



FUNKČNÍ VZOREK

**Probiotická směs pro novorozená selata potlačující
výskyt enteropatogenních bakterií**

**Doc. RNDr. Ivan Rychlík, CSc.
Mgr. Helena Juřicová, Ph.D.
MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D.
MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.**

4935
2021

Funkční vzorek 4934/2021

**Probiotická směs pro novorozená selata potlačující výskyt
enteropatogenních bakterií**

Autoři

Doc. RNDr. Ivan Rychlík, CSc.

Mgr. Helena Juřicová, Ph.D.

MVDr. Jitka Matiašovicová, Ph.D.

MVDr. Ján Matiašovic, Ph.D.

**Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu
(QK1810462) a Ministerstva zemědělství České republiky (RVO0518).**

2021

ISBN 978-80-7672-017-6

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

OBSAH

1	Úvod	3
2	Cíl	4
3	Probiotická směs	4
	3.1 Kultivace probiotických kmenů	4
	3.2 Příprava probiotické směsi	4
	3.3 Real time PCR pro průkaz a kvantifikaci 4 různých druhů <i>Bacteroides</i>	5
	3.4 Kontrola specifity vybraných primerů	7
	3.5 Aplikace probiotické směsi	7
4	Kolonizace trávicího traktu selat baktériemi z probiotické směsi	7
5	Výskyt patogenních klostridií a <i>E. coli</i> v trávicím traktu selat ošetřených probiotickým preparátem	8
6	Srovnání „novosti postupů“	10
7	Seznam použité související literatury	11
8	Dedikace	12

1 Úvod

Selata v produkčních chovech prasat ihned po narození přichází do styku s mikroflórou prasnice a stájového prostředí. Součástí této mikroflóry jsou i patogenní nebo podmíněně patogenní bakterie. Časná interakce mezi komenzálními a patogenními bakteriemi tak může anebo nemusí vést ke zvýšeným úhynům v prvních dnech života. Skladba střevní mikroflóry sajících selat je do značné míry determinována jejich mléčnou výživou. Bakterií vhodných pro trávení mléčné diety je však v trusu prasnic a stájovém prostředí velmi málo, a proto osídlení trávicího traktu selat vhodnou mikroflórou trvá i několik dní. V důsledku toho může v trávicím traktu selat dojít k pomnožení nežádoucích bakterií způsobujících průjemová onemocnění, například *Clostridioides difficile* a *Clostridium perfringens*. Nežádoucí je rovněž vysoký podíl *Escherichia coli*, z nichž některé kmeny mohou enteropatogenní.

K potlačení klinických příznaků průjemových onemocnění novorozených selat se často používá preventivní aplikace antibiotik ihned po narození. To je v rozporu se současným trendem snižování spotřeby antibiotik a zejména jejich preventivního užití. Proto je nutné hledat jiné cesty, jak zabezpečit správný rozvoj střevní mikroflóry selat, který přirozeným způsobem potlačí multiplikaci nežádoucí flóry. V předchozích studiích jsme popsali rozvoj střevní mikroflóry sajících selat. Přitom jsme zjistili, že první 3 až 4 dny života běžně ve střevní mikroflóře selat i bez zjevných klinických příznaků dominují patogenní klostridie. K potlačení jejich výskytu docházelo okolo 4. dne života, právě v době, kdy došlo ke zvýšení přítomnosti zástupců rodu *Bacteroides*. Negativní korelace mezi přítomností patogenních klostridií a *Bacteroides* nás proto vedla k myšlence využít zástupce rodu *Bacteroides* jako probiotika pro osídlení jednodenních selat. Navíc je známo, že prasnice ve své střevní mikroflóře mají nízké zastoupení rodu *Bacteroides* (nahrazují je zástupci příbuzného rodu *Prevotella*) a proto se nemusí chovat jako optimální zdroj těchto bakterií pro sající selata. Podání směsi bakteriálních kultur několika zástupců rodu *Bacteroides* novorozeným selatům by tak mohlo vést k rychlejšímu vývoji žádoucí střevní mikroflóry sajících selat, která by zabránila pomnožení patogenních mikroorganismů.

