



FUNKČNÍ VZOREK

Preparát snižující kolonizaci slepého střeva kuřat salmonelami

**Doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. František Šišák, CSc.
Ing. Hana Havlíčková**

**4530
2018**

Funkční vzorek 4530/2018

Preparát snižující kolonizaci slepého střeva kuřat salmonelami

Autoři

Doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. František Šišák, CSc.
Ing. Hana Havlíčková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i., Brno

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1610219 Využití střevní mikroflóry pro zvýšení přirozené rezistence masných typů kura domácího k infekcím bakteriálními patogeny a s podporou projektů AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01, RVO 0517.

2018

ISBN 978-80-88233-33-6

1.	Úvod	3
2.	Předmět funkčního vzorku	3
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	4
	<i>Sekvenační analýza genů pro 16S rRNA</i>	4
	<i>Vliv probiotického preparátu na složení střevní mikroflóry</i>	5
	<i>Ochrana kuřat před infekcí Salmonella Enteritidis</i>	7
	<i>Souhrn</i>	8
4.	Srovnání „novosti postupů“	9
5.	Uplatnění funkčního vzorku	9
6.	Ekonomické aspekty	9
7.	Seznam použité související literatury	10
8.	Dedikace	10

1. Úvod

Intenzivní selekce během v chovech drůbeže posledních desetiletí vedla k tomu, že kuřata efektivně přeměňují zdroje a energii v potravě na tělesnou hmotnost. Hrabavá drůbež proto v současnosti patří mezi hospodářská zvířata s neúčinnější konverzi živin. Bílkoviny drůbežího původu jsou navíc vysoce ceněny pro své senzorické vlastnosti a relativně nízký obsah tuků. Extrakce živin z krmiva a jejich přeměnu na drůbeží bílkovinu nebo vejce vyžaduje souhru mezi trávením, vstřebáváním živin a následnými anaboličnými reakcemi vedoucími k nárůstu celkové hmotnosti. Při trávení a zisku dodatečné energie ze zdrojů, které drůbež sama neumí využít, hraje důležitou úlohu střevní mikroflóra. Přitom právě u hrabavé drůbeže je zcela přerušen kontakt mezi rodiči (kvočnou) a potomky (vylíhlými kuřaty). V komerčních líhních vysoká hygienická opatření ve snaze zamezit šíření patogenů snižují bakteriální „nabídku“ v prostředí. Důsledkem toho je, že vylíhlá kuřata jsou kolonizována z náhodných zdrojů v prostředí. Přitom správná kolonizace kuřecího traktu v počátečním období života je zásadní pro odolnost kuřat k enterálním infekcím. Laboratorní experimenty přitom jasně ukazují, že kuřata mohou být osídlena „dospělou“ mikroflórou od prvních dnů života [1, 2] a pokud je tato mikroflóra dostatečně komplexní, během 24 hodin po vylíhnutí navozuje vysokou chráněnost kuřat před kolonizací patogeny se zoonotickým potenciálem jako je např. salmonela [3]. Osídlování nedefinovanými preparáty však má i své úskalí. Při těchto experimentech jsme pozorovali velmi účinný přenos baktérií rodu *Campylobacter* z trusu nosnic na jednodenní kuřata [1]. Rovněž jsme běžně zaznamenávali nižší hmotnostní přírůstky u kuřat osídlených komplexní mikroflórou z trusu dospělých nosnic. Z těchto důvodů se hledají alternativní opatření, která by zvyšovala přirozenou odolnost drůbeže proti infekčním chorobám. Jednou z možností je aplikace pouze omezeného počtu různých bakteriálních druhů, které jsou součástí přirozené střevní mikroflóry zdravých dospělých jedinců. Pokud by se podařilo takové směsi připravit, jejich využití v chovech drůbeže by vedlo nejen ke snížení výskytu onemocnění trávicího traktu, ale nepřímo i ke snížení potřeby terapeutického užití antibiotik a tím i ke snížení selekce baktérií rezistentních k jejich účinku. Proto jsme v této studii otestovali protektivní vlastnosti definované směsi 17 anaerobních baktérií původem ze slepého střeva zdravých nosnic.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem předkládaného funkčního vzorku bylo připravit a otestovat definovanou směs anaerobních baktérií využitelných jako probiotika pro aktivní osídlení kuřat v den vylíhnutí.

