



VÚVeL Academy - od výzkumu k praxi v chovech
hospodářských zvířat, cyklus seminářů

SBORNÍK ZE SEMINÁŘE
31. 10. 2024
(VÚVeL)

Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Seminář přinášející poznatky vzniklé v souvislosti s řešení projektu NAZV QK22020066 Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice.



EVROPSKÁ UNIE



PROGRAM ROZVOJE VENKOVA

PRV 2014 – 2020 Prioritní oblast 2A Opatření MO1
Předávání znalostí a informační akce

Reg. číslo projektu
23/016/0121a/564/000059

POZVÁNKA



PRV 2014 – 2020 Prioritní oblast 2A Opatření MO1
Předávání znalostí a informační akce

Reg. číslo projektu
23/016/0121a/564/000059



VÚVeL Academy - od výzkumu k praxi v chovech hospodářských zvířat, cyklus seminářů

Mikrobiom drůbeže v souvislostech

PROGRAM

- Střevní mikroflóra kuřat v prvních dnech po vylíhnutí a koncept Qocna -** MVDr. Jiří Volf, Ph.D. (VÚVeL)
- Ochrana kuřat proti *E. coli* směsi anaerobních bakterií -** MVDr. Aneta Papoušková, Ph.D. (VETUNI)
- Aktivní monitoring závažných klonů *E. coli* v rodičovských chovech, líhních a užitkových chovech masné drůbeže -** prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. (VETUNI)
- Sledování přestupu reziduů antimikrobik užitých v chovech drůbeže do životního prostředí v kontextu udržitelného zemědělství -** Ing. Kamil Šťastný, Ph.D. (VÚVeL)
- Jak bakterie ovlivňují skladbu malých molekul v trávenině slepého střeva -** Mgr. Lenka Vlasatíková, Ph.D. (VÚVeL)
- Jak se dál rozvíjí koncept Qocna a směry dalšího rozvoje probiotik pro drůbež -** doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D. (VÚVeL)

Kontaktní osoba

doc. MVDr. Soňa Šlosáková, Ph.D.
e-mail: sona.slosarkova@vri.cz

Seminář je včetně občerstvení hrazen z prostředků PRV, není požadován účastnický poplatek.

Registrace www.vri.cz/prihaseni/

Seminář přinášející poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu NAZV QK22020066 Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice

V průběhu semináře bude pořizována fotodokumentace akce, případně audiovizuální záznam výhradně za účelem medializace a propagace akce.

Osobní údaje budou v souladu s nařízením EP a Rady (EU) č. 679/2016 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů a o zrušení směrnice 95/46/ES zpřístupněny také Státnímu zemědělskému intervenčnímu fondu a Ministerstvu zemědělství pro účely administrace, kontroly a evaluace Programu rozvoje venkova na období 2014-2020.

Kdy:

31. 10. 2024
10:00 – 15:00 hod.

Kde:

VÚVeL,
Hudcová 296/70,
Brno 621 00

Kontakt:

Tel.: 773 756 631

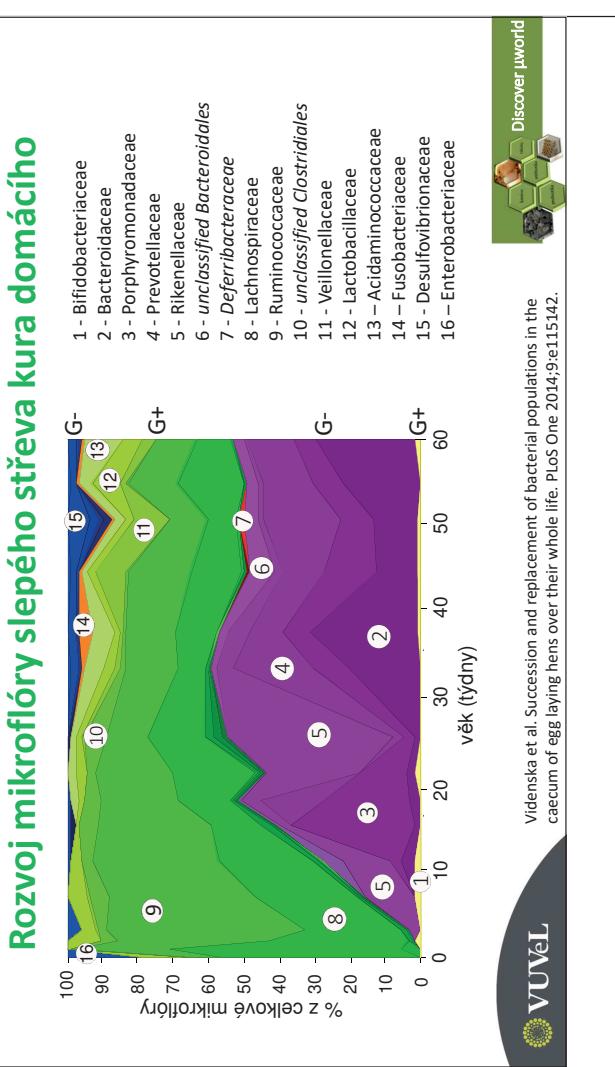


Střevní mikroflóra kuřat v prvních dnech po vylíhnutí a koncept QuoCNA

Jiří Wolf

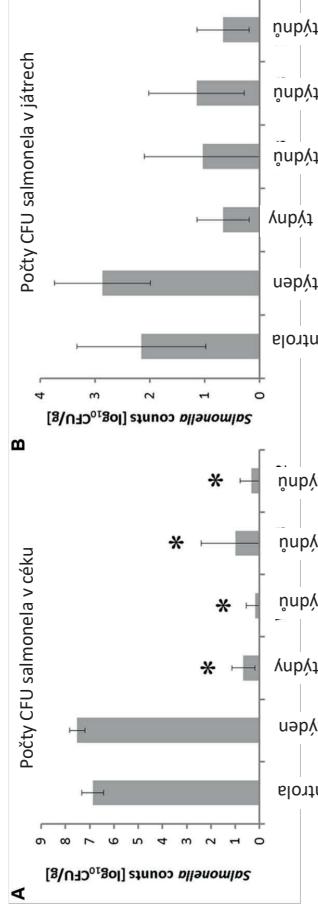


31.10. 2024 Výběr Academy: Mikrobiom drůbeže v souvislostech



Mikroflóra slepého střeva kuřat v závislosti na přítomnosti / nepřítomnosti dospělé slepice (24 h)

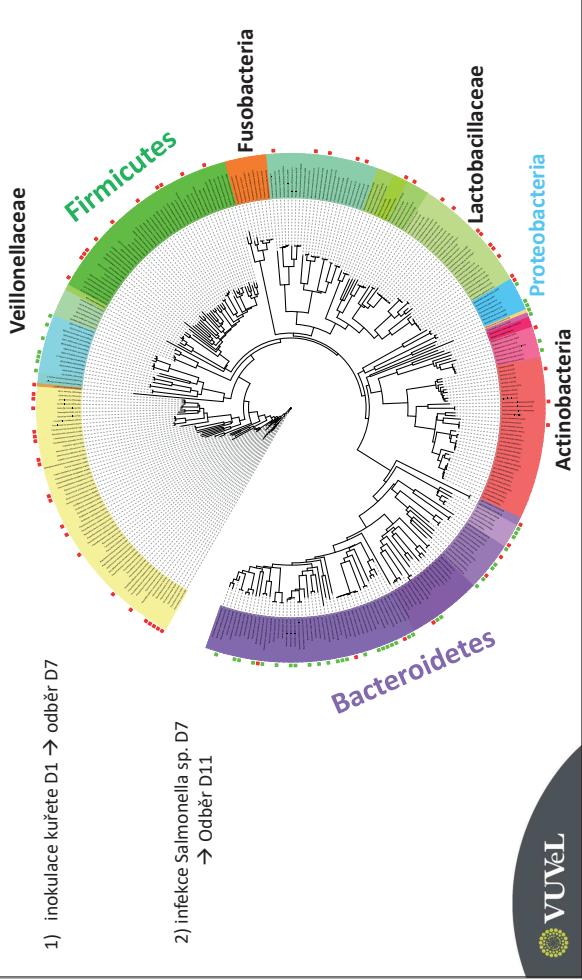
Ochranný efekt inokulace vyhlíknutých kuřat mikroflórou slepého střeva starších kategorií drůbeže



Jednodenní kuřata byla inokulována mikroflórou ze slepého střeva starších kategorií a následně infikována salmonelou.

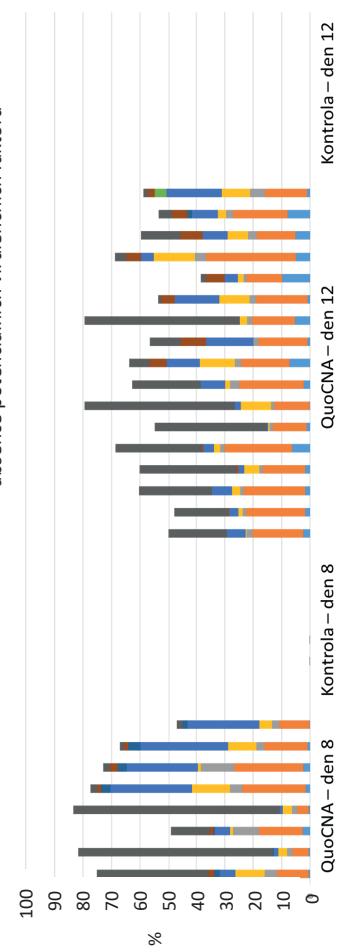
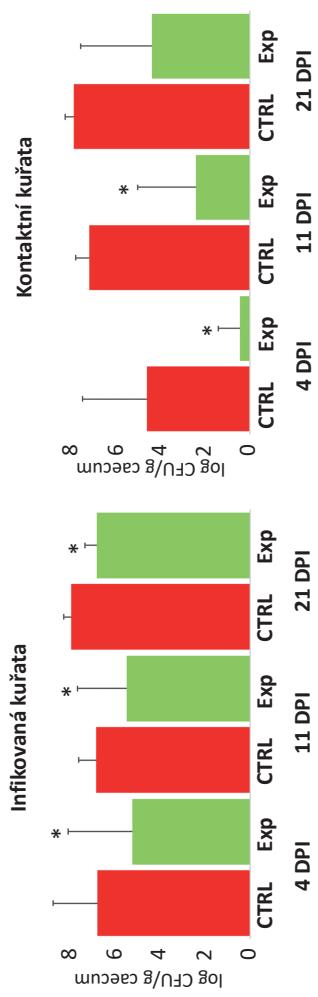
kompetitivní exkluze

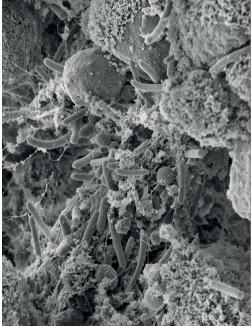
VUVaL



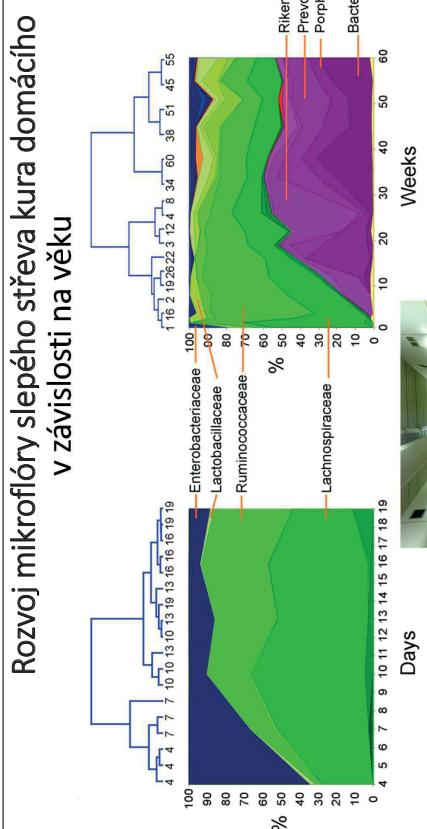
Ochranný efekt testovaných probiotik

Probiotika orálně den 1, infekce salmonelou den 7, počty salmonelou den 11, 18 a 28





