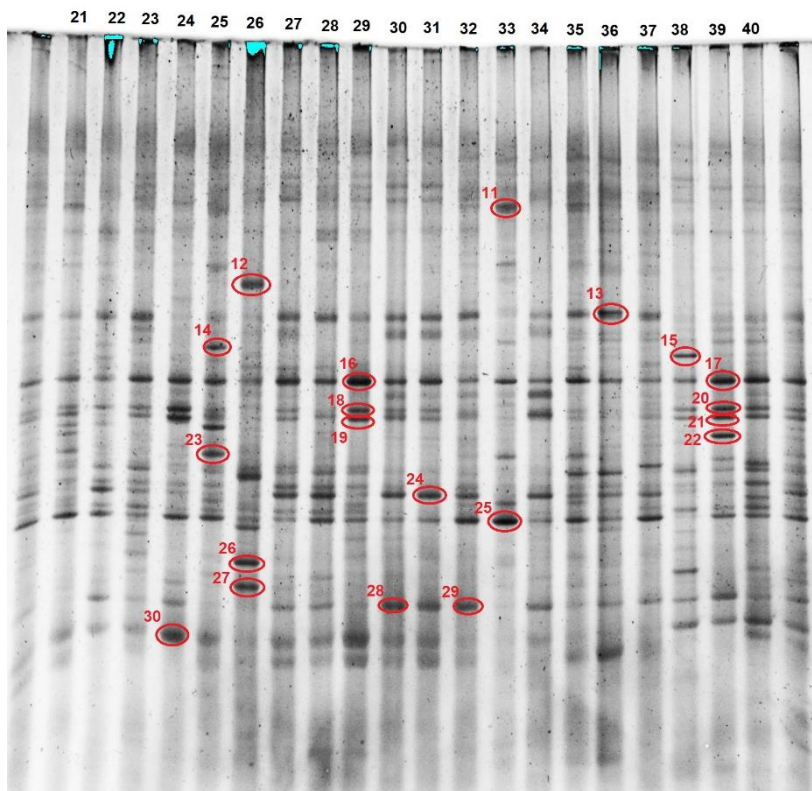
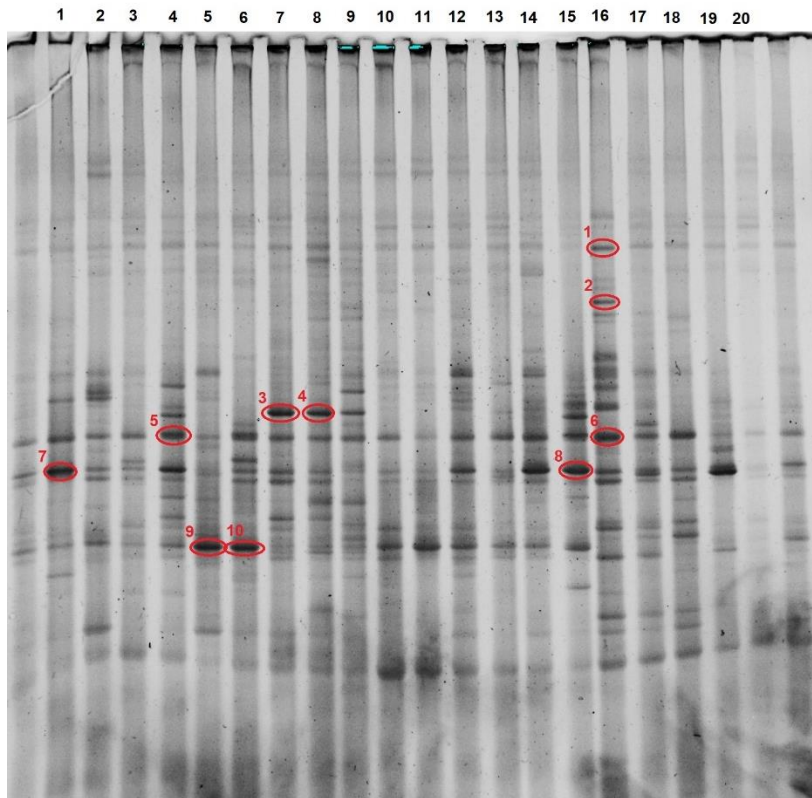
## Příloha 2: Přehled důležitých informací o psech krmeným konceptem BARF

