

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů**

**Katedra mikrobiologie, výživy a dietetiky**



**Fakulta agrobiologie,  
potravinových a přírodních zdrojů**

**Mikrobiologická analýza probiotik pro psy**

**Bakalářská práce**

**Tereza Madžarová**

**Kynologie**

**Prof. MVDr. Eva Skřivanová, Ph.D.**

**© 2022 ČZU v Praze**

## **Čestné prohlášení**

Prohlašuji, že svou bakalářskou práci "Mikrobiologická analýza probiotik pro psy" jsem vypracovala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské 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 bakalářské práce dále prohlašuji, že jsem v souvislosti s jejím vytvořením neporušila autorská práva třetích osob.

V Praze dne 22.4.2022

---

## **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala Prof. MVDr. Evě Skřivanové, Ph.D za trpělivost a pomoc při zpracování bakalářské práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Kláře Laloučkové, Ph.D. a Ing. Lucii Malé za pomoc při výzkumu v laboratoři. Také děkuji kolegům z Hrasu, své rodině a přátelům za jejich trpělivost a vstřícnost.

# Mikrobiologická analýza probiotik pro psy

## Souhrn

Teoretická část se zabývá znalostmi mikrobioty a její modifikací v gastrointestinálním traktu savců, zejména psů. Mikrobiota ovlivňuje mnoho aspektů zdraví hostitele, včetně fyziologie, anatomie, chování, reprodukce a zdatnosti. Řada environmentálních a klinických faktorů včetně složení potravy, způsobu chovu, onemocnění a aplikace léků může vyvolat podstatné posuny ve složení mikrobioty trávicího traktu psa. V posledních letech se začíná mluvit o možnostech její terapeutické modifikace různými probiotiky, prebiotiky a synbiotiky.

Probiotika se podle WHO/FAO definují jako „*živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány ve vhodných dávkách, přinášejí svému hostiteli zdravotní benefit*“. Studie prokázaly roli probiotik v prevenci zdravotních problémů, včetně poruch trávení, jako je průjem způsobený infekcemi. Aby se předešlo závažným onemocněním, mohou být krmiva pro domácí zvířata formulována s různými probiotickými bakteriemi. Skutečný počet životaschopných mikroorganismů by měl odpovídat popisům na etiketě, což je předpokladem pro to, aby krmivo mělo zamýšlené příznivé účinky.

V praktické části bylo cílem zhodnotit vybraná probiotika, určit rod bakterií a jejich množství kultivační metodou. Bylo testováno osm komerčních probiotických past, u kterých výrobce deklaroval určitý počet probiotických bakterií. Výrobce popisuje pozitivní přínos na mikrobiotu střev, a hlavně na celého jedince. V daných vzorcích se nacházely bakterie rodu *Enterococcus* a *Lactobacillus*. Z osmi přípravků se k deklarovanému počtu přiblížilo šest probiotických past. Ve dvou vzorcích se nacházel podle výrobce i rod *Lactobacillus*, v obou pastách byl však jeho nález minimální až žádný.

Hypotéza, že probiotické pasty budou obsahovat deklarované množství mikroorganismů, a že množství bude i vyšší se v této práci potvrdila jen z části. Některé pasty obsahovaly deklarovaný počet *Enterococcus spp.*, ale ani jedna pasta neobsahovala deklarované množství bakterií rodu *Lactobacillus*.

**Klíčová slova:** probiotikum; pes; dietetika; výživa; zdraví; mikrobiota

# Probiotics in dog nutrition and their bacteriological analysis

## Summary

The theoretical part deals with the knowledge of microbiota and its modification in the gastrointestinal tract of mammals, especially dogs. The microbiota influences many aspects of host health, including physiology, anatomy, behavior, reproduction, and fitness. A number of environmental and clinical factors, including diet composition, husbandry, disease and drug administration, can induce significant shifts in the composition of the microbiota of the canine gastrointestinal tract. In recent years, the possibility of its therapeutic modification with various probiotics, prebiotics and synbiotics has been discussed. According to the WHO/FAO, probiotics are defined as "live microorganisms which, when administered in appropriate doses, confer a health benefit on their host". Studies have shown the role of probiotics in preventing health problems, including digestive disorders such as diarrhea caused by infections. To prevent serious illness, pet foods have been formulated with various probiotic bacteria, and the actual number of viable microorganisms should match the label descriptions.

In the practical part, the aim was to evaluate the selected probiotics, determine the type of bacteria and their quantity by culture method. Eight commercial probiotic pastes were tested for which the manufacturer declared a certain number of probiotic bacteria. The manufacturer describes the positive benefits on the gut microbiota and, more importantly, on the whole individual. Bacteria of the genus *Enterococcus* and *Lactobacillus* were present in the samples. Of the eight preparations, six probiotic pastes came close to the declared number. Two of the samples also contained the *Lactobacillus* spp., according to the manufacturer, and both pastes had minimal to no detection of the genus.

The hypothesis that the probiotic pastes would contain the declared amount of microorganisms and that the amount would be higher was only partially confirmed in this work. Some pastes contained the declared number of *Enterococcus* spp., but none of the pastes contained the declared amount of *Lactobacillus* spp.

**Keywords:** probiotic; dog; dietetics; nutrition; health; microbiota

# 1 Obsah

2 Úvod.....	7
3 Cíl práce.....	8
3.1 Hypotéza .....	8
4 Literární rešerše.....	9
4.1 Mikrobiota trávicího traktu savců .....	9
4.1.1 Mikrobiální osídlení gastrointestinálního traktu (GIT) .....	11
4.1.2 Faktory ovlivňující složení mikrobioty GITu psa .....	15
4.2 Probiotika.....	19
4.2.1 Rozdíl mezi probiotiky, prebiotiky a synbiotiky.....	19
4.2.2 Význam probiotik.....	20
4.2.3 Vlastnosti probiotik.....	20
4.2.4 Komerčně využívaná probiotika .....	21
4.2.5 Mechanismy působení probiotik .....	22
4.2.6 Účinek probiotik.....	24
4.2.7 Výběrová kritéria a bezpečnost probiotik .....	25
4.2.8 Kvalita a stabilita probiotik .....	26
4.3 Probiotika ve výživě psů.....	27
4.4 Fekální mikrobiální transplantace .....	27
5 Metodika.....	28
5.1 Testované vzorky .....	28
5.2 Postup mikrobiologického rozboru.....	29
5.2.1 Příprava vzorků .....	29
5.2.2 Kultivace bakterií rodu Enterococcus .....	32
5.2.3 Kultivace bakterií rodu Lactobacillus.....	33
6 Výsledky .....	35
7 Diskuze.....	37
8 Závěr .....	39
9 Seznam literatury.....	40

## 2 Úvod

Populace domácích mazlíčků se zvyšuje. Mezi hlavními lidskými společníky najdeme psy, kteří byli domestikováni už před tisíci lety. Většina majitelů považuje psa za člena rodiny (Cohen & Phillips 2002). Jejich blízký kontakt s lidmi přináší mnoho důsledků nejen pro zvířata, ale také pro zdraví majitelů. Proto v posledních desetiletích vzrůstá zájem o zdraví a pohodu domácích mazlíčků. Většina psů žije ve městech a čelí podobnému životnímu stylu jako lidé.

Velká část zdraví a pohody domácích zvířat závisí na složení jejich střevní mikrobioty (Grzeškowiak et al. 2015). Je známo, že „zdravá střeva“ jsou zásadní pro fyziologii a pohodu hostitele. Gastrointestinální trakt (GIT) ukrývá komplexní mikrobiální komunitu, která je neustále ovlivňována faktory souvisejícími s hostitelem a vnějším prostředím. Tento mikrobiální ekosystém působí několika způsoby, ovlivňuje jak absorpci, tak metabolismus živin, trofické a ochranné funkce hostitele. Jakékoli poruchy střevní mikrobioty mohou vést k rozvoji celé řady nemocí a poruch, např. průjmu, alergiím, obezitě a symptomům stresu (Lee & Hase 2014).

K vyvážení narušené mikrobioty a v boji proti infekcím byla navržena různá terapeutická aditiva, jako jsou například probiotika (Grzeškowiak et al. 2015). Mezi produkty používané jako přísady do krmiv patří mimo jiné také prebiotika, oligosacharidy, enzymy, organické kyseliny, vitamíny a minerály (Yirga 2015).

Během posledních desetiletí se rozšířil zájem o přidání bakteriálních rodů do stravy zvířat, které by mohly mít příznivý účinek na gastrointestinální mikrobiotu a obecněji na celkové zdraví cílových hostitelů.

Vzhledem k tomu, že výzkum zdravotních přínosů probiotik u lidí i zvířat je stále konzistentnější, aplikace potenciálně prospěšných bakteriálních druhů v krmivu pro domácí zvířata se stává stále více předmětem zájmu (Coman et. al 2019).

### **3 Cíl práce**

V současné době je na trhu řada preparátů s obsahem probiotických bakterií, jejichž cílem je zlepšení stavu trávicího traktu psů. Cílem práce bylo mikrobiologicky zhodnotit vybraná probiotika, určit druh bakterií a jejich množství kultivační metodou. Zjištěná data konfrontovat s tvrzením výrobce. Výsledky diskutovat a učinit příslušné závěry.

#### **3.1 Hypotéza**

V probiotických přípravcích (pastách) se nenachází počet bakterií odpovídající deklaraci výrobce.



## 4 Literární rešerše

### 4.1 Mikrobiota trávicího traktu savců

Mikrobiota savců zahrnuje biliony buněk (Gibson & Roberfoid 1995), hub, archeí, virů a prvoků (Stinson et al. 2019) sídlících v trávicím traktu. Genetická informace těchto mikroorganismů se souhrnně označuje jako „mikrobiom“ (Turnbaugh 2007). Trávicí trakt začíná v dutině ústní a pokračuje hrudní a břišní dutinou do konečníku (Gibson & Roberfoid 1995).

Mikroorganismy v trávicím traktu vytvářejí metabolity, které mohou působit jako zdroje energie pro buňky a jejich metabolismus (Honda & Littman 2012). Ovlivňují mnoho aspektů zdraví hostitele, včetně fyziologie, anatomie, chování, reprodukce a zdatnosti (Thomas et al. 2017). Dokáží podporovat vývoj a funkčnost imunitního systému a zabráňovat kolonizaci patogenními mikroorganismy (Honda & Littman 2012). Mnoho mikrobů se pravděpodobně nachází právě na hranici mezi komenzálem a patogenem (Gilmore et al. 2003).

Ačkoliv savci mají mnoho společných rysů, každý jedinec skrývá individuální směs mikrobiálních kmenů a druhů (Schmidt et al. 2018). Rozmanitá mikrobiota je obecně považována za žádoucí a svědčící pro zdraví (Morgan et al. 2012). Různorodá mikrobiota má pravděpodobně funkční redundanci pro důležité metabolické procesy nebo jiné kritické služby poskytované mikrobiotou hostiteli (Carthey et al. 2020).

Vysoce výkonné přístupy pro sekvenování DNA poskytují atraktivní a finančně nenáročný přístup ke zkoumání složení a funkcí hostitelského mikrobiomu (Caporaso et al. 2012). V roce 2007 byl zahájen projekt HMP neboli Human Microbiome Project, díky kterému se ukázalo, že lidský mikrobiom je velmi rozmanitý. Předpokládá se, že počet mikroorganismů desetkrát převyšuje počet lidských buněk. Bylo také zjištěno, že složení a změny mikrobioty souvisí s různými nemocemi jako je diabetes, zánětlivé onemocnění střev, obezita, astma, revmatoidní artritida a náchylnost k infekcím (Bahrndorff et al. 2016).

V poslední době byl také sekventován mikrobiom mnoha druhů jiných obratlovců, včetně hospodářských a volně žijících zvířat (Brulc et al. 2009).

Do nedávna se předpokládalo, že se mikrobiota začíná vyvíjet v okamžiku porodu a jedinec se rodí se sterilním trávicím traktem (Leahy et al. 2005). Nedávná studie z roku 2019 ovšem ukázala, že by se mikrobiota mohla formovat již před narozením jedince. Kdy jedinec pravděpodobně získává mikroorganismy z plodové vody matky (Stinson et al. 2019). Mikrobiota se tedy formuje v prvních letech života. Její zrání se vyvíjí podle faktorů prostředí, včetně geografické polohy, způsobu porodu, expozice antibiotikům a kojení (Rodríguez et al. 2015). Savčí mikrobiota je získávána jak vertikálně z matky na potomka, tak i horizontálně mezi nepříbuznými jedinci prostřednictvím sociálních interakcí a sdílených prostředí (Moeller et al. 2018). První vlivy životního prostředí mají hluboký dopad na pozdější vývoj, strukturu a funkci organismu. Tento jev se nazývá „vývojové programování“, to je proces, při kterém environmentální faktor působící během citlivého nebo zranitelného

vývojového období má vliv na strukturu a funkci orgánů, které v některých případech přetrvávají po celý život (Seckl & Meaney 2004).

Jelikož trávicí trakt těsně po porodu obsahuje kyslík, první mikroorganismy, které kolonizují trávicí trakt savců, jsou fakultativně anaerobní bakterie (Uyeno et al. 2015). Bifidobakterie jsou nejpočetnější bakteriální skupinou u většiny mláďat savců v období mléčné výživy (Hopkins 2001).

Rozdíly ve složení gastrointestinální mikrobioty najdeme i mezi domestikovanými zvířaty a jejich divokými příbuznými. Domácí zvířata často konzumují méně rozmanitou, snáze stravitelnou stravu. Vydávají také méně energie. Žijí v poměrně statických skupinách s vysokou hustotou a mohou být vystaveny moderním lékařským zásahům včetně léčby antibiotiky (McClure 2013). Domácí zvířata v péči člověka často procházejí šlechtitelskými změnami, mohou být selektována na intenzitu růstu (u hospodářských zvířat), spolehlivou reprodukci nebo odolnost vůči stresu (např. u laboratorních zvířat) a jedinečné fyzické a behaviorální atributy společenských zvířat. Ačkoli se cílené fenotypy liší na základě domestikovaných druhů, všichni domestikovaní savci sdílejí to, že byli záměrně nebo nepřímou vybraní pro krotkost (Wilkins et al. 2014).

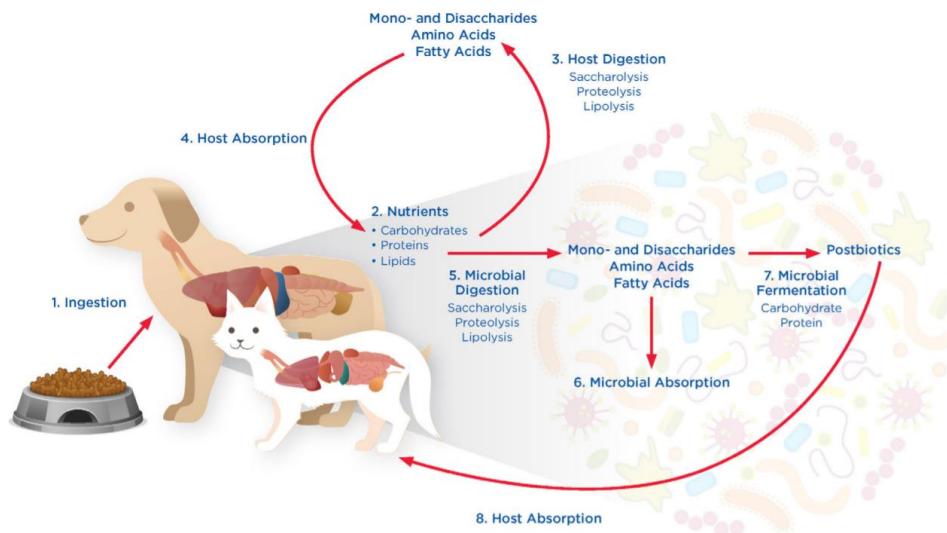
V rozsahu, v jakém je střevní mikrobiota závislá na biologii hostitele, bychom mohli navíc očekávat, že domestikace zformovala střevní mikrobiotu podobnými, potenciálně konvergentními způsoby napříč různými savčími liniemi. Změny v mikrobiotě samozřejmě nebyly jedinou cestou, jak zvířata podstupující domestikaci reagovaly na měnící se ekologické faktory. Například genetické změny zvýšily kapacitu pro trávení škrobu u psů (Axelsson et al. 2013). Nicméně zvýšená mikrobiální diverzita a posuny v mikrobiálním složení, které byly pozorovány u psů, mohly dodatečně přispět k trávení sacharidů. Psi krmení konvenční stravou mají ve svých střevních metagenomech větší zastoupení genů metabolismu sacharidů, než psi krmení dietou s převahou masa (Alessandri et al. 2019).