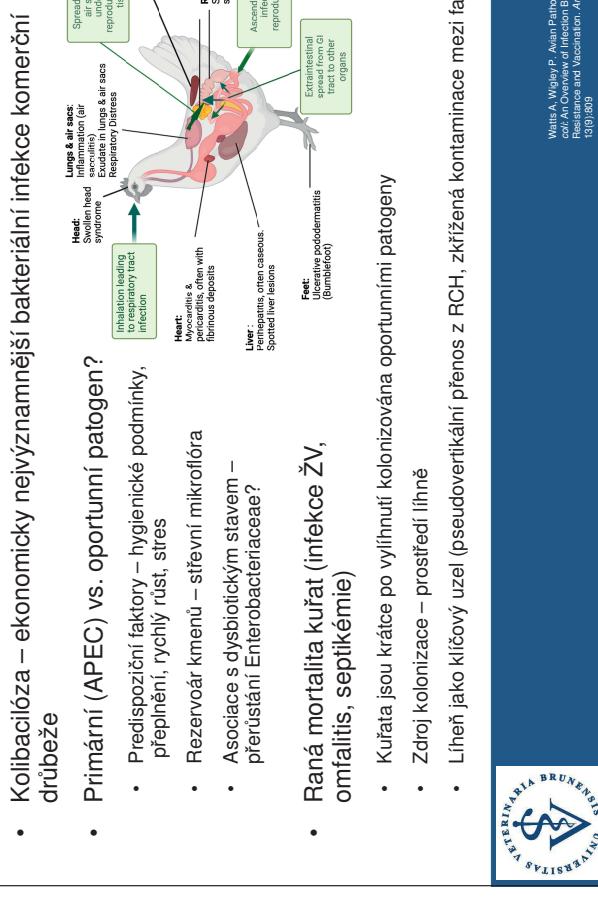
Děkují za pozornost



E. coli – klinický význam u drůbeže

Ochrana kuřat proti *E. coli* směsi anaerobních bakterií

- Kolibacióza – ekonomicky nejvýznamnější bakteriální infekce komerční drůbeže
- Primární (APEC) vs. oportunní patogen?
 - Predispoziční faktory – hygienické podmínky, přepňení, rychlý růst, stres
 - Rezervoár kmenů – střevní mikroflóra
 - Asociace s dysbiotickým stavem – přeruštání Enterobacteriaceae?
- Raná mortalita kuřat (infekce ŽV, omfalitis, septikémie)
 - Kuřata jsou krátce po vylíhnutí kolonizována oportunnými patogeny
 - Zdroj kolonizace – prostředí lhánek
 - Liheň jako klíčový uzel (pseudovertikální přenos z RCH, zkřížená kontaminace mezi farmami)



Watts A, Wigley P. Avian Pathogenic *Escherichia coli*: An Overview of Infection Biology, Antimicrobial Resistance and Vaccination. *Antibiotics*. 2014; 3(9):249.

Mikrobiom drůbeže v souvislostech

přinášející poznatky vzniklé v souvislosti s řešením projektu NAZV QLK220220066
Opatření na snižování spotřeby a racionalního užívání antibiotik ve výkruhu broilerů v České republice

MUDr. Aneta Papoušková, Ph.D.

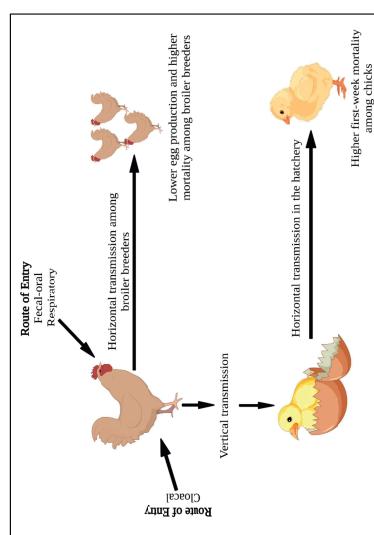
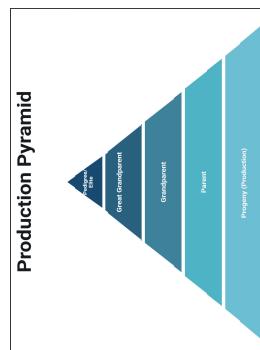


Probiotika proti *E. coli*

- Střevní mikrobiota – klíčová role ve vývoji imunitního systému; imunomodulace, kompetitivní exkluze
- Ochrana kuřat v kritickém období života
- Jednodruhová a vícedruhová probiotika
 - *Lactobacillus* sp., *Enterococcus* sp., *Bifidobacterium* sp., *Bacillus* sp.
 - Přehodná kolonizátoři, omezená ochrana
- Komerční částečně definované lyofilizované probiotické směsi
 - Broilact, Aviguard
 - Probiotika nové generace
 - Nesporulující striktní anaerobny, jejichž zdrojem je kvočna (deficitní u komerčních kuřat)
 - Diluční probiotika



Přenos *E. coli* u drůbeže



Joseph J. Zhang, L. Adhikari, P. Evans, J.D. Ramachandran, R. Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) in Broiler Breeders - An Overview. *Pathogens* 2023; 12(11):1280.



Experiment

- Cíl – účinek komplexní definované probiotické směsi střevních anaerobů na kolonizaci slepého střeva kuňat kmenem APEC
- Experimentální zvířata – jednodenní kuňata Ross 308 z komerční lhñé (experimentální a kontrolní skupina po 28 kuňatech)
- Experimentální skupiné podána probiotická směs
- Experimentální kmen – APEC ST117-O78:H4
- Ověřená virulence
- Rezistence k ciprofloxacinu
- Podání oběma skupinám 24 hodin po aplikaci probiotické směsi

- V obou skupinách 7., 14., 21., a 28. den po 7 kuňatech zváženo a usmrceno CO_2 , odběr obsahu slepých střev
- Selektivní kultivace s kvantifikací a detekcí přítomnosti kmene O78

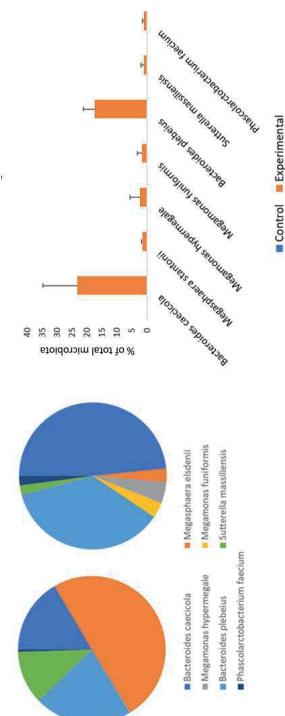


Probiotická směs

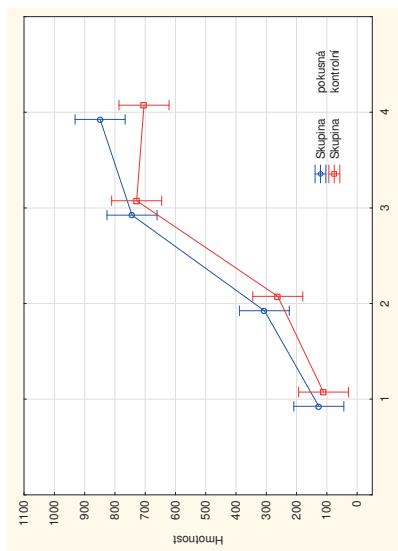
- Bacteroides caecicola*, *Bacteroides plebeius*, *Megasphaera stantonii*, *Megamonas hypermegale*, *Megamonas tuniformis*, *Phascolarctobacterium faecium*, *Sutterella massiliensis*
- Fermentace 48 hodin ve 100 ml Wilkins-Chalgrenova bujónu 37 ° C, 85% N_2 , 10% CO_2 , 5% H_2
- Podání 0,1 ml p.o. experimentální skupiné v den naskladnění



Výsledky – kolonizace probiotickou směsí



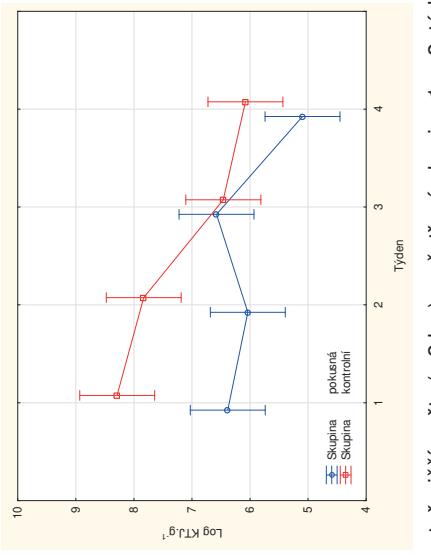
Výsledky – hmotnostní přírůstky



Nezjištěny signifikantní rozdíly mezi skupinami.



Výsledky – kolonizace CIP-rez. *E. coli*



Závěry

- U kuřat ošetřených probiotickou směsí zjištěny signifikantně nižší počty CIP-rez. *E. coli*
 - Jistá zpětná účinnost? (kuřata již kolonizována z líně)
 - Výsledek srovnatelný s účinkem tradičních probiotik a komerčních směsí (Hofacre et al., 2002; Kathayat et al., 2021)
- Rozdíl v kolonizaci experimentálním kmenelem mezi pokusnou a kontrolní skupinou
- Zásadní rozdíl v kolonizaci dvou týdnech života (zráni střevní mikroflóry)
- Kritické je včasné podání probiotické směsi

Detectce experimentálního kmene

1. týden		2. týden		3. týden		4. týden	
Pokusná skupina	Kontrolní skupina						
P1	0	K1	+++	P8	0	K15	0
P2	0	K2	+++	P9	0	K9	+++
P3	0	K3	+++	P10	0	K10	+++
P4	0	K4	+++	P11	0	K11	+++
P5	0	K5	+++	P12	0	K12	+++
P6	0	K6	+++	P13	0	K13	+++
P7	0	K7	+++	P14	0	K14	+++

1. - 2. týden - 100% kolonizace kontrolní skupiny experimentálním kmensem x
experimentální kmens pod hranicí detekce u ošetřené skupiny



Poděkování

- Spoluautoři – Doc. RNDr. Ivan Rychlík, Ph.D., RNDr. Danka Haruštiaková, Ph.D., Prof. MVDr. Alois Čížek, CSc.
- NAZV QK22020066

Research Note: A mixture of *Bacteroides* spp. and other probiotic intestinal anaerobes reduces colonization by pathogenic *E. coli* strain OTS-H-ST17 in newly hatched chickens

Anesta Papousekova, Ivan Rychlík, Duška Haruštiaková, and Alena Čížek

Institute of Microbiology and Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Veterinary Sciences Brno, Brno, Brno, The Czech Republic; Veterinary Research Institute, Brno, The Czech Republic; and IBERETOX, Faculty of Science, Masaryk University, Brno, The Czech Republic

ABSTRACT
An experimental group of one-day-old chicks was fed a diet containing a mixture of *E. coli*. Significant reduction of colonization rates as the result of the administration of the mixture was observed in the group for the numbers of ciprofloxacin-resistant *E. coli*. The results show that colonization of chicken by *E. coli* was reduced after administration of 7 gut microorganisms. The next day the chicks were inoculated by an APEC strain OTS-H-ST17. The results show that the chicks fed with the mixture were less colonized than the control group. This may provide a decisive protection against *E. coli* infection. The mixture may also reduce the risk of transmission of *E. coli* from the mother to the offspring. More detailed studies are needed to elucidate the mechanism of action of the mixture.

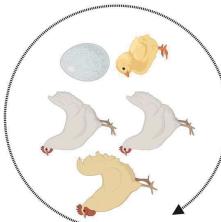
Key words: competitive exclusion, colonization, chicken, avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), mixture

<https://doi.org/10.1016/j.vetres.2022.108239>



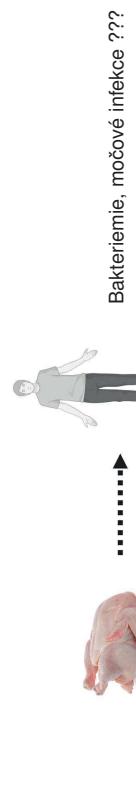
Co jsou to závažné klony/linie *E. coli* ?