2 Cíl

Cílem bylo vybrat, připravit a otestovat účinnost probiotické směsi složené ze 4 různých druhů bakterií rodu *Bacteroides* na potlačení výskytu patogenních klostridií a *E. coli* ve střevním obsahu sajících selat.

3 Probiotická směs

3.1 Kultivace probiotických kmenů

Pro přípravu probiotického preparátu byly vybrány čisté kultury 4 různých druhů rodu *Bacteroides*, a to *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* a *Bacteroides xylanisolvens*. Vybrané druhy odpovídají druhům, které se nejčastěji vyskytují ve střevní mikroflóře sajících selat. Všechny izoláty byly původně izolovány od prasat a u všech kmenů byla stanovena úplná sekvence jejich chromozómu. Znalost úplné genomové sekvence nám umožnila zařadit do probiotického preparátu jen kmeny, které nepřenášely žádné známé geny pro rezistence k antibiotikům u rodu *Bacteroides* (zejména geny *tetQ* a *linA*). Kmeny v probiotickém preparátu tedy nejsou přenašeči žádných horizontálně přenositelných rezistencí k antibiotikům. Znalost celogenomové sekvence nám zároveň umožnila připravit pro každý kmen přísně specifické PCR pro jejich detekci a kvantifikaci v trusu osídlených i kontrolních selat.

Všechny kmeny byly kultivovány 24 hodin na WCHA agaru (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 a ze všech smyvů byla připravena směs všech 4 kultur. Směsná kultura 4 druhů *Bacteroides* byla rozplněna v objemu 1 ml do 2ml kryozkumavek a zamražena při -80 °C jako master inokula pro další použití. Složení master inokula bylo postupně zkontrolováno i) negativním růstem v aerobním prostředí, ii) sadou PCR specifickou pro 4 druhy *Bacteroides* a iii) sekvenováním části genu pro 16S rRNA. Tím byla zajištěna absolutní kontrola nad složením master inokula včetně přesného stanovení poměrového zastoupení všech 4 kmenů.

3.2 Příprava probiotické směsi

Před aplikací probiotické směsi byla jedna z kryozkumavek odebrána ze skladování při -80 °C a po rozmrazení bylo 10 µl použito pro zaočkování 10 ml WCHB media. Po

24hodinové fermentaci v anaerobním prostředí při 37 °C byla směsná kultura připravena pro orální aplikaci jednodenním selatům.

3.3 Real-time PCR pro průkaz a kvantifikaci 4 různých druhů *Bacteroides*

Pro specifický průkaz použitých kmenů jsme využili skutečnost, že z trávicího traktu hospodářských zvířat 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 *Bacteroides vulgatus* (nebo *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* a *Bacteroides xylanisolvens*), a nevyskytly se v genomu 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. transpozázy, integrázy, rekombinázy nebo geny spojené s integrovanými bakteriofágy). Na takové geny byly navrženy dvojice primerů pro PCR. Pro každý druh jsme tedy na počátku připravili PCR reakce zaměřené na 3 různá cílová místa. Všechny navržené páry primerů 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 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 *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* a *Bacteroides xylanisolvens*.