U domácích psů bylo zjištěno, že strava s vysokým obsahem sacharidů může zvýšit relativní množství *Firmicutes*, zatímco strava s vysokým obsahem bílkovin může zvýšit relativní množství *Fusobakterie* (Hang et al. 2012).

Gastrointestinální (GI) mikrobiota usnadňuje rozklad potravy (Obr. 1), stejně jako produkci metabolitů, jako jsou mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA), sekundární žlučové kyseliny, vitamíny, živiny a další bakteriálně odvozené sloučeniny (Suchodolski 2016).

Mikroorganismy v trávicím traktu uvolňují do těla živiny a metabolity, ovlivňují imunitní buňky a průběh zánětlivé reakce (Tizard & Jones 2018). Na oplátku hostitel poskytuje infrastrukturu pro mikrobiotu a reguluje jeho prostředí pro optimální růst (teplotu a hladinu kyslíku). Řídí peristaltiku, poskytuje obranu proti patogenům a nabízí anatomickou strukturu, která slouží jako životní prostředí pro GI mikrobiotu. Epiteliální bariéra lemovaná hlenem tvoří rozhraní mezi hostitelem a rezidentními mikroby. Navíc podporuje imunitní dohled a usnadňuje udržení homeostázy hostitele a mikrobioty. Důkazy také naznačují, že GI mikrobiota ovlivňuje vývoj a regulaci hlavních hostitelských systémů, včetně nervového, ledvinového, trávicího, dermálního, endokrinního, imunitního a dýchacího (Makki et al. 2018).

Vzhledem k tomu, že z GI traktu je obtížné získat vzorky, studie obvykle pro studium GI mikrobioty využívají vzorky stolice. Bylo navrženo, že vzorky psích výkalů poskytují lepší reprezentaci bakteriálních taxonů relevantních pro zdraví ve srovnání se vzorky lidí, což může být způsobeno skutečností, že psi mají kratší GI trakt a rychlejší dobu průchodu s menším počtem taxonů spojených s hlenem než lidé. Poměry kmenů se mohou také lišit mezi jednotlivými zvířaty stejného druhu v důsledku faktorů, jako je plemeno, strava, věk, životní prostředí a různé metody analýzy napříč studiemi (Pilla & Suchdolski 2020).



Obrázek 1 Rozklad potravy pomocí mikrobioty střeva (Suchdolski 2007)

#### 4.1.1 Mikrobiální osídlení gastrointestinálního traktu (GIT)

GIT se skládá z oddílů, které se liší svou anatomii a funkcí a poskytují potravě podmínky průchodu. Potrava má být strávena, absorbována a vyloučena. Probíhají zde různé enzymatické procesy, změny koncentrace elektrolytů, vyprazdňování žaludku a průchodu střevem, pH, sekrece a složení žluči a rychlost absorpce (Smeets-Peeters et al. 1998).

U psa, stejně jako u jiných organismů s trávicí trubici diferencovanou do více specializovaných celků, stoupá počet a diverzita přítomných mikroorganismů s postupem trávicí soustavou (Suchdolski et al. 2005). (Obr.2)

##### 4.1.1.1 Dutina ústní

Mikrobiota dutiny ústní je velmi různorodá a má podíl na závažných chorobných procesech (Farrell et al. 2012). U psů se ukázalo, že mají podobné množství bakterií jako lidé, ale populace těchto bakterií je odlišná (Dewhirst et al. 2012).

Složení orální mikrobioty ovlivňuje mnoho faktorů, jako je potrava, zdravotní stav, věk ale také záleží na pracovním zařazení psa (Isaiah et al. 2017). Když je mikrobiota stabilní a zdravá, slouží jako ochranná bariéra. Když se ovšem změní jeden nebo více z těchto faktorů,

změní se složení bakterií, což způsobuje nerovnováhu. Tato nerovnováha může způsobit široké spektrum nemocí jako je zubní kaz nebo paradontitida (Krishnan & Paster 2017).

Podle Krishnana a Pastera (2017) složení mikrobioty dutiny ústní slouží jako biomarker pro srdeční onemocnění, bakteriální pneumonii a rakovinu slinivky.

Bell et al. (2020) zkoumali, jaký má vliv podávání perorálních probiotik na mikrobiální diverzitu v ústní dutině psa. Výsledkem studie bylo, že žádný vliv na mikrobiální diverzitu nemá, na rozdíl u lidí, kdy se změna diverzity potvrdila.

#### 4.1.1.2 Žaludek

Žaludek má pro celou řadu mikroorganismů poměrně nepříznivé, související s nízkým pH prostředí a peristaltikou žaludku, která brání kolonizaci bakterií. Nicméně, u lidí bylo pozorováno, že přechodné bakterie mohou na krátkou dobu zakládat malé kolonie. Další bakterie, jako např. *Helicobacter pylori* pouze nekolonizují žaludeční sliznici, ale mohou se podílet i na onemocněních (Nardone & Compare 2015).

Avšak tato zjištění nemusí nutně platit pro psy. U psů je *Helicobacterie* považována za komenzální bakterii, která převládá nejen v žaludku (Garcia-Mazcorro et al. 2012), ale také v záhybch tlustého střeva zdravých jedinců (Giaretta et. al 2020).

V žaludku psa se nachází malá koncentrace mikroorganismů a jejich diverzita je až zanedbatelná. Díky silně kyselému prostředí (pH 3-4), které má na většinu mikroorganismů letální efekt. V žaludku najdeme 99,5 % bakterií kmene *Proteobacteria*. Také zde najdeme nepatrné množství zástupce rodu *Lactobacillus* a *Clostridium*, která patří do čeledi *Firmicutes* (Garcia-Mazcorro et al. 2012).

#### 4.1.1.3 Tenké střevo

Ve svém prodloužení se tenké střevo skládá z přibližně 10 % dvanáctníku (*duodenum*), 85 % lačnicku (*jejunum*) a 5 % kyčelníku (*ileum*), které pozitivně koreluje s velikostí těla psa, navzdory určité variabilitě (Oswald et al. 2015).

Mikrobiota dvanáctníku se od zastoupení mikroorganismů v žaludku zásadně liší. Protože pH dvanáctníku je mírně kyselé až zásadité (kolem 6,2), tak se zde vyskytuje mnohem větší koncentrace mikroorganismů a stejně tak fundamentálně stoupá i jejich diverzita (Suchodolski et al. 2009).

Mikrobiota degraduje proteiny a sacharidy, které se dostanou do tenkého střeva a uniknou hostitelským enzymatickým trávením (Gilbert et al. 2018). Jako výsledek, se uvolňují produkty konečné fermentace včetně SCFA. Jedná se hlavně o propionát, butyrát, acetát a laktát ze sacharidů. Řadíme sem také amoniak, mastné kyseliny s rozvětveným řetězcem, polyaminy (např. putrescin, kadaverin, spermin, spermidin), indoly a jiné látky, které se vytváří hlavně z degradace proteinů. Role některých metabolitů při propagaci zdraví nebo ve vývoji nemocí zůstává dodnes velkou neznámou (Minamoto et al. 2019).

V lačniku najdeme asi 46 % proteobakterií, cca 15 % bakterií kmene *Firmicutes*, asi 11,2 % *Actinobakterií*, bakterie rodu *Spirochetes* se nachází v počtu 14 %, *Bacteroidetes* 6,2 % a *Fusobacteria* 5,4 % (Suchodolski et al. 2009).

Z hlediska jednotlivých druhů je jak ve dvanáctníku, tak i lačniku nejvíce zastoupen rod *Lactobacillus*, který tvoří asi 22 % celkové mikrobioty dvanáctníku a 10 % lačniku (Xenoulis et al. 2008).

#### 4.1.1.4 Tlusté střevo

Slepé střevo je první segment tlustého střeva. Následovaný je třemi segmenty: vzestupným, příčným a sestupným tračníkem. Konečník je konečná přímá část, ve které se hromadí výkaly k vyloučení.

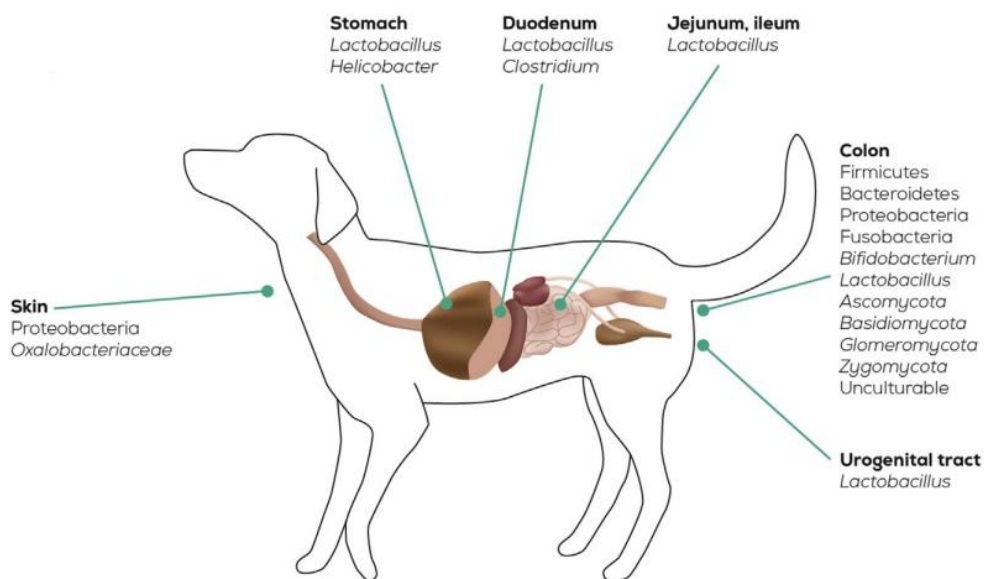
Přestože je vstřebávání hlavní funkcí střeva, uvolňování živin z potravy je usnadněná jak bakteriální enzymatickou aktivitou, tak bakteriální fermentací (Honneffer et al. 2017)

V tlustém střevě psa najdeme bakterie *Firmicutes* hlavně řádu *Clostridiales* (Suchodolski et al. 2008). Pozorovaná četnost těchto bakteriálních skupin se liší. *Firmicutes* se pohybuje mezi 25 % a 95 % získaných skvencí genu 16S rRNA (Handl et al. 2011).

Poté zde můžeme najít *Fusobacteria* a *Bacteroidetes*. Ve větším počtu se tu objevují laktobacily, které tvoří 10 % mikrobioty tlustého střeva. U zdravého psa můžeme také najít proteobakterie, které zaujímají asi 1,4 % mikrobioty (Suchodolski et al. 2009).

#### 4.1.1.5 Fekální Mikrobiota

Fekální mikrobiom psa obsahuje zpravidla bakterie spadající do skupiny *Fusobacteria* (24–40 %), *Bacteroidetes* (32–34 %), *Firmicutes* (15–28 %), *Proteobacteria* (5–6 %) a *Actinobacteria* (0,8 – 1,4 %) (Xenoulis et al. 2008).



Obrázek 2 Mikrobiální osídlení GI traktu psa (Grzeškowiak et al. 2015)

#### 4.1.1.6 Ostatní mikroorganismy trávicího traktu

Kromě bakterií se v gastrointestinálním traktu savců nachází rozmanitá směs mikroorganismů, včetně hub, archeí, prvoků a virů (většinou bakteriofágů). Molekulární nástroje poskytly informace o druhovém bohatství těchto mikrobů, ale jejich roli v gastrointestinálním zdraví je třeba dále objasnit (Suchodolski 2011).

##### 4.1.1.6.1 Plísně a kvasinky

Kultivační studie prokázaly přítomnost kvasinek a plísní ve střevě psa (Benno et al. 1992). Pomocí PCR testu byla DNA mikroskopických hub detekována v tenkém střevě u 39 ze 64 (61 %) zdravých psů a u 54 ze 71 (76 %) psů s chronickými enteropatiemi. *Saccharomyces* byly nejčastěji identifikovanou třídou a nebyly pozorovány žádné významné rozdíly v prevalenci specifických fylogypů těchto mikroorganismů mezi zdravými a nemocnými psy (Suchodolski et al. 2008).

Nedávná vysoce výkonná sekvenační data založená na 454 pyrosekvenování genu 18S rRNA odhalila 4 kmeny ve vzorcích trusu psů, přičemž většina sekvencí patří kmenům *Ascomycota* (více než 90 %) a *Neocallimastigomycota* (více než 5 %). Plísně byly přítomny u všech 19 hodnocených zvířat, přičemž každé zvíře ukrývalo více druhů mikroskopických hub a kvasinek, s mediánem 40 fylogypů. Byly pozorovány pozoruhodné rozdíly mezi zvířaty, protože každý pes měl jedinečný profil. Ačkoli většina psů přechovávala podobné kmeny, každé zvíře mělo jedinečnou druhovou populaci (Handl et al. 2011).

##### 4.1.1.6.2 Archea

Archaea jsou evolučně odlišné od bakterií a eukaryot. Jsou klasifikovány jako třetí doména života a patří mezi obligátní anaeroby. Jsou součástí normální střevní mikrobioty u přežvýkavců a byly také charakterizovány ve vzorcích lidských i psích střev (Eckburg et al. 2005)

##### 4.1.1.6.3 Viry

Vzhledem k heterogenitě virů (tj. DNA virů, RNA virů, ssDNA virů) není možný přístup s univerzálními primery, preferovanou metodou pro bakterie, archaea a houby. Proto zůstává náročné charakterizovat virová společenství přítomná ve střevě psů. Ve střevech psů se našly viry jako je rotavirus, koronavirus, parvovirus, norovirus, astrovirus, virus psinky a paramyxovirus. Předpokládá se, že míra koinfekce více viry je nízká. V nedávné studii využívající elektronovou mikroskopii pouze 6,5 % z 935 hodnocených vzorků stolice obsahovalo více než 1 virus (Kemp et al. 2018).

Metagenomické studie popsaly dsDNA viry ve vzorcích stolice psů a koček. Cca. 0,38 % všech získaných sekvencí představovalo dsDNA viry, přičemž drtivou většinu představovaly bakteriofágy (Swanson et al. 2011).

#### 4.1.2 Faktory ovlivňující složení mikrobioty GITu psa

Řada environmentálních a klinických faktorů včetně složení potravy, způsobu chovu, onemocnění a aplikace léků může vyvolat podstatné posuny ve složení mikrobioty trávicího traktu psa. Mnoho studií ukázalo, že strava a léky jsou funkčními silami ovlivňujícími střevní mikrobiální diverzitu (Scepanovic et al. 2019).

##### 4.1.2.1 Vliv diety a živin na střevní mikrobiotu

Potrava může ovlivnit přítomnost a množství bakteriálních taxonů, což může negativně zasáhnout zdraví GIT psů. Je známo, že nutriční složení a obsah krmiva významně působí na funkci trávicího traktu, složení mikrobioty a jejich metabolických produktů ve střevech zvířat (McKenzie et al. 2017).

Složení potravy psů se během času vyvíjelo od lovení potravy a zbytků od stolu k vědecky a nutričně vyvážené potravě, navržené pro specifické potřeby každého jedince. Zbytky od stolu nesplňují základní metabolické potřeby společenských zvířat. Kvalitně vyrobená krmiva poskytují dobrý zdroj všech potřebných živin, vitamínů, minerálů a dalších složek. Krmné přípravky pro psy a kočky jsou často obohaceny o probiotika, která nabízí funkční krmiva modulující mikrobiotu a jsou cílená na pohodu.