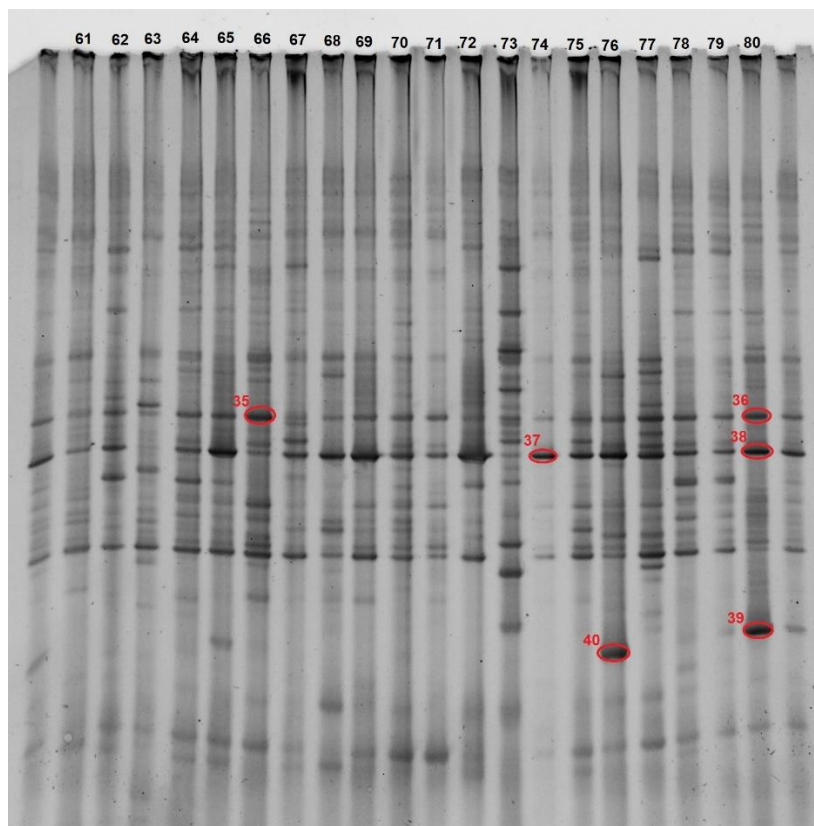
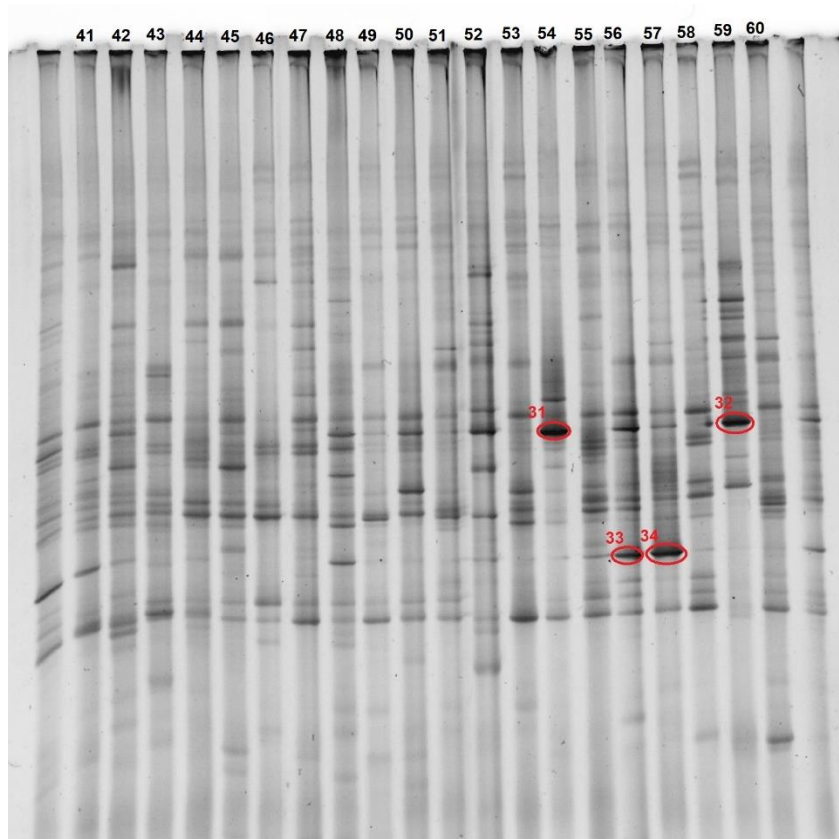
Číslo Vzorku	Pohlaví	Věk (roky)	Kastrace	Plemeno	Umístění	Kondice	Odčervení	Koprologie
1	pes	3	ne	Stafordšířský bulteriér	uvnitř	normální	2x ročně	ne
2	pes	0,6	ne	Border kolie	uvnitř	normální	každý měsíc	ne
3	fena	2,5	ano	Americký stafordšířský teriér	uvnitř	normální	2x ročně	ne
4	fena	1,5	ne	Kavalír	uvnitř	normální	4x ročně	ne
5	pes	1	ne	Samojed	uvnitř	normální	6x ročně	ne
6	fena		ne	Brabantík	uvnitř	normální	Ne	ne
7	fena	15	ano	Rhodský ridgeback	uvnitř	normální	Ne	ne
8	fena	3	ne	Rhodský ridgeback	uvnitř	normální	Ne	ne
9	fena	9	ano	Rhodský ridgeback	uvnitř	normální	Ne	ne
10	fena	3	ano	Kříženec	uvnitř	normální	Ne	ano
11	pes	15	ano	Jack Russel teriér	uvnitř	nadváha	Ne	ano
12	pes	2	ne	Flat coated retriever	uvnitř	normální	Ne	ano
13	fena	11	ano	Rhodský ridgeback	uvnitř	normální	Ne	ne
14	pes	2	ne	Novosotský retrívr	uvnitř	normální	2x ročně	ne
15	pes	3	ne	Kříženec	obojí	normální	2x ročně	ne
16	fena	1	ne	Biewer terier	uvnitř	normální	4x ročně	ne
17	fena	11	ano	Labradorský retrívr	uvnitř	normální	4x ročně	ne
18	pes	5	ne	Border kolie	uvnitř	normální	4x ročně	ne
19	pes	1	ne	biewer terier	uvnitř	normální	4x ročně	ne
20	pes	5,5	ne	Československý vlčák	venku	normální	2x ročně	ne
21	fena	1	ne	Jezevčík	uvnitř	normální	4x ročně	1x ročně
22	fena	13	ano	Labradorský retrívr	uvnitř	normální	1x ročně	ne
23	pes	1	ano	Australský ovčák	uvnitř	normální	2x ročně	ano
24	pes	11	ano	Estrelský pastevecký	uvnitř	nadváha	ne	ano
25	fena	13	ano	Kříženec	uvnitř	normální	ne	ano
26	fena	4	ano	American bully	uvnitř	normální	ne	ne
27	pes	5	ano	Australský ovčák	uvnitř	normální	4x ročně	ne
28	pes	2,5	ano	Saarloos wolfdog	uvnitř	normální	ne	3x ročně
29	pes	6	ne	Kříženec	uvnitř	normální	ne	ne
30	fena	7	ne	Československý vlčák	obojí	normální	1x ročně	ne
31	pes	1	ne	Evropský sáňkový pes	obojí	normální	1x ročně	ne
32	pes	1	ne	Evropský sáňkový pes	obojí	normální	1x ročně	ne
33	pes	11	ne	Aljašský malamut	venku	normální	1x ročně	ne
34	pes	7	ne	Aljašský malamut	venku	normální	1x ročně	ne
35	fena	8	ano	Aljašský malamut	venku	normální	1x ročně	ne
36	pes	6	ne	Aljašský malamut	venku	normální	1x ročně	ne
37	fena	11	ano	Aljašský malamut	venku	normální	1x ročně	ne
38	fena	4	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
39	fena	6	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
40	fena	3,5	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
41	pes	5,5	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
42	fena	1,5	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
43	pes	3	ne	Boxer	uvnitř	normální	2x ročně	ne
44	pes	5	ne	Jack Russel teriér	uvnitř	mírná nadváha	ne	ano
45	fena	14	ano	Jack Russel teriér	uvnitř	nadváha	ne	ano
46	fena	10	ano	Jack Russel teriér	uvnitř	normální	ne	ano
47	fena	12	ano	Jack Russel teriér	uvnitř	normální	ne	ano
48	fena	10	ano	Kříženec	uvnitř	mírná nadváha	ne	1x za rok
49	fena	7	ne	Irský červený setr	uvnitř	normální	1x za rok	2x ročně
50	pes	7	ne	Jack Russel teriér	uvnitř	normální	ne	ano