Smyslem tohoto konání bylo zvýšit přirozenou odolnost kuřat vůči infekčním chorobám s využitím modelové infekce *Salmonella* Enteritidis. Výsledný probiotický preparát lze aplikovat orálně, bezprostředně po vylíhnutí.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

Čisté kultury vybraných anaerobních bakterií zástupců kmenů *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (Tab. 1) byly 3 dny kultivovány na WCHA agar (Oxoid) v anaerobním kabinetu v atmosféře N₂, CO₂ a H₂. Po kultivaci byly jednotlivé bakteriální kultury smyty z povrchu agaru fyziologickým roztokem a na závěr byla připravena směs 15 kultur. Ta byla orálně aplikována jednodenním kuřatům. O týden později byla ve slepých střevech 6 kuřat pokusných i 6 kuřat kontrolních stanovena skladba střevní mikroflóry a následně bylo stejné množství zvířat z obou skupin orálně infikováno kmenem *Salmonella* Enteritidis. Za 4 dny byla všechna kuřata utracena a byly stanoveny počty salmonel v tkáních jater a sleziny, a v obsahu slepého střeva. Obsahy slepých střev byly odebrány i za účelem stanovení skladby mikroflóry sekvenováním variabilních oblastí genů pro 16S rRNA.

druh	kmen
<i>Alistipes senegalensis</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Alistipes shahii</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Alistipes onderdonkii</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides clarus</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides dorei</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides ovatus</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides salanitronis</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides uniformis</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Bacteroides xylanisolven</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Mediterranea massiliensis</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Barnesiella viscericola</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Parabacteroides distasonis</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Parabacteroides johnsoni</i>	<i>Bacteroidetes</i>
<i>Megamonas hypermegale</i>	<i>Firmicutes</i>
<i>Megasphaera elsdenii</i>	<i>Firmicutes</i>

Tabulka. 1. Druhové složení bakteriální směsi použité k osídlení jednodenních kuřat.