- APEC
 - virulentní APEC - linie se specifickým genotypem (např. ST95/140, ST429, ST117, ST23/88, ST58, ST10)
 - ✓ primárně adaptovány na drůbež
 - ✓ variabilní kombinace faktorů virulence
 - ✓ přítomnost plazmidů ColV
- Epidemiologicky významné klony spojené s nebezpečnými typy antibiotické rezistence (ESBL/pAmpC) (např. ST131, ST95)



Ústav infekčních chorob a mikrobiologie
FVL VETUNI Brno

Seminář VÚVEL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech



Bakteriemie, močové infekce ???



Seminář VÚVEL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Proč monitorovat závažné klony *E. coli*?

Chybí data pro zavádění účinnějších opatření

- nemáme vycísleny ztráty způsobené kolinfekcemi
 - Holandsko - 3,7 milionu EUR v důsledku infekcí APEC v rodičovských chovech (Landman and van Eck, 2015)
- o cirkulaci APEC v našich chovech a zavlečení dovozem
 - příprava autovakcín pro rodičovské chovy
 - neje centralizovat, musí mít zájem chovatel
- o cirkulaci epidemiologicky významných klonů *E. coli* v našich chovech
 - úkol pro dozorové orgány SVS
 - snaha řetězci rychlého občerstvení získávat drůbeží maso vyroběné bez použití ato



Aktivní monitoring závažných klonů *Escherichia coli* v rodičovských chovech, líhnicích a užitkových chovech

Alois Čížek

Ústav infekčních chorob a mikrobiologie
FVL VETUNI Brno

Seminář VÚVEL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Projekt NAZV č. QK22020066

„Opatření na snižování spotřeby a racionalní užití antibiotik ve výkruhu broilerů v ČR“

Aktivní monitoring závažných klonů *E. coli* v rodičovských chovech, líhnicích a užitkových chovech

- cílem bylo poskytnout pracovníkům SVS, veterinárních ústavů, specialistům na choroby drůbeže i chovatelům drůbeže metodický postup:
 - pro cílený odběr vzorků a
 - postupy laboratorního vyšetření a charakterizace izolátů *E. coli*

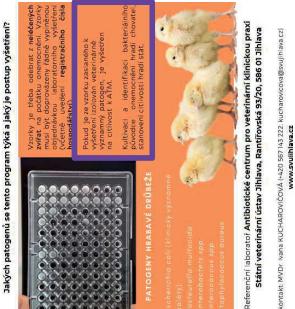
Seminář VÚVEL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Seminář VÚVEL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech



Zavedené programy

- Národní antibiotický program
(SVÚ Jihlava)
- Vyšetření zadávaná chovateli,
veterináři
- Výzkumné aktivity financované projekty
výzkumných agentur, NAZV aj.



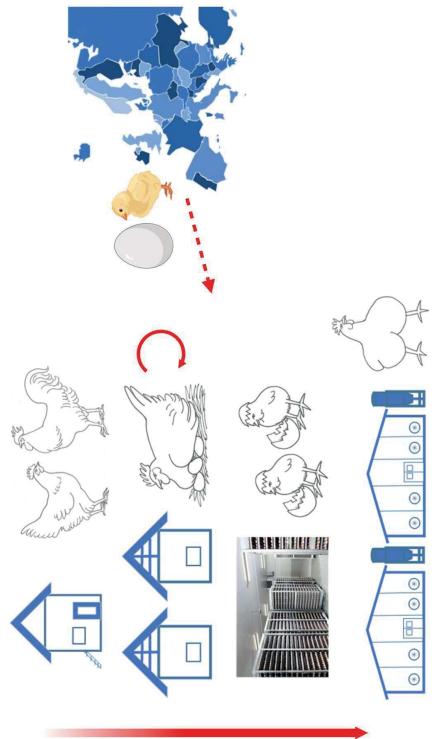
Seminář Výběr, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Odběry vzorků v produkční pyramidě



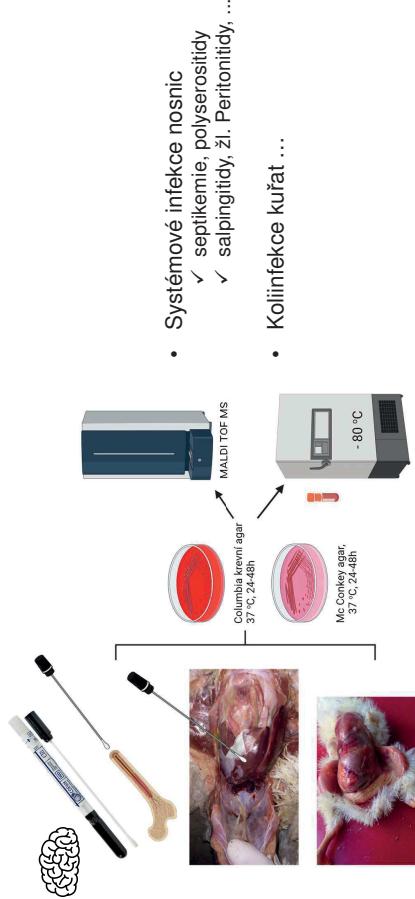
Stručně k metodice

Cesty šíření závažných klonů *E. coli* v produkční pyramídě marné drůbeže jsou známé



Seminář Výběr, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

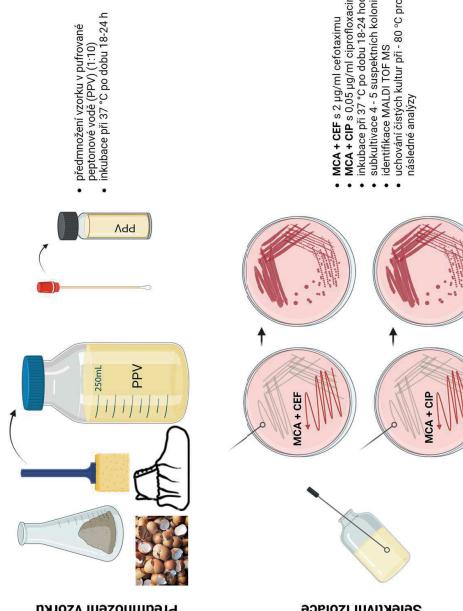
Odběr a zpracování vzorků - sekční materiál



Seminář Výběr, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

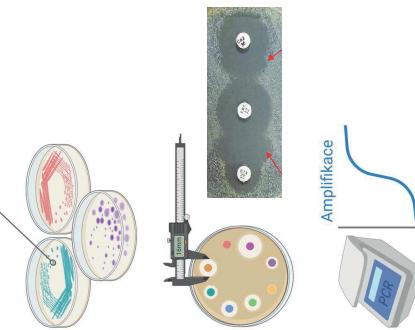
Seminář Výběr, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Vzorky prostředí



Seminář VÚvel, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Vlastní výběr izolátů *E. coli* k analýze DNA



- ✓ Izoláty vybavené 4 (5) a více geny asociovanými s virulencí
- ✓ Multirezistentní izoláty
- ✓ Izoláty rezistentní k 3. generaci cefalosporinů

Ověřili jsme postup výběru izolátů pro celogenomové sekvenování

Přehled genů, které lze využít jako kritérium pro skríning APEC

	Gen	Funkce	Lokalizace
	<i>ompT</i>	Protein vnitřní membrány	Plazmid
	<i>hlyF</i>	Hemolyzin F	Plazmid
	<i>iron</i>	Receptor salmonochelinového sideroforu	Plazmid
	<i>lutA</i>	Receptor aerobaktinového sideroforu	Plazmid
	<i>iss</i>	Protein asociovaný s zvýšenou serovou rezistencí	Plazmid
	<i>tsh</i>	Termosenzitivní hemaglutinin (fadhezin)	Plazmid
	<i>cvaC</i>	Produkce kolistinu V	Plazmid
	<i>ip2</i>	Siderofor versülabaktin	Chromozom
	<i>ir2 (orf4)</i>	Karbohydátový transportér	Chromozom
	<i>felA</i>	F11 varianta P fimbrií	Chromozom

Sestava antibiotik a hraniční inhibiční zóny pro interpretaci výsledku citlivosti

Zkratka	Název	Minimální koncentrace antibiotika v disku (μg)	Předních inhibičních zóny (mm)
AMP	Ampicilin	10	≥ 17
AMC	Aminocyclitol-klavulanát	20/10	≥ 18
KF	Cefalotin	30	≥ 18
S3	Sulfonamidy	250-300	≥ 17
CN	Gentamicin	10	≥ 25
	Nalidixiková kyselina	30	≥ 19
	Sulfonatoazotriminetoprim	1,25/23,75	≥ 16
SXT	Tetracyclin	30	≥ 15
	Chloramfenikol	30	≥ 18
CIP	Ciprofloxacin	5	≥ 21

Seminář VÚvel, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Vyhodnocení dat z WGS

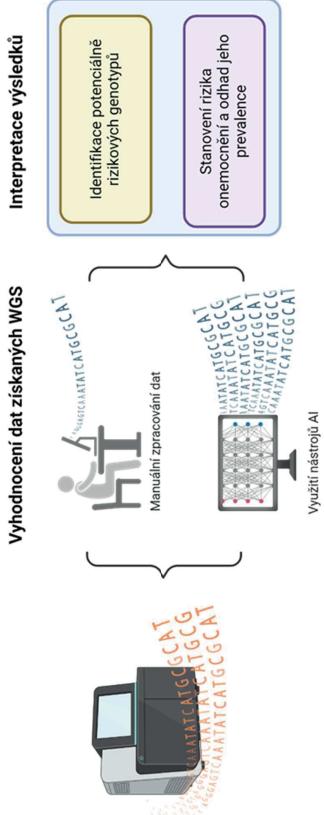
Základní typizace zahrnuje:

- MLST (např. <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>)
- Fylogenetická skupina (<https://ezclermont.hutton.ac.uk/>)
- Sérotyp (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>)
- Získané geny rezistence a chromozomální mutace (<https://genepi.food.dtu.dk/estfinder>)
- Plazmidy (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)
- Virulence (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)
- Fylogenetická analýza příbuznosti izolátů

Seminář VÚvel, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Seminář VÚvel, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

Zjednodušený postup zpracování dat



Odhadnout reálné riziko klinických infekcí by měly umožnit prediktivní modely.

Seminář vúvěL, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech



Q1202006-V3
Kontrolní monitoring závažných klad. *Escherichia coli* v řadičovských nověch, lůmnicích a uštkovkových chovech – místní drážďe
(typ výsledku: „Ametis“ – Metocilka)

Bořek Čížek^a, Aneta Papoušková^b, Kateřina Nedbalcová^c, David Šenk^c

— Veterinární univerzita Brno
— Výzkumný ústav Veterinárního lékařství, v. v.

107

Seminář VI/Vol 31. 10. 2021 Mikrofizické dřívějšky v souvislostech

Jak metodiku využít?

- **Chovatelé**
 - ekonomická návratnost (často chybí kalkulace ztrát v důsledku kolonifikací)
 - získání údajů pro členou přípravu autovakcín
 - prověření zdravotních rizik nákupu od dodavatelů včetně zahraničních
 - **Státní veterinární správa**
 - Monitoring epidemiologicky významných genotypů
 - Vybudovali a udržovali informačního systému ???

Seminář vývět, 31. 10. 2024. Mikrobiom dřívější v souvislostech



Děkuji za nozornost!