Cílový druh	Forward	Reverse
<i>Bacteroides vulgatus</i>	atagttggtgcaagcggagg	tcctgagcattccaagtcgg
<i>Bacteroides fragilis</i>	caacgacacaacagcttcg	tcgagtccattcgccccaac
<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	gttgctcccatgttgacgag	gccataagccgagcaatgag
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	ctaccgttatcgcaacctcg	gacagctcccacatccatacg
<i>Clostridioides difficile</i>	tggttcatatctgtagaggag	ctatttacgtttcagcttgaggt
<i>Clostridium perfringens</i>	tggtactgccgttgatagcg	ttagttttgcaacctgctgtgt
<i>Escherichia coli</i>	aatctgccgggtaagaacgg	cacgaatcgctcagttcacgc
Eubakteriální 16S rRNA	tcctacgggaggcagcag	cgtattaccgcggctgct

Po selekci specifických primerů byla 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 všech bakterií. Po PCR se odečetla Ct hodnota amplifikace jednotlivých druhů *Bacteroides* od Ct hodnoty amplifikace bakteriální 16S rRNA (ΔCt). Následně se na tento rozdíl umocnil základ 2 ($2^{\Delta Ct}$), vypočetla se převrácená hodnota ($1/2^{\Delta Ct}$) a výsledek se pro přepočet na procentuální zastoupení vynásobil číslem 100 ($100 \times 1/2^{\Delta Ct}$). Na závěr se tato hodnota vynásobila koeficientem 7, který představoval přibližnou korekci mezi průměrným počtem kopií genů pro 16S rRNA v bakteriálních genomech (který jsme používali pro normalizaci) a skutečností, že cílové geny se vyskytovaly v genomu *Bacteroides* pouze v jedné kopii. Tím se získalo zastoupení jednotlivých druhů *Bacteroides* v celé bakteriální populaci v procentech. Vypočtená hodnota je zcela přesná pro porovnání zastoupení jednotlivých druhů u jednoho selate i mezi selaty z různých skupin. Vypočtená hodnota však může dávat mírně nepřesné výstupy ve smyslu přesného a absolutního vnímání zastoupení každého druhu. Protože však stejnou chybou, a to relativně nízkou, jsou „postiženy“ výstupy pro všechna vyšetřená selata, vzájemné porovnání je možné v plném rozsahu.

3.4 Kontrola specifity vybraných primerů

Vybrané primery umožňovaly amplifikaci jen pokud byla jako cílová DNA použita DNA z cílového druhu. Primery nevykazovaly žádnou aktivitu s necílovým druhem rodu *Bacteroides*. U všech vzorků byla po provedení PCR s cílovou DNA stanovena teplota tání PCR produktu (melting temperature). Tato hodnota pak byla využívána jako referenční při verifikaci kvality PCR produktů vzniklých po amplifikaci DNA z terénních vzorků o neznámém složení. Za pozitivní výsledek byly považovány jen amplifikace, u kterých se teplota tání výsledného PCR produktu shodovala s experimentálně stanovenou hodnotou.