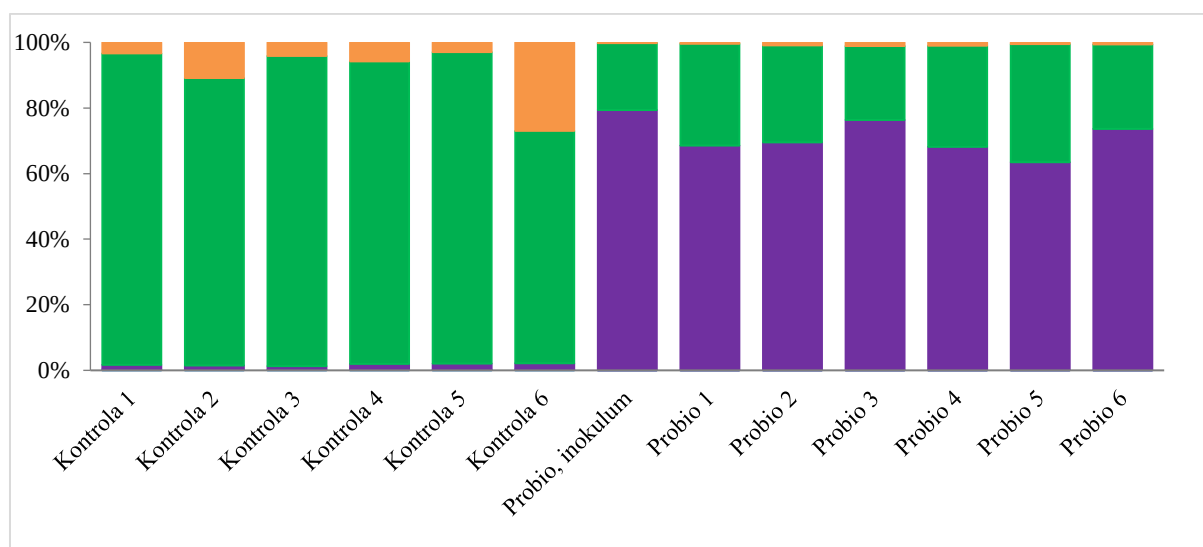
Sekvenční analýza genů pro 16S rRNA

Z obsahů slepých střev kuřat byla izolována celková bakteriální DNA pomocí QIAmp DNA Stool Mini kitu (Qiagen). Ta byla následně použita jako templát v PCR pro amplifikaci V3 a

V4 variabilní oblasti genů pro 16S rRNA s využitím forward primeru se sekvencí 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' a reverse primeru se sekvencí 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT- amplifikujících tyto geny ve všech známých bakteriích. Sekvenační reakce probíhaly v přístroji MiSEQ s využitím MiSeq Reagent kitu v3 (Illumina). Data získaná po sekvenaci byla zpracována pomocí software Qiime [4]. Kvalitou vyhovující sekvence byly dále klasifikovány do jednotlivých OTU (Operation Taxonomic Units, taxonomických operačních jednotek) na základě 97% podobnosti. Jednotlivé OTUs byly identifikovány pomocí databáze RDP Seqmatch.

Vliv probiotického preparátu na složení střevní mikroflóry

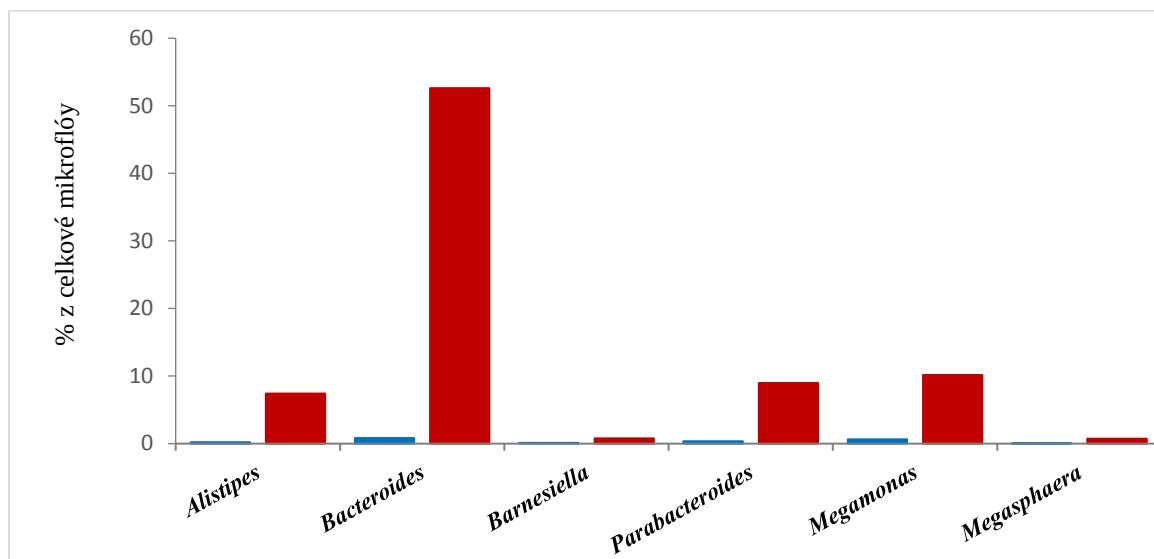
Jednorázová orální aplikace probiotického preparátu měla zásadní vliv na globální skladbu gastrointestinálního traktu kuřat (Obr. 1). Zatímco v mikroflóře kontrolních kuřat dominovaly Gram pozitivní bakterie kmene *Firmicutes*, ve slepých střevech pokusných kuřat převládaly bakterie kmene *Bacteroides*.