Seminář vývěl, 31. 10. 2024, Mikrobiom drůbeže v souvislostech

VÚVEL ACADEMY

Sledování přestupu reziduí antimikrobií užitých v chovech drůbeže do životního prostředí v kontextu udržitelného zemědělství

Kamil Šťastný

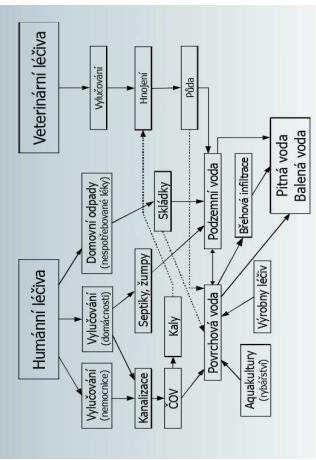


- VÚVEL ACADEMY 2024-
- 31. listopadu 2024-

Úvod: Veterinární antimikrobiá v životním prostředí

- Cíl: vyvinout analytický nástroj, který by nám pomohl objektivně zmapovat zatížení životního prostředí bezprostředně souvisejícího s veterinární praxí ve velkochovech drůbeže

Schéma zdrojů a cest léčiv v životním prostředí¹



1) Upraveno podle T. Heberer, Toxicology Letters 131 (2002)



Úvod: Veterinární antimikrobiá v životním prostředí

- Aktuální téma úze související s antimikrobiá v životním prostředí:

- Vzrůstající mikrobní resistance (The EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2021–2022, European Food Safety Authority (EFSA), a European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) - January 2024),
• Zvyšování regulačních tlaků EU na celý „životní cyklus léčiv“ tak, jak vyplývá z Usnesení Evropského parlamentu a EK ze dne 17. září 2020, O strategickém přístupu k léčivým přípravkům v životním prostředí,

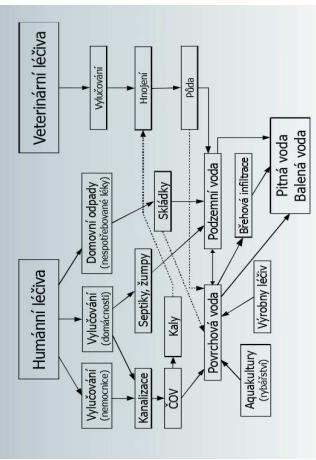
- Nové postoje spotřebitelů v EU a Prosazování Zelené dohody pro Evropu (Green Deal).
• Evropský Účetní Dvůr ve své auditní zprávě č. 19 z roku 2019 dospěl k závěru, že existuje prázdnin i přes všechny vynaložené finanční prostředky a činnosti Evropské Komise a agentur prostřednictvím vydaných regulačních opatření v EU.



Úvod: Veterinární antimikrobiá v životním prostředí

- Cíl: vyvinout analytický nástroj, který by nám pomohl objektivně zmapovat zatížení životního prostředí bezprostředně souvisejícího s veterinární praxí ve velkochovech drůbeže

Schéma zdrojů a cest léčiv v životním prostředí¹



1) Upraveno podle T. Heberer, Toxicology Letters 131 (2002)

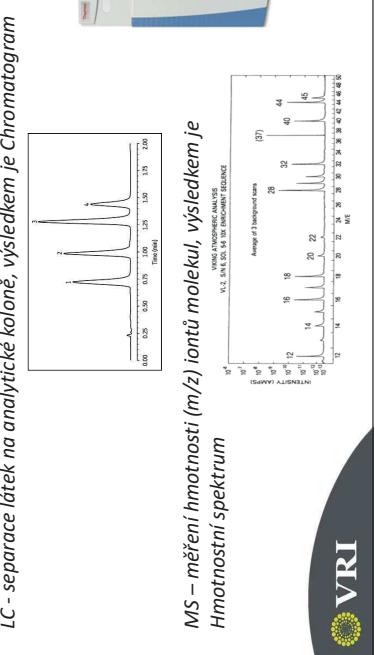
Analytická metodika pro stanovení antimikrobik

- Dnes již existuje velký počet publikací a výzkumů, zpráv atd., které uvádějí naměřené úrovně znečištění residuů léčiv „mikro-polutanty“ v životním prostředí.
 - Neze však jednoznačně určit zdroj znečištění. Studie, které uvádějí přímou souvislost mezi veterinárními antimikrobiky používanými v živočišné výrobě a jejich výskytom v životním prostředí, je stále nedostatek.
- Vyuvinutá metodika jednoznačně identifikuje a kvantifikuje přítomnost těchto neužívanějších antimikrobik:
 - enrofloxacin, ciprofloxacin, sulfamethoxazole, trimethoprim, amoxicillin a doxycycline* v napájecí vodě, odpadních vodách a v podestýlkách z drůbežích chovů.
 - Metodika je schopna jednoznačně identifikovat a monitorovat na základě charakteristických RT a MA celou řadu dalších antimikrobik, která jsou registrovány jako hromadně vyrobávány pro drůbež, např. analyty: tetracyclin, oxytetracyclin, chlortetracyclin, florfenikol, ampicillin, oxacillin, prokain benzprin, ceftalexin, ceftiofur, sulfadimidine, sulfadimethoxin, sulfadoxin, sulfadiazin, erythromycin, tylosin, tylosin, tilmicosin, gamithromycin, linkomycin, gentamicin, neomycin, marbofloxacin, kolistin, tiamulin a valnemulin.



Analytická metodika pro stanovení antimikrobik

- Vyvinutou metodu pro stanovení antimikrobiálního mánku založenou na dnes nejcitlivější instrumentální technice: spojení kapalinové chromatografie (LC) s hmotnostní spektrometrií (MS), tedy (UHPLC-
(HR)MS/MS

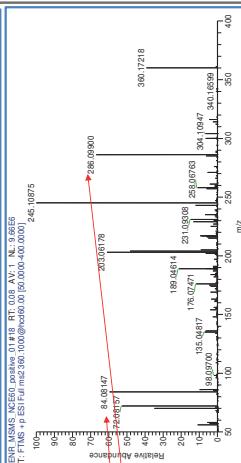


Analytická metodika – identifikace analytu

Mass accuracy (správnost) pro prekurzorové ionty standardů (N)

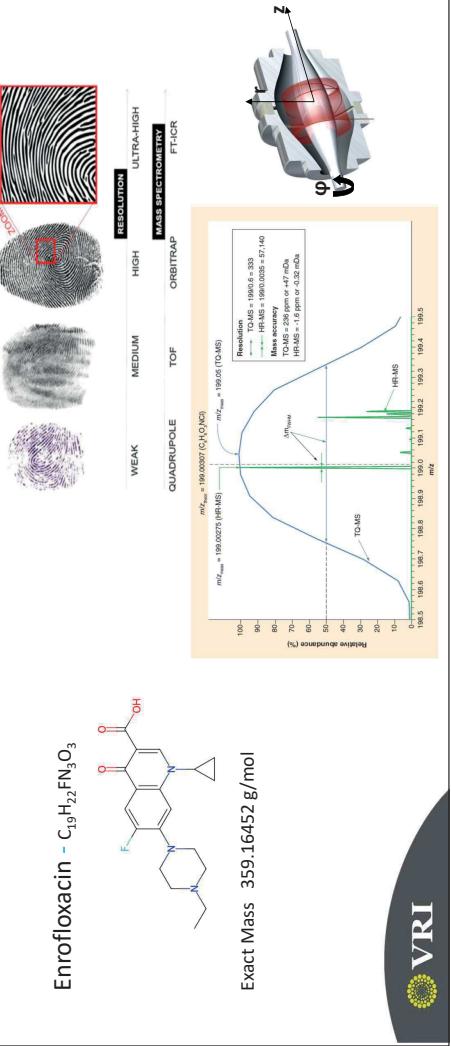
Analýza	Produkt iontu pro kontinuální identifikaci	(m/z)	Družstvo produktu iontu pro identifikaci	(m/z)	Kořenová energie (eV)
Amonidiclin	Ammonium	349,08600	208,04984	172	
Ciprofloxacin		231,15650	249,06729	60	
Dosulepin		452,13640	316,06765	40	
Doxycycline		84,08187	266,06900	35	
Erythromycin		9,070518	1,5601185	60	
Fluorouracil		290,11595	261,10520	172	
Gentamicin		393,11615	222,06765	172	
Indandiol-D ₅		393,12311	2,888,1175	60	

Namáčené produktové (fragmentační) inony analutiv v (MMS²)



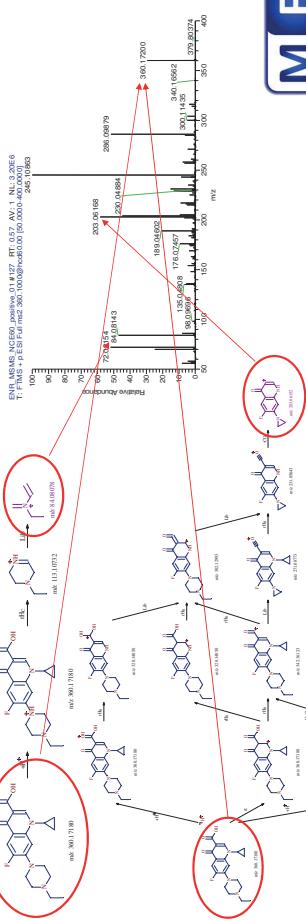
Analytická metodika pro stanovení antimikrobik

- Vysoké rozšíření (HR) = benefit Orbitrapu = 99,9% identifikace organické molekuly



Analytická metodika – Identifikace analytu

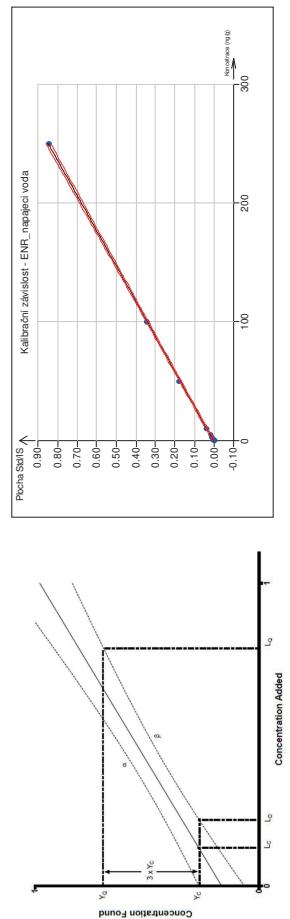
- **Mass Frontier (Thermo Scientific)** – softwarový expertní systém pro určování fragmentačních mechanismů organických molekyl v hmotnostních spektrech – dnes AI systém



VR

Analytická metodika – Kvantifikace analytu

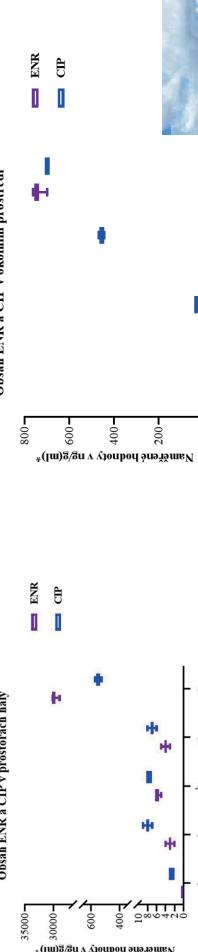
Validace metody byla provedena na základě dokumentu VICH Topic GL2 - Validation Methodology (1998) EU.



Aplikace metodiky: Sledování přestupu reziduí antimikrobik užitých v chovech drůbeže do životního prostředí

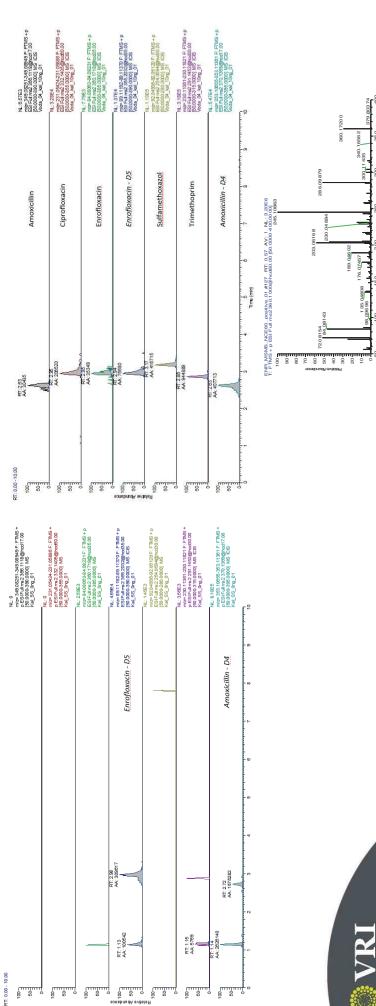
Obsah enrofloxacinu (ENR) a metabolitu ciprofloxacinu (CIP) ve vzorech odebraných v prostorách produkčních hal a v okolním prostředí hal. * Naměřené hodnoty uvedeny v jednotkách ng/ml pro vzorky z čistiny odpadních vod (ČOV) a vzorky z jímky; pro ostatní vzorky platí jednotka ng/g.