Pilotní studie zahrnující pět psů plemene bígl krmených různými dietami odhalila, že krmivo s vysokým obsahem sacharidů na bázi škrobu vede ke snížení fekálního amoniaku. Na druhou stranu škvarkové moučky s vysokým obsahem bílkovin (vedlejší produkt, který vzniká při tavení syrového tuku např. z prasat), vedou ke zvýšení pH, poklesu hodnoty kyseliny propionové a octové a zvyšují produkci mastných kyselin s rozvětveným řetězcem a kyseliny valerové. Podporují i změny struktur těkavých mastných kyselin ve stolici, vyšší koncentrace psího kalprotektinu ve stolici, která byla spojena se zvýšenou koncentrací kyseliny valerové. Kromě toho se u všech studovaných psů krmených škvarkovou moučkou s vysokým obsahem bílkovin objevil průjem (Hang et al. 2013).

Jedna studie odhalila, že konzumace malého množství řepné dužiny jako vlákniny změnila hojnost typické psí střevní mikrobioty. Přidání 7,5 % řepných řízků (60 % celkové dietní vlákniny) do standardní psí stravy po dobu 14 dnů významně posunulo početnost *Firmicutes* a ztrojnásobilo nízké taxonomické úrovně *Faecalibacterium*. *Eubacterium hallii*, který produkuje butyrát, se objevil po vlákninové dietě (Middelbos et al. 2010).

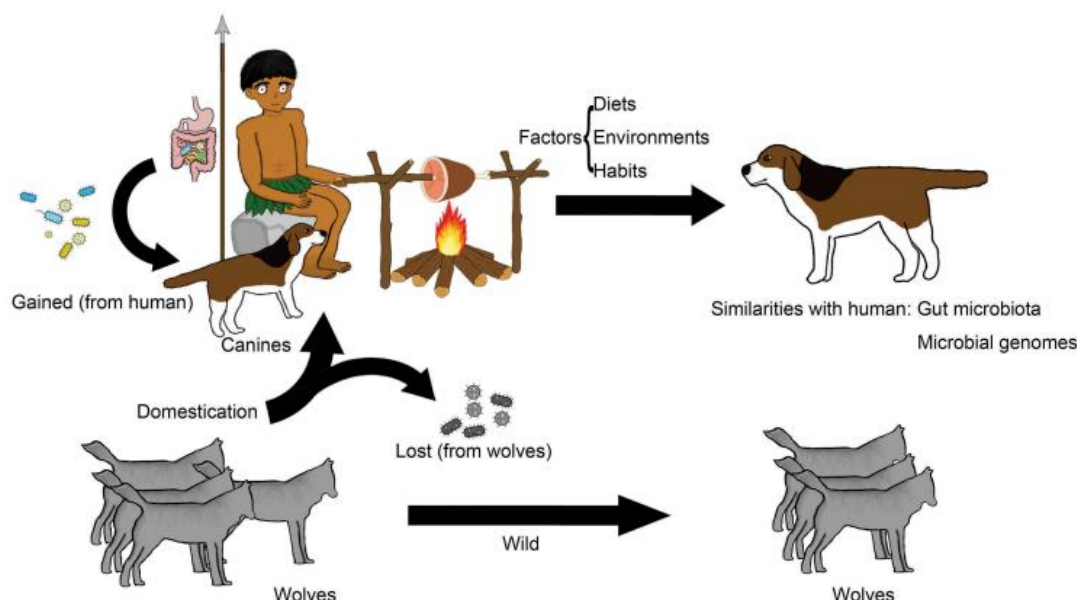
V jiné studii byli psi s nadváhou krmeni přibližně 1% prebiotickou stravou inulinového typu a výsledky ukázaly, že prebiotika inulinového typu mohou modulovat střevní mikrobiotu, mastné kyseliny s krátkým řetězcem (SCFA) a žlučové kyseliny (BA) u psů s nadváhou. Psi s nadváhou měli po prebiotické léčbě významně zvýšené SCFA a nižší koncentrace indolu. Fermentace prebiotik inulinového typu produkovala SCFA, které snižovaly lumenální pH a bránily reabsorpci BA (Alexander et al. 2018).

I malé změny krmné dávky mohou vést k posunům v mikrobiálním složení. Změna může záležet i na vnějším prostředí. Studie prokázala, že přemístění laboratorních myší do místnosti se změněnou teplotou a vlhkostí, ale při podávání stejného krmiva, vedlo k významným změnám ve složení střevní mikrobioty (Bär et al. 2020).

Také přechod mezi podmínkami ve volné přírodě a podmínkami v zajetí mohou vyvolat změny ve střevní mikrobiotě. Potrava v zajetí se může složením značně lišit od přirozené potravy (Morgan & Tromborg 2007). (Obr. 3)

Interakce s člověkem přináší další stresory jedinečné pro prostředí, které mohou ovlivnit složení GI mikrobioty. Přirozenou mikrobiotu ve střevě snižuje podávání antibiotik (Willing et al. 2011) a odvracení od přirozených patogenů jako jsou helmiti, kteří se snižují pomocí antihelmintik nebo zvýšené hygieny (Leung & Loke 2013).

V některých případech však mohou antropogenní poruchy diverzitu střevního mikrobiomu naopak zvýšit. To může být způsobeno infekcí patogenními mikroorganismy, nebo vytěsněním klíčových, funkčně důležitých mikrobiálních druhů jinými, méně funkčními mikroorganismy (Laforest-Lapointe et al. 2017).



Obrázek 3 Přechod mezi podmínkami ve volné přírodě a podmínkami v zajetí (Huang 2020)

#### 4.1.2.2 Střevní mikrobiota a onemocnění GIT

Byl analyzován fekální mikrobiom psů s chronickou enteropatií. Porovnávalo se, jak psi reagují na potravu před a po 6 týdnech dietní intervence. Dále se porovnával s fekální mikrobiotou zdravých psů před a poté, co byli převedeni na stejnou stravu používanou nemocnými psy. Psi konzumovali hydrolyzovanou proteinovou dietu. Výsledkem bylo, že nebyl detekován významný vliv na mikrobiální složení nebo diverzitu připisovaný změně stravy (Schmitz & Suchodolski 2016).

Kolonizace GI traktu specifickými patogeny může hluboce narušit integritu střevní epitelální bariéry (Viswanathan et al. 2009). U psů je rozpoznáno několik potenciálních GI



patogenů, včetně *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp.* a *E. coli* (Marks et al. 2002). Většina z nich jsou však také uznávaní komenzálové a byli izolováni v podobných frekvencích od psů s příznaky onemocnění GI i bez nich (Marks 2003). Proto je třeba vztah příčiny a účinku mezi těmito organismy a onemocněním GIT vykládat opatrně (Schmitz & Suchodolski 2016).

Nespecifické změny GI mikrobioty byly považovány za klíčový faktor pro vývoj akutní nebo chronické onemocnění GIT. Několik studií se pokusilo charakterizovat mikrobiální složení stolice u průměrných psů. U akutního průjmu byly pozorovány rozsáhlé změny, jak při kultivaci, tak při sekvenování. To zahrnovalo zvýšenou hojnost *Clostridium spp.*, *E. coli*, *Lactobacillus* a *Enterococcus spp.* se současnou redukcí těch bakteriálních skupin, které tvoří většinu normální mikrobioty tlustého střeva, jako je např. *Faecalibacterium*, *Ruminococcaceae* a *Blautia spp.* (Bell et al. 2008). U chronického průjmu se nacházely výrazně vyšší počty *Bacteroides sp.*, které byly nalezeny pomocí fluorescenční hybridizační analýzy *in situ* (Jia et al. 2010).

Ve studii hodnotící velkou skupinu psů s chronickým průjmem pomocí testů qPCR měli nemocní psi významně snížené množství *Fusobacteria*, *Ruminococcaceae*, *Blautia spp.* a *Faecalibacterium spp.* a výrazně zvýšily množství *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.* a *E. coli* ve srovnání se zdravými psy (Minamoto et al. 2015).

Ve vzorcích od psů se zánětlivým onemocněním střev (IBD) byly zjištěny změny mikrobiomu podobné těm, které byly pozorovány u lidí s IBD. Výrazně snížená druhová bohatost a vyšší podíl *Enterobacteriaceae* byly pozorovány ve vzorcích duodenálních kartáčků psů s IBD ve srovnání se zdravými psy (Xenoulis et al. 2008). Navíc v biopsiích duodenální sliznice byla u IBD zjištěna vyšší četnost proteobakterií a nižší množství klostridií ve srovnání se zdravými psy (Suchodolski et al. 2010). Analýza vzorků trusu psů s IBD odhalila dysbiózu s výrazně nižší bakteriální diverzitou, nárůstem gamaproteobakterií (tj. *E. coli*) a snížení *Erysipelotrichia*, *Clostridia* a *Bacteroidia* (Minamoto et al. 2015).

Zda jsou tyto změny částečně příčinou nebo výsledkem aberantních imunitních reakcí pozorovaných v GI traktu u IBD, zůstává předmětem debaty jak u lidí, tak u psů.

Nyní však existuje podezření, že tyto bakteriální změny jsou spojeny se změnami metabolickými funkcemi mikrobioty (např. pokles koncentrací SCFA, změněný metabolismus aminokyselin, změna redoxní rovnováhy, změna metabolismu žlučových kyselin), a proto potenciálně zhoršují zánětlivý stav hostitele (Guard et al. 2015).

#### 4.1.2.2.1 Obezita

Předpokládalo se, že poměr *Firmicutes* a *Bacteroidetes* ve střevě pozitivně koreluje s obezitou. Zatímco některé současné studie nedokázaly potvrdit význam korelace mezi těmito mikroorganismy a přírůstkem hmotnosti u člověka (Koliada et al. 2017).

Klinický význam tohoto mikrobiálního markeru je také nejasný u psů. Existuje pouze několik studií o spojení tohoto markeru se zdravím psů a jedna studie odhalila, že strava s vysokým obsahem bílkovin a nízkým obsahem sacharidů zvyšuje poměr *Firmicutes* a *Bacteroidetes* u psů (Li et al. 2017).

Obézní děti měly vyšší poměr *Firmicutes (Fc.) prausnitzii* ve srovnání s neobézními účastníky (Balamurugan et al. 2010) a také tato bakterie hrála roli v zánětu metabolických onemocnění (Furet et al. 2010).

U psů s hemoragickým i nehemoragickým akutním průjem a zánětlivým onemocněním střev byl pozorován snížený počet *Fc. prausnitzii* (Suchodolski et al. 2012).

Naproti tomu *Fc. prausnitzii* v prostředí bez vlákniny je schopen trávit mucinovou vrstvou, která poskytuje příznivější prostředí pro pronikání oportunních patogenů přes střevní bariéru hostitele (Velasquez-Manoff 2015).

Další studie ukázala, že nepřetržité krmení psů nízkotučnou dietou s vysokým obsahem hrubé vlákniny po dobu 17 týdnů snížilo tělesnou hmotnost obézních psů v průměru o 18 % z původní tělesné hmotnosti (Salas-Mani et al. 2018).

Vzhledem k rostoucímu zájmu o zdraví a welfare domácích zvířat, zejména psů, bylo aktivně zkoumáno složení a role střevní mikrobioty psů a přibyly studie o možnostech její terapeutické modifikace různými probiotiky, prebiotiky a synbiotiky (Schmitz & Suchodolski 2016).

## 4.2 Probiotika

### 4.2.1 Rozdíl mezi probiotiky, prebiotiky a synbiotiky

#### 4.2.1.1 Probiotika

Termín probiotikum je odvozen z řeckého slova, které by se dalo přeložit jako „*pro život*“. Tento termín byl poprvé použit v roce 1965 Lillym a Stillwellem, kde slovo probiotikum použili pro organismus, který stimuluje růst jiného organismu (Fuller 1992). Probiotika se ve fermentovaných potravinách používají po tisíciletí. Je známo, že staří Egypťané konzumovali fermentované mléčné výrobky již před 9000 lety. Fermentace rostla v popularitě díky své schopnosti uchovávat potraviny a také možná jako pomoc při trávení (Gogineni 2013).

Avšak teprve v nedávné době byla fermentace spojena s mikroorganismy. V návaznosti na práci Louise Pasteura ze 70. let 19. století, která prokázala, že fermentaci kyseliny mléčné řídily mikroorganismy, vyslovil na počátku 20. století ruský vědec Elie Metchnikoff hypotézu o potenciálu změnit střevní mikrobiotu konzumací určitých potravin.

Zejména Metchnikoff uvedl, že konzumace jogurtu povede k přítomnosti laktobacilů ve střevech. *Lactobacillus* inhibuje růst hnilobných bakterií a tím předchází „střevní autointoxikaci“ tzn. otravě toxickými látkami látky tvořící se v těle, při střevním trávení (Bested et al. 2013).

Od roku 1989 se probiotika definují jako „*živé mikroorganismy v potravě, které mají pozitivní vliv na hostitele a vylepšují jeho střevní mikrobiální rovnováhu*“ (Fuller 1992). Světová organizace pro výživu a zemědělství (FAO) a Světová zdravotnická organizace (WHO) v roce 2001 tuto definici upravily, probiotika definují jako „*živé mikroorganismy, které pokud jsou podávány ve vhodných dávkách, přinášejí svému hostiteli zdravotní benefit*“.

V mnoha případech však není jejich zdravotní přínos pro danou chorobu, aplikaci nebo hostitelský organismus striktně prokázán. Vzhledem k tomu, že probiotika nejsou obvykle definována jako léčiva, nemusí procházet žádným procesem prokazujícím jejich účinnost při aplikacích a onemocněních u cílových druhů. Proto bylo učiněno mnoho lékařských tvrzení o jejich blahodárných účincích, a to jak u lidí, tak u zvířat (Schmitz & Suchodolski 2016).

Nástup antibiotik na počátku 20. století byl hlubokým vědeckým průlomem. Navzdory jejich nespornému přínosu pro moderní medicínu vedlo jejich všudypřítomné a často nevybíravé používání v kombinaci s nedostatkem nových antibiotik k současné globální zdravotní hrozbě rezistence na antibiotika (Nathan & Cars 2014).

Kromě toho je antibiotická terapie také spojena s řadou nežádoucích vedlejších účinků, včetně *Clostridium difficile* – přidružený průjem a kandidóza a možný rozvoj řady chronických onemocnění včetně syndromu dráždivého tračníku, obezity, alergií, a dokonce i psychiatrických poruch (Li et al. 2016). Proto v posledních letech roste povědomí o výhodách doplnění antibiotické terapie probiotickou terapií pro prevenci takového onemocnění (Goldenberg et al. 2015).

#### 4.2.1.2 Prebiotika

Mezinárodní vědecká asociace pro probiotika a prebiotika je definuje jako „substrát, který je selektivně využíván hostitelskými mikroorganismy, což přináší zdravotní přínos“ (Gibson et al. 2017). Prebiotika jsou obvykle sloučeniny vlákniny různé délky, které procházejí nestrávené GI traktem. Patří mezi ně disacharidy, oligosacharidy a polysacharidy nebo prebiotika s dlouhým řetězcem, jako je inulin (Koh et al. 2013).

#### 4.2.1.3 Synbiotika

Synbiotika jsou přípravky kombinující jak probiotika, tak prebiotika. Tento koncept byl poprvé představen jako „směs probiotik a prebiotik, který příznivě ovlivňuje hostitele tím, že zlepšují přežití a implantaci živých mikrobiálních doplňků stravy do GI traktu. Pomocí selektivní stimulací růstu a aktivací metabolismu jednoho nebo omezeného počtu kmene zdraví prospěšných bakterií, čímž zlepšují pohodu hostitele“ (Gibson & Roberfroid 1995).

Organizace OSN pro výživu a zemědělství (FAO) doporučuje, aby se termín synbiotikum používal pouze v případě, že čistý pozorovaný přínos pro zdraví je synergický.

