

Črevný mikrobióm a analýza dysbiózy u koní



Zdroj obrázka: Envato Elements

Klinický obraz gastrointestinálnych ťažkostí u koní je rôznorodý. Patrí sem napríklad kolika, hnačka, zápcha či plynatosť. Veľký význam majú infekcie baktériami, vírusmi a parazitmi. Príčinou sú však často aj neinfekčné faktory, ako je kŕmenie a manažment chovu. Medzitým sa aj u koní stáva čoraz dôležitejšia analýza mikrobiómu s cieľom zmapovať črevné dysbiózy. Dysbióza popisuje stav narušenej mikrobiálnej kolonizácie čreva. Okrem gastrointestinálnych ťažkostí sa teraz môžu s črevnou dysbiózou koní spájať aj iné klinické ochorenia.

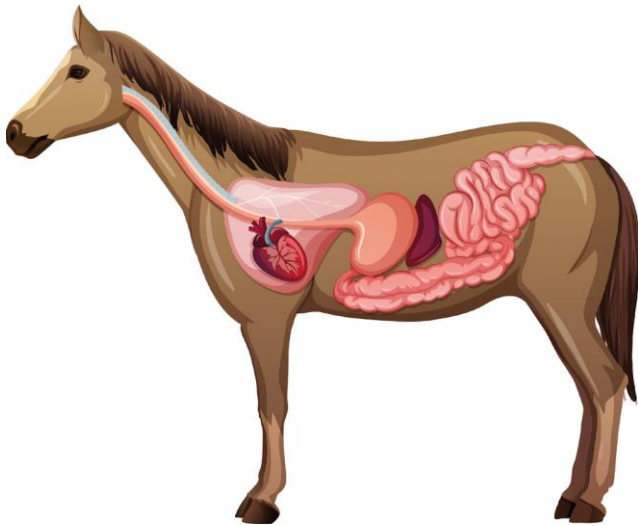
Črevný mikrobióm

Črevo je predstavuje najväčšiu kontaktnú plochu tela s prostredím. Črevná mikrobiota pozostáva z baktérií, húb a prvokov. Okrem nich sú tu prítomné aj vírusy a Archaea.

Pod pojmom intestinálny mikrobióm rozumieme celkovú črevnú mikrobiotu. Hrubé črevo obsahuje až 10^{12} baktérií na gram trusu, čo z neho robí najhustejšie osídlený ekosystém na svete.

Črevná mikroflóra plní rôzne úlohy.

V prvom rade má ochrannú funkciu, pretože na jednej strane by sa živiny z potravy mali cez črevá vstrebávať, na druhej strane by škodliviny nemali mať možnosť cez črevnú stenu preniknúť do organizmu. Vytvára sa slizničná bariéra, ktorá je udržiavaná o. i. baktériami. Mikrobiota tiež ovplyvňuje imunitný systém čreva. To zaisťuje stálu rovnováhu medzi toleranciou voči komenzálom a obranou proti patogénnym faktorom.



Obr.1: Tráviaci trakt koňa *Zdroj: Shutterstock*

Okrem toho sa črevné baktérie významne podieľajú na metabolických procesoch.

V proximálnej časti tráviaceho traktu prebieha trávenie tukov, bielkovín a cukrov, pasáž tráveniny trvá niekoľko hodín. Sacharidy a zložky hrubej vlákniny ako celulóza a hemicelulóza, ktoré sa nedajú stráviť v tenkom čreve, sa dostávajú do hrubého čreva nenatrávené. V hrubom čreve prebieha mikrobiálna fermentácia zložiek vlákniny, výsledkom čoho je tvorba mastných kyselín s krátkym reťazcom - butyrát, propionát a acetát. Mastné kyseliny s krátkym reťazcom poskytujú predovšetkým energiu. U koňa to môže predstavovať až 65 % celkovej energetickej potreby. Neporušená črevná mikrobiológia je preto pre koňa veľmi dôležitá. V závislosti od druhu krmiva môže proces trávenia trvať až 50 hodín. Krmivo resp. trávenina prejde proximálnym gastrointestinálnym traktom (ústnou dutinou, pažerákom, žalúdkom a tenkým črevom) v priebehu niekoľkých hodín (cca 2 - 4 hodiny). Pri prechode do distálnej časti, pozostávajúcej z céka a kolónu, začína mikrobiálna fermentácia. Trávenina môže zostať v tejto časti čreva až 48 hodín.