Obsah ENR a CIP v prostorách hal



Analytická metodika – Kvantifikace analytu

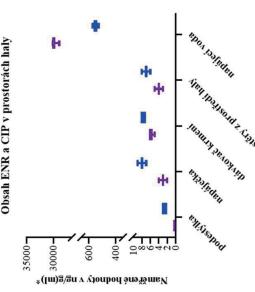
Chromatogram pozitivního vzorku s obsahem 10 µg/l⁻¹: amoxicillinu (RT = 2,63), ciprofloxacinu (RT = 2,96), enrofloxacinu (RT = 2,95), sulfamethoxazolu (RT = 3,17) a trimethoprimu (RT = 2,85); a s obsahem IS o koncentraci 1 µg/l⁻¹: enrofloxacinu – D5 (RT = 2,94) a amoxicillinu – D4 (RT = 2,63).



Diskuse: Sledování přestupu reziduí antimikrobik užitých v chovech drůbeže do životního prostředí

Obsah enrofloxacinu (ENR) a metabolitu ciprofloxacinu (CIP) ve vzorech odebraných v prostorách produkčních hal a v okolním prostředí hal. * Naměřené hodnoty uvedeny v jednotkách ng/ml pro vzorky z čistiny odpadních vod (ČOV) a vzorky z jímky; pro ostatní vzorky platí jednotka ng/g.

Obsah ENR a CIP v prostorách hal



Metabolit



Diskuse: Sledování přestupu reziduů antimikrobií užitých v chovech drůbeže do životního prostředí

Obsah enrofloxacinu (ENR) a metabolitu ciprofloxacinu (CIP) ve vzorcích odebraných v prostorách produkčních hal a v okolním prostředí hal. * Naměřené hodnoty uvedeny v jednotkách ng/ml pro vzorky z čistirny odpadních vod (ČOV) a vzorky z jímky, po ostatní vzorky platí jednotka ng/g.

Obsah ENR a CIP v okolním prostředí

- 33 µg/l v řekách + 23 µg/l v laguně ENR
- 162 – 182 µg/l v řekách + 129 µg/l v laguně FQ

v Severní Francii, Nord-Pas-de-Calais (Tillie I. et al., 2016).

ENR <LOD a CIP <0,1 µg/l – v povrchových vodách, český hydrometeorologický ústav, 2023.

- vnímat souvislosti s celkovou sektoru o spotřebou těchto léčiv, tedy poměří veterinární vs. humánní spotřebbal průměrná vážená spotřeba FQ v EU 6,3 mg FQ/kg odhadované biomasy u lidí a 2,9 mg FQ/kg odhadované biomasy u zvířat určených k produkcii potravin, veterinární spotřeba 2,2x nižší než humánní v roce 2021.
- v ČR naopak tento poměr opačný, 1,7 mg FQ/kg biomasy u zvířat a 1,0 mg FQ/kg biomasy u lidí, což představuje cca 1,7x vyšší spotřebu veterinárních vůči humánním léčivům s ohlasem FQ v 2021.



• Naše analytická metodika potvrdila možnost použití LC-MS/MS metody jako analytického nástroje pro monitoring vlivu řízeného použití antimikrobií na drůbežích farmách v českých podmínkách.

- Byla optimalizována pro odber vzorků, který funguje na jednoduchém a rychlém principu, který může provádět řadový zaměstnanec chovu.

- Byla započata její certifikace a metodika bude vydána jako certifikovaná pod číslem CM č. 149/2024 (ISBN 978-80-7672-057-2).

- Využití metodiky jako součást screeningu pro přítomnost reziduí antimikrobií v chovech brojlerů a v blízkém životním prostředí pro přípravu podkladu pro ESG dotazníky v souvisí s principy EU politiky, obecně nazývané jako „Zelená dohoda pro Evropu“ (Green deal), a to Environmental, Social, and Governance reporting (ESG). (ESG reporting se především zabývá poskytováním informací o environmentálních, sociálních a správních aspektech každého podnikání, včetně udržitelnosti).
- Dokladování nepoužívání antimikrobií v produkčních chovech drůbeže: souvislost s přechodem na udržitelné zemědělství a měnití se požadavky spotřebitelů s nastupem mladé generace.



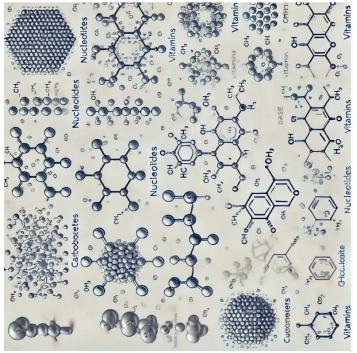
Závěr

Děkuji za pozornost...



Kamil Šťastný
kamil.stastny@vri.cz

Projekt Qk 2202066 + článek ve Veterinářství 10/2024



Co jsou to malé molekuly

Definice:

Malé molekuly: velikost 100 až 1000 Daltonů

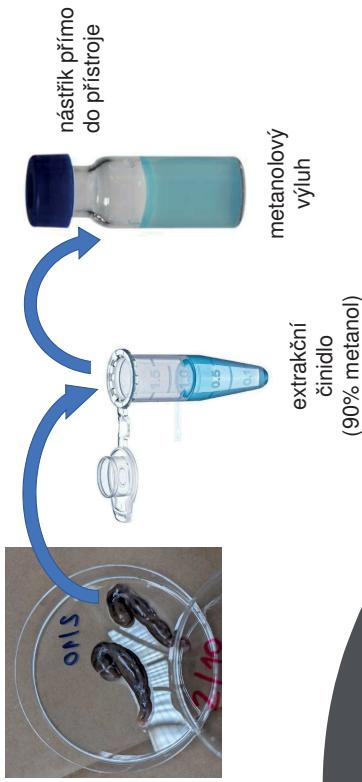
Sacharidy, aminokyseliny, mastné kyseliny, nukleotidy, vitamíny, neurotransmity, hormony, koenzymy

Metabolity



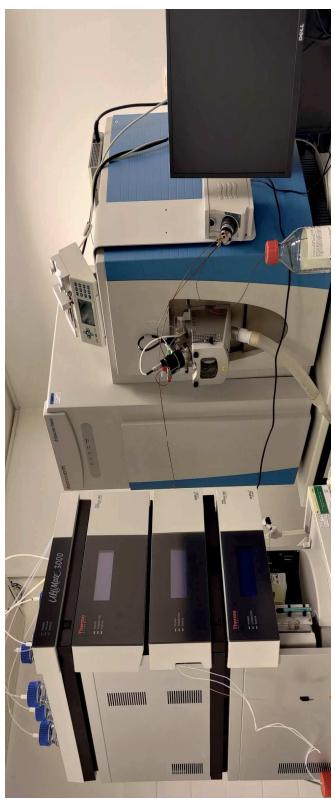
Velké molekuly: velikost od několika tisíců do milionů Daltonů

Analyza metabolitů v obsazích slepých střev



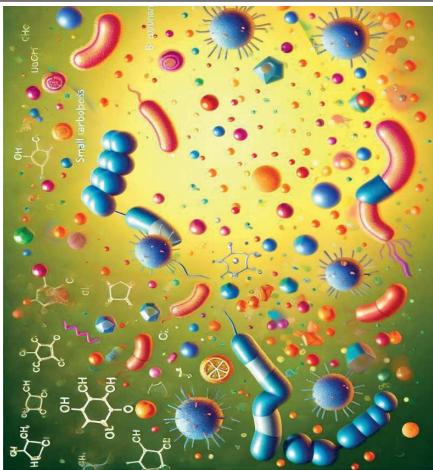
VRJ

Jak bakterie ovlivňují skladbu malých molekul v trávenině slepého střeva



VRJ

Jak bakterie ovlivňují skladbu malých molekul v trávenině slepého střeva?



Co víme jiště

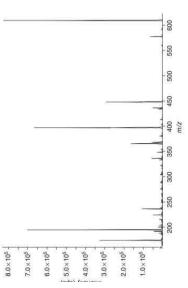
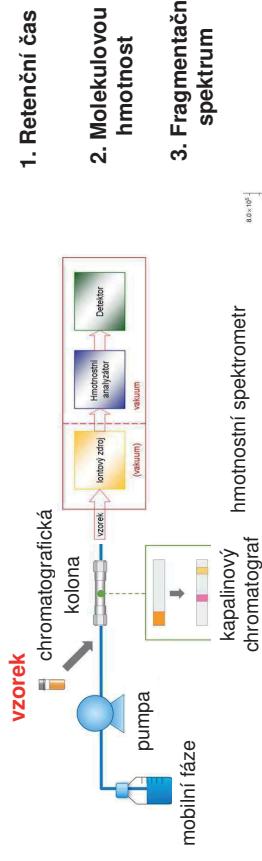
Bakterie ovlivňují složení metabolitů ve střevě výrazně.

Další faktory ovlivňující složení malých molekul

- Stresové faktory po vylíhnutí 2019
- Chov v zajetí nebo v přírodě
- Množství vlákniny v krmivu
- Omezení množství krmiva
- Použití antibiotik
- Suplementace např.
 - kyselinou laurylovou
 - rostlinními oleji
 - virginilamyrcinem
 - extraktem ze semen hroznového vína

Nikdo neví, jakým způsobem se to děje a co to vlastně znamená.

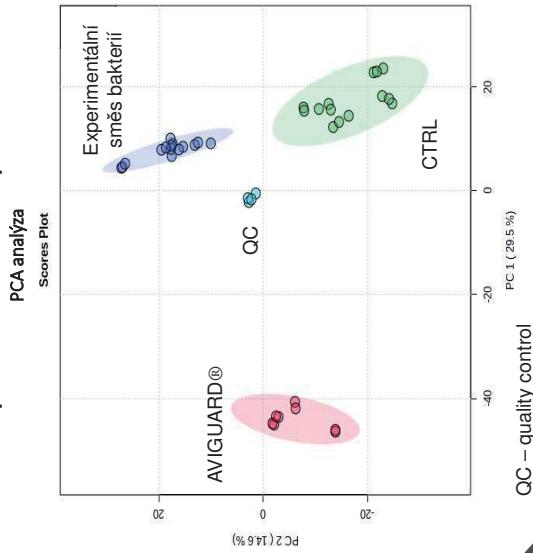
Kapalinový chromatograf ve spojení s hmotnostním spektrometrem (LC-MS)