Obr. 1. Individuální složení mikroflóry na úrovni kmenů (phylum) u sedmidenních kuřat. Každý sloupec ukazuje složení mikroflóry slepého střeva kontrolních (Kontrola 1 až 6) a experimentálních kuřat (Probio 1 až 6). Skladba bakterií v testovaném probiotickém preparátu je rovněž uvedena (sloupec Probio, inokulum). Fialová barva – *Bacteroidetes*, zelená barva – *Firmicutes*, oranžová barva – *Proteobacteria*.

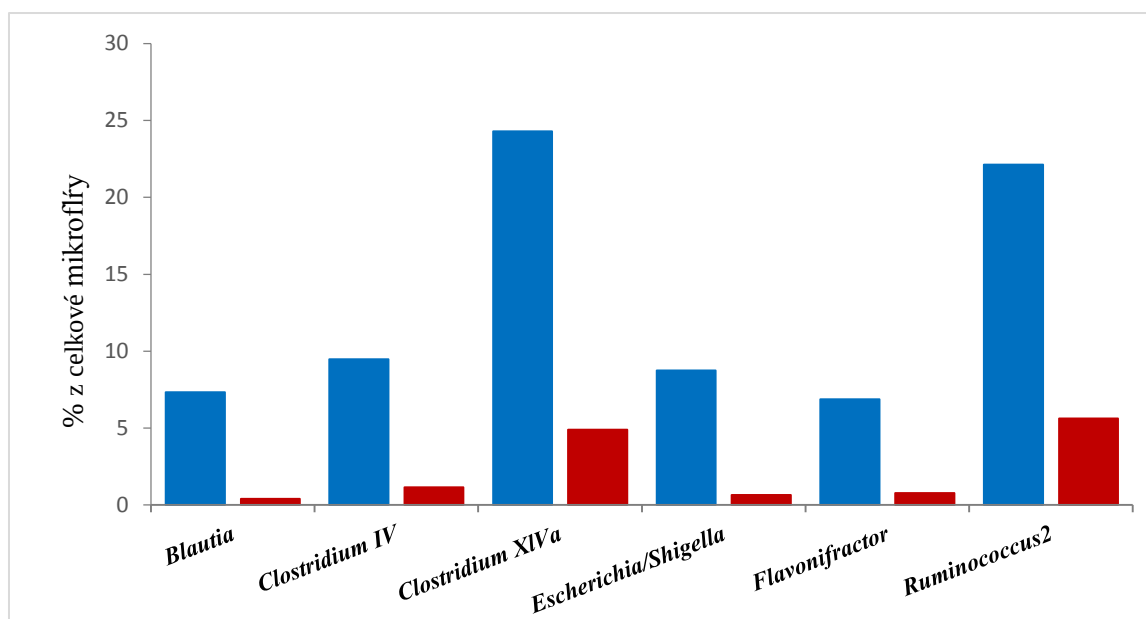
Detailní porovnání zastoupení bakteriálních rodů u kontrolních a experimentálních kuřat ukázalo značné rozdíly. S výjimkou rodu *Mediterranea*, bakterie přítomné v testovaném preparátu úspěšně kolonizovaly trávicí trakt kuřat (Obr. 2 a Tab. 1). Ve slepém střevě kuřat v experimentální skupině dominovaly bakterie rodu *Bacteroides*, které tvořily víc než 50%

celkové mikroflóry. U kontrolních kuřat se bakterie tohoto rodu téměř nevyskytovaly. Podobné výsledky byly pozorovány i pro ostatní bakterie přítomné v testovaném preparátu, které náležely mezi rody *Alistipes*, *Barnesiella*, *Parabacteroides*, *Megamonas* a *Megasphaera*.



Obr. 2. Bakteriální rody dominující v mikroflóře slepého střeva sedmidenních kuřat osídlených testovaným probiotickým preparátem. Modrá barva – zastoupení uvedených rodů v mikroflóře kontrolních kuřat, červená – zastoupení uvedených rodů v mikroflóře kuřat osídlených probiotickým preparátem.

