

Črevná flóra u psa

Intestinálna mikroflóra psa pozostáva z veľkého množstva baktérií, vírusov, húb a prvokov a predstavuje komplexný ekosystém. Každé zviera má individuálnu flóru. Predstavuje dynamický systém, ktorý je závislý od mnohých vonkajších a vnútorných faktorov. Črevné mikroorganizmy sú závislé okrem iného od stravovacích návykov, predchádzajúcej antibiotickej terapie, podávania prebiotík a probiotík, ako aj od individuálnych faktorov ako vek a genetické komponenty.

Metódy vyšetrení – kultivačné verus molekulárne biologické

Obvykle pre vyšetrenie mikroorganizmov čreva resp. trusu volíme **kultivačné metódy**. Pri nich sa vzorky trusu nanesú na rôzne selektívne a neselektívne živné pôdy a prenesú do obohatených bujónov. Následne sa inkubujú pri rôznych kultivačných podmienkach. Výhodou kultivačného vyšetrenia je rýchla a cenovo výhodná identifikácia mnohých enteropatogénov ako salmonely, yersínie, campylobacter, ako aj fakultatívne patogénnych baktérií, ako sú klebsielly a E. coli. Okrem toho je možné zhotoviť antibiogram proti bakteriálnym pôvodcom. S pomocou kultivačného vyšetrenia je tiež možné určenie množstva pôvodcov semikvantitatívnym spôsobom (nízka, stredná, vysoká koncentrácia) alebo aj v absolútnych počtoch pôvodcov (v KbE/g trusu).

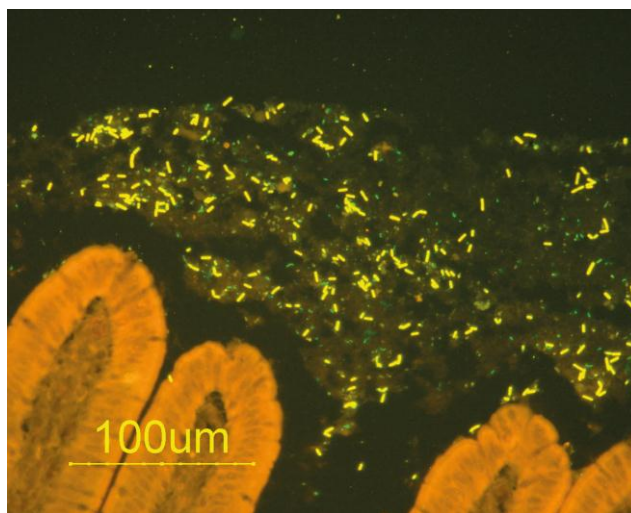


Obr. 1: Salmonely na selektívnych živných médiách

Pre komplexnú mikrobiologickú analýzu čreva a trusu nie sú však kultivačné postupy dostatočne senzitivne. Mnohé druhy baktérií sa nedajú kultivovať. Ich dôkaz je možný len **molekulárne biologickými metódami**.

Jedna (hlavne vo výskume) bežná metóda na vyšetrenie intestinálnych mikróbov sa zakladá na analýze bakteriálneho 16S-rRNA-génu. Najprv sa zo vzorky extrahuje DNA a následne pomocou PCR rozmnoží a stanoví bakteriálny 16S-rRNA-gén.

Ďalšou metódou nezávislou na kultivácii je fluorescenčná in situ hybridizácia (FISH). Baktérie sú dokazované prostredníctvom špecifických génových sond zviditeľnené fluorescenčnými farbivami. Tým je na základe histologických rezov čreva možná aj analýza rozmiestnenia v lumene a v mukóze čreva.



Obr.2: Dôkaz baktérií prostredníctvom FISH v reze črevom

Pomocou molekulárne biologických techník môžu byť baktérie identifikované na rôznych taxonomických úrovniach.

Pri kultivačnom vyšetrení sa baktérie uvádzajú na úrovni druhu resp. rodu. Ďalej je pri kultivácii rôznych patogénnych baktérií (napr. salmonely

alebo *Yersinia enterocolitica*) možná sérotypizácia.

Všetky metódy analýzy mikroflóry majú svoje výhody aj nevýhody a sú len ťažko vzájomne porovnateľné.

Avšak pre analýzu intestinálneho mikrobiómu ako komplexného ekosystému poskytujú molekulárne biologické postupy podrobnejšie výsledky.

Fyziologická mikroflóra

Prostredníctvom molekulárne biologických vyšetrovacích postupov bolo možné vytvoriť komplexný obraz črevnej mikrobioty. Pritom budí pozornosť, že každé zviera má svoje individuálne spektrum pôvodcov a mikrobiálne zloženie sa výrazne líši rez od rezu (črevom). V tenkom čreve sa nachádzajú prevažne aeróbne a fakultatívne anaeróbne baktérie, zatiaľ čo v hrubom čreve sa vyskytujú väčšinou anaeróbne baktérie. Množstvo a rôznorodosť baktérií stúpa kraniokaudálne.

Celkovo obývajú črevo dospelého psa prevažne bakteriálne kmene **Firmicutes**, **Bacteroidetes** a **Fusobacteria** a z menšej časti **Actinobacteria** a **Proteobacteria**.