Obr. 2: Faeces koňa *Zdroj: Shutterstock*

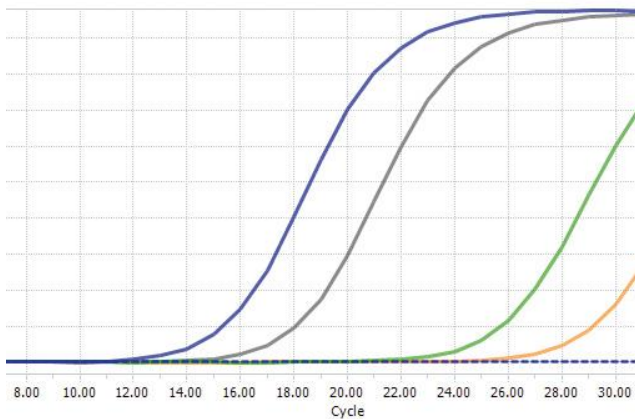
Mikrobiologické vyšetrenie vzoriek trusu

Vzorky trusu sú zaujímavým materiálom na vyšetrenie. Ľahko sa získavajú a môžu nám poskytnúť množstvo informácií. Kultivačné bakteriologické vyšetrenie je už dlho etablovaný a osvedčený postup. Používa sa na detekciu živých, reproduktívnych sa mikroorganizmov a je vhodné na detekciu obligátnych patogénnych baktérií, ako sú salmonely. Sérotypizácia a testovanie rezistencie sú možné len v kombinácii s kultivačnou metódou. Bakteriálne izoláty z kultivácie sú navyše základom pre výrobu autovakcíny. Avšak spravidla sa kultivujú iba baktérie, ktoré rastú za aeróbnych kultivačných podmienok na použiteľnom médiu. V individuálnych prípadoch je možné detegovať niektoré anaeróby, ale kultivácia je zložitá, časovo náročná a darí sa len u niektorých druhov baktérií. Črevný mikrobióm pozostáva takmer zo 100 % z anaeróbne rastúcich druhov. To znamená, že väčšinu nie je možné vykultivovať.

Analýza dysbiózy sa realizuje pomocou real-time PCR, kvantitatívnej PCR (qPCR), pri ktorej sa vyšetruje počet kópií 16s-rDNA určitých markerových druhov (obr. 3). PCR je nezávislá od kultivácie. Má vysokú špecifitu a schopnosť kvantifikácie a je možné ju použiť na detekciu anaeróbných baktérií s neznámymi podmienkami rastu.

Cieľom analýzy dysbiózy je rozpoznať normobiotické alebo dysbiotické stavy. Na tento účel slúžia bakteriálne kmene, ktoré boli najviac zastúpené v doterajších vedeckých štúdiách. V súčasnosti sú to u koňa: Firmicutes, Bacteroidetes, Verrucomicroba a Proteobacteria.

qPCR sa vykonáva podľa štandardizovaného protokolu. Na kvantifikáciu jednotlivých skupín markerových organizmov slúži štandard so známou koncentráciou.



Obr. 3: qPCR – amplifikačná krivka Zdroj: Laboklin

Ak okrem gastrointestinálnych porúch pozorujeme aj zhoršený celkový stav, mali by sa pred analýzou dysbiózy alebo popri nej objasniť aj infekčné príčiny.

Okrem parazitologického vyšetrenia trusu, ktoré je u koní vždy indikované, môžu hnačku spôsobovať aj vírusy či baktérie. Napríklad infekcia koronavírusmi môže spôsobiť klinické príznaky aj u dospelých koní, hoci zvyčajne sú postihnuté iba jednotlivé zvieratá. Detekcia sa uskutočňuje zo vzorky stolice pomocou PCR. Hnačku u koní môžu spôsobiť aj rôzne baktérie. Narušenie celkového stavu nie je vždy prítomné. Aj pri bakteriálnej hnačke sú často postihnuté len jednotlivé zvieratá.

Kone sú napríklad relatívne citlivé na **salmonelové infekcie**. Na prenos môže stačiť nízky počet pôvodcov. Zdrojom infekcie sú často asymptomatické kone, ktoré salmonely prenášajú a vylučujú. Najmä u žriebät, imunosuprimovaných a stresovaných zvierat sa môžu vyvinúť masívne klinické príznaky. ***Clostridium perfringens***, striktno anaeróbna baktéria, je najbežnejším druhom v hrubom čreve koní, ako aj iných zvierat a ľudí. Kolonizácia prebieha v ranom veku: *Clostridium perfringens* sa dá dokázať v truse viac ako 90 % žriebät starších ako 3 dni. Za určitých okolností môžu tieto baktérie produkovať enterotoxíny, ktoré potom spôsobujú hnačku.