### 4.2.2 Význam probiotik

Jedním z hlavních důvodů, proč majitelé přivádí psy k veterinárním lékařům, jsou poruchy GIT. Tyto poruchy způsobují enteropatogeny jako je například *Salmonella*, ale také se mohou u psů objevovat zoonózy, které jsou pro člověka nebezpečné (Roddie et al. 2008). Původ probiotik tvoří základ prevence a léčby různých poruch a onemocnění zvířat. Proto je často strava o probiotika doplněna (Hill et al. 2014).

Mezi možné přínosy použití probiotik u domácích zvířat patří: modulace imunitního systému, pomoc při udržování stresu, ochrana před infekcemi způsobenými enteropatogeny, zvýšený růst a vývoj, kontrola alergických poruch a nově i obezity.

Více než 500 různých bakterií kolonizují a rozmnožují se ve střevě, přichytávají se a přilnou ke střevnímu epitelu a stabilizují rovnováhu střevní mikrobioty (Vanderhoof & Young 2004).

### 4.2.3 Vlastnosti probiotik

Mikroorganismy musí splňovat určité vlastnosti, aby mohly být použity jako probiotika ve výživě zvířat. Nesmí být pro zvířata patogenní, musí být odolné vůči fyzikálním a environmentálním faktorům typickým pro procesy výroby krmiv pro zvířata, a to: teple, sušení, UV záření. Musí si zachovat životaschopnost při zpracování, skladování a manipulaci (Setlow 2006; Cutting 2011).

Probiotika by měla být bezpečná a bez vektorů, které jsou schopny přenášet rezistenci k antibiotikům. Kromě toho by probiotikum mělo mít velkou schopnost přežít ve střevních podmínkách (kyselé pH, enzymy, žlučové soli atd.) (Plaza-Díaz et al. 2018).

Probiotika v ideálním případě přilnou ke stěně střeva a kolonizují trávicí trakt zvířete. Tyto mikroorganismy musí mít schopnost rychle růst v levných kultivačních médiích, aby jejich produkce a použití ve výživě zvířat byly ziskové (Bajagaia kol. 2016). Díky tomu je použití sporotvorných bakterií vysoce odolných vůči nepříznivým podmínkám prostředí, jako jsou vysoké teploty a vysychání, zejména patřících do rodu *Bacillus*, jsou stále častější (Reid 2016)

Probiotické vlastnosti mikroorganismů jsou spojeny se specificitou hostitele (Christensen et al. 2002). Pro úspěšné použití jako probiotika by tedy bakteriální druh měl být hostitelského střevního původu (Silva 2013), protože takové kmeny mají vyšší schopnost přežití a kolonizace (Minelli 2009). Bohužel většina probiotik nepochází původně z psí GIT mikrobioty. Psí střevo je však bohaté na mikroorganismy s probiotickým potenciálem (Silva et al. 2013).

A v konečném důsledku musí mít prokazatelné příznivé účinky na hostitele. Nakonec by mělo být prokázáno zachování aktivity, životaschopnosti a růstové účinnosti probiotika po technologickém ošetření (Plaza-Díaz et al. 2018).

#### 4.2.4 Komerčně využívaná probiotika

Dosud byly zkoumány čtyři bakteriální kmeny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA) z hlediska jejich bezpečnosti a účinnosti jako probiotik nebo doplňkových látek u psů. Mezi tyto kmeny zahrnujeme *Enterococcus faecium* (*E. faecium* NCIMB 10415 E1705, *E. faecium* NCIMB 10415 E1707), *Lactobacillus acidophilus* DSM 13241 25 a *Bifidobacterium sp. animalis*.

Rod *E. faecium* byl již dřív schválen pro použití u hospodářských zvířat a v roce 2004 byl schválen pro zájmová zvířata (Lee & Salminen 2009).

##### 4.2.4.1 Enterococcus

Rod *Enterococcus* se skládá z více než 40 druhů bakterií (Van Tyne et al. 2013). Tyto gram pozitivní a fakultativně anaerobní bakterie se vyskytují ve formě kulovitých buněk (koků). Bakterie se mohou vyskytovat jednotlivě, v párech nebo krátkých řetězcích. Optimálním prostředím pro jejich růst je teplota 35 °C a pH 9,6 (Araújo & Ferreira 2013). Enterokoky patří mezi bakterie mléčného kvašení (BMK), jsou schopny přeměnit glukózu na kyselinu mléčnou.

Jako probiotikum se využívají *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*, kteří se přirozeně nachází v GIT lidí i zvířat (Sedláček 2007; Rada & Marounek 2005).

#### 4.2.4.2 Lactobacillus

Rod *Lactobacillus* zahrnuje více než 100 různých druhů (Gaggia et al. 2010). Patří do skupiny grampozitivních a fakultativně anaerobních bakterií. Jedná se o buňky tvaru pravidelných delších tyček (Lee & Salminen 2009). Stejně jako rod *Enterococcus* patří mezi BMK (Sedláček 2007). Většina je schopna růstu při 45 °C při a pH 5,5 – 6,2. Jejich zdrojem energie jsou organické látky tvořené mikrobiotou. Laktobacily jsou schopné fermentovat laktózu a můžeme je rozdělit na tzv. homofermentativní, kdy bakterie produkují pouze kyselinu mléčnou a heterofermentativní produkují kyseliny mléčnou, ethanol a oxid uhličitý. Bakterie se přirozeně vyskytují v gastrointestinálním traktu (Liong 2011).

Používané jsou: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, které najdeme v mléce, v sýru a v prostředí. *L.delbrueckii sp. Bulgaricus* se nachází v sýru a jogurtu. A v potravinách a v prostředí můžeme najít *L. rhamnosus*, *L. reuteri*, *L. plantarum* (Sedláček 2007; Rada & Marounek 2005).

#### 4.2.4.3 Bifidobacterium

Bifidobakterie jsou přirozeně vyskytující se bakterie v trávicím traktu lidí i zvířat. Řadíme mezi ně více než 30 druhů. Jsou to grampozitivní a anaerobní bakterie. Bifidobakterie jsou nepravidelné, někdy zahnuté nebo rozvětvené tyčinky. Také je často najdeme ve tvaru Y nebo V (Roy 2011). Citlivost ke kyslíku ztěžuje jejich použití jako probiotik, protože stabilizace produktů s bifidobakteriemi tak, aby splnily požadavky na trvanlivost je obtížná ve srovnání například s laktobacily (Venema & do Carmo 2015). Jejich optimální růstové prostředí je teplota od 37 do 41 °C a pH 6,5 – 7,0 (Roy 2011). Bifidobakterie fermentací sacharidů produkují kyselinu octovou a kyselinu mléčnou (Venema & do Carmo 2015).

### 4.2.5 Mechanismy působení probiotik

Probiotika mohou zlepšit zdraví sliznic několika navrhovanými mechanismy. Vytěsněním střevních patogenů (Lee et al. 2003), produkcí antimikrobiálních látek (Jones & Versalovic 2009), posílení imunitních odpovědí (Pagnini et al. 2010) nebo zvýšením receptorů buněk pro různé metabolity (Soo et al. 2008).

Probiotika mohou konkurovat potenciálním patogenům tím, že interferují s jejich přilnavostí ke střevní sliznici nebo indukci tvorby mucinu. Předpokládá se, že tyto mechanismy jsou kmenově specifické, přičemž některé kmeny mají zvýšenou schopnost adherence a některé kmeny jsou schopné zvýšit adherenci patogenů ke střevnímu hlenu (Collado et al. 2007).

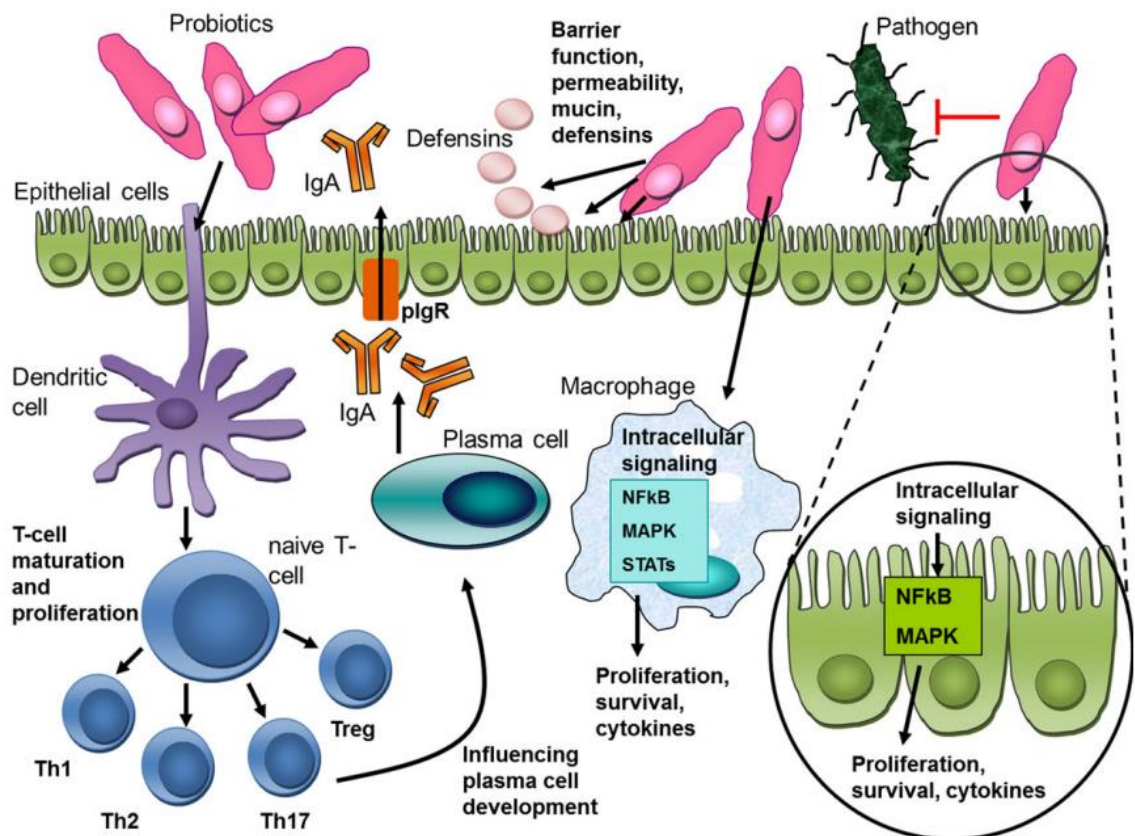
Probiotické bakterie mohou produkovat různé antimikrobiální látky, jako jsou mastné kyseliny, kyselinu mléčnou a kyselinu octovou (Saarela et al. 2000). Například *Lactobacillus* dokáže snížit expresi a produkci toxinového genu *Salmonella* a *E. coli* in vitro (Schmitz & Suchodolski 2016).

Imunitní modulace hostitelského organismu, zejména střevních epiteliálních buněk, může nastat prostřednictvím složek mikrobiálních buněčných stěn, jejich metabolitů nebo DNA. Účinky zahrnují udržování a posilování těsných spojů, prodloužení přežití střevních epiteliálních buněk. Také mohou produkovat protilátky IgA a  $\beta$ -defenzin neboli antimikrobiální peptid s baktericidními účinky. Tento peptid působí proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím (Oelschlaeger 2010).

Životaschopné bakterie mohou být nezbytné pro probiotické účinky. Tyto účinky mohou také umožnit složkami buněčné membrány nebo strukturně odlišnými vylučovanými molekulami, např. peptidy, lipopeptidy, lipopolysacharidy, DNA nebo RNA (Lauková et al. 2004).

Několik studií ukazuje, že klíčové biologické signální dráhy, jako jsou jaderné faktory kappa B, MAP kinázy (Thomas & Versalovic 2014), které se účastní širokého spektra buněčných pochodů, jako je exprese genů, mitóza, buněčná diferenciaci i programovaná smrt buněk (Pearson 2001), fosfatidylinositol-3-kinázy a peroxisom proliferační aktivátor transkripčního receptoru gama jsou cíle pro probiotika nebo jejich produkty (Thomas & Versalovic 2014). (Obr.4)

Tyto dráhy mohou být jednotlivými probiotickými kmeny různě modifikovány. To je kmenově specifický účinek, bakteriální kmeny stejného druhu mohou různě měnit buněčné reakce. Například *Lactobacillus reuteri* ATCC PTA 6475 může inhibovat TNF- $\alpha$  neboli faktor nádorové nekrózy, který je produkován z myeloid buněk (Lin et al. 2009).



Obrázek 4 Mechanismus účinku probiotik (Thomas a Versalovic 2010)

## 4.2.6 Účinek probiotik

Účinky probiotických organismů jsou velmi rozmanité a závisí na věku zvířete a jeho fyziologickém stavu (Rada 2010). Studie prokázaly roli probiotik v prevenci zdravotních problémů, včetně poruch trávení, jako je průjem způsobený infekcemi (Plaza-Díaz et al. 2018), průjem související s antibiotiky (Newberry 2012), syndrom dráždivého tračníku (IBS) (Moayyedi et al. 2010), *Clostridium difficile* (Goldenberg et al. 2017), zánětlivé onemocnění střev (IBD), a ulcerózní kolitidy (Saez-Lara et al. 2015), u alergických poruch, jako je atopická dermatitida (ekzém) a alergická rýma (Berings et al. 2017).

V současné době se uznává, že střevní dysbióza se týká změn v kvantitativním a kvalitativním složení mikrobioty, že tyto změny mohou vést ke změně hostitelské mikrobiální interakce, která může přispívat k chorobnému stavu často se zánětem (Plaza-Díaz et al. 2018).

### 4.2.6.1 Efekt probiotik při prevenci a léčbě nemocí

#### 4.2.6.1.1 Infekční a neinfekční akutní průjem

Celkově se zdá, že použití probiotik u akutních infekčních GI onemocnění psů má své opodstatnění. Podání probiotické směsi štěňatům s potvrzenou parvovirózou vedlo ke zvýšení životnosti štěňat ze 70 % na 90 %, také k rychlejšímu zlepšení klinických příznaků a zvýšení počtu leukocytů (Jensen & Bjørnqvad 2019).

V další studii došlo k významnému snížení vylučování vajíček *Ancylostoma* u psů léčených směsí laktobacilů (*L. acidophilus* ATCC 4536, *L. plantarum* ATCC 8014 a *L. delbrueckii* UFV H2B20) po dobu 28 dnů ve srovnání s neléčenou kontrolní skupinou (Coêlho et al. 2013).

Také byla léčena giardiáza psů pomocí *E. faecium* SF68. Po 6 týdnů léčby nebyly mezi léčenými a neléčenými psy pozorovány žádné rozdíly ve vylučování cyst, vylučování fekálního antigenu, fekálního IgA ani fagocytární aktivitě leukocytů (Simpson et al. 2009).

Mezi další formy akutního průjmu u psů, kterým byla podávána probiotika, patří průjem související se stresem, antibiotiky vyvolaným a idiopatickým průjem. Výsledky podávání probiotik jsou variabilní v závislosti na kmenech a hodnocené populaci psů. Použitím *E. faecium* SF68, nebyl zjištěn žádný účinek na průjem související se stresem chovatelské stanice, což by mohlo být částečně způsobeno nízkou prevalencí průjmu v této studii (Bybee et al. 2011).

Stolice se významně zlepšila u psů, podstupujících chovatelský stres, když bylo doplněno *Bifidobacterium animalis* AHC7 ve srovnání s neléčenou kontrolní skupinou (Kelley et al. 2010). Podobné reakce byly pozorovány ve studii akutní gastroenteritidy s použitím probiotické směsi *L. acidophilus*, *Pediococcus acidilactici*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* a *L. farciminis*. Doba zotavení se významně zkrátila ve srovnání s neléčenými jedinci (Herstad et al. 2009).