3.5 Aplikace probiotické směsi

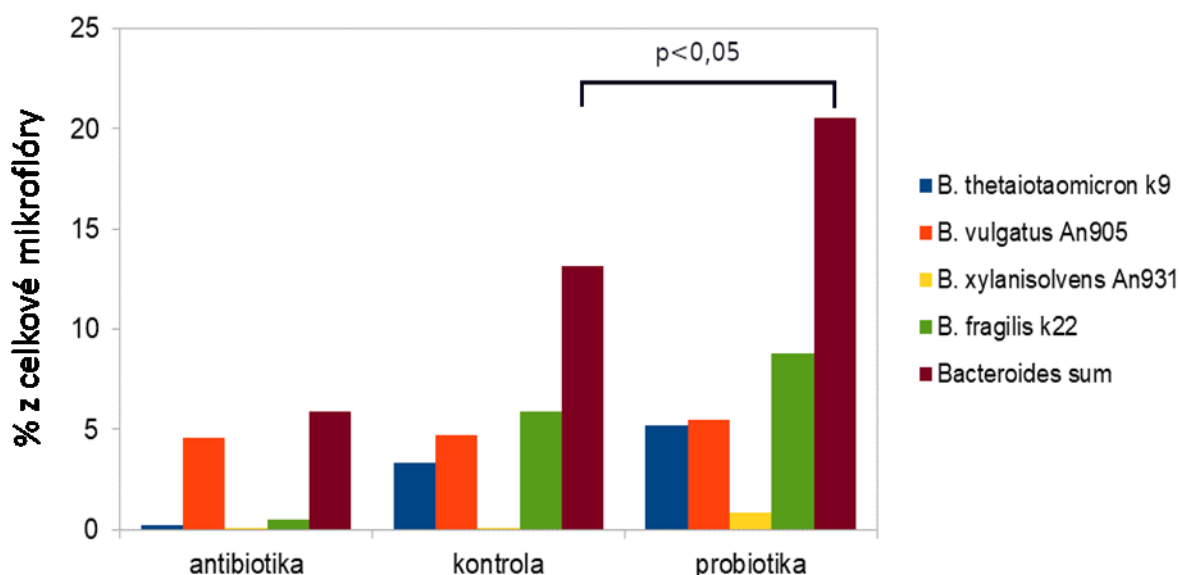
Probiotická směs byla transportována v hermeticky uzavřeném obalu. Po dokončení porodu prasnic se všem novorozeným selatům sterilní injekční stříkačkou aplikoval 1 ml probiotické směsi na kořen jazyka a dohlédlo se na polknutí směsi seletem. O týden později byla v trusu pokusných a kontrolních selat stanovena přítomnost všech 4 kmenů rodu *Bacteroides* z probiotického preparátu a současně *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens* a *Escherichia coli* pomocí real-time PCR.

4 Kolonizace trávicího traktu selat bakteriemi z probiotické směsi

Celkem bylo probiotickou směsí ošetřeno 109 selat v šesti různých turnusech. Dalších 54 selat bylo ošetřeno jednorázovou dávkou amoxicilinu (1 ml intramuskulárně) a 37 selat nebylo ošetřeno ani probiotiky ani amoxicilinem.

Množství probiotických bakterií bylo stanoveno 5. den po porodu v rektálním výtěru selat pomocí real-time PCR. Selata, která byla ošetřena dávkou probiotických bakterií krátce po porodu, měla i zvýšené množství probiotických bakterií v trusu (Obr. 1). Probiotické bakterie tedy po jednorázové aplikaci kolonizovaly trávicí trakt selat. Celkové množství (součet hodnot všech čtyř probiotických bakterií) bylo oproti neošetřené kontrole statisticky významně vyšší. Individuální rozdíly u sledovaných druhů *Bacteroides* však nebyly statisticky významné nebo byly na hranici významnosti. V prostředí stájí se běžně vyskytoval *B. vulgatus*, který se nacházel i u kontrolních selat. Tento druh nebo alespoň klon vyskytující se v prostředí byl rezistentní vůči terapii amoxicilinem. *B. thetaiotaomicron* a *B. fragilis* se rovněž vyskytovali v prostředí stájí, přestože nelze ani vyloučit, že u kontrol došlo k osídlení

baktériemi z probiotické směsi. Tyto dva druhy byly citlivé k terapii amoxicilinem, jak jde vidět z jejich nízkého výskytu u amoxicilin ošetřených selat. *B. xylanisolvens* kolonizoval všechna selata v nejmenším rozsahu a byl jen v malé míře detekován v trusu kontrolních selat (Obr. 1).