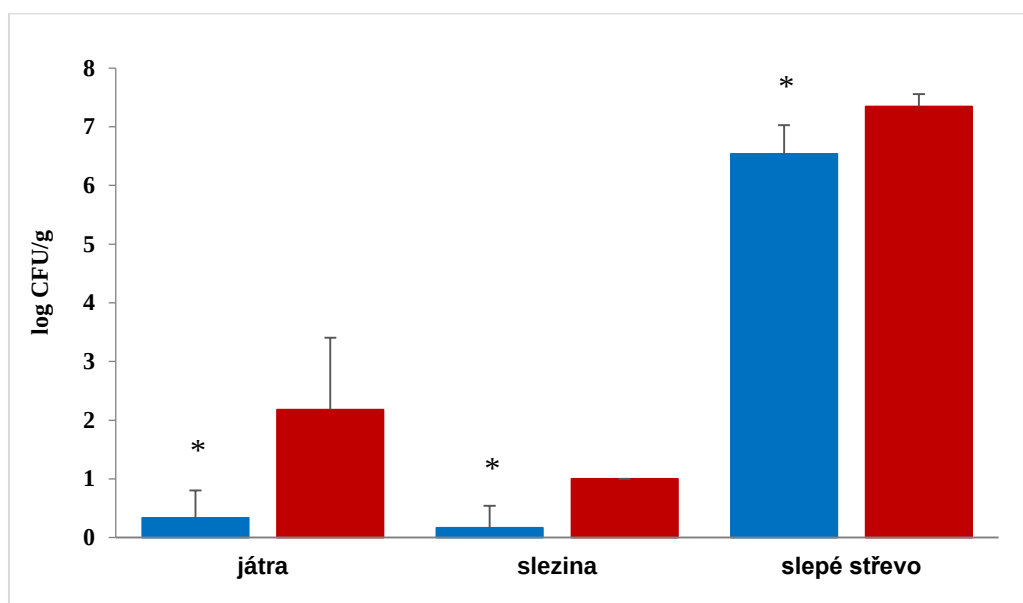
Ve střevní mikroflóře kontrolních kuřat naopak dominovali zástupci rodů *Blautia*, *Clostridium IV*, *Clostridium XIVa*, *Escherichia/Shigella*, *Flavonifractor* a *Ruminococcus2*, (Obr. 3). U kontrolních kuřat tyto bakterie tvořily 78,8 % z celkové mikroflóry, zatímco u kuřat v experimentální skupině tyto rody tvořily pouze 13,4 % z celkové mikroflóry. Inokulace testovaným preparátem měla proto podstatný vliv na skladbu mikroflóry slepého střeva sedmý den života, tedy v okamžiku, kdy byla část kuřat v obou skupinách orálně infikována *S. Enteritidis*.



Obr. 3. Bakteriální rody dominující v mikroflóře slepého střeva sedmidenních kontrolních kuřat. Modrá barva – zastoupení uvedených rodů v mikroflóře kontrolních kuřat, červená – zastoupení uvedených rodů v mikroflóře kuřat osídlených probiotickým preparátem.

Ochrana kuřat před infekcí Salmonella Enteritidis

Aplikace probiotického preparátu chránila kuřata před infekcí plně virulentním kmenem *Salmonella* Enteritidis (Obr. 4). Chráněnost kuřat kolonizovaných probiotickou směsí anaerobních bakterií byla patrná u všech sledovaných orgánů. Rozdíly v počtech salmonel kvantifikovaných ve všech odebraných orgánech u kuřat s probiotickou směsí a kontrolní skupinou dosáhly statistické významnosti.