#### 4.2.6.1.2 Chronický průjem

Stejně jako u lidí se předpokládá, že patogeneze chronických zánětlivých stavů GIT u psů je způsobena aberantní odpovědí imunitního systému na mikrobiotu lumen střeva (Sartor 2006). Existuje dostatek důkazů o imunitní dysregulaci, i když přesný typ zánětlivé reakce a patogeneze nebyl objasněn (Schmitz et al. 2012).

Několik studií ukázalo, že u psů s průjmovým onemocněním existují také změny střevního mikrobiomu (Suchodolski et al. 2012). Bylo provedeno několik pokusů k ovlivnění složení mikrobioty u psů. Účelem těchto pokusů bylo zmírnění klinických příznaků pomocí probiotik, u kterých se už prokázaly imunomodulační vlastnosti (Schmitz et al. 2012).

Byla provedena léčba jedním kmenem *E. faecium* u psů s onemocněním reagujícím na potravu. Zjistilo se, že *E. faecium* nemá žádný vliv na klinické příznaky, histologii nebo genovou expresi duodenálních a tračníku vybraných genů spojených se specifickým pomocným T lymfocytům (Schmitz et al. 2015).

Lepší výsledek se u psů objevil při použití probiotické směsi. Kombinace laktobacilů (*L. acidophilus* a *L. johnsonii*) snížila duodenální interleukin, interferon gama tlustého střeva, hladina mRNA a počet fekálních bakterií rodu *Enterobacteriaceae*. Zatímco se počty *Lactobacillus spp.* zvýšily (Sauter et al. 2005).

#### 4.2.7 Výběrová kritéria a bezpečnost probiotik

##### 4.2.7.1 Testování mikrobiálních kmenů pro jejich kvalifikaci jako probiotika u psů

Například 4 jednotlivé bakteriální kmeny –*Enterococcus faecium* NCIMB10415, *Ec. faecium* NCIMB10415, *Lactobacillus acidophilus* DSM13241 a *Bifidobacterium animalis ssp. animalis* NCIMB41617 — byly posouzeny Evropským úřadem pro bezpečnost potravin z hlediska jejich bezpečnosti a účinnosti jako probiotik nebo doplňků stravy pro psy (Schmitz & Suchodolski 2016).

Při testování se studie zvláště zaměřily na vlastnosti přežití kmenů při nízkém pH (aby napodobovaly průchod žaludkem), aby odolávaly degradaci žlučovými kyselinami v tenkém střevě, jejich adhezní vlastnosti ke střevnímu hlenu a jejich potenciál produkovat antimikrobiální peptidy nebo inhibovat *in vitro* růst patogenů (většinou *E.coli* a *Salmonella ssp.*). Posuzovány byly i některé další funkční a genetické vlastnosti (např. fermentace sacharidů a imunomodulační účinky) (Schmitz & Suchodolski 2016).

Není úplně jasné, zda je přežití probiotik pro příznivý účinek vůbec nutné, nebo zda například stačí jejich DNA (Kant et al. 2014). Existují určité důkazy, že i neživotoschopné probiotické bakterie mohou způsobit imunitní modulaci hostitele (Zhong et al. 2012).

Nedávné studie naznačují, že probiotické směsi jsou schopny vyvolat velké změny v mikrobiotě adherující na ileální sliznici u kolitických myší a také psů s chronickými enteropatiemi (Mar et al. 2014).

#### 4.2.8 Kvalita a stabilita probiotik

Kontrola kvality je u probiotických produktů velkým problémem. Jelikož jsou probiotika klasifikována jako doplňky stravy, není ze zákona vyžadována kontrola kvality jako u léků. Není k dispozici velké množství údajů o kvalitě a trvanlivosti komerčně dostupných probiotik (Weese & Arroyo 2003).

Studie Schmitze a Suchodolskiho (2016) hodnotila mikrobiální složky krmiva pro psy s tvrzením, že obsahují probiotika. Bylo kontrolováno 19 komerčních diet a výsledkem bylo, že krmiva neobsahovala všechny uváděné organismy. Přibližně z 50 % vzorků bylo možné izolovat určité množství složek. Jedenáct vzorků obsahovalo další příbuzné organismy a více než 25 % testovaných diet nevykazovalo žádný relevantní bakteriální růst.

Například v Kanadě existuje průvodce pro spotřebitele, který uvádí probiotika registrovaná na kanadském trhu pro podávání lidem. Nachází se zde seznam probiotik, která byla uspokojujivě testována. V této příručce se odkazuje na vědecké články, které podporují testy a přesně popisují na jakou patologii bylo každé probiotikum testováno (Skokovic - Sunjic 2016).

Před použitím komerčních probiotik v živočišné výrobě je důležité přezkoumat vědeckou podporu, která je produktu k dispozici. Zda je přípravek vhodný pro daný druh a věk zvířete. Mezi zeměmi existují rozdíly v označování a hlášení účinku. V Evropské unii úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) prakticky omezil používání termínu probiotika na etiketách, protože pro ně existuje jen málo registrovaných produktů, které prokázaly svůj účinek a účinnost nad placebo efekt (Yeoman a White 2014).

Bylo prokázáno, že výrobní postupy a potravinový nosič mohou ovlivnit původní vlastnosti probiotik (Grzeškowiak et al. 2015). Protože různé zdroje stejného probiotika mohou významně změnit vlastnosti kmene, může být výsledek intervenčních studií zpochybněn. Bylo ukázáno, že růstová média mohou významně ovlivnit přilnavost psích probiotik laktobacilů k hleny psů (Grzeškowiak et al. 2013). Jejich vliv na adhezi enteropatogenů ke psímu hleny se také měnil v závislosti na růstovém médiu použitém ke kultivaci probiotik (Grzeškowiak et al. 2014). Proto je třeba pečlivě zvážit podmínky růstu a média pro kontrolu kvality stávajících probiotik a pro identifikaci nových probiotik pro domácí zvířata, protože i malé změny vlastností mohou významně ovlivnit výsledek s různým dopadem na zdraví hostitele (Grzeškowiak et al. 2015).

### 4.3 Probiotika ve výživě psů

Probiotika, která jsou regulována jako doplňky stravy a potravin, se skládají z kvasinek nebo bakterií. Jsou dostupné jako kapsle, tablety, balíčky nebo prášky a jsou obsaženy v různých fermentovaných potravinách (Santosa et al. 2006).

Dle doporučení FAO/WHO by také na etiketách probiotických přípravků měli být vyznačeny informace o který rod, druh a kmen mikroorganismu se jedná, jaké minimální množství životaschopných bakterií na konci doby trvanlivosti výrobek obsahuje, na základě vědeckých poznatků by měla být stanovena zdravotní tvrzení, doporučená dávka a správné podmínky skladování (FAO/WHO 2002).

Aby se předešlo závažným onemocněním, byla krmiva pro domácí zvířata formulována s různými probiotickými bakteriemi (Weese a Arroyo 2003). Mezi nejpoužívanější bakteriální rody patří *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Pediococcus* a *Streptococcus* (Yirga 2015). Některé komerční produkty používají jeden mikrobiální druh, jiné jsou vícedruhové, navíc jsou na trhu probiotika na bázi bakterií, plísní, sporotvorných i nesporotvorných mikroorganismů (Bajagaia kol. 2016).

Často skutečný počet životaschopných mikroorganismů obecně neodpovídá popisům na etiketě, což brání tomu, aby krmivo mělo zamýšlené příznivé účinky (Weese a Arroyo 2003).

Z hlediska výživy u domácích zvířat jsou diety přesně sestaveny a krmivo je konzumováno tak, aby bylo dosaženo produkčních cílů, které zahrnují potřeby růstu, údržby a reprodukce. Víme, že tyto potřeby se v průběhu života zvířete mění, a proto mají formulované diety založené na produkčních cílech, potřebách údržby a věku (Rauw 2012).

### 4.4 Fekální mikrobiální transplantace

Podávání jednokmenových nebo i vícekmenných probiotických přípravků může mít omezenou schopnost trvale ovlivňovat složení střevní mikrobioty, zejména s ohledem na skutečnost, že mikrobiota se skládá ze stovek mikrobiálních druhů.

Na základě předpokladu, že za určitých podmínek je potřeba komplexnější změna (např. *Clostridium difficile* infekce nebo IBD), došlo k pokusům o přenos střevní mikrobioty z jednoho subjektu na druhého. Toto bylo nazváno fekální mikrobiální transplantace (FMT), mikrobiální restorativní terapie nebo fekální bakterioterapie.

V humánní medicíně se FMT většinou prováděla pro recidivy *C. difficile* infekce. Ukázalo se, že FMT je bezpečný a účinný u 83–92 % lidských pacientů, u kterých bylo dosaženo úplného vymizení klinických příznaků (Gough 2011).

K dispozici jsou omezené klinické údaje hodnotící použití FMT pro IBD u psů, ale pilotní studie naznačují, že míra odpovědi na FMT u chronického střevního zánětu je mnohem nižší ve srovnání s *C. difficile* infekcí (Colman 2014).

## 5 Metodika

### 5.1 Testované vzorky

Bylo testováno 8 různých vzorků komerčně vyráběných probiotických past pro psy, které byly náhodně vybrány a následně zakoupeny v běžné tržní síti. Probiotika obsahují, dle deklarace výrobců, probiotické mikroorganismy zlepšující střevní mikrobiom.

**Vzorek 1** je probiotická pasta pro kočky a psy. Výrobce uvádí, že pasta se využívá při průjmech, změně dietních návyků, parazitárních a infekčních onemocněních trávicího traktu. Pasta dle výrobce obsahuje živé bakterie *Enterococcus faecium* v počtu  $1,5 \times 10^8$  CFU/g a *Lactobacillus acidophilus* v počtu  $5,2 \times 10^3$  CFU/g v kombinaci s vysokým obsahem kvasinek.

**Vzorek 2** je probiotická a prebiotická pasta pro psy a kočky. Dle výrobce je pasta určena na zmírnění akutních průjmů. K rekolonizaci střeva je dle výrobce využit *Enterococcus faecium* v počtu  $2 \times 10^9$  CFU/g.

**Vzorek 3** je probiotická pasta s přidavkem  $\text{Fe}^{2+}$  iontů k prevenci fyziologické anemie mláďat a zvýšení odolnosti mláďat k enterálními infekcím. 1 g pasty dle výrobce obsahuje  $5 \times 10^8$  CFU/g zárodků (*Enterococcus faecium*).

**Vzorek 4** je probiotická pasta určena především pro štěňata a koťata, popřípadě gravidní a laktující feny nebo zvířata v rekonvalescenci. Dle výrobce zlepšuje odolnost k bakteriálním infekcím zoohygienickým a nutričním stresům a mimořádným fyzickým zátěžím. Pasta dle výrobce obsahuje bakterii *Enterococcus faecium* v počtu  $2 \times 10^9$  CFU/g.

**Vzorek 5** je prebiotická a probiotická pasta kombinace laktobacilů a kolostra pro psy a kočky. Přípravek je určen k podpoře růstu a vývoji normální mikroflóry. Výrobce uvádí, že pasta obsahuje *Lactobacillus acidophilus* v počtu  $3,33 \times 10^8$  CFU/g, *Lactobacillus rhamnosus* v počtu  $3,33 \times 10^8$  CFU/g a *Enterococcus faecium* v počtu  $5 \times 10^8$  CFU/g.

**Vzorek 6** je pasta, která obsahuje probiotické bakterie. Přípravek je určen pro obnovení a udržení správné funkce střev u psa. Využívá se při mikrobiální dysbalanci. Výrobce uvádí, že přípravek obsahuje bakterii *Enterococcus faecium* v počtu  $5 \times 10^8$  CFU/g.

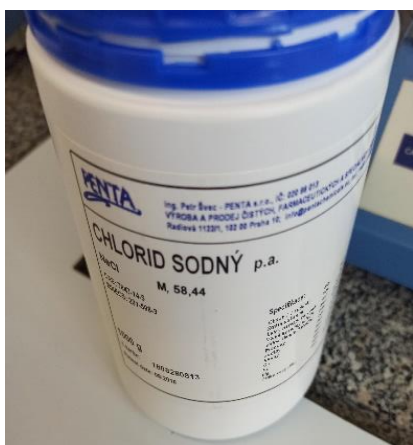
**Vzorek 7** je probiotická pasta pro psy a kočky, která dle výrobce obsahuje prospěšnou střevní mikrobiální kulturu v podobě *Enterococcus faecium* ( $2 \times 10^8$  CFU/g), prebiotikum, kaolin a pektin. Výrobek zklidňuje střevo a zlepšuje konzistenci výkalů.

**Vzorek 8** je dle výrobce vylepšený vzorek 7, který navíc obsahuje psyllium, beta-glukany a vedle kaolinu další druh jílu. Dle výrobce obsahuje *Enterococcus faecium* v počtu  $2 \times 10^8$  CFU/g.

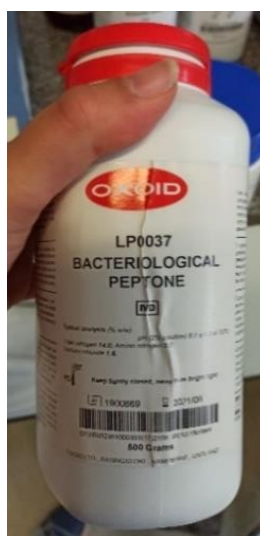
## 5.2 Postup mikrobiologického rozboru

### 5.2.1 Příprava vzorků

Na ředící řadu bylo vytvořeno potřebné množství peptonové vody. Na 1 litr destilované vody bylo přidáno 5 g chloridu sodného (Penta, CZ) (Obr.8) a 10 g peptonu (Oxid, UK) (Obr.9). Vše bylo smícháno a pomocí pipety přeneseno do zkumavek po 9 mililitrech. Zkumavky s peptonovou vodou byly následně autoklávovány při 120 C° po dobu 10 minut v autoklávu (Obr. 6).



Obrázek 8 Chlorid sodný (vlastní dokumentace)



Obrázek 5 Pepton (vlastní dokumentace)



Obrázek 6 Autoklav (vlastní dokumentace)



Obrázek 7 Peptonová voda pH 5-6 (vlastní dokumentace)



Obrázek 8 Zkumavky s peptonovou vodou (vlastní dokumentace)

Do prvních zkumavek ředících řad byl přidán 1 g vzorku (Obr.9 a 10).



Obrázek 9 1 g vzorku  
(vlastní dokumentace)



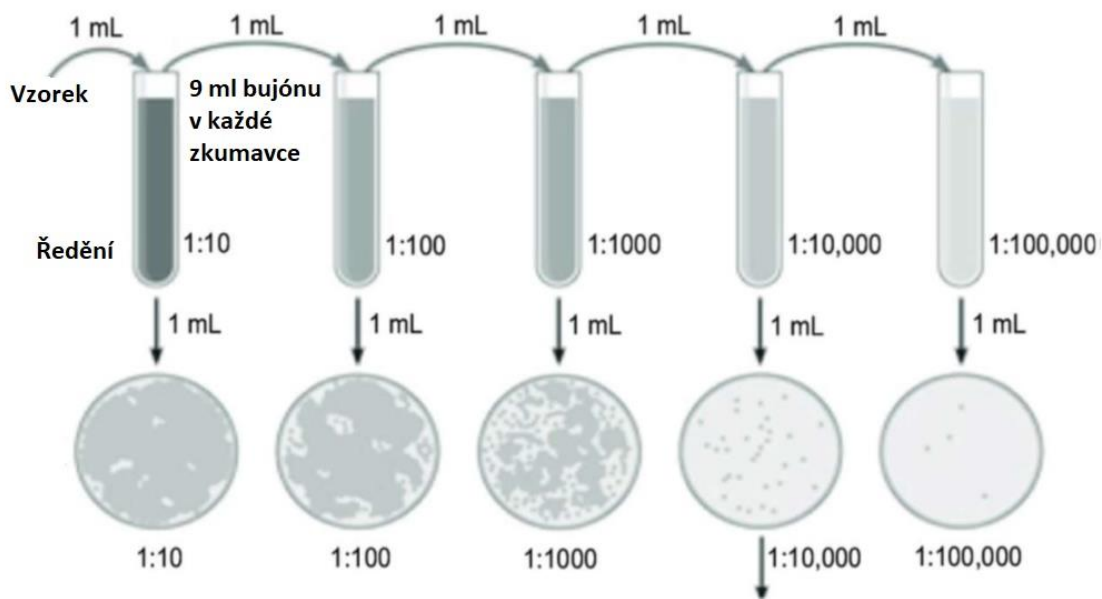
Obrázek 10 1 g vzorku  
(vlastní dokumentace)

Do zkumavek se vzorky byly přidány skleněné antiperle a zkumavky byly zvortexovány (Obr.11). U každého vzorku byla vytvořena desítková ředící řada (9 ml peptonové vody a 1 ml předchozího ředění) (Obr.12 a 13).