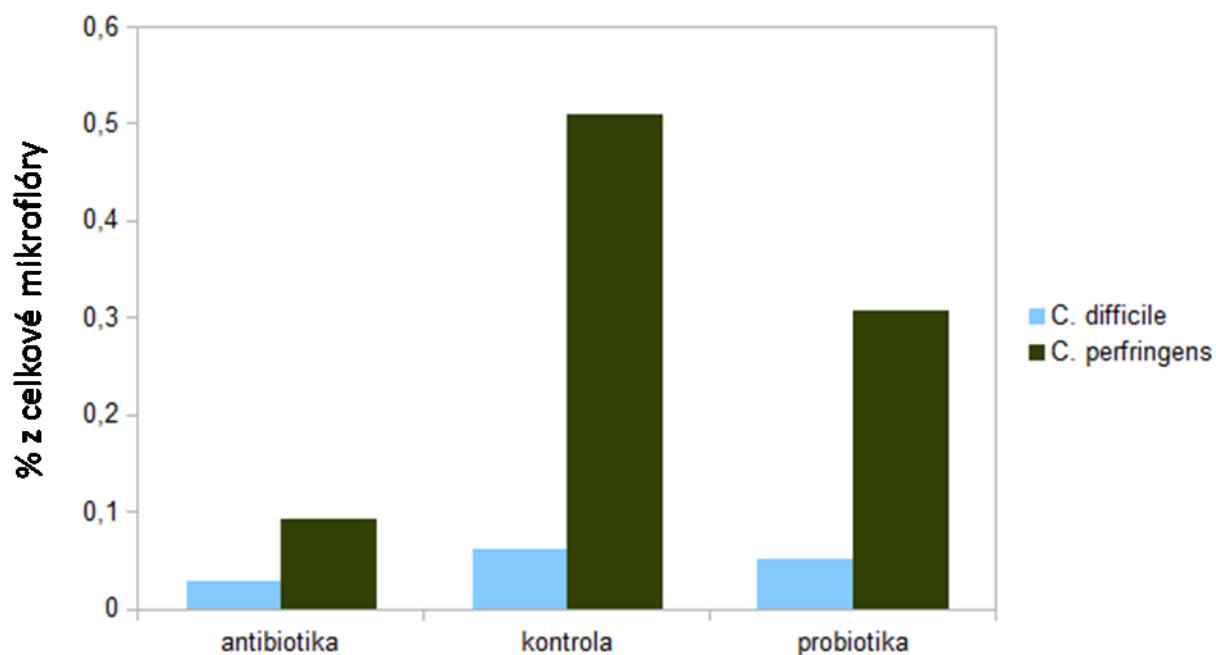


Obr. 1. Účinnost kolonizace trávicího traktu sajících selat baktériemi z probiotického preparátu. Selata ošetřená dávkou probiotických bakterií krátce po porodu měla 5 dní po aplikaci zvýšené množství probiotických bakterií v trusu.

