

# SLOVENSKÝ VETERINÁRSKY ČASOPIS



Štátna  
veterinárna a  
potravinová  
správa SR

Univerzita  
veterinárskeho  
lekárstva  
Košice

Slovak  
Veterinary  
Journal

ISSN 1335-0099

2004, XXIX: 4

PHARMACOPOLA

# VPLYV PROBIOTICKÉHO KMEŇA *LACTOBACILLUS* SP. AD1 NA BIOCHEMICKÉ PARAMETRE V KRVI ZDRAVÝCH PSOV

Štrompfová, V., Lauková, A.

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice, Slovenská republika

Probiotiká možno definovať ako biopripravky obsahujúce živé bunky alebo metabolity stabilizovaných autochtónnych mikroorganizmov, ktoré optimalizujú osídlenie a zloženie črevnej mikroflóry zvierat a ľudí, so stimulačným efektom na tráviace procesy a obranyschopnosť hostiteľa (Nemcová, 1997). Počiatky používania probiotík sú až neuveriteľne ďalekosiahle, siahajú do úsvitu civilizácie, ale až začiatkom 20. storočia upozornil na prospešné účinky baktérií v jogurte ruský vedec I. Mečnikov. Poukázal na schopnosť štartérových mikroorganizmov (*Lactobacillus bulgaricus* a *Streptococcus thermophilus*) pri výrobe jogurtov potláčať hnilobné typy fermentácií črevnej mikroflóry a na význam konzumácie jogurtov pri udržiavaní zdravia (Mečnikov, 1907). Probiotické mikroorganizmy sú čoraz častejšie používané ako krmovínové doplnky nielen pre hospodárske zvieratá, ale tiež pre spoločenské zvieratá. Terapia využívajúca probiotiká je doporučovaná pri liečbe, ale aj pri prevencii rozličných ochorení predovšetkým tráviaceho traktu. Z hľadiska využitia probiotík vo veterinárnej medicíne je mimoriadne významný ich biomedicínsky účinok: inhibičný efekt na patogény, optimalizačný vplyv na tráviace procesy a stimulačný účinok na imunitný systém. Pre probiotické účely sa najčastejšie využívajú kyselinu mliečnu produkujúce baktérie, ako sú laktobacily, bifidobaktérie a enterokoky, ale tiež niektoré druhy kvasiniek z rodu *Saccharomyces*. Medzi apelujúci význam probiotík patrí možnosť redukovať používanie antibiotík, značne vysoký stupeň bezpečnosti a samozrejme pozitívne vnímanie verejnosti v zmysle „natúrálnej“ alebo „alternatívnej“ terapie. Probiotiká sú klasifikované a všeobecne považované za bezpečné, čo sa o antibiotikách s ich častými vedľajšími účinkami povedať nedá (Reid, 2000). Celosvetový trh je zaplavený komerčnými probiotickými preparátmi pre ľudské a veterinárne použitie a rozhodujúcu úlohu pri jeho zásobení majú USA a Japonsko. Môžu byť v rozličnej aplikačnej forme (tablety, kapsule, pasta, tekutá forma). Niektoré komerčne vyrábané granulované krmivá pre psov a mačky obsahujú taktiež probiotiká, čo predstavuje výhodu z hľadiska jednoduchosti každodenného prísunu prospešných mikroorganizmov. Častou nevýhodou týchto krmív však je, že mnohokrát obsahujú už len malé počty živých buniek daného probiotika a niekedy neobsahujú druhy mikroorganizmov uvedené na etike. Príčinou nízkych počtov probiotických mikroorganizmov môže byť ich nedostatočné prežívania počas spracovania a výroby krmiva, resp. jeho dlhodobé skladovanie.

Zámerom našej práce bolo sledovať účinky potenciálne probiotického kmeňa *Lactobacillus* sp. AD1 na metabolizmus zdravých psov

prostredníctvom stanovenia niektorých biochemických parametrov v ich sére (totálne proteíny, totálne lipidy, cholesterol, alanínaminotransferáza, močovina, glukóza).