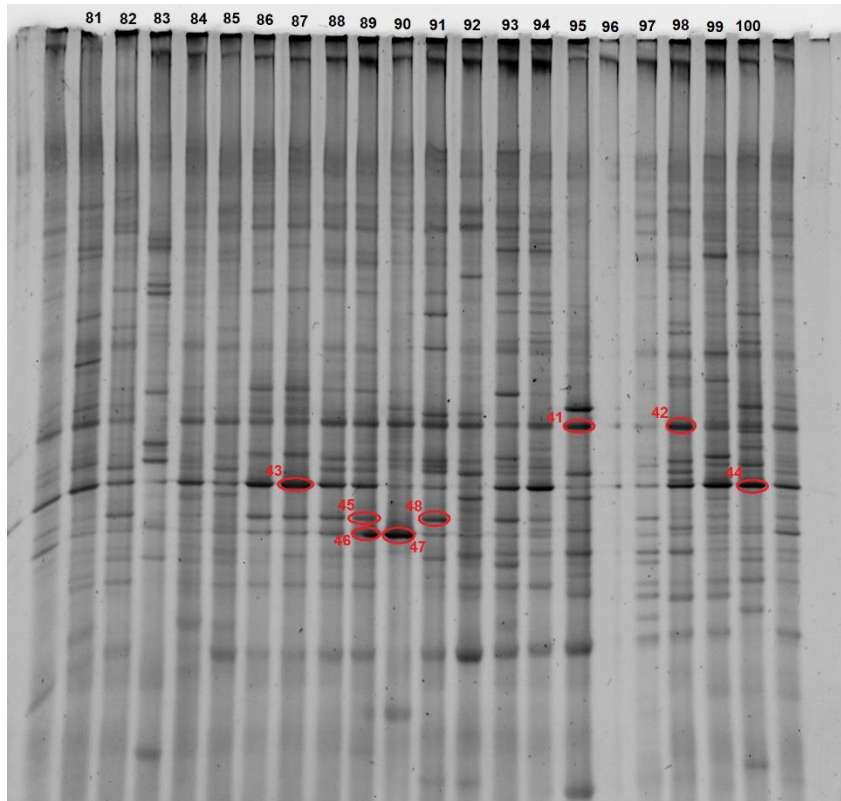
**Příloha 3: Přehled podstatných informací o psech krmenými granulemi**

