



FUNKČNÍ VZOREK

**Specifická detekce vybraných druhů rodu *Lactobacillus*
ve voleti kuřat a preparát ovlivňující kolonizaci
volete kuřat v prvním týdnu života**

**doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. Jitka Matiašovicová Ph.D.**

**4374
2021**

Funkční vzorek 4374/2021

**Specifická detekce vybraných druhů rodu *Lactobacillus* ve voleti kuřat a
preparát ovlivňující kolonizaci volete kuřat v prvním týdnu života**

Autoři

doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D.
MVDr. Marcela Faldynová, Ph.D.
Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.
Mgr. Alena Šebková
MVDr. Jitka Matiašovicová Ph.D.

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

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QK1810462, Manipulace se složením střevní mikroflóry monogastrů jako cesta k potlačení *E. coli* infekcí a snížení spotřeby antimikrobik.

ISBN 978-80-7672-014-5

Brno, listopad 2021

Obsah

1.	Úvod	3
2.	Předmět funkčního vzorku	4
3.	Vlastní popis funkčního vzorku	4
	<i>3.1. Real time PCR pro průkaz a kvantifikaci 3 různých druhů laktobacilů</i>	4
	<i>3.2. Kontrola specifity vybraných primerů</i>	6
	<i>3.3. Vliv probiotického preparátu na složení mikroflóry volete</i>	6
	<i>3.4. Souhrn</i>	7
4.	Srovnání „novosti postupů“	7
5.	Uplatnění funkčního vzorku	8
6.	Ekonomické aspekty	8
7.	Seznam použité související literatury	8
8.	Dedikace	9

1. Úvod

Intenzivní selekce v chovech drůbeže 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 nejúčinnější konverzí 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 mikroflóra podél celého trávicího traktu. Ten se u drůbeže sestává z volete, žlázatého a svalnatého žaludku, a tenkého, slepého a tlustého střeva.

Drůbež se v komerční produkci líhne v čistém prostředí líhni a osídlování trávicího traktu je tak závislé jen na zdrojích v prostředí. Vysoká hygienická opatření v komerčních líhních ve snaze zamezit šíření patogenů však snižují i „nabídku“ komensálních bakterií. Důsledkem toho je, že vylíhlá kuřata jsou kolonizována z náhodných zdrojů v prostředí, s různě dlouhou a nedefinovatelnou časovou prodlevou. Přitom správná kolonizace celého trávicího traktu v počátečním období života je zásadní pro odolnost kuřat k enterálním infekcím. Laboratorní experimenty 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]. Na modelu rozvoje mikroflóry slepého střeva jsme již dříve prokázali, že nepřítomnost slepice jako zdroje střevní mikroflóry lze nahradit směsí vybraných bakterií pocházejících z trávicího traktu dospělých jedinců kura domácího. Při těchto experimentech jsme však překvapivě pozorovali, že laktobacily v tenkém a slepém střevě nemají téměř žádný význam pro odolnost kuřat před infekcí salmonelami, a možná ještě hůře, námi podávané kultury laktobacilů, přestože původně pocházely z trávicího traktu drůbeže, tak se po experimentálním podání neuchytily ani v tenkém, ani v tlustém střevě. Proto jsme se zabývali schopnostmi laktobacilů osídlit trávicí trakt drůbeže, až jsme zjistili, že klíčové místo pro osídlení laktobacily je v rámci celé trávicí soustavy reprezentováno voletem kuřat.

2. Předmět funkčního vzorku

Cílem předkládaného funkčního vzorku bylo připravit a otestovat definovanou směs laktobacilů využitelných jako probiotika pro aktivní osídlení volat kuřat v den vylíhnutí. Smyslem tohoto konání bylo připravit preparát, který by vedl k okamžité a správné kolonizaci volete a s tím spojené správné funkci volete. Probiotický preparát tedy zvyšuje přirozenou odolnost kuřat vůči infekcím a současně umožňuje přednatrávení krmiva ve voleti. Výsledný probiotický preparát lze aplikovat orálně, bezprostředně po vylíhnutí první den života kuřat.

3. Vlastní popis funkčního vzorku

Čisté kultury vybraných zástupců rodu *Lactobacillus*, tedy *Lactobacillus salivarius* An63, *Lactobacillus reuteri* An769 a *Lactobacillus ingluviei* An777 byly kultivovány 24 hodin na WCHA agar (Wilkins Chalgren Agar, Oxoid) při 37 °C v anaerobním kabinetu v atmosféře N₂, CO₂ a H₂. Po kultivaci byly jednotlivé bakteriální kultury smyty z povrchu agaru WCHB bujónem s 10% glycerolem, 2,5% inulínem a 2,5% trehalózou a ze všech smyvů byla připravena směs 3 kultur. Směsná kultura 3 druhů laktobacilů byla rozplněna v objemu 1 ml do 2ml kryozkumavek a zamražena při -80 °C jako master inokula pro další použití.