## MATERIÁL A METODIKA

*Lactobacillus* sp. AD1 bol vyselektovaný na MRS agare (Merck, Nemecko) z fekálií zdravého psa plemena tibetský teriér (vek 6 rokov) zo skupiny 40 kmeňov izolovaných z 10 zdravých psov. Uvedený kmeň vykazoval najlepšie vlastnosti z hľadiska prežívania pri testovaní tolerancie na žlč (1 % oxgall v MRS bujóne, Merck), kedy došlo k poklesu o 24,6 % buniek za 24 hod. Prežívania kmeňa pri pH 3,0 bolo testované metódou podľa Jina a kol. (1998). Za 3 hod pôsobenia pri pH 3,0 (čas zdržania potravy v žalúdku) došlo u kmeňa k poklesu počtu buniek len o 13,2 %. Adhézia na mukózne membrány sledovaná metódou podľa Owehanda a kol. (1999) dosahovala v prípade pšej mukózy  $2,1 \pm 1,1$  % a v prípade ľudskej mukózy  $2,7 \pm 1,9$  %.

*Lactobacillus* sp. AD1 tzv. rifampicin rezistentný mutant bol aplikovaný *per os* denne v množstve 3 ml ( $10^9$  cfu/ml) psom, ktoré boli držané v útulku (areál UVL, Košice) pričom zaobchádzanie s nimi bolo v súlade s nariadením vlády č. 289/2003 Z.z. podľa § 7 ods. 2 písm. h) po schválení Etickou komisiou. Počty kmeňa AD1 vo fekáliách týchto psov boli sledované na MRS agare (Merck) s prídavkom rifampicínu. Vplyv probiotika AD1 na niektoré biochemické parametre bol vyhodnotený v krvi u 6 psov, pričom boli sledované hodnoty celkových lipidov, proteínov, hladina cholesterolu, alanínaminotransferáza, močovina a glukóza. Fekálie a krv boli odobrané pred podaním a týždeň po aplikácii kmeňa AD1. Kolonizácia čreva kmeňom AD1 po skončení aplikácie bola sledovaná vo fekáliách v dvojtýždňových intervaloch.

## VÝSLEDKY A DISKUSIA

Kmeň AD1 pri testovaní *in vitro* prejavil z hľadiska tolerovania podmienok v tráviacom trakte (nízke pH, prítomnosť žlče) najlepšie vlastnosti z testovanej skupiny laktobacilov. Napriek tomu, že tento kmeň z hľadiska adhezívnej kapacity testovanej *in vitro* dosahoval pomerne nízke hodnoty, overovanie prežívania a stability kmeňa u psov vyvrátilo tento výsledok, keďže bol prítomný v tráviacom trakte v množstve  $10^8$ - $10^9$  cfu/g fekálií. Po skončení aplikácie jeho počty mierne klesli ( $10^3$ - $10^5$  cfu/g), avšak minimálne 5 mesiacov (doteraz sledované obdobie) pretrvával vo fekáliách psov. Pre porovnanie treba uviesť, že známy ľudský probiotický kmeň *Lactobacillus rhamnosus* GG, dosahujúci *in vitro* adhezívnu kapacitu  $34,0 \pm 4,0$  % na psiu črevnú mukózu, pretrvával po skončení jeho aplikácie psom len 5 dní (Weese, 2002). Preto sa žiada podotknúť, že nie všetky výsledky získané pri *in vitro* testovaní musia bezpodmienečne korelovať s výsledkami získanými v *in vivo* štúdiách. I keď z klinického hľadiska treba povedať, že perzistencia probiotického kmeňa je menej dôležitá ako jeho kolonizácia počas aplikácie. Avšak optimálny probiotický mikroorganizmus by mal byť schopný aspoň prechodnej kolonizácie tráviaceho traktu.