Číslo Vzorku	Pohlaví	Věk (roky)	Kastrace	Plemeno	Umístění	Kondice	Odčervení	Koprologie
51	fena	3	ne	Erdelteriér	uvnitř	normální	Ne	Ne
52	fena	0,6	ne	Bostonský teriér	uvnitř	normální	3x ročně	Ne
53	fena	5	ano	Americký stafordšířský teriér	uvnitř	normální	2x ročně	Ne
54	pes	2	ne	Americký stafordšířský teriér	uvnitř	normální	3x ročně	Ne
55	pes	14	ano	Kříženec	uvnitř	normální	2x ročně	Ne
56	pes	3	ano	Kříženec	uvnitř	normální	4x ročně	Ne
57	fena	5	ne	Zlatý retrívr	venku	mírná nadváha	3x ročně	Ne
58	pes	2	ano	Kříženec	uvnitř	normální	3 x ročně	Ne
59	pes	6	ne	Kříženec	uvnitř	normální	ne	Ne
60	fena	2,5	ano	Kříženec	uvnitř	normální	3x ročně	Ne
61	fena	3	ano	Kříženec	uvnitř	normální	1x ročně	Ne
62	fena	1,5	ne	Jezevčík	uvnitř	mírná nadváha	2x ročně	Ne
63	fena	0,6	ne	Border kolie	uvnitř	normální	každý měsíc	Ne
64	fena	2,5	ne	Kříženec	uvnitř	normální	3x ročně	Ne
65	pes	2	ne	Kříženec	uvnitř	normální	4x ročně	Ne
66	fena	10	ne	Kříženec	uvnitř	normální	3 x ročně	Ne
67	fena	1	ne	Australský ovčák	uvnitř	normální	každý měsíc	Ne
68	pes	6	ano	Francouzský buldoček	uvnitř	normální	ne	ne
69	pes	2	ne	Stafordšířský bulteriér	uvnitř	normální	4x ročně	ne
70	fena	2	ne	Australský Silky Teriér	uvnitř	normální	4x ročně	ne
71	fena	8,5	ano	Pitbull	uvnitř	normální	2x ročně	ne
72	pes	13	ano	Yorkshirský teriér	uvnitř	normální	3x ročně	ne
73	fena	8	ano	Kříženec	uvnitř	normální	2x ročně	ne
74	fena	1	ne	Kříženec	uvnitř	normální	každý měsíc	ne
75	pes	3	ne	Americký bezsrstý teriér	uvnitř	normální	1x ročně	ne
76	fena	13	ano	Jorkšířský teriér	uvnitř	normální	4x ročně	ne
77	fena	20	ano	Kříženec	uvnitř	normální	1 x ročně	ne
78	fena	10	ne	Německý pinč	uvnitř	nadváha	2x ročně	ne
79	fena	11	ne	Peruánský naháč	uvnitř	normální	3x ročně	ne
80	pes	4	ne	Čivava	uvnitř	nadváha	1x ročně	ne
81	fena	5	ano	Kříženec	uvnitř	normální	2x ročně	ne
82	pes	7	ano	Kříženec	uvnitř	normální	1x ročně	ne
83	fena	4	ano	Kříženec	uvnitř	normální	3x ročně	ne
84	fena	0,4	ne	Border kolie	uvnitř	normální	každý měsíc	ne
85	fena	7	ano	Kříženec	uvnitř	mírná nadváha	4x ročně	ne
86	fena	10	ne	Jack Russel Terier	uvnitř	normální	2x ročně	ne
87	fena	7	ne	Jack Russel Terier	uvnitř	normální	2x ročně	ne
88	pes	8	ano	Jack Russel Terier	uvnitř	normální	2x ročně	ne
89	pes	5	ano	Jack Russel Terier	uvnitř	normální	2x ročně	ne
90	fena	0,5	ne	Kříženec	uvnitř	normální	každý měsíc	ne
91	fena	13	ano	Kříženec	uvnitř	normální	2x ročně	ne
92	fena	5	ne	Zlatý retrívr	venku	normální	3x ročně	ne
93	fena	3	ano	Stafordšířský teriér	uvnitř	normální	1x ročně	ne
94	pes	6	ne	Border Kolie	uvnitř	nadváha	2x ročně	ne
95	fena	10	ano	Pražský krysařík	uvnitř	normální	1x ročně	ne
96	fena	3,5	ne	Husky	uvnitř	normální	1x ročně	ne
97	pes	5	ne	Kříženec	venku	nadváha	2x ročně	ne
98	pes	2	ne	Kříženec	uvnitř	normální	2x ročně	1x ročně
99	fena	12	ano	kříženec	uvnitř	normální	Ne	1x ročně
100	fena	10	ano	Jorkšířský teriér	uvnitř	normální	2x ročně	ne