mobilní fáze



Necílené profilování metabolitů pomocí LC-MS



Design experimentů 1 a 2

Den 7

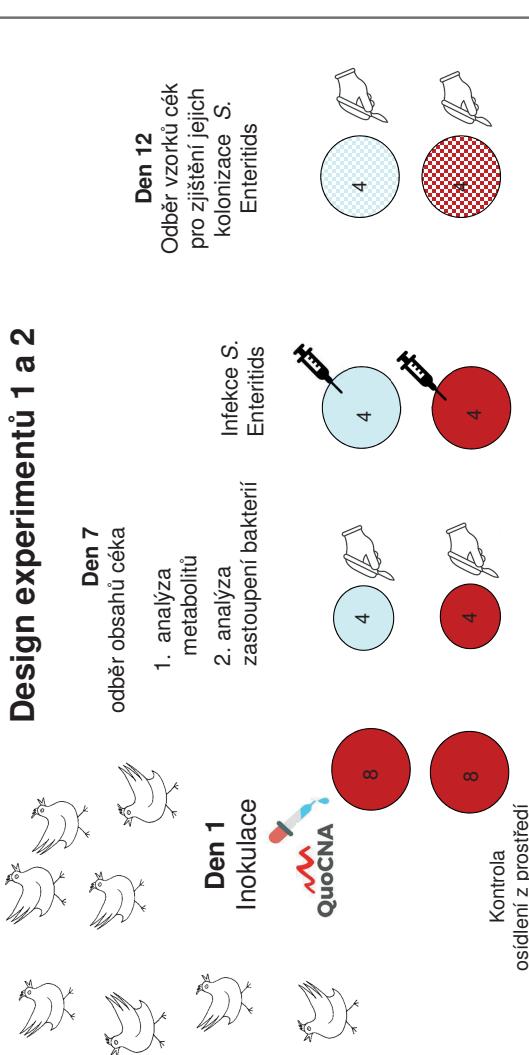
odber obsahu céka

1. analýza metabolitů

2. analýza zastoupení bakterií

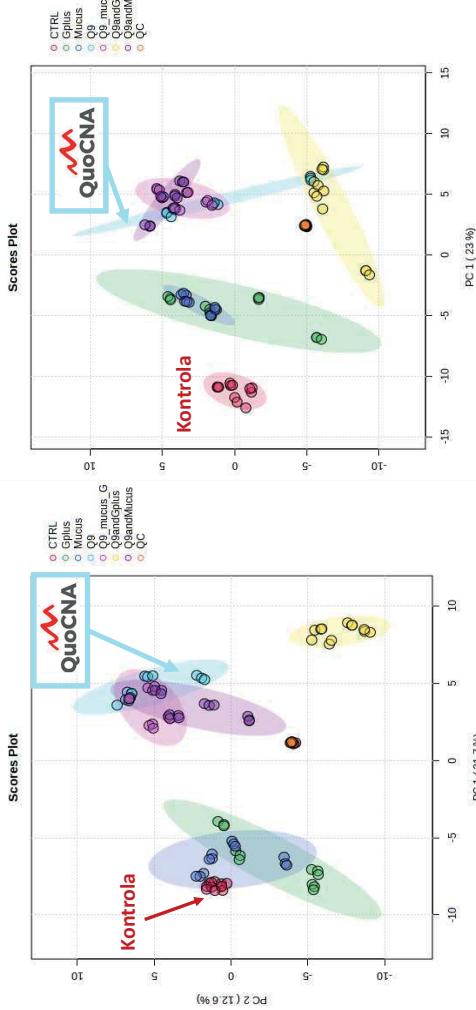
Den 12

Odběr vzorků cék pro zjištění jejich kolonizace S. Enteritidis

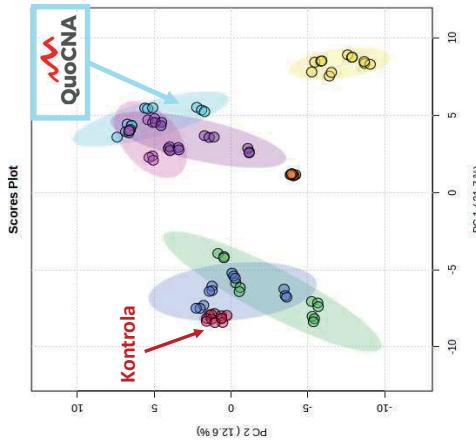


PCA

Experiment 2

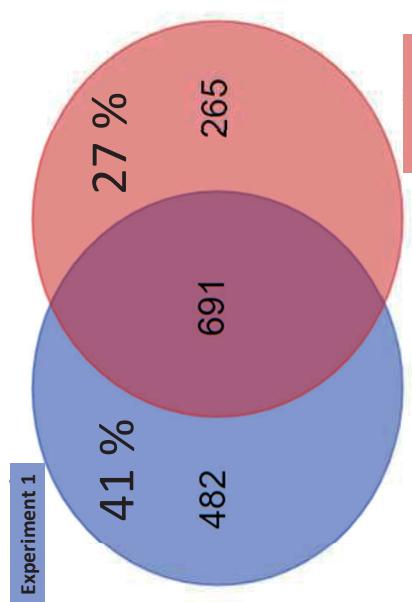


Experiment 1

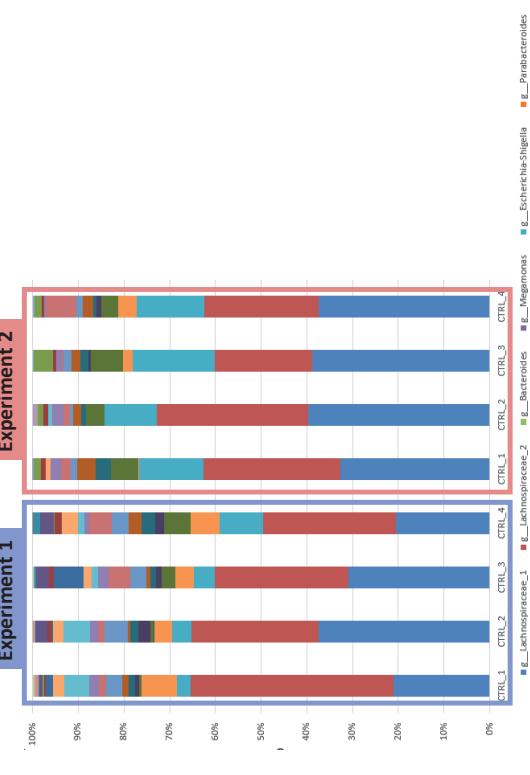


PCA

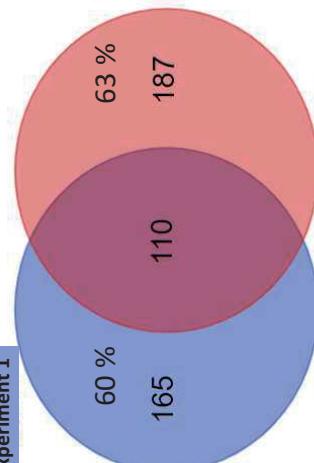
Překryv všech detekovaných metabolitů mezi dvěma stejnými experimenty



Zastoupení bakteriálních rodů v sedmidenich kultivacích QuoCNA



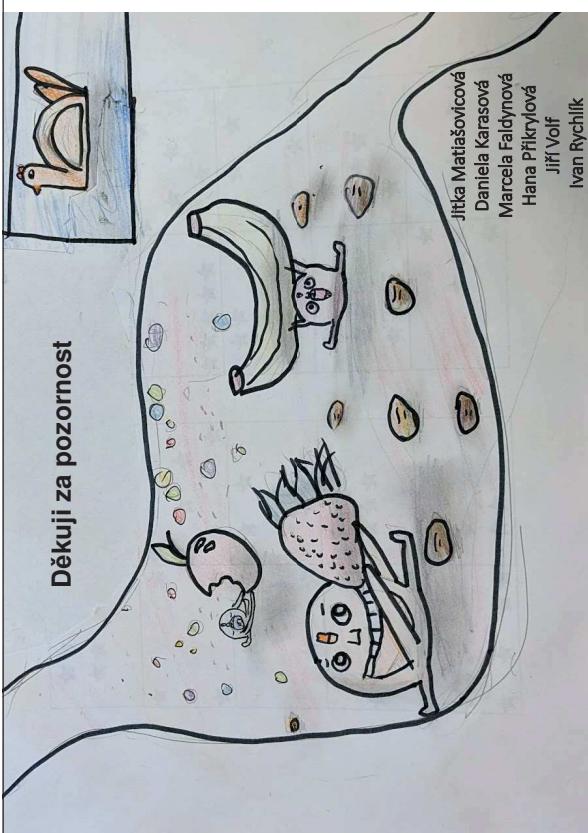
Metabolity ovlivněné osídlením QuoCNA



24 %
z 1237 metabolitů

Velká písma – databáze standardů Malá písma – on-line databáze

Metabolit	% obsah v čeku		Experiment 1	Experiment 2
	Experiment 1	Experiment 2		
PANTOTHENATE	1.72	1.9	3.6	4.8
RIBOFLAVIN	0.04	0.04	7.1	2.6
Thiamine	0.04	0.06	4	3.2
Biopterin	0.01	0.02	43.2	25.7
DIHYDROBIOPTERIN	0.02	0.01	14.2	10.8
GUANOSINE	0.03	0.04	4.4	3.4
ADENOSINE	1.03	1.51	4	2
GUANINE	0.13	0.07	3.2	5.2
INDOLE-3-METHYL ACETATE	0.03	0.02	5.6	14.3
KYNURENATE	0.07	0.07	4.1	13
UROCANATE	0.31	0.24	1.8	2.2
Methylimidazoleacetic acid	0.1	0.07	8.1	22.4
CYTIDINE	0.04	0.04	2.5	2.3
1-(9Z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphochanolamine	0.01	0.01	6.4	3.6
Ethyl palmitoleate	0.02	0.01	3.7	4.6
trans-3-Indoleacrylic acid	0.14	0.16	1.5	20.7
Linoleyl Ethanolamide	0.02	0.05	2.7	2.1
9-Nitrooleate	0.02	0.05	35.4	8
SPHINGANINE	0.02	0.02	3.3	50.3
				8.8



Metabolit	% obsah v cedu		Kolikrát je sníženo množství po QuoCNA	
	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
GLUTAMATE	1.38	0.63	5.8	3.7
PHENYLACETALDEHYDE	1.64	0.03	2.5	61
S)-N-d-benzoylarginine ethyl ester	0.02	0.03	14	14.1
Acetylarginine	0.03	0.03	5.3	4.9
Guanosineglycerol-beta-sinapoylcholine ether	0.02	0.02	7.4	5.8
Sinapine	0.86	0.78	73.5	60.4

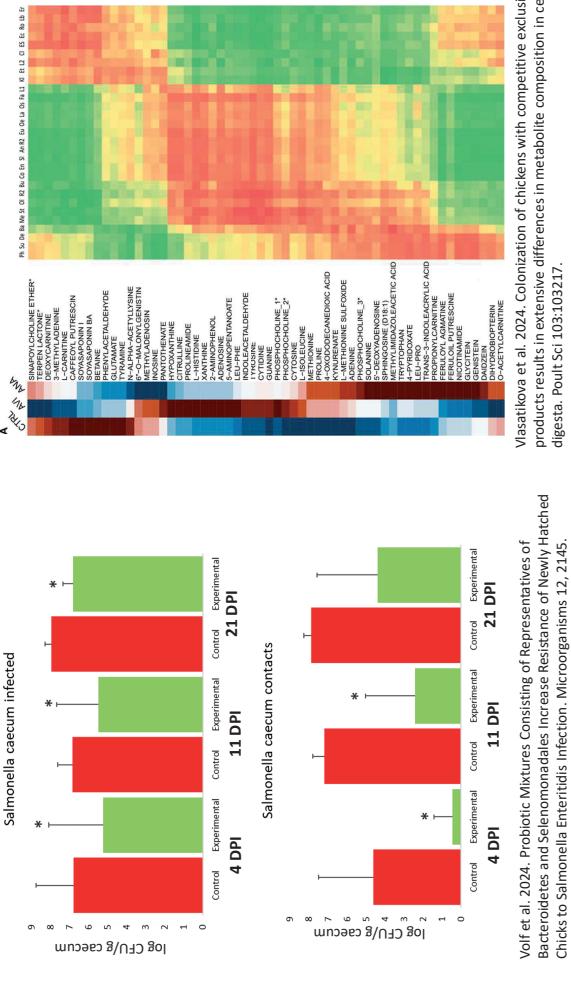
Jak se dál rozvíjí koncept Qocna a směry dalšího rozvoje probiotik pro drůbež

Ivan Rychlík

Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno



VUVeL



Klíčem je ale selekce...

1. Přenáší se ze slepice na kuřáta a obvykle chybí u jednodenních kuřat z líhní
 2. Po jednorázové aplikaci čistých kultur účinně kolonizují trávící trakt (slepé střevo)
 3. Zvyšují odolnost kuřat před salmonelami
 4. A to vše ve skupinách o 20 kuřátech max.

Jak postavit selekci jinak?

Jak uvažovat jinak obecně?



Víme, že osidlení jednodenních kuřat trusem nosnic vede k ještě lepší ochraně Aha, existují další stimulující baktérie...

Víme, že smyvy z agarových ploter zaočkovanych trusochraně



2. Po jednorázové aplikaci čistých kultur účinně kolonizují trávící trakt (islépé st

3. Zvyšují odolnost kuřat před salmonelami

Lokalizace, lumenální vers slizniční
Lokalizace, respirační trakt?

Metabolismus, fermentace cukrů vers fermentace aminokyselin

Funkční, motilita lumenálních baktérií

Funkční, tvorba spór lumenálnimi baktériemi

Funkční, exprese sekrečního systému typu VI, T6SS

Funkční, interakce s imunitním systémem, vazba Ig

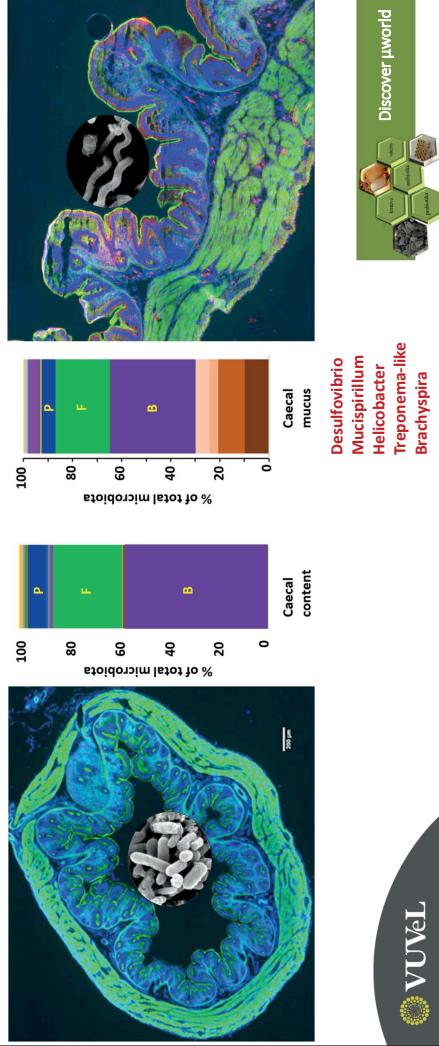
Jiná selekce, třeba na hmotnostní přírůstky?