Cieľom našej štúdie bolo sledovať i vplyv kmeňa na niektoré biochemické parametre v krvi psov. Aplikácia kmeňa znamenala jednoznačne zvýšenie hladiny totálneho proteínu v priemere o 11,2 g/l (Tab. 1). Tento efekt probiotického kmeňa môže byť perspektívne významný u zvierat s malabsorpčným syndrómom, ako aj zvierat kŕmených krmivom s nižším obsahom proteínu alebo menej kvalitným proteínom. Podobne zvýšenú retenciu dusíka po aplikácii probiotika - Paciflor u rastúcich prasiat zaznamenal Schuermann (1993). Pravdepodobne je viac dusíka nachádzajúceho

Tab. 1 Vybrané biochemické hodnoty u zdravých psov pred a po aplikácii probiotického kmeňa *Lactobacillus* sp. AD1 - Selected blood biochemistry in dogs before and after application of *Lactobacillus* sp. AD1

| Plemeno,<br>pohlavie, vek                    | TP <sup>1</sup><br>57,0 - 75,0 |       | TL <sup>2</sup><br>4,70 - 7,25 |       | CHOL <sup>3</sup><br>2,60 - 6,47 |          | ALT <sup>4</sup><br>pes 1,48;<br>suka 1,23 |           | Urea <sup>5</sup><br>do 8,99 |          | GLU S <sup>6</sup><br>4,05 - 6,99 |          |
|--|--------------------------------|-------|--------------------------------|-------|----------------------------------|----------|--|-----------|------------------------------|----------|-----------------------------------|----------|
|  | (g/l)                          | (g/l) | (g/l)                          | (g/l) | (mmol/l)                         | (mmol/l) | (mcKat/l)                                  | (mcKat/l) | (mmol/l)                     | (mmol/l) | (mmol/l)                          | (mmol/l) |
| 1. Kríženec<br>suka, 1 a 1/2 roka            | 42,8                           | 65,6  | 3,81                           | 5,76  | 4,50                             | 5,65     | 0,860                                      | 0,623     | 7,19                         | 6,99     | 6,16                              | 4,66     |
| 2. Kríženec<br>suka, 3 roky                  | 61,6                           | 72,1  | 2,49                           | 5,89  | 3,82                             | 5,01     | 0,730                                      | 0,566     | 5,37                         | 5,07     | 6,74                              | 5,78     |
| 3. Kríženec<br>suka, 3 roky                  | 65,0                           | 63,6  | 7,65                           | 6,06  | 5,09                             | 4,91     | 0,429                                      | 0,671     | 6,14                         | 5,06     | 6,77                              | 5,95     |
| 4. Doberman<br>pes, 2 roky                   | 58,1                           | 63,4  | 3,96                           | 4,78  | 3,02                             | 3,68     | 0,580                                      | 0,860     | 5,33                         | 6,75     | 7,28                              | 5,82     |
| 5. Jazvečík hladkosrstý<br>pes, 1 a 1/2 roka | 61,8                           | 80,0  | 5,44                           | 6,68  | 3,00                             | 5,67     | 0,763                                      | 0,452     | 5,78                         | 5,22     | 7,25                              | 5,34     |
| 6. Kríženec<br>suka, 3 roky                  | 75,4                           | 87,3  | 6,85                           | 5,36  | 6,15                             | 6,45     | 0,575                                      | 0,693     | 6,18                         | 7,75     | 6,26                              | 6,22     |

<sup>1</sup>Celkové proteíny; <sup>2</sup>Celkové lipidy; <sup>3</sup>Cholesterol; <sup>4</sup>Alanínaminotransferáza; <sup>5</sup>Močovina; <sup>6</sup>Glukóza