Obrázek 11 Zvortexované vzorky v peptonové vodě (vlastní dokumentace)





Obrázek 12 Desítková ředící řada (Singh et al. 2018)



Obrázek 13 Desítková ředící řada (Vlastní dokumentace)

## 5.2.2 Kultivace bakterií rodu *Enterococcus*

Bylo připraveno kultivační médium. Médium bylo připravováno dle návodu a množství bylo vypočítáno z počtu ředění a opakování každého vzorku.

**Médium: Slanetz and Bartley agar (Oxoid, UK) (Obr.14)**

Na 1 litr destilované vody bylo dáno 42 g agaru Slanetz and Bartley.

Složení (g/l):	Tryptóza	20,0
	Kvasničný extrakt	5,0
	Glukóza	2,0
	Hydrogenfosforečnan draselný	4,0
	Azid sodný	0,4
	Trifenyttetrazolium chlorid	0,1
	Agar	10,0

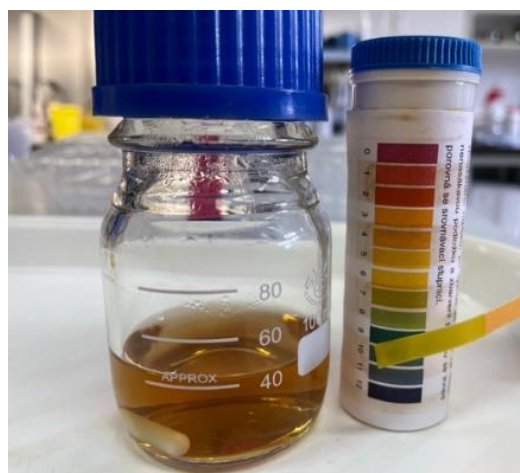


Obrázek 14 Médium  
(vlastní dokumentace)

Dle potřebného objemu bylo smícháno navážené množství agaru v destilované vodě. Suspenze byla přivedena k varu. Poté co se prášek zcela rozpustil, byl agar dán do vodní lázně a zchlazen na 50 °C (Obr.15).

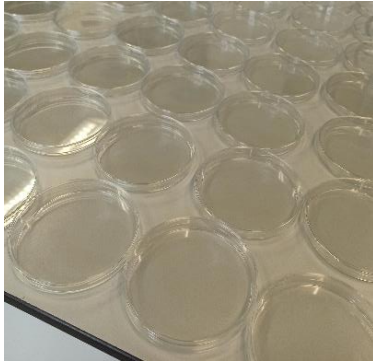


Obrázek 15 Agar ve vodní lázni  
(vlastní dokumentace)



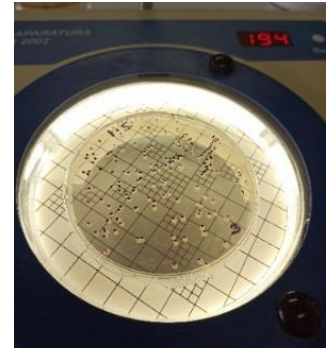
Obrázek 16 Agar, pH 6-7  
(vlastní dokumentace)





Obrázek 17 Petriho misky  
(vlastní dokumentace)

Agar byl rozlit do Petriho misek (Obr.17), v průměru 90 mm (cca 12 ml v misce). Po ztuhnutí, bylo na každou misku dáno asepticky 10 $\mu$ l vzorku z každé zkumavky ve 3 opakováních. Každý vzorek byl rozetřen skleněnou hokejkou.



Obrázek 18 Počítání kolonií  
(vlastní dokumentace)

Vzorky se nechaly kultivovat 24 hodin a poté se spočítaly počty kolonií (Obr.18).

### 5.2.3 Kultivace bakterií rodu *Lactobacillus*

Médium na Lactobacily bylo připraveno dle návodu a množství, které bylo vypočítáno z počtu ředění a opakování každého vzorku.

#### Rogosa agar (Oxoid, UK) (Obr. 19)

Na 1 litr destilované vody je dáno 82 g Rogosa agaru.

Složení(g/l):	Trypton	10,0
	Kvasničný extrakt	5,0
	Glukosa	20,0
	Tween 80	1,0
	Dihydrogenfosforečnan draselný	6,0
	Citrát amonný	2,0
	Acetát sodný	17,0
	Síran hořečnatý	0,575
	Síran manganatý	0,12
	Síran železitý	0,034
	Agar	20,0

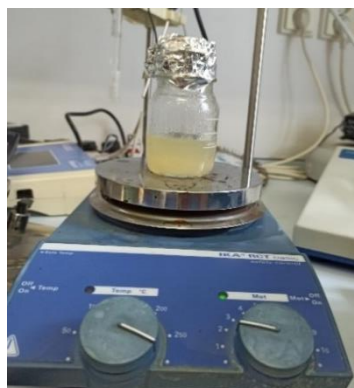


Obrázek 19 Rogosa agar, médium  
(vlastní dokumentace)

V destilované vodě bylo smícháno navážené množství agarů (Obr.20) dle potřebného objemu. Roztok byl vařen, dokud se agar nerozpustil (Obr.21).



Obrázek 20 navážené množství média (vlastní dokumentace)



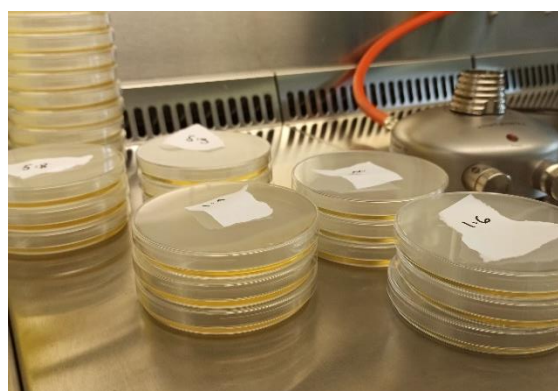
Obrázek 21 vaření agarů (vlastní dokumentace)

Do roztoku bylo zamícháno potřebné množství kyseliny octové (1,32 ml/l destilované vody) (Obr.22). Roztok byl znovu přiveden k varu a poté vložen do vodní lázně na zchlazení na 45°C.



Obrázek 22 Rozvařený agar pH kolem 6 (vlastní dokumentace)

Ve Flowboxu byl zapálen kahan a do Petriho misky byl dán 10 $\mu$ l vzorku, nalil se agar a krouživými pohyby se rozprostřel po misce. Po ztuhnutí byla do každé misky přidána a rozprostřena další, tenká vrstva totožného agarů.



Obrázek 23 Tuhnoucí médium se vzorky (vlastní dokumentace)

Misky byly kultivovány 72 hodin. Poté byly spočítány kolonie a vyhodnoceny výsledky.

## 6 Výsledky

Bylo otestováno 8 vzorků probiotických past, u kterých výrobce uvádí, že obsahují mikroorganismy zlepšující mikrobiom psa. Výrobce u každého vzorku deklaruje určitý počet mikroorganismů.

Tabulky 1–8 zobrazují výsledky mikrobiologické kultivační analýzy. Jsou zde zobrazeny rozdíly mezi počtem kolonií z analýzy a počtem kolonií deklarovaným výrobcem. Pro identifikaci bakterií bylo využito selektivní médium pro dané bakterie. Výsledné počty celkových enterokoků a laktobacilů jsou uvedeny v log/CFU.

Výsledky jsou následující:

**Tabulka 1:** Vyhodnocení kultivace vzorku 1

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	7,88	7,91	8,94	8,24	0,49	8,18
<i>Lactobacillus</i>	0	4,82	X	2,41	2,41	9,72

**Tabulka 2:** Vyhodnocení kultivace vzorku 2

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	0	4,82	4,74	3,19	2,25	9,3

**Tabulka 3:** Vyhodnocení kultivace vzorku 3

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	7,94	0	4,74	4,23	3,26	8,70

**Tabulka 4:** Vyhodnocení kultivace vzorku 4

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	9,67	9,49	9,44	9,53	0,1	9,3

**Tabulka 5:** Vyhodnocení kultivace vzorku 5

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	8,88	8,97	9,20	9,02	0,13	8,45
<i>Lactobacillus</i>	0	11,22	X	5,61	5,61	8,82

**Tabulka 6:** Vyhodnocení kultivace vzorku 6

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	9,75	9,01	9,29	9,35	0,31	8,70

**Tabulka 7:** Vyhodnocení kultivace vzorku 7

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	8,86	9,16	9,12	9,05	0,13	8,30

**Tabulka 8:** Vyhodnocení kultivace vzorku 8

	1. opakování Log/CFU	2. opakování Log/CFU	3. opakování Log/CFU	Průměr z opakování Log/CFU	Směrodatná odchylka	Výrobce Log/CFU
<i>Enterococcus</i>	8,50	8,98	9,08	8,85	0,25	8,30

CFU = KTJ – Kolonie tvořící jednotku

Zelená – počet kolonií je stejný nebo vyšší

Červená – počet kolonií je nižší, než bylo deklarováno

Nejlépeších výsledků dosáhl vzorek 7 (tabulka 7), kde se našlo v průměru o 0,35 log/CFU (9,04 %) enterokoků více, než deklaroval výrobce. Na druhou stranu nejméně se deklarovanému počtu přiblížil vzorek 2 (tabulka 2), kde se nacházelo o 6,11 log/CFU (65,69 %) enterokoků méně. Laktobacilů se nacházelo ve vzorcích (tabulka 1 a 5) až o 75 % méně, než bylo deklarováno.

## 7 Diskuze

Aby se bakterie mohly klasifikovat jako probiotika, dle WHO/FAO (2002) musí být bakterie životaschopné a dodávané v dostatečném množství. Na trhu se objevují přípravky, které dle výrobce obsahují deklarované množství probiotik. Ale často počet životaschopných mikroorganismů neodpovídá popisům na etiketě (Weese & Arroyo 2003).

Momentálně popularita probiotických preparátů exponenciálně vzrůstá. Objevuje se otázka, jestli i kvalita probiotických preparátů vzrůstá (Kolaček et al. 2017).

V publikacích hodnotící kvalitu probiotik je zřejmé, že kvalita neodpovídá deklarovaným informacím na etiketách výrobků. Jejich počet je nedostačující a životaschopnost velmi snižena (Jackson et al. 2019). Například ve studiích Gaggia et al. (2010) se ve výsledku našly rozdílné mikroorganismy, než byly deklarovány. Také množství těchto bakterií nebylo dostačující.

Častým problémem je absence deklarovaných taxonů. A kvůli nedostačujícímu množství životaschopných bakterií, nemusí docházet ani k očekávanému zdravotnímu přínosu pro hostitele (Jackson et al. 2019).

Ve studii od Coman et al. (2019) byly izolovány některé rody *Lactobacillus sp.* z výkalů zdravých psů. Tyto bakterie byly identifikovány a charakterizovány pro jejich potenciální probiotickou aktivitu. Z čerstvého exkrementu zdravých psů bylo izolováno 14 různých druhů patřících do rodu *Lactobacillus sp.*, ale pouze pět z nich bylo schopno přežít v podmínkách simulované žaludeční kyseliny.

Tolerance bakterií vůči kyselinám je důležitým faktorem nejen pro zajištění jejich odolnosti vůči žaludečním stresům, ale také během výroby a komercializace pro jejich použití jako dietních doplňků (Tuomola et al. 2001).

Xu (2019) zkoumal příznivé účinky podávání probiotických sloučenin psům různého věku. Výsledky naznačovaly, že probiotické sloučeniny můžou účinně zmírňovat klinické příznaky průjmu u psů. Pozorování naznačovala, že komunita mladých střevních bakterií by mohla zlepšit schopnost trávení potravy u starších psů modulací jejich chuti k jídlu a asimilací živin.

Změny střevní mikrobioty související s věkem jsou spojeny se zvýšeným zánětem a oslabenou imunitou a tyto změny mohou z dlouhodobého hlediska zkrátit životnost zvířat (Smith et al. 2017). Na druhou stranu, zdravá střevní mikrobiota může zachránit nebo zpomalit proces stárnutí tím, že zachová vrozenou imunitní homeostázu, a nakonec podpoří dlouhověkost zvířete (Guo et al. 2014).

Ve výsledku studie Di Pierra et al. (2019) žádný ze zkoumaných probiotických přípravků neobsahoval dostatečný počet životaschopných mikroorganismů.

Cílem praktické části bylo hodnotit vybraná probiotika na rodové úrovni a stanovit jejich množství kulturační metodou. Pro práci bylo vybráno 8 komerčních past, kde byl deklarován počet probiotických organismů.

Z výsledků je patrné, že 6 z 8 probiotických past (vzorek 1, 4, 5, 6, 7, 8) obsahovalo deklarovaný počet bakterií rodu *Enterococcus*. Na rozdíl od vzorků 2 a 3, který se k počtu deklarovaných mikroorganismů ani nepřiblížily. Ve vzorku 2 se nacházelo o 6,11 Log/CFU *Enterococcus spp.* méně, než deklaroval výrobce. A ve vzorku 3 se objevilo o 4,47 Log/CFU bakterie *Enterococcus spp.* méně, než výrobce uváděl na obalu výrobku.

Vzorky 1 a 5 dle výrobce obsahovaly bakterie rodů *Enterococcus* a *Lactobacillus*. V těchto vzorcích se našel minimální počet bakterie *Lactobacillus*. Ve vzorku 1 o 7,31 Log/CFU a ve vzorku 5 o 3,21 Log/CFU, než deklaroval výrobce na etiketě.

Vzorky 2, 3 a 4 se špatně rozpouštěly v peptonové vodě, která má podobné pH jako tenké střevo (pH kolem 6 – Obr. 7). Což mohl být také důvod menšího výskytu bakterií na kultivačních médiích. Jen vzorek 4 měl vyšší počet bakterií, než je deklarováno na obalu.

Dalším důvodem může být problém s kvalitou probiotik. Je to jeden z nejběžnějších důvodů, proč mikroorganismy ztratily svou životaschopnost. Kvalita se může změnit během balení, skladování, distribuce a maloobchodního prodeje. Přežití a životaschopnost jsou skutečně ovlivněny řadou faktorů prostředí, jako je materiál nosiče, pevnost v tlaku, kyslík, teplota, aktivita vody, přítomnost dalších složek a doba skladování, které nejsou vždy dobře kontrolovány (Schoeni 2015).

Životaschopnost mikroorganismů během skladování by mohla být udržena například sníženou okolní teplotou, kontrolou vlhkosti a zabráněním přístupu kyslíku k výrobku s probiotiky (Huang et al. 2017).

Výsledky mohou být jiné z důvodu nesprávného zacházení při experimentu. Pro eliminaci chyb byl každý vzorek při každém opakování dán na 3 Petriho misky. A experiment byl pro rod *Enterococcus* třikrát opakován a pro rod *Lactobacillus* dvakrát. Manipulace s bakteriemi není jednoduchá a často vede ke smíšeným výsledkům (Pilla & Suchodolski 2020).

Ideální by bylo určit bakterie na úrovni druhu, například pomocí metody PCR s druhově specifickými primery, nicméně to nebylo předmětem bakalářské práce.

## 8 Závěr

Dle hypotézy se předpokládalo, že se v probiotických přípravcích bude nacházet nižší než deklarovaný počet probiotických bakterií (*Enterococcus* a *Lactobacillus*). Hypotéza se potvrdila jen z části.