**Příloha 4:** Přehled všech DGGE gelů vyfocených pod UV světlem







## Příloha 5: Dotazník ke zmapování metod krmení psů v canisterapii

### Mapování metod krmení psů zapojených do canisterapie

Vážení respondenti,

Jsem studentka magisterského studia České zemědělské univerzity v Praze, oboru Výživa zvířat. Tímto bych Vás ráda požádala o vyplnění následujícího dotazníku, který je důležitý pro mou diplomovou práci na téma „Vyhodnocení rizika výskytu bakterií způsobujících zoonózy u psů v důsledku krmení konceptem BARF s ohledem na jejich využití v canisterapii“.

Dotazník je zcela anonymní. Vyplněné dotazníky poslouží pouze ke statistickému zpracování výsledků v rámci diplomové práce nebo publikace ve vědeckých časopisech.

Děkuji Vám za ochotu a čas  
Blanka Novotná

---

*Demografické otázky:*

**Pohlaví:**

Muž

Žena

**Věk: .....**

**Vzdělání:**

Střední odborné

Vyšší odborné

Střední s maturitou

Vysokoškolské

*Dotazníkové otázky:*

**Pohlaví psa:**

Fena

Pes

**Věk psa: .....**

**Plemeno psa: .....**



**Jak dlouho se věnujete canisterapii?**

- |                                       |  |
|---------------------------------------|--|
| <input type="checkbox"/> Méně než rok | <input type="checkbox"/> 10 – 20let      |
| <input type="checkbox"/> 1 – 5let     | <input type="checkbox"/> Více než 20 let |
| <input type="checkbox"/> 5 – 10let    |  |

**Jak často navštěvujete se svým canistereutickým psem klienty?**

- |  |   |
|--|---|
| <input type="checkbox"/> Jednou týdně        | <input type="checkbox"/> Několikrát do měsíce |
| <input type="checkbox"/> Několikrát do týdne | <input type="checkbox"/> Pouze příležitostně  |
| <input type="checkbox"/> Jednou za měsíc     |   |

**Jak krmíte Vašeho psa?**

- |   |   |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> Suchá strava (granule) | <input type="checkbox"/> Konzervovaná strava  |
| <input type="checkbox"/> Vařená strava          | <input type="checkbox"/> Syrová strava (BARF) |

**Je podle Vás krmení syrovou stravou (BARF) vhodné v canisterapii?**

.....

**Jaká jsou možná rizika zoonóz v důsledku krmení syrovou stravou (BARF)?**

.....

**Jak často odčervujete Vašeho psa? .....**

**Necháváte dělat preventivní parazitologické vyšetření (tzv. koprologii) u Vašeho psa?**

- |                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ano | <input type="checkbox"/> Ne |
|------------------------------|-----------------------------|

**Necháváte dělat preventivní bakteriologická vyšetření u Vašeho psa?**

- |                              |                             |
|------------------------------|-----------------------------|
| <input type="checkbox"/> Ano | <input type="checkbox"/> Ne |
|------------------------------|-----------------------------|

S veškerými informacemi se bude pracovat na základě Zákona o ochraně osobních údajů č. 101/2000 Sb. pouze pro daný výzkum k diplomové práci.

**Příloha 6:** Počet kopií bakterie *Campylobacter jejuni* u jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)
1	34 672,102	34	116 854,355	67	1 828,102
2	54 772,417	35	33 895,977	68	37 163,845
3	29 634,478	36	36 353,782	69	29 599,744
4	16 302,253	37	11 278,473	70	179 747,480
5	15 936,752	38	72 225,259	71	43 452,339
6	56 225,439	39	228 496,465	72	18 919,143
7	47 886,333	40	47 500,044	73	14 481,597
8	28 021,038	41	98 054,990	74	19 419,407
9	3 996,881	42	30 105,974	75	23 204,026
10	19 904,963	43	89 745,410	76	58 626,782
11	9 968,760	44	75 334,409	77	140 910,771
12	55 184,473	45	28 655,740	78	72 011,855
13	27 069,053	46	173 503,379	79	55 821,294
14	47 730,889	47	149 707,861	80	50 686,953
15	32 727,112	48	50 577,271	81	453 773,047
16	109 104,102	49	41 651,636	82	225 368,398
17	1 344 782,344	50	26 547,969	83	68 362,827
18	295 722,383	51	26 231,643	84	3 800,302
19	110 758,408	52	11 842,548	85	34 118,267
20	189 631,191	53	42 048,081	86	16 920,604
21	146 260,156	54	38 571,936	87	11 332,277
22	60 272,563	55	112 189,414	88	163 483,262
23	116 321,582	56	19 295,426	89	71 199,346
24	77 974,336	57	19 943,627	90	12 302,615
25	41 590,186	58	101 284,951	91	6 509,251
26	38 990,925	59	16 428,790	92	5 565,846
27	56 666,553	60	18 756,383	93	1 761,541
28	27 041,904	61	10 406,023	94	3 605,813
29	567 474,219	62	26 737,495	95	287,990
30	374 089,219	63	32 319,761	96	1 151,573
31	109 886,436	64	68 185,122	97	723,761
32	47 087,622	65	268,597	98	20 888,264
33	43 616,929	66	32 923,972	99	346,805
				100	844,541