sa v potrave konvertovaného na telovú hmotu, pretože častým účinkom probiotík býva urýchlenie zvyšovania hmotnostných prírastkov predovšetkým u mladých zvierat. Taktiež častým účinkom probiotík je zvýšenie podielu imunoglobulínov, k čomu je však potrebné sledovať jednotlivé frakcie plazmatických proteínov. Hladina močoviny nebola v našej štúdii významne ovplyvnená. Ďalším sledovaným parametrom boli totálne lipidy. U troch psov (1, 2, 4) boli hodnoty totálnych lipidov pred aplikáciou na spodnej hranici fyziologickej normy, resp. pod ňou. Aplikáciou probiotika došlo u týchto psov k zvýšeniu totálnych lipidov v krvi na fyziologickú normu. S metabolizmom lipidov úzko súvisí i hladina cholesterolu, ktorá mierne stúpla; avšak len v rámci fyziologickej normy. Je potrebné podotknúť, že na rozdiel od ľudí, u psov je predominantná frakcia HDL („dobrý lipoproteín“; C h a p m a n, 1986), čo dovoľuje väčší príjem živočíšnych tukov bez ohrozenia normálnej hladiny cholesterolu v krvi. Ide pravdepodobne o evolučnú výhodu, keďže prevahu v strave divokožijúcich psových šeliem tvorili iné malé zvieratá. Dôsledkom týchto rozdielov v metabolizme cholesterolu je, že zvýšené hladiny cholesterolu a ateroskleróza sú u psov extrémne vzácné (v súvislosti s inými chorobnými procesmi). Pri sledovaní hodnôt pečeneového enzýmu – alanínaminotransferázy (ALT) v krvnom sére došlo k nevýznamným zmenám v rámci fyziologickej normy, tzn. že testovaný kmeň nepôsobil negatívne na funkcie pečeneového parenchýmu. Hodnoty sérovej glukózy po aplikácii kmeňa mierne klesli (v priemere o 1,11

mmol/l), čo je významné v súvislosti so stále častejšie sa vyskytujúcim ochorením – diabetes mellitus u psov, prejavujúcim sa hyperglycemiou. Tento pokles mohol byť spôsobený priamou fermentáciou (spotrebou) cukrov pri raste a množení kmeňa v tráviacom trakte s následnou tvorbou organických kyselín.

## ZÁVER

Potenciálny probiotický kmeň *Lactobacillus* sp. AD1 p.o. aplikovaný 6 zdravým psom prejavil dobré kolonizačné vlastnosti, keď počas aplikácie dosahoval celkové počty  $10^8$ – $10^9$  cfu/g vo fekáliách. Po ukončení jeho aplikácie pretrvával 5 mesiacov v tráviacom trakte, pričom dosahoval hodnoty  $10^3$ – $10^5$  cfu/g. Pri sledovaní niektorých biochemických parametrov, významnejšie bola ovplyvnená hladina celkových proteínov v smere ich zvýšenia a hladina glukózy v smere jej poklesu. Hodnoty alanínaminotransferázy, močoviny a celkových lipidov neboli významnejšie ovplyvnené. Pri testovaní *in vitro* preukázal ašpecifickú schopnosť adhézie na mukózne membrány. Bol relatívne stabilný v kyslom prostredí (pH 3,0) a v prítomnosti žĺče. Prejavené vlastnosti ho po overení výsledkov u ďalších jedincov potenciálne predučia na probiotické využitie prevažne u psov kachektických, u mladých a gravidných psov vyžadujúcich zvýšený podiel proteínu, prípadne u psov s diabetes mellitus.

## SUMMARY

STROMPFOVÁ, V., LAUKOVÁ, A.: Influence of probiotic strain *Lactobacillus* sp. AD1

on the biochemical parameters in blood of healthy dogs.

Probiotic strain *Lactobacillus* sp. AD1 was applied p.o. to 6 healthy dogs. It showed good colonization of gastrointestinal tract during application ( $10^8$ – $10^9$  cfu/g of faeces). This strain also persists in the digestive tract five months after cessation of its administration and it reached counts  $10^3$ – $10^5$  cfu/g. One week after application of strain AD1, an increase of total protein and reduction of glucose in blood of dogs was noted. The values of ALT, urea and total lipids were not significantly influenced. Concerning the adhesion capacity of AD1 strain, no host specificity was detected; it means that this strain exhibited almost the same adhesion capacity to human as well as to canine mucus. Strain AD1 showed also *in vitro* good survival by low pH (3,0) and in the presence of bile. On the basis of above-mentioned properties it can be used as probiotic in the dog breeding. Of course, its testing and characterization are the subject of the other temporary studies.

Výsledky boli dosiahnuté za podpory grantu VEGA č. 2/2043/24. Poďakovanie patrí Mgr. D. Tóthovej a K. Mačatkovej za umožnenie a výpomoc pri realizácii pokusu u psov v útulku (areál UVL) v Košiciach.

Literatúra u autorov

Lektor: Nemcová R.  
UVL Košice

# METÓDY NA DÔKAZ ALERGÉNNYCH ZLOŽIEK POTRAVÍN POLYMERÁZOVOU REŤAZOVOU REAKCIOU

Kuchta, T.

Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava, Slovenská republika

V rozvinutých krajinách 4 až 8 % detí a približne 1 % dospelých trpí potravinovými alergiami, a 0,3 až 0,5 % trpí celiakiou, čo je potravinová intolerancia. Zložky potravín, ktoré spôsobujú uvedené zdravotné problémy, však podľa doterajšej potravinárskej legislatívy nemuseli byť explicitne uvedené v označení potravín. Aby sa v tejto súvislosti zamedzilo ohrozeniu zdravia niektorých spotrebiteľov, upravila sa legislatíva označovania potravín. Európska smernica 2003/89/EC z 10. novembra 2003 a výnos Ministerstva pôdohospodárstva SR a Ministerstva zdravotníctva SR č. 1187/2004 - 100 z 28. apríla 2004 určujú povinnosť uvádzať v označení potravín prítomnosť alergénnych zložiek alebo obilnín obsahujúcich glutén. Súčasný zoznam alergénov, ktorých označovanie je povinné, zahŕňa kôrovce, vajcia, ryby, podzemnicu olejnú, sóju, mlieko, rôzne druhy orechov, zeler, horčicu a sezam.

## CHARAKTERISTIKA METÓD ZALOŽENÝCH NA POLYMERÁZOVEJ REŤAZOVEJ REAKCII

Na kontrolu správnosti označovania potravín z hľadiska prítomnosti alergénov sú, ako alternatívne metódy vo viacerých prípadoch,

k dispozícii metódy využívajúce princíp polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). PCR umožňuje identifikáciu prítomnosti alergénov na základe analýzy DNA. Prvým krokom pracovných postupov je izolácia DNA z potravín. Najvhodnejšie izolačné metódy sú precipitácia s detergentom CTAB a extrakcia do kvapalnej fázy, chaotropická extrakcia do tuhej fázy a nechaotropická extrakcia do tuhej fázy. Vyizolovaná DNA sa potom analyzuje pomocou PCR, pričom sa v pozitívnych vzorkách amplifikuje (rozmnoží) špecifický fragment DNA. Amplifikovaný fragment sa identifikuje na základe svojej molekulovej hmotnosti (najčastejšie elektroforézou v agarózovom géli) alebo na základe svojej sekvencie (najčastejšie hybridizáciou s DNA-sondou). Výhodami PCR sú najmä vysoká selektivita, vysoká citlivosť a tiež použiteľnosť metódy na analýzu tepelne opracovaných potravinárskych výrobkov.

## VÝVOJ PCR-METÓD NA DÔKAZ ALERGÉNNYCH ZLOŽIEK POTRAVÍN

Vypracovanie PCR-metód pre zložky jednotlivých rastlinných druhov je do značnej miery závislé na dostupnosti informácií o sekvenciách ich

genómu. V prípade dobre preskúmaných druhov je možné vytypovať markerové sekvencie DNA, softvérovo ich porovnať s príbuznými druhmi a inými druhmi, ktoré sú zvyčajne tiež prítomné v danej potravinovej matici. Na základe nájdených špecifických sekvencií sa potom navrhnu príslušné priméry pre PCR. V prípade neúspechu tohoto postupu alebo v prípade menej preskúmaných druhov je potrebné rozsiahle sekvenovanie, ktoré je nákladné a nie vždy vedie k úspechu.

Alternatívnym prístupom je návrh náhodných špecifických primérov na základe tzv. markerov SCAR (sequence-characterized amplified region). V tomto prípade sa na súbor druhov, ktoré je potrebné rozlíšiť, aplikuje niektorá DNAtypizačná metóda, napríklad metóda PCR s náhodnou aneláciou primérov (randomly-amplified polymorphic DNA - RAPD) a hľadá sa fragment DNA, ktorý je prítomný v hľadanom druhu a neprítomný v iných druhoch. Tento fragment DNA sa osekvenuje a na základe zistenej sekvencie sa navrhnu špecifické priméry. Uvedený postup závisí na náhode, ale v niektorých prípadoch bol úspešnejší než návrh primérov na základe sekvencií s identifikovanou funkciou.