Před aplikací probiotické směsi byla jedna z kryozkumavek odebrána ze skladování při -80 °C, rozmražena a 10 µl bylo použito pro zaočkování 10 ml HiVeg WCHB media (HiMedia). Po 24hodinové fermentaci v anaerobním prostředí při 37 °C byla směsná kultura připravena pro orální aplikaci jednodenním kuřatům. Ta byla orálně aplikována jednodenním kuřatům. O týden později byla ve voleti 8 pokusných a 8 kontrolních kuřat stanovena přítomnost laktobacilů z probiotického preparátu pomocí specifické real time PCR.

3.1. Real time PCR pro průkaz a kvantifikaci 3 různých druhů laktobacilů

Pro specifický průkaz použitých kmenů jsme využili skutečnost, že z trávicího traktu drůbeže jsme izolovali více než 400 různých bakteriálních druhů a izolátů, které jsme charakterizovali celogenomovým sekvenováním. Získané sekvence byly anotovány pomocí webově dostupné aplikace RAST. Porovnáním anotovaných sekvencí a z nich protein-kódujících genů jsme identifikovali takové geny, které se vyskytly pouze v genomu *Lactobacillus salivarius* (nebo *Lactobacillus reuteri* nebo *Lactobacillus ingluviei*), a nevyskytly se v genomech žádného

jiného ze stovek porovnávaných druhů. Z těchto genů jsme pro každý druh vybrali 3 takové, které se vyskytovaly uvnitř nejdelších kontigů a v jejich okolí se nevyskytovaly žádné geny, které by mohly indikovat nedávný horizontální přenos (např. plazmidy, transpozázy, integrázy, rekombinázy nebo geny spojené s integrovanými bakteriofágy). Na takové geny byly navrženy dvojice primerů. Pro každý druh jsme tedy na počátku připravili 3 páry primerů na 3 různá cílová místa, které byly testovány s cílovou DNA příslušného bakteriálního druhu pro pozitivní výsledek, a všemi nejbližší příbuznými druhy pro negativní výsledek. Ze tří párů primerů pro detekci každého druhu laktobacilů pak byl vybrán jeden pro další práci a to takový, který s cílovou DNA vykazoval nejnižší hodnotu Ct ze tří porovnávaných, a naopak nejvyšší Ct hodnotu při použití DNA necílových druhů (Tab. 1).

Tabulka 1. Primery pro specifickou detekci a kvantifikaci *Lactobacillus salivarius* An63, *Lactobacillus reuteri* An769 a *Lactobacillus ingluviei* An777.

DNA	Izolát	Forward	Reverse
<i>Lactobacillus salivarius</i>	An63	tcgatgacgttttcggtgta	aaaagccgtgttcgacaatc
<i>Lactobacillus reuteri</i>	An769	gaagcaaagccagctcaaac	tccccggattgtcaaagtag
<i>Lactobacillus ingluviei</i>	An777	agtcctccacgaacataccg	tgattagtggcaccgtcaaa
Eubakteriální 16S rRNA	-	tctacgggaggcagcag	cgtattaccgcggctgct

Po selekci specifických primerů byla rutinní real time PCR prováděna ve formátu SybrGreen. Pro normalizaci na celkový počet bakterií ve vzorku byla použita PCR s primery amplifikujícími část genu pro 16S rRNA. Po PCR se odečetla Ct hodnota amplifikace jednotlivých druhů laktobacilů od Ct hodnoty amplifikace eubakteriální DNA (ΔCt). Následně se na tento rozdíl umocnil základ 2 ($2^{\Delta Ct}$), vypočetla se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta Ct}$) a výsledek se vynásobil číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta Ct}$). Na závěr se tato hodnota vynásobila koeficientem 6, který představoval přibližnou korekci na počet kopií genů pro 16S rRNA v bakteriálních genomech (který jsme používali pro normalizaci) a skutečností, že cílové geny se vyskytovaly v genomu laktobacilů pouze v jedné kopii. Tím se získalo zastoupení jednotlivých druhů laktobacilů v celé bakteriální populaci v procentech.