**Příloha 7:** Počet kopií bakterie *Salmonella spp.* u jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)
1	136 381,377	34	120,940	67	–
2	–	35	377,878	68	–
3	751,100	36	167,204	69	295,467
4	761,290	37	117,305	70	1 452,661
5	1 906,59	38	130,090	71	–
6	–	39	143,166	72	235,368
7	543,999	40	145,423	73	–
8	801,046	41	6304,028	74	418,992
9	495,059	42	559,156	75	204,193
10	123,926	43	345,232	76	1584,944
11	–	44	843,198	77	255,951
12	176,480	45	47,921	78	177,043
13	90,876	46	36,666	79	175,876
14	157,561	47	79,659	80	41,249
15	844,942	48	304,554	81	238,793
16	140,290	49	433,284	82	550,504
17	–	50	–	83	354,921
18	833,581	51	438,693	84	188,604
19	562,812	52	1035,260	85	88,101
20	62,568	53	135,799	86	178,211
21	38,560	54	–	87	317,224
22	118,844	55	73,137	88	698,033
23	242,666	56	448,143	89	1072,466
24	213,947	57	134,676	90	–
25	478,514	58	56,837	91	342,578
26	31,766	59	–	92	236,983
27	–	60	349,496	93	322,573
28	389,801	61	59,474	94	55,463
29	–	62	181,296	95	–
30	805,825	63	6 693,947	96	71,848
31	212,628	64	193,046	97	434,310
32	1 597,049	65	132,458	98	549,511
33	812,548	66	376,508	99	358,318
				100	202,403

**Příloha 8:** Počet kopií bakterie *Clostridium perfringens* u jednotlivých vzorků

Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)	Číslo vzorku	Počet kopií (čistá DNA)
1	109 994,727	34	83 426,943	67	1 457,032
2	3 703,167	35	322 991,133	68	349,631
3	1 081 972,188	36	1 156 452,344	69	819,718
4	32 496,523	37	747 947,344	70	1 759,153
5	803 768,984	38	3 085 592,188	71	4 873,578
6	1 764 946,406	39	427 741,484	72	411,354
7	512 634,063	40	90 929,229	73	328,836
8	107 638,359	41	1 189 539,375	74	754,592
9	52 863,384	42	779 356,641	75	1 475,551
10	1 281 526,719	43	412 690,586	76	13 386,060
11	230 374,609	44	1 653 968,594	77	4 249,397
12	579 468,008	45	1 939,212	78	44 467,700
13	1 219 706,641	46	954 098,203	79	76 301,938
14	23 937,622	47	174 774,941	80	885,752
15	280 856,816	48	332 564,219	81	1 502,414
16	130 845,254	49	263 706,016	82	292,126
17	10 193,545	50	494 751,055	83	193 204,961
18	5 068,610	51	3 418,515	84	22 099,744
19	461 295,391	52	105,651	85	113 459,014
20	1 659 410,469	53	3 205,895	86	124 643,008
21	159 270,791	54	6 985,085	87	219 153,379
22	613,996	55	2 502 789,688	88	3 045,683
23	1 132 999,844	56	1 260,443	89	2 404,981
24	31 538,433	57	219 190,703	90	2 127,004
25	584 591,563	58	5 953,718	91	3 061,603
26	266 919,453	59	85 701,865	92	710 032,266
27	789 038,594	60	794,427	93	236,008
28	1 402 215,938	61	2 915,951	94	930,394
29	251 347,051	62	5 911,288	95	845,932
30	26 545,869	63	11 208,188	96	254 469,551
31	1 008 352,969	64	2 884,804	97	148,258
32	7 255 340,000	65	5 183,252	98	5 767,085
33	323 691,504	66	196,406	99	115,175
				100	49,237

## Příloha 9: Statistické vyhodnocení dat

### *Campylobacter jejuni* – krmivo

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. jejuni) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$					
	Sčt poř. BARF	Sčt poř. granule	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	3067,000	1983,000	708,0000	3,733003	0,000189	3,733003