Některé probiotické přípravky obsahovaly deklarovaný počet bakterií rodu *Enterococcus faecium*, ale probiotické pasty, které měly obsahovat bakterie rodu *Lactobacillus*, dané bakterie v deklarovaném množství neobsahovaly.

Do budoucna by se studie měly zaměřit na to, jak nejlépe uchovat mikroorganismy životaschopné při manipulaci s probiotickými výrobky. A výrobce by se měl zaměřit na lepší rozpustnost probiotických past.

## 9 Seznam literatury

- Alessandri, G., Milani, C., Mancabelli, L., Mangifesta, M., Lugli, G., Viappiani, A., . . . Ventura, M. (2019). Metagenomic dissection of the canine gut microbiota: insights into taxonomic, metabolic and nutritional features. *Environmental Microbiology*, vol. 21(issue 4), 1331-1343. doi: 10.1111/1462-2920.14540
- Alexander, C., Cross, T.-W., Devendran, S., Neumer, F., Theis, S., Ridlon, J., . . . Swanson, K. (2018). Effects of prebiotic inulin-type fructans on blood metabolite and hormone concentrations and faecal microbiota and metabolites in overweight dogs. *British Journal of Nutrition*, vol. 120(issue 6), 711-720. doi: 10.1017/S0007114518001952
- Axelsson, E., Ratnakumar, A., Arendt, M.-L., Maqbool, K., Webster, M., Perloski, M., . . . Lindblad-Toh, K. (2013). The genomic signature of dog domestication reveals adaptation to a starch-rich diet. *Nature*, vol. 495(issue 7441), 360-364. doi: 10.1038/nature11837
- Bajagai, Y.S., A.V. Klieve, P.J. Dart, and W.L. Bryden. 2016. Probiotics in animal nutrition: Production, impact and regulation. paper 179. FAO Animal Production and Health, Rome, ITA.
- Bahrndorff, S., Alemu, T., Alemneh, T., & Lund Nielsen, J. (2016). The Microbiome of Animals: Implications for Conservation Biology. *International Journal of Genomics*, vol. 2016, 1-7. doi: 10.1155/2016/5304028
- Bär, J., Leung, J., Hansen, C., Loke, P., Hall, A., Conour, L., & Graham, A. (2020). Strong effects of lab-to-field environmental transitions on the bacterial intestinal microbiota of *Mus musculus* are modulated by *Trichuris muris* infection. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 96(issue 10). doi:10.1093/femsec/fiaa167
- Bell, J., Kopper, J., Turnbull, J., Barbu, N., Murphy, A., & Mansfield, L. (2008). Ecological Characterization of the Colonic Microbiota of Normal and Diarrheic Dogs. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, vol. 2008, 1-17. doi:10.1155/2008/149694
- Bell, S., Nash, A., Zanghi, B., Otto, C., & Perry, E. (2020). An Assessment of the Stability of the Canine Oral Microbiota After Probiotic Administration in Healthy Dogs Over Time. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 7. doi:10.3389/fvets.2020.00616



- BENNO, Y., NAKAO, H., UCHIDA, K., & MITSUOKA, T. (1992). Impact of the Advances in Age on the Gastrointestinal Microflora of Beagle Dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*, vol. 54(issue 4), 703-706. doi:10.1292/jvms.54.703
- Berings, M., Karaaslan, C., Altunbulakli, C., Gevaert, P., Akdis, M., Bachert, C., & Akdis, C. (2017). Advances and highlights in allergen immunotherapy: On the way to sustained clinical and immunologic tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, vol. 140(issue 5), 1250-1267. doi:10.1016/j.jaci.2017.08.025
- Bested, A., Logan, A., & Selhub, E. (2013). Intestinal microbiota, probiotics and mental health: from Metchnikoff to modern advances. *Gut Pathogens*, vol. 5(issue 1). doi:10.1186/1757-4749-5-5
- Brulc, J., Antonopoulos, D., Berg Miller, M., Wilson, M., Yannarell, A., Dinsdale, E., . . . White, B. (2009). Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 106(issue 6), 1948-1953. doi:10.1073/pnas.0806191105
- Bybee, S., Scorza, A., & Lappin, M. (2011). Effect of the Probiotic *Enterococcus faecium* SF68 on Presence of Diarrhea in Cats and Dogs Housed in an Animal Shelter. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 25(issue 4), 856-860. doi:10.1111/j.1939-1676.2011.0738.x
- Caporaso, J., Lauber, C., Walters, W., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., . . . Knight, R. (2012). Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *The ISME Journal*, vol. 6(issue 8), 1621-1624. doi:10.1038/ismej.2012.8
- Carthey, A., Blumstein, D., Gallagher, R., Tetu, S., Gillings, M., & Bennett, A. (2020). Conserving the holobiont. *Functional Ecology*, vol. 34(issue 4), 764-776. doi:10.1111/1365-2435.13504
- Coêlho, M., Coêlho, F., & Mancilha, I. (2013). Probiotic Therapy: A Promising Strategy for the Control of Canine Hookworm. *Journal of Parasitology Research*, vol. 2013, 1-6. doi:10.1155/2013/430413
- Cohen, S. (2002). Can Pets Function as Family Members? *Western Journal of Nursing Research*, vol. 24(issue 6), 621-638. doi:10.1177/019394502320555386

- Collado, M., Grześkowiak, Ł., & Salminen, S. (2007). Probiotic Strains and Their Combination Inhibit In Vitro Adhesion of Pathogens to Pig Intestinal Mucosa. *Current Microbiology*, vol. 55(issue 3), 260-265. doi:10.1007/s00284-007-0144-8
- Collado, M., Meriluoto, J., & Salminen, S. (2007). Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Letters in Applied Microbiology*, vol. 45(issue 4), 454-460. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02212.x
- Colman, R., & Rubin, D. (2014). Fecal microbiota transplantation as therapy for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*, vol. 8(issue 12), 1569-1581. doi:10.1016/j.crohns.2014.08.006
- Coman, M., Verdenelli, M., Cecchini, C., Belà, B., Gramenzi, A., Orpianesi, C., . . . Silvi, S. (2019). Probiotic characterization of Lactobacillus isolates from canine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 126(issue 4), 1245-1256. doi:10.1111/jam.14197
- Dewhirst, F., Klein, E., Thompson, E., Blanton, J., Chen, T., Milella, L., . . . Ravel, J. (2012). The Canine Oral Microbiome. *PLoS ONE*, vol. 7(issue 4). doi:10.1371/journal.pone.0036067
- Di Pierro, F., Polzonetti, V., Patrone, V., & Morelli, L. (2019). Microbiological Assessment of the Quality of Some Commercial Products Marketed as Lactobacillus crispatus-Containing Probiotic Dietary Supplements. *Microorganisms*, vol. 7(issue 11). doi:10.3390/microorganisms7110524
- Eckburg, P., Bik, E., Bernstein, C., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., . . . Relman, D. (2005). Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science*, vol. 308(issue 5728), 1635-1638. doi:10.1126/science.1110591
- FAO/WHO Working Group. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization. London Ontario, Canada.
- Farrell, J., Zhang, L., Zhou, H., Chia, D., Elashoff, D., Akin, D., . . . Wong, D. (2012). Variations of oral microbiota are associated with pancreatic diseases including pancreatic cancer. *Gut*, vol. 61(issue 4), 582-588. doi:10.1136/gutjnl-2011-300784
- Fuller, R. (1992). History and development of probiotics. V R. Fuller, *Probiotics* (stránky 1-8). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-94-011-2364-8\_1
- Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 141, S15-S28. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.031

- Garcia-Mazcorro, J., Dowd, S., Poulsen, J., Steiner, J., & Suchodolski, J. (2012). Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *MicrobiologyOpen*, vol. 1(issue 3), 340-347. doi:10.1002/mbo3.36
- Garcia-Mazcorro, J., Suchodolski, J., Jones, K., Clark-Price, S., Dowd, S., Minamoto, Y., . . . Dossin, O. (2012). Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 80(issue 3), 624-636. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01331.x
- Giaretta, P., Suchodolski, J., Jergens, A., Steiner, J., Lidbury, J., Cook, A., . . . Rech, R. (2020). Bacterial Biogeography of the Colon in Dogs With Chronic Inflammatory Enteropathy. *Veterinary Pathology*, vol. 57(issue 2), 258-265. doi:10.1177/0300985819891259
- Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, vol. 125(issue 6), 1401-1412. doi:10.1093/jn/125.6.1401
- Gibson, G., & Roberfroid, M. (1995). Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. *The Journal of Nutrition*, vol. 125(issue 6), 1401-1412. doi:10.1093/jn/125.6.1401
- Gibson, G., Hutkins, R., Sanders, M., Prescott, S., Reimer, R., Salminen, S., . . . Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 14(issue 8), 491-502. doi:10.1038/nrgastro.2017.75
- Gilbert, M., Ijssennagger, N., Kies, A., & van Mil, S. (2018). Protein fermentation in the gut; implications for intestinal dysfunction in humans, pigs, and poultry. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, vol. 315(issue 2), G159-G170. doi:10.1152/ajpgi.00319.2017
- Gilmore, M., & Ferretti, J. (2003). The Thin Line Between Gut Commensal and Pathogen. *Science*, vol. 299(issue 5615), 1999-2002. doi:10.1126/science.1083534
- Gogineni, V. (2013). Probiotics: History and Evolution. *Journal of Ancient Diseases & Preventive Remedies*, vol. 01(issue 02). doi:10.4172/2329-8731.1000107

- Goldenberg, J., Lytvyn, L., Steurich, J., Parkin, P., Mahant, S., & Johnston, B. (2015). Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD004827.pub4
- Goldenberg, J., Yap, C., Lytvyn, L., Lo, C.-F., Beardsley, J., Mertz, D., & Johnston, B. (2017). Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. doi:10.1002/14651858.CD006095.pub4
- Gough, E., Shaikh, H., & Manges, A. (2011). Systematic Review of Intestinal Microbiota Transplantation (Fecal Bacteriotherapy) for Recurrent Clostridium difficile Infection. *Clinical Infectious Diseases*, vol. 53(issue 10), 994-1002. doi:10.1093/cid/cir632
- Guo L, Karpac J, Tran SL, Jasper H. PGRP-SC2 promotes gut immune homeostasis to limit commensal dysbiosis and extend lifespan. *Cell*. (2014) 156:109–22. doi: 10.1016/j.cell.2013.12.018
- Grześkowiak, Ł., Collado, M., Beasley, S., & Salminen, S. (2014). Pathogen exclusion properties of canine probiotics are influenced by the growth media and physical treatments simulating industrial processes. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 116(issue 5), 1308-1314. doi: 10.1111/jam.12477
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Beasley, S., & Salminen, S. (2015). Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe*, vol. 34, 14-23. doi: 10.1016/j.anaerobe.2015.04.002
- Grześkowiak, Ł., Endo, A., Collado, M., Pelliniemi, L., Beasley, S., & Salminen, S. (2013). The effect of growth media and physical treatments on the adhesion properties of canine probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 115(issue 2), 539-545. doi:10.1111/jam.12235
- Guard, B., Barr, J., Reddivari, L., Klemashevich, C., Jayaraman, A., Steiner, J., . . . Monleon, D. (2015). Characterization of Microbial Dysbiosis and Metabolomic Changes in Dogs with Acute Diarrhea. *PLOS ONE*, vol. 10(issue 5). doi: 10.1371/journal.pone.0127259
- Handl, S., Dowd, S., Garcia-Mazcorro, J., Steiner, J., & Suchodolski, J. (2011). Massive parallel 16S rRNA gene pyrosequencing reveals highly diverse fecal bacterial and fungal communities in healthy dogs and cats. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 76(issue 2), 301-310. doi:10.1111/j.1574-6941.2011.01058.x

- Hang, I., Heilmann, R., Grützner, N., Suchodolski, J., Steiner, J., Atroshi, F., . . . Spillmann, T. (2013). Impact of diets with a high content of greaves-meal protein or carbohydrates on faecal characteristics, volatile fatty acids and faecal calprotectin concentrations in healthy dogs. *BMC Veterinary Research*, vol. 9(issue 1). doi:10.1186/1746-6148-9-201
- Hang, I., Rinttila, T., Zentek, J., Kettunen, A., Alaja, S., Apajalahti, J., . . . Spillmann, T. (2012). Effect of high contents of dietary animal-derived protein or carbohydrates on canine faecal microbiota. *BMC Veterinary Research*, vol. 8(issue 1). doi:10.1186/1746-6148-8-90
- Herstad, H., Nesheim, B., L'Abée-Lund, T., Larsen, S., & Skancke, E. (2009). Effects of a probiotic intervention in acute canine gastroenteritis – a controlled clinical trial. *Journal of Small Animal Practice*, vol. 51(issue 1), 34-38. doi:10.1111/j.1748-5827.2009.00853.x
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G., Merenstein, D., Pot, B., . . . Sanders, M. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 11(issue 8), 506-514. doi:10.1038/nrgastro.2014.66
- Honda, K., & Littman, D. (2012). The Microbiome in Infectious Disease and Inflammation. *Annual Review of Immunology*, vol. 30(issue 1), 759-795. doi:10.1146/annurev-immunol-020711-074937
- Honneffer, J., Steiner, J., Lidbury, J., & Suchodolski, J. (2017). Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, vol. 13(issue 3). doi:10.1007/s11306-017-1165-3
- Hopkins, M. (2001). Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*, vol. 48(issue 2), 198-205. doi:10.1136/gut.48.2.198
- Huang S, Vignolles M. -L., Chen XD, Le Loir Y, Jan G, Schuck P, Jeantet R. 2017. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 63: 1-17.
- Christensen, H., Frøkiær, H., & Pestka, J. (2002). Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, vol. 168(issue 1), 171-178. doi:10.4049/jimmunol.168.1.171

- Isaiah, A., Hoffmann, A., Kelley, R., Mundell, P., Steiner, J., Suchodolski, J., & He, Z. (2017). Characterization of the nasal and oral microbiota of detection dogs. *PLOS ONE*, vol. 12(issue 9). doi:10.1371/journal.pone.0184899
- Jensen, A., & Bjørnvad, C. (2019). Clinical effect of probiotics in prevention or treatment of gastrointestinal disease in dogs: A systematic review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 33(issue 5), 1849-1864. doi:10.1111/jvim.15554
- Jia, J., Frantz, N., Khoo, C., Gibson, G., Rastall, R., & McCartney, A. (2010). Investigation of the faecal microbiota associated with canine chronic diarrhoea. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 71(issue 2), 304-312. doi:10.1111/j.1574-6941.2009.00812.x
- Jones, S., & Versalovic, J. (2009). Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, vol. 9(issue 1). doi:10.1186/1471-2180-9-35
- Kant, R., de Vos, W., Palva, A., & Satokari, R. (2014). Immunostimulatory CpG motifs in the genomes of gut bacteria and their role in human health and disease. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 63(issue 2), 293-308. doi:10.1099/jmm.0.064220-0
- Kempf, C., Schulz, B., Strauch, C., Sauter-Louis, C., Truyen, U., & Hartmann, K. (2018). Virusnachweis in Kotproben und klinische sowie labordiagnostische Befunde von Hunden mit akutem hämorrhagischem Durchfall. *Tierärztliche Praxis Ausgabe K: Kleintiere / Heimtiere*, vol. 38(issue 02), 79-86. doi:10.1055/s-0038-1622838
- KELLEY, Russell L., et al. Clinical benefits of probiotic canine-derived *Bifidobacterium animalis* strain AHC7 in dogs with acute idiopathic diarrhea. *Veterinary Journal*, 2009, 10.3: 121-130.)
- Koh, J., Choi, S., Park, S., Choi, N.-J., Kim, Y., & Kim, S. (2013). Synbiotic impact of tagatose on viability of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG mediated by the phosphotransferase system (PTS). *Food Microbiology*, vol. 36(issue 1), 7-13. doi:10.1016/j.fm.2013.03.003
- Kolaček S, Hojsak I, Canani RB, Guarino A, Indrio F, Orel R, Pot B, Shamir R, Szajewska H, Vandenaspl Y, Goudoever JV, Weizman Z. 2017. Commercial Probiotic Products: A Call for Improved Quality Control. A position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 65(1):117-124