3.2. Kontrola specifity vybraných primerů

Vybrané primery byly testovány na specifitu (Tab. 2). Primery umožňovaly amplifikaci jen pokud byla jako cílová DNA použita DNA z cílového druhu. Primery nevykazovaly žádnou aktivitu s necílovým druhem rodu *Lactobacillus* ani s DNA zástupců kmene Bacteroidetes. V Tab. 2 lze vidět i posun v Ct hodnotách s primery pro 16S rRNA a specifickými primery pro daný druh. To je způsobeno přítomností více kopií genu pro 16S rRNA v genomu bakterií a tedy i laktobacilů. Proto výše zmiňujeme korekci (násobení) faktorem 6 pro přesnější kvantifikaci laktobacilů ve vzorcích. U všech vzorků byla po provedení PCR stanovena teplota tání PCR produktu (melting temperature), která pro každý specifický produkt musela vykazat experimentálně stanovenou hodnotu.

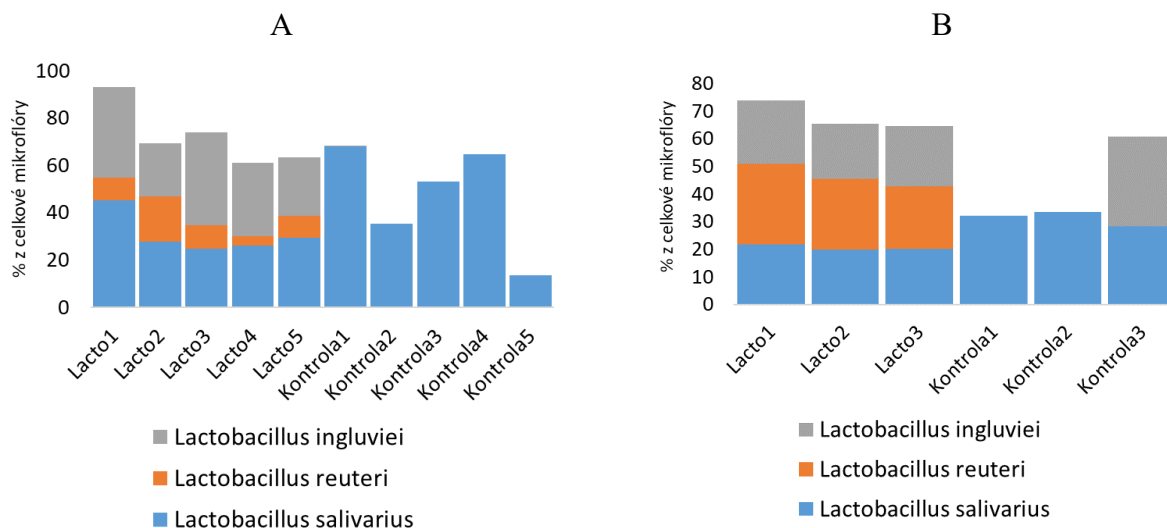
Tabulka 2. Testování specifity primerů. Primery umožňovaly jen amplifikaci s DNA cílového druhu, což je vyjádřeno nízkými Ct hodnotami v tabulce. ND – nedetekováno.

DNA		Primery specifické pro			
		16S	L. salivarius	L. reuteri	L. ingluviei
Lactobacillus salivarius	An63	11,255	14,98	ND	ND
Lactobacillus reuteri	An769	11,665	ND	14,205	ND
Lactobacillus ingluviei	An777	10,035	30,69	ND	12,465
Lactobacillus mucosae	ET343	13,47	ND	ND	ND
Lactobacillus aviarius	ET345	11,77	31,78	26,6	31,44
Bacteroides caecigallinarum	ET21	9,9	ND	ND	26,735
Marseilla massiliensis	An824	6,925	32,92	ND	ND

3.3. Vliv probiotického preparátu na složení mikroflóry volete

Jednorázová orální aplikace probiotického preparátu měla zásadní vliv na osídlení volete kuřat (Obr. 1). Všechny tři druhy laktobacilů z preparátu jsme zachytili u experimentálních kuřat, a to ve dvou nezávislých experimentech. U kontrolních kuřat jsme však v obou pokusech zachytili ve voleti *Lactobacillus salivarius*. V případě tohoto druhu tak nelze jednoznačně říci, zda u experimentálních kuřat došlo k osídlení díky experimentálnímu zásahu anebo z volně dostupných zdrojů v prostředí. U *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus ingluviei* však prokazatelně došlo k dlouhodobé kolonizaci po jednorázové experimentální aplikaci. Procentuální zastoupení *Lactobacillus reuteri* a *Lactobacillus ingluviei* v rozsahu od 10 do 30 % z celkové mikroflóry volete pak ukazuje, že se nejedná o dílčí kolonizaci na hranici detekce, ale že tyto bakterie do volete patří a kolonizují jej trvale a ve velkém rozsahu.