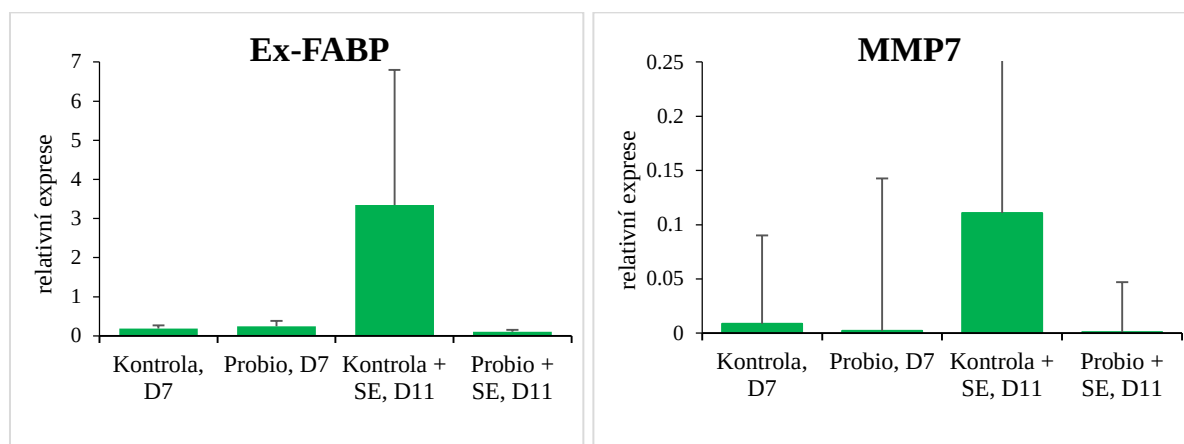


Obr. 4. Ochrana kuřat probiotickým preparátem aplikovaným orálně před infekcí divokým kmenem *S. Enteritidis*. Pokusné skupině kuřat byl podán testovaný probiotický preparát první den života. Po sedmi dnech

byla kontrolní i experimentální kuřata orálně infikována plně virulentním kmenem *S. Enteritidis*. Kuřata z obou skupin byla utracena 4 dny po infekci a byly stanoveny počty salmonel v játrech, slezině a slepých střevech. Modré sloupce - počty salmonel u experimentálních kuřat osídlených první den života testovanou probiotickou směsí, červené sloupce - počty salmonel u kontrolních kuřat. Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly ($P < 0,05$) vzhledem k příslušné kontrole.

Protože rozdíly v počtech salmonel ve slepém střevě kontrolních a experimentálních kuřat byly relativně nízké, na závěr jsme kultivační průkaz salmonel ověřili stanovením exprese ExFABP a MMP7. Míra exprese ExFABP a MMP7 je velmi citlivým znakem zánětu.

Samotné osídlení kuřat probiotickou směsí neindukovalo žádnou zánětlivou reakci u kuřat utracených sedm dní po osídlení ještě před infekcí *S. Enteritidis* (Obr. 5). Signifikantní rozdíl v expresi obou znaků však byl zaznamenán po infekci *S. Enteritidis*. Zatímco kuřata osídlená testovaným probiotickým preparátem nevykazovala žádné známky zánětu, u kontrolních kuřat došlo po infekci k 18násobnému nárůstu exprese ExFABP a 12násobnému nárůstu exprese MMP7. Nižší počty salmonel v důsledku předchozího osídlení probiotickým preparátem tak vedly i k absenci zánětlivé odpovědi u osídlených kuřat.



Obr. 5. Expresce ExFABP a MMP7 ve slepém střevě kontrolních kuřat a kuřat osídlených testovaným probiotickým preparátem. U sedmidenních kuřat, tedy před infekcí *S. Enteritidis*, byla u obou znaků pozorována nízká hladina exprese. Po infekci došlo ke zvýšení exprese ExFABP a MMP7 pouze u kontrolních neosídlených kuřat. Kolonizace testovaným probiotickým preparátem sama o sobě tak neměla žádné nežádoucí účinky a naopak zvyšovala odolnost kuřat před infekcí salmonelami.