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. jejuni) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$			
	p-hodn.	N platn. BARF	N platn. granule	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,000189	50	50	0,000145

### *Campylobacter jejuni* – způsob chovu

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. jejuni) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$					
	Sčt poř. uvnitř	Sčt poř. oboje	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	3849,000	337,0000	108,0000	-1,85486	0,063617	-1,85486

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. jejuni) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$			
	p-hodn.	N platn. uvnitř	N platn. oboje	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,063617	86	5	0,062304

### *Clostridium perfringens* – krmivo

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. perfringens) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$					
	Sčt poř. BARF	Sčt poř. granule	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	3499,000	1551,000	276,0000	6,711134	0,000000	6,711134

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. perfringens) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině $p < ,05000$			
	p-hodn.	N platn. BARF	N platn. granule	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,000000	50	50	0,000000

***Clostridium perfringens*** – způsob chovu

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. perfringens) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině p <,05000					
	Sčt poř. uvnitř	Sčt poř. oboje	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	3818,000	368,0000	77,00000	-2,39478	0,016631	-2,39478

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (C. perfringens) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině p <,05000			
	p-hodn.	N platn. uvnitř	N platn. oboje	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,016631	86	5	0,013166

***Salmonella spp.*** – krmivo

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (Salmonella spp.) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině p <,05000					
	Sčt poř. BARF	Sčt poř. granule	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	1892,000	1763,000	860,0000	0,373570	0,708725	0,373570

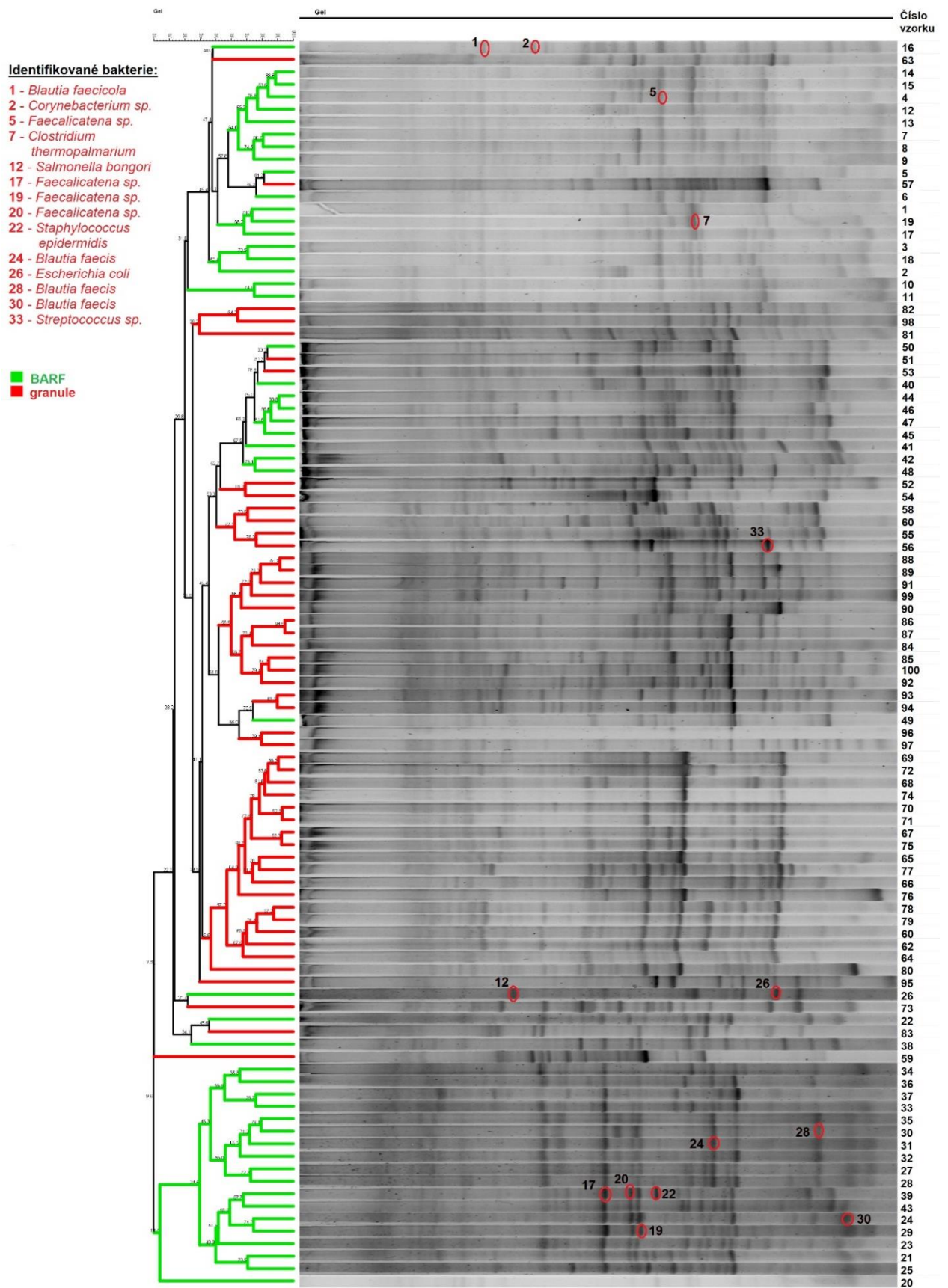
Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (Salmonella spp.) Dle proměn. Krmivo Označené testy jsou významné na hladině p <,05000			
	p-hodn.	N platn. BARF	N platn. granule	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,708725	43	42	0,710138