Kombinace se složením krmné směsi?

Úplně jinak? Ochrana prostředí?
Rychlik et al. 2023. Microbiota of chickens and their environment in commercial production. Avian Dis 67:1-9.



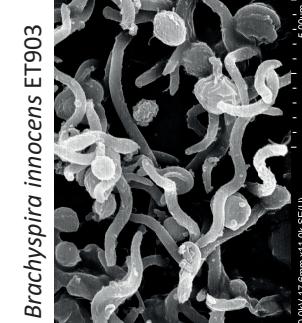
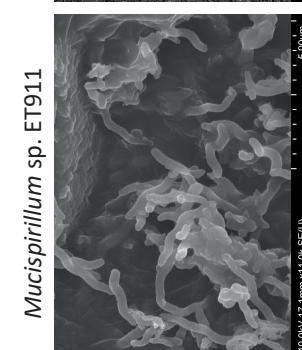
Slizniční mikroflóra slepého střeva kuřat



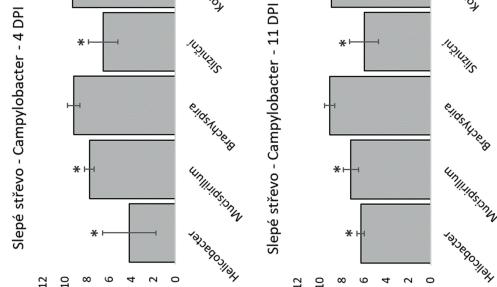
Pokud chcete osídlovat slizniční, ...

Měli byste

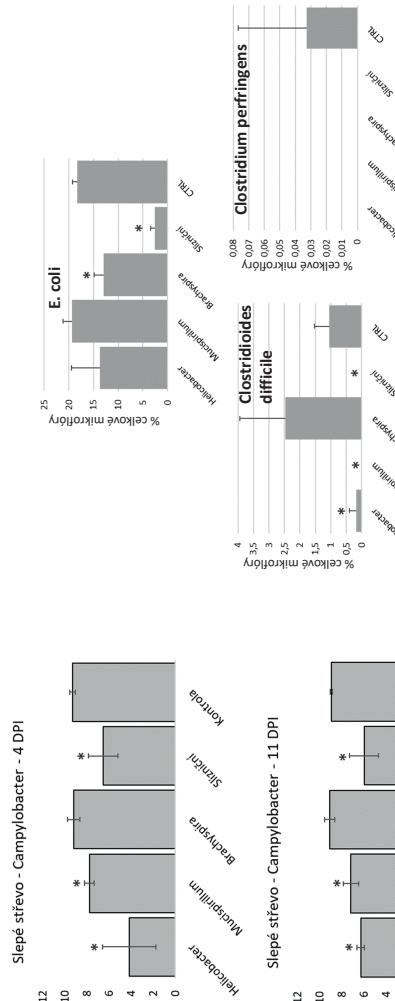
- být spirální
- být pohybliví (bíldky, flagella)



Slizniční mikroflóra slepého střeva kuřat



Slizniční mikroflóra slepého střeva kuřat

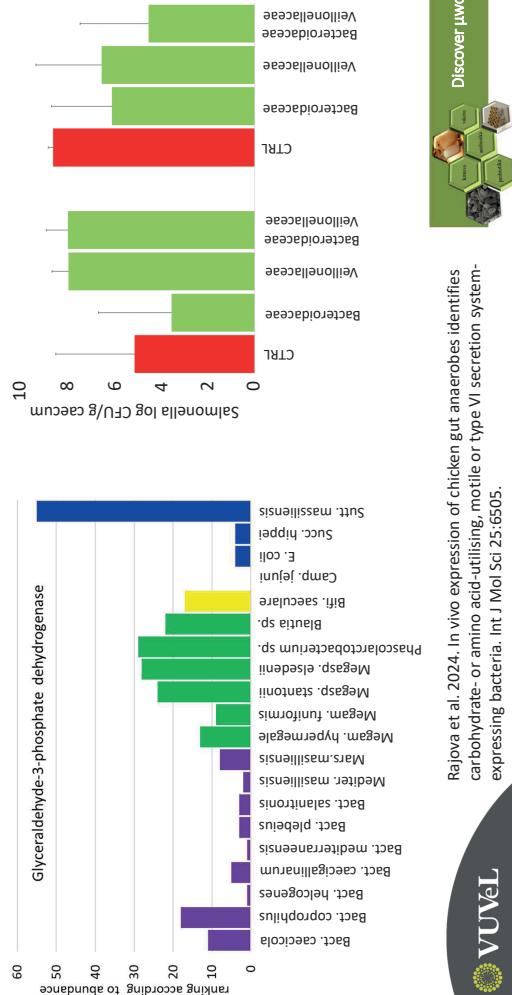


Mikroflóra respiračního traktu a kůže kuřat



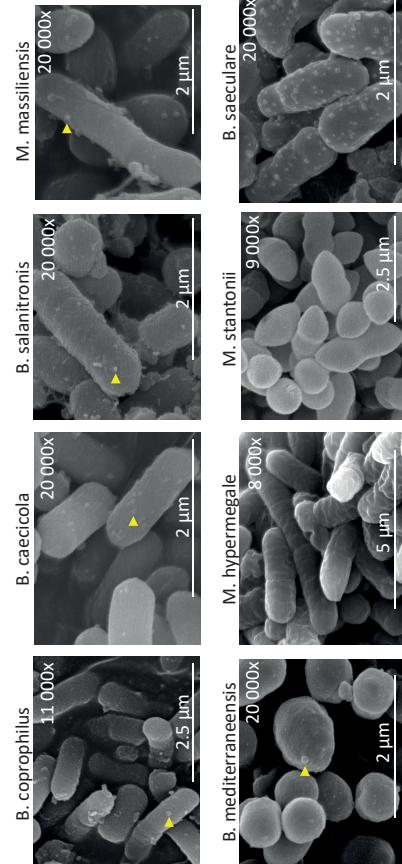
Faldynova et al. 2024. Contact with adult hens affects the composition of skin and respiratory tract microbiota in newly hatched chicks. Poult Sci 103:103302.

Metabolismus, fermentace cukrů vers fermentace aminokyselin



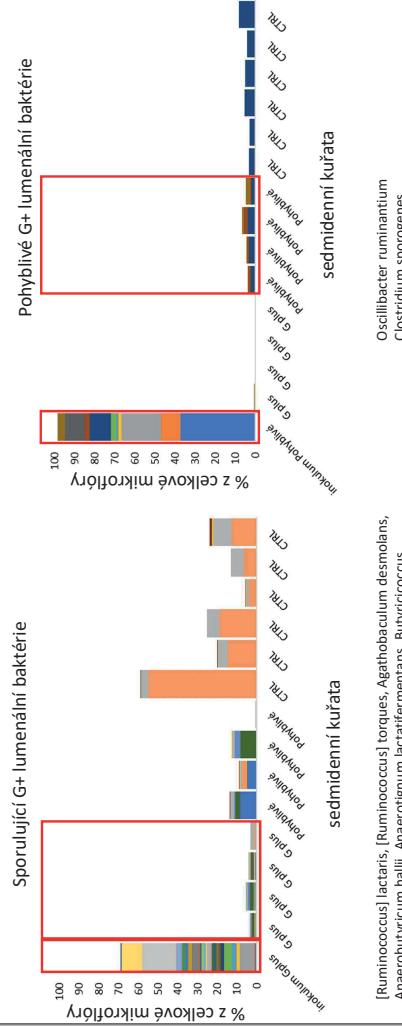
Rajova et al. 2024. In vivo expression of chicken gut anaerobes identifies carbohydrate- or amino acid-utilising, motile or type VI secretion system-expressing bacteria. Int J Mol Sci 25:6505.

Kombinace se složením krmné směsi



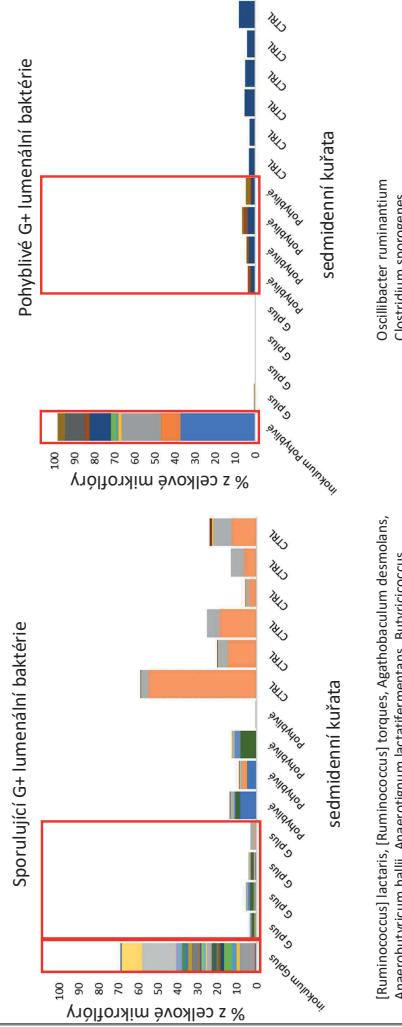
[Ruminococcus] lactaris, [Ruminococcus] torquatus, Agathobacter desmolans, Anaerobutyricum hallii, Anaeroflavigum lactifermentans, Butyrivibacillus pullicaeorum, Clostridium sporogenes, Diancourtella massiliensis, Enterocloster aldenensis, Faecalibacillus, Flavonifractor plautii, Flavonifractor plautii, Filamentibacter butyricus, Fournierella masiliensis, Intestinibacillus massiliensis, Massilimicrobium timonensis, Psuedolabiflavonifactor capillosus, Pseudolabiflavonifactor phocaensis, Seliimonas intestinalis,

Sporující a pohyblivé G+ lumenální baktérie



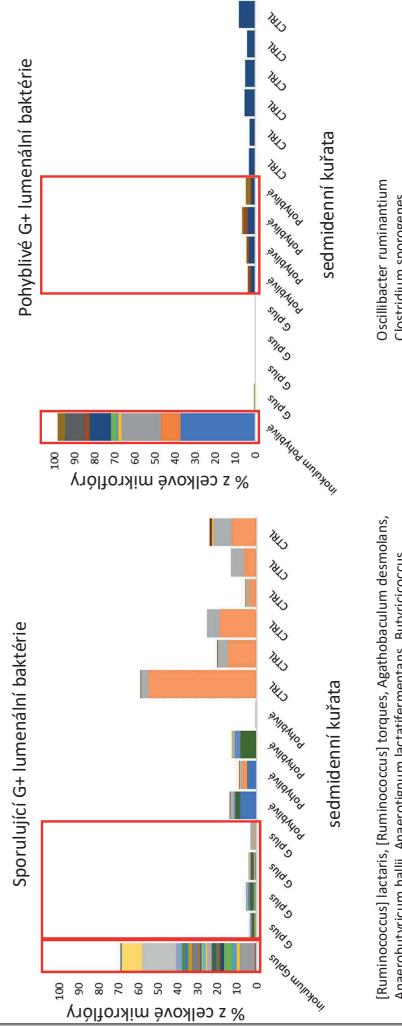
Oscillibacter ruminantium
Clostridium sporogenes
Paraclostridium benzoyticum
Enterocloster bovae
Flavonifractor plautii
Anaerotruncus colihominis