Souhrn

Vyvinutý probiotický preparát se sestává z 15 různých bakterií. Jednotlivé bakterie účinně kolonizují trávicí trakt drůbeže po jednorázové aplikaci v den vylíhnutí. Experimentálně jsme

prokázali, že tento preparát zvyšuje asi desetinásobně odolnost kuřat před infekcí kmenem *Salmonella* Enteritidis a rovněž účinně potlačuje rozvoj zánětu.

4. Srovnání „novosti postupů“

V chovech drůbeže se v současnosti používají nebo testují probiotické přípravky odvozené od bakterií rodu *Lactobacillus*, *Enterococcus* nebo *Bacillus*. Z našich zkušeností ale vyplývá, že těmito bakteriálními kmeny nelze účinně osídlit kuřata v prvních dnech života. Druhou alternativou jsou produkty kompetitivní exkluze jako je např. Aviguard od společnosti Lallemand, nebo Broilact od společnosti OrionPharma. Oba tyto produkty obsahují bakterie schopné kolonizovat trávicí trakt drůbeže a chránit je před infekcí salmonelami. Problém těchto produktů však spočívá v jejich nedefinovanosti, protože se připravují anaerobní kultivací trusu od zdravých slepic.

Izolace čistých bakteriálních kultur, které prokazatelně kolonizují trávicí trakt drůbeže, a jejich cílené mixování do definovaných směsí odstraňuje nevýhody jednoduchých probiotických produktů i produktů kompetitivní exkluze. Směs kmenů je od přípravy jasně definovaná, nemůže obsahovat nežádoucí bakterie, viry nebo eukaryotické parazity a je možné ji opakovaně připravit ve stejné kvalitě.

5. Uplatnění funkčního vzorku

O preparáty sestávající se z omezeného počtu bakterií aktivně osídlující trávicí trakt drůbeže již projevila zájem finská společnost OrionPharma nebo dánská společnost Chr. Hansen. V současnosti probíhají jednání o dalším společném vývoji preparátů ke skutečné komerční produkci.

6. Ekonomické aspekty

Preparáty na bázi omezeného počtu striktních anaerobů z trávicího traktu jsme úspěšně otestovali v ochraně před infekcí salmonelami. Tyto preparáty snižují také zánětlivou odpověď kuřat na infekci salmonelami. Protože vyvinutý preparát vychází i z principu přirozeného přenosu střevní mikroflóry z kvočny na kuřata, lze očekávat daleko širší uplatnění vyvinutého přípravku např. před infekcemi patogenními kmeny *E. coli* nebo *Clostridium perfringens* a *difficile*. Vyvinutý preparát měl rovněž pozitivní vliv na hmotnostní přírůstky masných plemen drůbeže a tak lze očekávat jeho uplatnění také v chovech brojlerů.

7. Seznam použité literatury

1. Polansky O, Sekelova Z, Faldynova M, Sebkova A, Sisak F, Rychlik I: Important metabolic pathways and biological processes expressed by chicken cecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 2016;82:1569–1576.
2. Volf J, Polansky O, Varmuzova K, Gerzova L, Sekelova Z, Faldynova M, Babak V, Medvecký M, Smith A L, Kaspers B, Velge P, Rychlik I: Transient and Prolonged Response f Chicken Cecum Mucosa to Colonization with Different Gut Microbiota. *PLoS One* 2016;11: e0163932.
3. Varmuzova K, Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Sisak F, Havlickova H, Sebkova A, Faldynova M, Rychlik I: Composition of Gut Microbiota Influences Resistance of Newly Hatched Chickens to Salmonella Enteritidis Infection. *Front Microbiol* 2016;7:957.
4. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010; 7:335-6.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QJ1610219 Využití střevní mikroflóry pro zvýšení přirozené rezistence masných typů kura domácího k infekcím bakteriálními patogeny a s podporou projektů AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006–ED0006/01/01, RVO 0517.



Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudcova 296/70
621 00 Brno
Czech Republic
Tel.: +420 5 3333 1111; www.vri.cz; e-mail: vri@vri.cz