***Salmonella spp.*** – způsob chovu

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (Salmonella spp.) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině p <,05000					
	Sčt poř. uvnitř	Sčt poř. oboje	U	Z	p-hodn.	Z upravené
Počet kopií (čistá DNA)	2681,000	245,0000	125,0000	-1,08952	0,275926	-1,08952

Proměnná	Mann-Whitneyův U Test (w/ oprava na spojitost) (Salmonella spp.) Dle proměn. Způsob chovu Označené testy jsou významné na hladině p <,05000			
	p-hodn.	N platn. uvnitř	N platn. oboje	2*1str. přesné p
Počet kopií (čistá DNA)	0,275926	71	5	0,285364

## Příloha 10: Identifikované mikroorganismy pomocí metody DGGE



**Příloha 11:** Rozdělení všech identifikovaných bakterií dle patogenity v závislosti na způsobu krmení psů

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Způsob krmení</b>	<b>Potenciálně patogenní bakterie</b>	<b>Bakterie zdravého mikrobiomu</b>	<b>Kontaminace vzorku bakteriemi z prostředí</b>
1	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
2	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
3	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
4	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
5	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
6	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
7	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
8	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
9	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
10	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Blautia faecicola</i>	-
11	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	-
12	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
13	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
14	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
15	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
16	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i> , <i>Corynebacterium sp.</i>
17	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
18	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
19	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
20	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
21	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
22	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
23	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	-



<b>Číslo vzorku</b>	<b>Způsob krmení</b>	<b>Potenciálně patogenní bakterie</b>	<b>Bakterie zdravého mikrobiomu</b>	<b>Kontaminace vzorku bakteriemi z prostředí</b>
24	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
25	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
26	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Salmonella bongori</i>	-	-
27	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
28	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
29	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
30	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
31	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
32	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
33	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
34	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
35	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
36	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
37	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	-
38	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	-
39	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
40	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
41	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
42	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
43	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecis</i>	-
44	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
45	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
46	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
47	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-

Číslo vzorku	Způsob krmení	Potenciálně patogenní bakterie	Bakterie zdravého mikrobiomu	Kontaminace vzorku bakteriemi z prostředí
48	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
49	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
50	BARF	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	-	-
51	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
52	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Salmonella bongori</i>	-	-
53	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Salmonella bongori</i>	-	-
54	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	-	-
55	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
56	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
57	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i> , <i>Blautia faecicola</i>	<i>C. thermopalmarium</i>
58	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
59	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	-	-
60	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
61	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
62	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
63	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
64	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
65	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
66	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
67	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i>	-	-
68	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i>	-	-
69	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
70	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
71	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i>	-	-

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Způsob krmení</b>	<b>Potenciálně patogenní bakterie</b>	<b>Bakterie zdravého mikrobiomu</b>	<b>Kontaminace vzorku bakteriemi z prostředí</b>
72	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
73	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	<i>Blautia faecis</i>	-
74	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
75	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
76	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
77	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
78	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
79	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	-	-
80	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>E. coli</i>	<i>Blautia faecis</i>	-
81	Granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Salmonella bongori</i>	-	-
82	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Blautia faecicola</i>	-
83	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	<i>Faecalicatena sp.</i>	-
84	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
85	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
86	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
87	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
88	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
89	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
90	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i>	-	-
91	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
92	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
93	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
94	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
95	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>E. coli</i>	-	<i>Staphylococcus epidermidis</i>

<b>Číslo vzorku</b>	<b>Způsob krmení</b>	<b>Potenciálně patogenní bakterie</b>	<b>Bakterie zdravého mikrobiomu</b>	<b>Kontaminace vzorku bakteriemi z prostředí</b>
96	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
97	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i> , <i>Streptococcus sp.</i>	-	-
98	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
99	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-
100	granule	<i>C. perfringens</i> , <i>C. jejuni</i> , <i>Salmonella spp.</i>	-	-

Poznámka: *C. jejuni* – *Campylobacter jejuni*, *C. perfringens* – *Clostridium perfringens*,  
*C. thermopalmarium* – *Clostridium thermopalmarium*, *E. coli* – *Escherichia coli*