- Koliada, A., Syzenko, G., Moseiko, V., Budovska, L., Puchkov, K., Perederiy, V., . . . Vaiserman, A. (2017). Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiology*, vol. 17(issue 1). doi:10.1186/s12866-017-1027-1
- Krishnan, K., Chen, T., & Paster, B. (2017). A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Diseases*, vol. 23(issue 3), 276-286. doi:10.1111/odi.12509
- Laforest-Lapointe, I., Paquette, A., Messier, C., & Kembel, S. (2017). Leaf bacterial diversity mediates plant diversity and ecosystem function relationships. *Nature*, vol. 546(issue 7656), 145-147. doi:10.1038/nature22399
- Lauková, A., Stropfová, V., & Ouwehand, A. (2004). Adhesion Properties of Enterococci to Intestinal Mucus of Different Hosts. *Veterinary Research Communications*, vol. 28(issue 8), 647-655. doi:10.1023/B:VERC.0000045948.04027.a7
- Leahy, S., Higgins, D., Fitzgerald, G., & Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, vol. 98(issue 6), 1303-1315. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x
- Lee, W.-J., & Hase, K. (2014). Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nature Chemical Biology*, vol. 10(issue 6), 416-424. doi:10.1038/nchembio.1535
- Lee, Y.-K., Puong, K.-Y., Ouwehand, A., & Salminen, S. (2003). Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *Journal of Medical Microbiology*, vol. 52(issue 10), 925-930. doi:10.1099/jmm.0.05009-0
- Lee YK, Salminen S. (2009). Handbook of Probiotics and Prebiotics. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey.
- Leung, J., & Loke, P. (2013). A role for IL-22 in the relationship between intestinal helminths, gut microbiota and mucosal immunity. *International Journal for Parasitology*, vol. 43(3-4), 253-257. doi:10.1016/j.ijpara.2012.10.015
- Li, Q., & Zhou, J.-M. (2016). The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder. *Neuroscience*, vol. 324, 131-139. doi:10.1016/j.neuroscience.2016.03.013

- Li, Q., Lauber, C., Czarnecki-Maulden, G., Pan, Y., Hannah, S., & Clemente, J. (2017). Effects of the Dietary Protein and Carbohydrate Ratio on Gut Microbiomes in Dogs of Different Body Conditions. *mBio*, vol. 8(issue 1), e01703-16. doi:10.1128/mBio.01703-16
- Lin, P., Myers, L., Ray, L., Song, S.-C., Nasr, T., Berardinelli, A., . . . Neish, A. (2009). Lactobacillus rhamnosus blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47(issue 8), 1205-1211. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.07.033
- Liong MT. (2011). Probiotics: Biology, Genetics and Health Aspects. Springer. Berlin
- Makki, K., Deehan, E., Walter, J., & Bäckhed, F. (2018). The Impact of Dietary Fiber on Gut Microbiota in Host Health and Disease. *Cell Host & Microbe*, vol. 23(issue 6), 705-715. doi:10.1016/j.chom.2018.05.012
- Mar, J., Nagalingam, N., Song, Y., Onizawa, M., Lee, J., & Lynch, S. (2014). Amelioration of DSS-induced murine colitis by VSL#3 supplementation is primarily associated with changes in ileal microbiota composition. *Gut Microbes*, vol. 5(issue 4), 494-503. doi:10.4161/gmic.32147
- Marks, S. (2003). Antimicrobial susceptibilities of canine Clostridium difficile and Clostridium perfringens isolates to commonly utilized antimicrobial drugs. *Veterinary Microbiology*, vol. 94(issue 1), 39-45. doi:10.1016/S0378-1135(03)00061-0
- Marks, S., Kather, E., Kass, P., & Melli, A. (2002). Genotypic and Phenotypic Characterization of Clostridium perfringens and Clostridium difficile in Diarrheic and Healthy Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 16(issue 5), 533-540. doi:10.1111/j.1939-1676.2002.tb02383.x
- McClure, S. (2013). Domesticated animals and biodiversity: Early agriculture at the gates of Europe and long-term ecological consequences. *Anthropocene*, vol. 4, 57-68. doi:10.1016/j.ancene.2013.11.001
- McKenzie, V., Song, S., Delsuc, F., Prest, T., Oliverio, A., Korpita, T., . . . Knight, R. (2017). The Effects of Captivity on the Mammalian Gut Microbiome. *Integrative and Comparative Biology*, vol. 57(issue 4), 690-704. doi:10.1093/icb/ix090
- Middelbos, I., Vester Boler, B., Qu, A., White, B., Swanson, K., Fahey, G., & Yang, C.-H. (2010). Phylogenetic Characterization of Fecal Microbial Communities of Dogs Fed Diets with or without Supplemental Dietary Fiber Using 454 Pyrosequencing. *PLoS ONE*, vol. 5(issue 3). doi:10.1371/journal.pone.0009768



- Minamoto, Y., Minamoto, T., Isaiah, A., Sattasathuchana, P., Buono, A., Rangachari, V., . . . Suchodolski, J. (2019). Fecal short-chain fatty acid concentrations and dysbiosis in dogs with chronic enteropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 33(issue 4), 1608-1618. doi:10.1111/jvim.15520
- Minamoto, Y., Otoni, C., Steelman, S., Büyükleblebici, O., Steiner, J., Jergens, A., & Suchodolski, J. (2015). Alteration of the fecal microbiota and serum metabolite profiles in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *Gut Microbes*, vol. 6(issue 1), 33-47. doi:10.1080/19490976.2014.997612
- Minelli, E., & Benini, A. (2009). Relationship between number of bacteria and their probiotic effects. *Microbial Ecology in Health and Disease*, vol. 20(issue 4), 180-183. doi:10.1080/08910600802408095
- Moayyedi, P., Ford, A., Talley, N., Cremonini, F., Foxx-Orenstein, A., Brandt, L., & Quigley, E. (2010). The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut*, vol. 59(issue 3), 325-332. doi:10.1136/gut.2008.167270
- Moeller, A., Suzuki, T., Phifer-Rixey, M., & Nachman, M. (2018). Transmission modes of the mammalian gut microbiota. *Science*, vol. 362(issue 6413), 453-457. doi:10.1126/science.aat7164
- Morgan, K., & Tromborg, C. (2007). Sources of stress in captivity. *Applied Animal Behaviour Science*, vol. 102(3-4), 262-302. doi:10.1016/j.applanim.2006.05.032
- Morgan, X., Huttenhower, C., Lewitter, F., & Kann, M. (2012). Chapter 12: Human Microbiome Analysis. *PLoS Computational Biology*, vol. 8 (issue 12). doi:10.1371/journal.pcbi.1002808
- Nardone, G., & Compare, D. (2015). The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United European Gastroenterology Journal*, vol. 3(issue 3), 255-260. doi:10.1177/2050640614566846
- Nathan, C., & Cars, O. (2014). Antibiotic Resistance — Problems, Progress, and Prospects. *New England Journal of Medicine*, vol. 371(issue 19), 1761-1763. doi:10.1056/NEJMp1408040
- Newberry, S. (2012). Probiotics for the Prevention and Treatment of Antibiotic-Associated Diarrhea. *JAMA*, vol. 307(issue 18). doi:10.1001/jama.2012.3507

- Oelschlaeger, T. (2010). Mechanisms of probiotic actions – A review. *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 300(issue 1), 57-62. doi:10.1016/j.ijmm.2009.08.005
- Oswald, H., Sharkey, M., Pade, D., & Martinez, M. (2015). Canine gastrointestinal physiology: Breeds variations that can influence drug absorption. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 97, 192-203. doi:10.1016/j.ejpb.2015.09.009
- Pagnini, C., Saeed, R., Bamias, G., Arseneau, K., Pizarro, T., & Cominelli, F. (2010). Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 107(issue 1), 454-459. doi:10.1073/pnas.0910307107
- Pearson, G. (2001). Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocrine Reviews*, vol. 22(issue 2), 153-183. doi:10.1210/er.22.2.153
- Pilla, R., & Suchodolski, J. (2020). The Role of the Canine Gut Microbiome and Metabolome in Health and Gastrointestinal Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, vol. 6. doi:10.3389/fvets.2019.00498
- Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2018). Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases. *Nutrients*, vol. 10(issue 1). doi:10.3390/nu10010042
- Rada, V., Marounek, M. (2005). Probiotika a prebiotika ve výživě zvířat. 4-17 s
- Reid, G. (2016). Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 30(issue 1), 17-25. doi:10.1016/j.bpg.2015.12.001
- Roddie, G., Stafford, P., Holland, C., & Wolfe, A. (2008). Contamination of dog hair with eggs of *Toxocara canis*. *Veterinary Parasitology*, vol. 152(1-2), 85-93. doi:10.1016/j.vetpar.2007.12.008
- Rodríguez, J., Murphy, K., Stanton, C., Ross, R., Kober, O., Juge, N., . . . Collado, M. (2015). The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microbial Ecology in Health & Disease*, vol. 26(issue 0). doi:10.3402/mehd.v26.26050
- Roy, D. (2011). Probiotics. *Comprehensive Biotechnology*. Elsevier. 591-602.

- Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, vol. 84(issue 3), 197-215. doi:10.1016/S0168-1656(00)00375-8
- Saez-Lara, M., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., & Gil, A. (2015). The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases: A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. *BioMed Research International*, vol. 2015, 1-15. doi:10.1155/2015/505878
- Salas-Mani, A., Jeusette, I., Castillo, I., Manuelian, C., Lionnet, C., Iraculis, N., . . . Torre, C. (2018). Fecal microbiota composition changes after a BW loss diet in Beagle dogs. *Journal of Animal Science*, vol. 96(issue 8), 3102-3111. doi:10.1093/jas/sky193
- Santosa, S., Farnworth, E., & Jones, P. (2006). Probiotics and Their Potential Health Claims. *Nutrition Reviews*, vol. 64(issue 6), 265-274. doi:10.1111/j.1753-4887.2006.tb00209.x
- Sartor, R. (2006). Mechanisms of Disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, vol. 3(issue 7), 390-407. doi:10.1038/ncpgasthep0528
- Sauter, S., Allenspach, K., Gaschen, F., Gröne, A., Ontsouka, E., & Blum, J. (2005). Cytokine expression in an ex vivo culture system of duodenal samples from dogs with chronic enteropathies: Modulation by probiotic bacteria. *Domestic Animal Endocrinology*, vol. 29(issue 4), 605-622. doi: 10.1016/j.domaniend.2005.04.006
- Scepanovic, P., Hodel, F., Mondot, S., Partula, V., Byrd, A., Hammer, C., . . . Fellay, J. (2019). A comprehensive assessment of demographic, environmental, and host genetic associations with gut microbiome diversity in healthy individuals. *Microbiome*, vol. 7(issue 1). doi:10.1186/s40168-019-0747-x
- Seckl, J. R., & MEANEY, M. J. (2004). Glucocorticoid Programming. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1032(issue 1), 63-84. doi:10.1196/annals.1314.006
- Sedláček, I. (2007). *Taxonomie prokaryot* (1. vyd. vyd.). Brno: Masarykova univerzita.
- Schoeni, J.L. Probiotics. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, 5th ed.; Salfinger, Y., Tortorello, M.L., Eds.; American Public Health Association: Washington, DC, USA, 2015; pp. 232–286.
- Schmidt, T., Raes, J., & Bork, P. (2018). The Human Gut Microbiome: From Association to Modulation. *Cell*, vol. 172(issue 6), 1198-1215. doi:10.1016/j.cell.2018.02.044

- Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre – and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, vol. 2(issue 2), 71-94. doi:10.1002/vms3.17
- Schmitz, S., & Suchodolski, J. (2016). Understanding the canine intestinal microbiota and its modification by pro-, pre- and synbiotics – what is the evidence? *Veterinary Medicine and Science*, vol. 2(issue 2), 71-94. doi:10.1002/vms3.17
- Schmitz, S., Garden, O., Werling, D., & Allenspach, K. (2012). Gene expression of selected signature cytokines of T cell subsets in duodenal tissues of dogs with and without inflammatory bowel disease. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, vol. 146(issue 1), 87-91. doi:10.1016/j.vetimm.2012.01.013
- Schmitz, S., Werling, D., Allenspach, K., & Sutterwala, F. (2015). Effects of Ex-Vivo and In-Vivo Treatment with Probiotics on the Inflammasome in Dogs with Chronic Enteropathy. *PLOS ONE*, vol. 10(issue 3). doi:10.1371/journal.pone.0120779
- Smith P, Willemsen D, Popkes ML, Metge F, Gandiwa E, Reichard M, et al. Regulation of life span by the gut microbiota in the shortlived African turquoise killifish. *Elife*. (2017) 6:e27014. doi: 10.7554/eLif e.27014
- Silva, B., Jung, L., Sandes, S., Alvim, L., Bomfim, M., Nicoli, J., . . . Nunes, A. (2013). In vitro assessment of functional properties of lactic acid bacteria isolated from faecal microbiota of healthy dogs for potential use as probiotics. *Beneficial Microbes*, vol. 4(issue 3), 267-275. doi:10.3920/BM2012.0048
- Simpson, K., Rishniw, M., Bellosa, M., Liotta, J., Lucio, A., Baumgart, M., . . . Bowman, D. (2009). Influence of Enterococcus faecium SF68 Probiotic on Giardiasis in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, vol. 23(issue 3), 476-481. doi:10.1111/j.1939-1676.2009.0283.x
- 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*, vol. 11(issue 1), 45-69. doi:10.1079/NRR19980005
- Soo, I., Madsen, K., Tejpar, Q., Sydora, B., Sherbaniuk, R., Cinque, B., . . . Fedorak, R. (2008). VSL#3 Probiotic Upregulates Intestinal Mucosal Alkaline Sphingomyelinase and Reduces Inflammation. *Canadian Journal of Gastroenterology*, vol. 22(issue 3), 237-242. doi:10.1155/2008/520383

- Stinson, L., Boyce, M., Payne, M., & Keelan, J. (2019). The Not-so-Sterile Womb: Evidence That the Human Fetus Is Exposed to Bacteria Prior to Birth. *Frontiers in Microbiology*, vol. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01124
- Suchodolski, J., Camacho, J., & Steiner, J. (2008). Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, vol. 66(issue 3), 567-578. doi:10.1111/j.1574-6941.2008.00521.x
- Suchodolski JS, Morris EK, Allenspach K, Jergens AE, Harmoinen JA, Westermarck E, Steiner JM. Prevalence and identification of fungal DNA in the small intestine of healthy dogs and dogs with chronic enteropathies. *Vet Microbiol*. 2008 Dec 10;132(3-4):379-88. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.05.017. Epub 2008 May 24. PMID: 18586415.
- Suchodolski, J., Dowd, S., Westermarck, E., Steiner, J., Wolcott, R., Spillmann, T., & Harmoinen, J. (2009). The effect of the macrolide antibiotic tylosin on microbial diversity in the canine small intestine as demonstrated by massive parallel 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiology*, vol. 9(issue 1). doi: 10.1186/1471-2180-9-210
- Suchodolski, J., Dowd, S., Wilke, V., Steiner, J., Jergens, A., & Hoshino, Y. (2012). 16S rRNA Gene Pyrosequencing Reveals Bacterial Dysbiosis in the Duodenum of Dogs with Idiopathic Inflammatory Bowel Disease. *PLoS ONE*, vol. 7(issue 6). doi:10.1371/journal.pone.0039333
- Suchodolski, J. (2016). Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *The Veterinary Journal*, vol. 215, 30-37. doi: 10.1016/j.tvjl.2016.04.011
- Venema K, Do Carmo AP. (2015). Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends. Caister Academic Press, U.K.
- Weese J.Scott. & Arroyo L. (2003) Bacteriological evaluation of dog and cat diets that claim to contain probiotics. *Canadian Veterinary Journal* 44, 212–216.).