Analýza dysbiózy – interpretácia nálezu a terapia

Na posúdenie prítomnosti dysbiotického stavu sa berú do úvahy výsledky vyšetrení jednotlivých skupín markerových mikroorganizmov. Sú hodnoty v rámci normy alebo existujú odchýlky od referenčného rozsahu? U ktorých markerových druhov pozorujeme zmeny a aké veľké sú odchýlky? Vzniká otázka, ako sa interpretujú výsledky analýzy dysbiózy a ako je navrhovaný terapeutický prístup.

Na rozdiel od iných laboratórnych analýz nie je možné s nálezom vyšetrenia poskytnúť všeobecné terapeutické odporúčanie. Každý nález je potrebné posudzovať individuálne, keďže črevný mikrobióm môže byť ovplyvnený mnohými faktormi (obr. 4).

Na začiatku by sa malo objasniť, či sú prítomné primárne ochorenia. Kŕmenie má zásadný vplyv na zloženie črevnej mikrobioty. Optimálny prísun objemového krmiva, mineralizácia podľa potreby a pitná voda bezchybnej kvality sú predpokladom pre fungujúci a zdravý tráviaci trakt. V prípade nejasností môžu poskytnúť informácie rozbory krmív a pitnej vody. Zmeny krmiva by sa mali robiť pomaly. Príkladom je začiatok a koniec pastevnej sezóny na jar a na jeseň. Príjem krmiva a jeho mechanické spracovanie v ústnej dutine je prvou fázou trávenia. V podrobnej anamnéze je preto dôležité zohľadniť aj stav zubov. Súčasťou je aj posúdenie podmienok chovu s osobitným zreteľom na možné stresové faktory. Kritické a holistické zváženie možných ovplyvňujúcich faktorov tvorí základ pre individuálny terapeutický prístup.

Faktory, ktoré môžu ovplyvňovať črevný mikrobióm:

- kŕmenie
- pitná voda
- podmienky chovu
- vek
- využitie
- plemeno / typ koňa
- predchádzajúce ochorenia
- antibiotiká

Prebiotiká a probiotiká

Prebiotiká a probiotiká sú pri poruchách trávenia s obľubou využívané. Údajne majú pozitívny vplyv na trávenie, črevnú sliznicu a črevnú mikroflóru. Prebiotiká sú balastné látky, ktoré sú podobne ako vláknina objemného krmiva v proximálnom tráviacom trakte ťažko trávené alebo netrávené a využívajú ich baktérie hrubého čreva. Probiotiká sú tiež mikrobiálne fermentované. To podporuje rast fyziologických mikroorganizmov. Probiotiká obsahujú žijúce mikroorganizmy, ktoré by mali mať priaznivé účinky na zdravie čriev. Najznámejším zástupcom je kvasinka *Saccharomyces cerevisiae*. Napriek častému používaniu pre- a probiotík bolo u koní vykonaných len málo štúdií, na rozdiel od iných druhov. Je sporné, či ich použitie má pozitívne a/alebo negatívne účinky.

Zhrnutie

Črevné dysbiózy môžu byť spojené s rôznymi klinickými ťažkosťami. Zloženie črevnej mikrobioty môže závisieť od mnohých faktorov a neexistuje žiadne všeobecné odporúčanie terapie. Molekulárne biologické metódy umožňujú prehľad o črevnej mikrobiote. Súčasné hodnotenia vychádzajú z aktuálneho stavu poznania. Pre lepšie pochopenie a viac poznatkov sú však potrebné ďalšie štúdie.

*Dr. Corinna Hader,
Dr. Anton Heusinger*

Ďalšia literatúra

Costa MC, Silva G, Ramos RV, Staempfli HR, Arroyo LG, Kim P und Weese JS. Characterization and comparison of the bacterial microbiota in different gastrointestinal tract compartments in horses. *Vet J.* 2015; 205(1), 74-80.

Kauter A, Epping L, Semmler T, Antao EM, Kannapin D, Stoeckle SD, Gehlen H, Lübke-Becker A, Günther S, Wieler LH und Walther B. The gut microbiome of horses: current research on equine enteral microbiota and future perspectives. *Anim Microbiome.* 2019; 1(1), 14.

Langner K und Vervuert I. Beeinflussung der equinen Mikrobiota durch Fütterung und Probiotika: aktueller Stand der Forschung und rechtliche Grundlagen. [Impact of nutrition and probiotics on the equine microbiota: current scientific knowledge and legal regulations]. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2019; 47(01), 35-48.