Laktobacily tak i nadále považujeme za nevhodná probiotika pro osídlování a manipulaci s mikroflórou tenkého, slepého a tlustého střeva. Laktobacily však lze účinně využít pro časné osídlení volete a nasměrovat funkci proximálních částí trávicího traktu správným směrem.



Obr. 1. Zastoupení testovaných druhů laktobacilů ve voleti sedmidenních kuřat. Každý sloupec ukazuje složení mikroflóry slepého střeva kontrolních (Kontrola) a experimentálních kuřat (Lacto). Experiment byl dvakrát zopakován (panel A a B) s velmi podobnými výsledky. Pro *L. salivarius* nebylo možné objektivně rozhodnout o jeho původu, protože jeho zdroje v prostředí stáji VÚVeL jsou zjevně dostatečné. Původ *L. reuteri* a *L. ingluviei* je však jednoznačný a souvisí s podáním připraveného probiotického preparátu.

3.4. Souhrn

Vyvinutý probiotický preparát se sestává z 3 různých druhů rodu *Lactobacillus*. Jednotlivé bakterie účinně kolonizují volec drůbeže po jednorázové aplikaci v den vylíhnutí. Protože laktobacily jsou součástí mikroflóry volete zdravých kuřat, časné nasměrování rozvoje mikroflóry volete správným směrem zvyšuje pohodu zvířat i jejich přirozenou odolnost proti kolonizaci patogenními mikroorganismy. Nepublikované výsledky nám ukazují, že s úbytkem laktobacilů ve voleti přibývá *Gallibacterium anatis* nebo *Fusobacterium mortiferum*, tedy oportunně patogenních bakterií. Jejich vyšší zastoupení je na úkor laktobacilů a může být spojeno se zvýšením pH ve voleti v důsledku úbytku laktobacilů.

4. Srovnání „novosti postupů“

V chovech drůbeže se v současnosti používají nebo testují probiotické přípravky odvozené od bakterií rodu *Lactobacillus*, které jsou určeny pro osídlení distálních částí trávicího traktu. Opakovaně však zjišťujeme, že takový princip a přístup u drůbeže nefunguje a je nesprávný.

Nově však ukazujeme, že laktobacily i po jednorázové aplikaci osídlují volata kuřat. Samozřejmě, že je žádoucí pro osídlení použít druhy a izoláty od drůbeže a vyhnout se použití izolátů s nejasným původem.

Směs laktobacilů sestavená v tomto funkční vzorku lze kombinovat s probiotickými směsmi pro osídlení distálních částí trávicího traktu, buď do jednoho preparátu anebo do dvou preparátů jejichž vzájemná kombinace se nevylučuje a naopak, přináší synergicky pozitivní výsledky.

5. Uplatnění funkčního vzorku

O preparáty sestávající se z omezeného počtu bakterií aktivně osídlující různé části trávicího traktu drůbeže již projevila finská společnost OrionPharma, dánská společnost Chr. Hansen nebo francouzská společnost Lallemand. Z českých firem intenzívně jednáme se společnostmi AceAgro nebo Addicoo. V současnosti probíhají jednání o dalším společném postupu při vývoji preparátů pro skutečnou komerční produkci.

6. Ekonomické aspekty

Laktobacily jsou relativně běžně využívány jako probiotika v produkci drůbeže. Jejich účinek je však velmi diskutabilní. To je zřejmě způsobeno mylným zacílením na kolonizaci distálních částí trávicího traktu. Teprve správné pochopení místa účinku laktobacilů u drůbeže na vole (a možná i další kompartmenty, např. kůže) umožní správně zacílit jejich využití, což povede k ekonomickým benefitům jak u producentů probiotik, tak i u jejich uživatelů. Z logiky celé věci by bylo žádoucí posunout celý systém do líhni, tak aby byla kuřata správně osídlena již před transportem na farmu, tak jak by se stalo, pokud by se kuřata byla bývala vylíhla v hnízdě v kontaktu se slepicí.

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 of 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.

8. Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu QK1810462, Manipulace se složením střevní mikroflóry monogastrů jako cesta k potlačení *E. coli* infekcí a snížení spotřeby antimikrobik.



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