5 Výskyt patogenních klostridií a *E. coli* v trávicím traktu selat ošetřených probiotickým preparátem

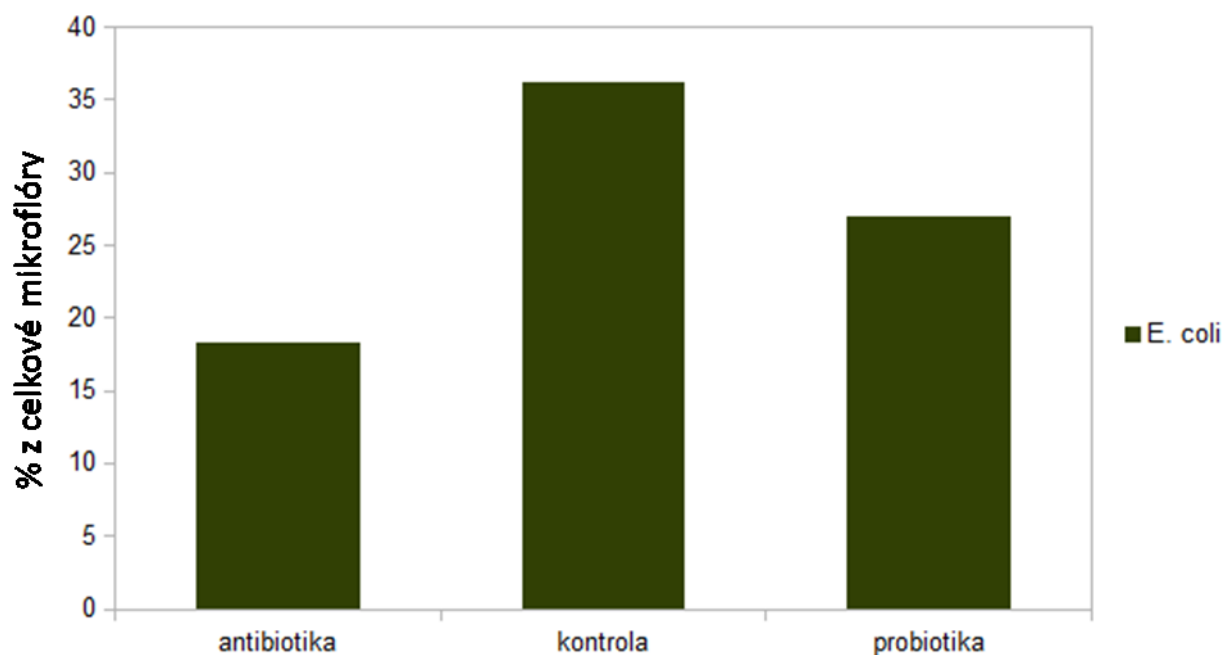
Množství patogenních bakterií *Clostridioides difficile*, *Clostridium perfringens* a *E. coli* bylo stanoveno 5. den po porodu v rektálním výtěru selat pomocí real-time PCR. Jak v případě *Clostridioides difficile*, tak *Clostridium perfringens* bylo nejnižší zastoupení zaznamenáno u selat ošetřených amoxicilinem. Naopak nejvyšší zastoupení patogenních klostridií bylo zaznamenáno u selat bez jakéhokoli ošetření. Podání probiotického preparátu tedy snižovalo výskyt patogenních klostridií ve srovnání se selaty bez jakéhokoli zásahu, ale nedosahovalo účinnosti jako antibiotika (Obr. 2). Díky značné variabilitě dosáhlo toto srovnání signifikance pouze v jednom z šesti nezávislých turnusů. Jako statisticky nevýznamné dopadlo i zhodnocení testování přes všech šest opakování. Je však potřeba si uvědomit, že v terénních

podmínkách ne vždy kontrolní skupina musí být infikovaná patogenními klostridiemi a v případě kdy se *Clostridioides difficile* nebo *Clostridium perfringens* shodou okolností nevyskytnou v prostředí, nemůže se ochranný efekt probiotického preparátu projevit. I numerické snížení výskytu patogenních klostridií u ošetřených selat tak považujeme za přijatelně pozitivní výsledek.



Obr. 2. Výskyt *Clostridioides difficile* a *Clostridium perfringens* u sajících selat přes všech šest nezávislých opakování. Aplikace probiotického preparátu snižovala výskyt patogenních klostridií ve srovnání s kontrolními neošetřenými selaty. Probiotika ale nedosahovala účinnosti antibiotik.

Podobně jako v případě klostridií byla zaznamenána i tendence ke snížení množství *E. coli* ve srovnání s kontrolní, nijak neošetřenou skupinou selat, přestože tento rozdíl nebyl statisticky významný za celé sledované období ani v jednotlivých turnusech (Obr. 3).



Obr. 3. Výskyt *Escherichia coli* ve střevní mikroflóře sajících selat. *E. coli* byla nejméně zastoupena v mikroflóře selat ošetřených antibiotiky. Naopak nejvyšší zastoupení *E. coli* bylo zaznamenáno u kontrolních selat bez jakéhokoli ošetření. Po podání probiotického preparátu bylo zastoupení *E. coli* ve střevní mikroflóře na úrovni mezi „antibiotickými“ a kontrolními selaty, přestože tato srovnání nedosáhla statistické významnosti.