Kmeň Firmicutes zahŕňa predovšetkým gram-pozitívne baktérie, ktoré patria do skupín Cluster IV a XIVa. Okrem fakultatívne patogénneho druhu *Clostridium perfringens* sa tu vyskytujú aj mnohé apatogénne klostrídie. K Proteobacteria počítame okrem iného Enterobacteriaceae ako *E.coli*, ktorá je jedným z najčastejšie izolovaných druhov pri kultivačnom vyšetrení.

V **žalúdku** psa dokazujeme prevažne *Helicobacter spp.*, ktoré sa nachádzajú na povrchu sliznice žalúdka, ale aj intramukózne. Aeróbne a anaeróbne baktérie Clostridia, Lactobacillales a Proteobacteria osídľujú **tenké črevo**, zatiaľ čo v **hrubom čreve** prevládajú anaeróbne baktérie ako Clostridiales, Bacteroides, Prevotella a Fusobacteria. Na rozdiel od žalúdka, v zdravom tenkom a hrubom čreve nenachádzame baktérie vnútri sliznice.

Mikroflóra u šteniat

V jednej aktuálnej štúdií určovali mikróby trusu šteniat molekulárne biologicky analýzou bakteriálneho 16S r RNA genómu.

Vzorky trusu boli vyšetrované v rôznych časoch od narodenia po odstav.

V tomto období (2. deň až 56. deň post partum) bola zaznamenaná výrazná zmena neonatálnej flóry smerom k adultnej mikrobiote v čase odstavu. So vzrastajúcim vekom šteniat dochádza k zvyšovaniu rôznorodosti baktérií a k posunu smerom k prevažne anaeróbnym druhom.

Podiely *Clostridium spp.* a *E. coli* sa znižujú, zatiaľ čo dominujú obligátne anaeróbne baktérie Bacteroidetes, Fusobacteria a Firmicutes.

Mikroflóra pri akútnych a chronických ochoreniach čreva

Pri akútnych hnačkách boli pomocou **kultivačných**, ako aj **molekulárne biologických vyšetrení** zistené výrazné zmeny v porovnaní so zdravou mikrobiotou.

Akútne hemoragické hnačky vedú k masívnym zmenám intestinálnej mikrobioty. V porovnaní so zdravým psom bola znížená rôznorodosť a množstvo určitých mikroorganizmov. To sa stalo hlavne bakteriálnym rodom *Blautia spp.*, *Turicibacter spp.* a Ruminococcus/ Faecalibacterium. Naopak *E.coli* a *Clostridium perfringens* boli pomnožené.

Pri **chronických enteropatiách** ako IBD sa v aktívnej fáze choroby vyskytujú hlavne znížené počty Faecalibacterium a Fusobacteria. Oba bakteriálne rody u psov v klinicky neaktívnej fáze boli preukázateľné a zmena oproti zdravým psom nebola zaznamenaná.

U humánnych pacientov s IBD sa často popisuje aj znížené množstvo Faecalibacterium prausnitzii v črevnej flóre.

E. coli sa pri IBD vyskytoval v mikroflóre trusu vo zvýšenej miere, zatiaľ čo klostrídie a Bacteroides boli dokazované menej.

Funkcia intestinálnej mikroflóry

Intestinálna mikrobiota spĺňa v hostiteľovi mnoho pozitívnych funkcií.

Predstavuje napríklad bariéru pre patogénne baktérie a endotoxíny tým, že obsadzuje miesta adhézie na sliznici čreva a konkuruje pri získavaní výživy. Ďalej produkty jej metabolizmu vytvárajú prostredie nevhodné pre iné ako rezidentné baktérie, podieľa sa na rozvoji fyziologickej štruktúry sliznice a u mladých zvierat prispieva k rozvoju orálnej tolerancie.

Veľa druhov klostrídií, ako aj *Faecalibacterium* a *Ruminococcaceae* produkujú metabolizáciu komplexných uhlohydrátov masťné kyseliny s krátkym reťazcom ako kyselina octová, propiónová a maslová. Tie na jednej strane slúžia ako zdroj energie pre hostiteľa, na druhej strane majú dôležité úlohy medziiným pri regulácii motility čreva, sú rastovými faktormi pre epiteliálne bunky a majú imunomodulačné účinky. Tieto imunomodulačné metabolity môžu ovplyvňovať expresiu interleukínov a mucin génov, ktoré okrem iného prispievajú k upevňovaniu tight-junctions.

Tab. 1: Prehľad flóry trusu vytvorený molekulárne biologickou analýzou

Mikroflóra			
Fyziologická dospelý pes	Šteňa	Akútna hemoragická hnačka	Chronická enteropatia
Firmicutes Bacteroidetes Fusobacteria	<i>Clostridium spp.</i> <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> ↑ <i>Clostridium perfringens</i> ↑	Aktívna fáza: <i>E. coli</i> ↑
Actinobacteria Proteobacteria	→ Bacteroides / Fusobacteria	<i>Blautia spp.</i> ↓ <i>Turicibacter spp.</i> ↓ <i>Ruminococcus /</i> <i>Faecalibacterium</i> ↓	<i>Faecalibacterium</i> ↓ Fusobacteria ↓ <i>Clostridium spp.</i> ↓ Bacteroides ↓