Sporující a pohyblivé G+ lumenální baktérie



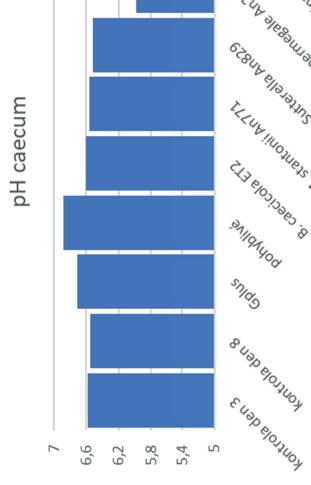
Oscillibacter ruminantium
Clostridium sporogenes
Paraclostridium benzoyticum
Enterocloster bovae
Flavonifractor plautii
Anaerotruncus colihominis

Pohyblivé G+ lumenální baktérie

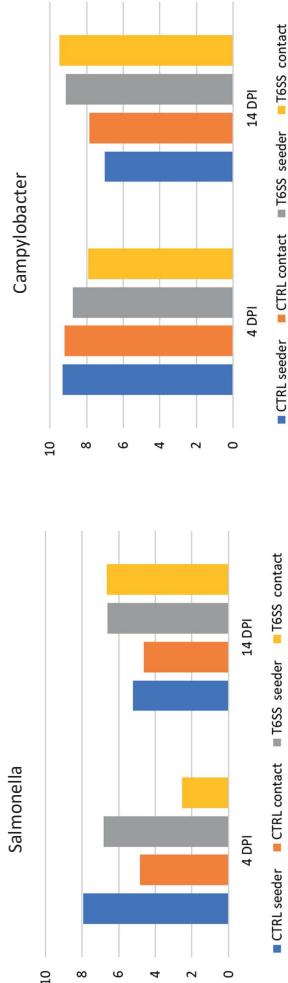


Oscillibacter ruminantium
Clostridium sporogenes
Paraclostridium benzoyticum
Enterocloster bovae
Flavonifractor plautii
Anaerotruncus colihominis

Neko selektovat na pH tráveniny? A raději vyšší nebo nižší?



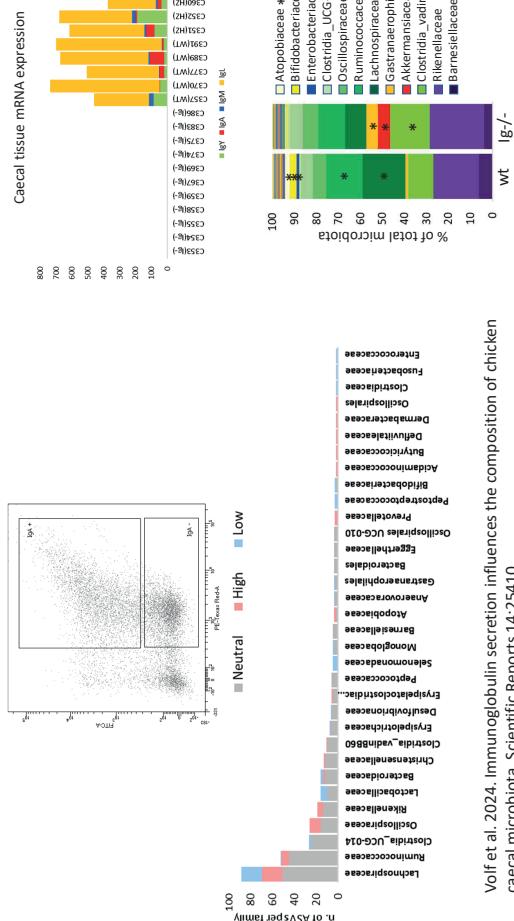
Expresce sekrečního systému typu VI, T6SS



Bacteroides mediterraneensis An793
Bacteroides barnesiae ET62
Bacteroides gallinaceum An825
Bacteroides coprophilus An818

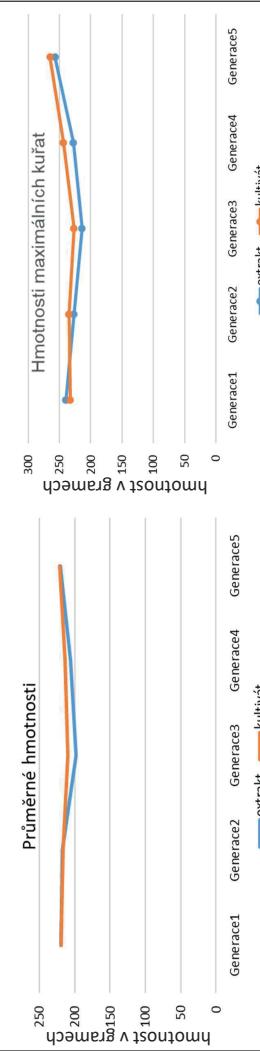
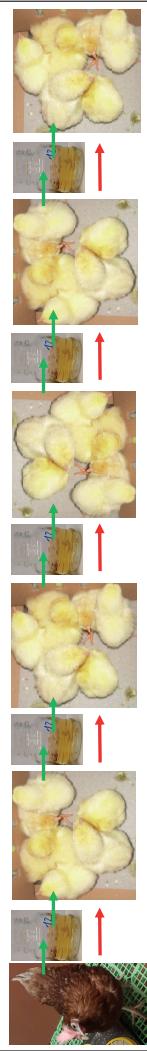
Bacteroides caedigallinarum ET336
Bacteroides gallinaceum An269
Bacteroides gallinaceum ET941
Bacteroides plebeius An426

Interakce s imunitním systémem, vazba Ig

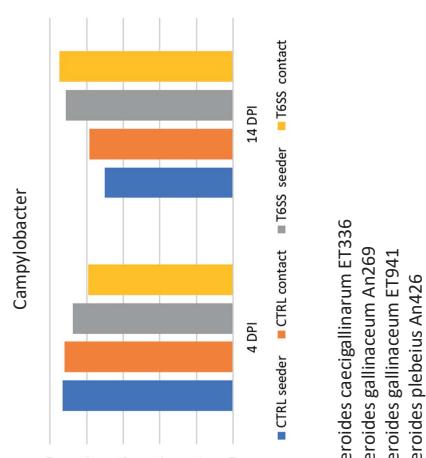


Volf et al. 2024. Immunoglobulin secretion influences the composition of chicken caecal microbiota. Scientific Reports 14:2510.

Selekce na hmotnostní přírůstky po 7 dnech života

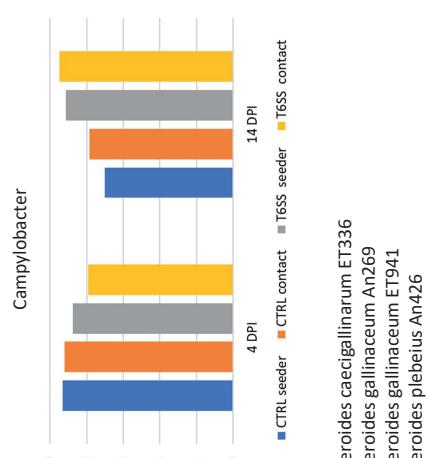


Expresce sekrečního systému typu VI, T6SS



Bacteroides caedigallinarum ET336
Bacteroides gallinaceum An269
Bacteroides gallinaceum ET941
Bacteroides plebeius An426

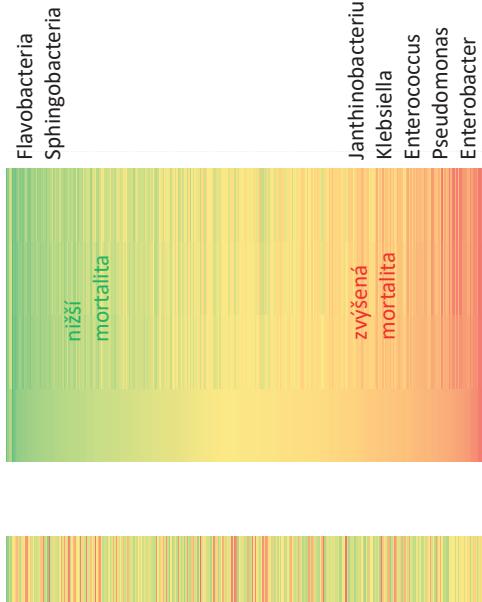
Expresce sekrečního systému typu VI, T6SS



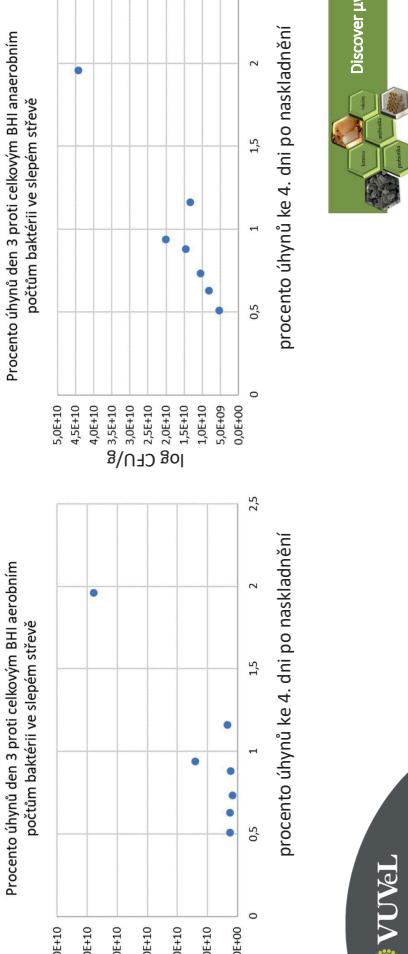
Bacteroides caedigallinarum ET336
Bacteroides gallinaceum An269
Bacteroides gallinaceum ET941
Bacteroides plebeius An426

Mikroflóra v prostředí kuřat

Odpad ze strojářek v líních



Anebo proč vlastně hynou kuřát po naskladnění a antibiotika to dokážou kontrolovat?



Souhrn

Osidlení jednodenních kuřat směsí sestávajících se z bakterií rodu *Bacteroides*, *Megamonas* a *Megasphaera* zvyšuje jejich odolnost před salmonelami – produkt QuoCNA

A dá?

Lokalizace, respirační trakt?
Funkční, motilita lumenálních bakterií
Funkční, tvorba spór lumenálnimi bakteriemi
Funkční, interakce s imunitním systémem, vazba Ig

ASI NE, ALE NIKDY NEŘÍKEJ NIKDY

Anebo za specifických podmínek oživit hypotézy o použití bakteriofágů?

Nebo které z anaerobních bakterií jsou lyofylizovatelné?

ALE JO, TADY BY NĚCO MOHOLO BYT

Jiná selekce, třeba na hmotnostní přírůstky?

Jiná selekce, rychlosť růstu in vitro nebo in vivo, lyofylizovatelnost?

Lokalizace, lumenální vers slizniční
Úplně jinak? Ochrana prostředí?

TOHLE BEREME VÁZNÉ, VČETNĚ PATENTOVÉ OCHRANY

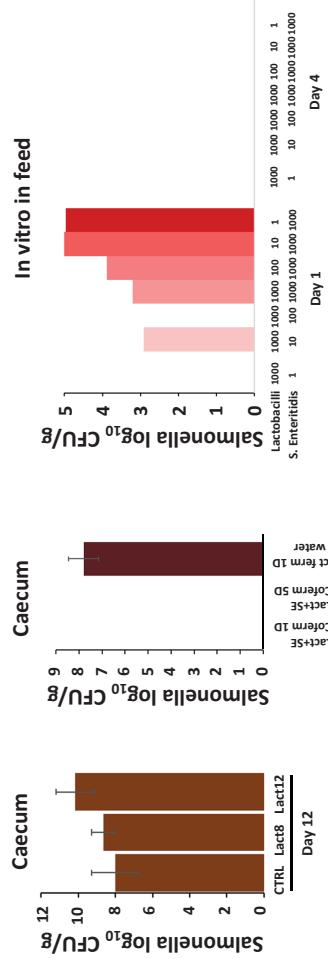


Lactobacilli as probiotics in protection of chickens against *Salmonella*

Newly hatched chicks, a mixture of 4 Lactobacilli via drinking water during the first week of life

Salmonella challenge on day 8 of life

Salmonella counts 4 days later, i.e. on day 12 of life



Copyright:

Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, v. v. i. Brno
Hudcova 296/70, 621 00

Tel.: +420 773 756 631
E-mail: vri@vri.cz

www.vri.cz