6 Srovnání „novosti postupů“

Použitá probiotická směs pro novorozená selata sestávající se z *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides vulgatus* a *Bacteroides xylanisolvens* je naprosto unikátní. Je založena na vlastním pozorování negativní korelace mezi přítomností bakterií rodu *Bacteroides* u sajících selat a patogenních klostridií. Není nám známo, že by podobný výrobek byl na trhu dostupný. Preparát se podává jednorázově, přirozenou orální cestou a vychází z poznatků o přirozeném osídlování trávicího traktu selat. V souladu s tím jsme nezaznamenali žádné negativní reakce selat na podání preparátu, přestože byl podáván selatům v den porodu. Probiotický preparát nepředstavuje žádný lidmi uměle připravený produkt. Preparát jen urychluje a garantuje rozvoj střevní mikroflóry sajících selat správným a přirozeným směrem. Sající selata by dosáhla osídlení bakteriemi rodu *Bacteroides* i bez podání probiotického preparátu, což se každodenně v produkci prasat děje. Tuto skutečnost jsme zaznamenali i během testování, kdy v 5 z 6 nedošlo k signifikantnímu snížení

patogenních klostridií. Přesto nastávají situace, kdy se vývoj střevní mikroflóry selat opozdí a umožní rozvoj nežádoucí mikroflóry spojené s úhyny selat. V takovém případě podání probiotického preparátu na bázi bakterií rodu *Bacteroides* může účinně selata ochránit a snížit ekonomické ztráty chovatelů. Preparát tak nabízí alternativu k podávání antibiotik. Protože výrobní cena jedné dávky pro jedno sele se pohybuje v korunách, lze takový preparát podávat automaticky, preventivně a plošně každému seleti. Protože se preparát sestává ze striktně anaerobních bakterií, je i poměrně bezpečný. Baktérie z preparátu ztrácejí životaschopnost během 24hodinové expozice aerobnímu prostředí a tak jejich nekontrolovatelné šíření v prostředí, včetně přenosu na necílové druhy, je jen velmi málo pravděpodobné.

7 Seznam použité související literatury

ÚSKVBL (2020) Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání trendů ve spotřebách antimikrobik 2010-2018, p. 1-48, www.uskvbl.cz

Gerzova L, Babak V, Sedlar K, Faldynova M, Videnska P, Cejkova D, Jensen AN, Denis M, Kerouanton A, Ricci A, Cibir V, Österberg J, Rychlik I. Characterization of Antibiotic Resistance Gene Abundance and Microbiota Composition in Feces of Organic and Conventional Pigs from Four EU Countries. PLoS One 2015;10:e0132892.

V této práci jsme poprvé charakterizovali základní parametry skladby střevní mikroflóry prasat. Velkou výhodou bylo, že jsme dostali vzorky od partnerů ze 4 různých zemí Evropy a navíc z konvenčních a ekologických chovů prasat.

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Merlot E, Medvecký M, Polansky O, Gardan-Salmon D, Quesnel H, Rychlik I. Housing Systems Influence Gut Microbiota Composition of Sows but Not of Their Piglets. PLoS One 2017;12:e0170051.

Klíčová práce pro tuto studii, ve které popisujeme skladbu mikroflóry prasnic a jejich selat a poukazujeme na to, že typ výživy dominuje nad vlivem prasnic na skladbu mikroflóry selat.

Kubasova T, Davidova-Gerzova L, Babak V, Cejkova D, Montagne L, Le-Floc'h N, Rychlik I. Effects of host genetics and environmental conditions on fecal microbiota composition of pigs. PLoS One 2018;13:e0201901.

V této práci jsme mimo jiné poukázali na změny ve skladbě mikroflóry selat v době odstavu, zejména na výměnu bakteriálních druhů z čeledi *Bacteroidaceae* za zástupce z čeledi *Prevotellaceae*.

8 Dedikace

Funkční vzorek byl vytvořen v rámci projektu Národní agentury zemědělského výzkumu (QK1810462) a Ministerstva zemědělství České republiky (RVO0518).



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