

Divoká a domácí prasata jako zdroj probiotických kultur pro selata po odstavu

Mgr. Magdaléna Crhánová, Ph.D.



VU VeL



Hrozba

- Plošné užívání antibiotik - šíření **rezistence bakterií** k antibiotikům
- V EU využití antibiotik jako růstových stimulátorů u hospodářských zvířat zakázáno od roku 2006
- Používání zinku – ukládání v půdě, zvyšování podílu **rezistentních bakterií**
- V EU je zakázáno používat oxid zinečnatý v terapeutických dávkách jako krmné aditivum od června 2022



Náhrada antibiotik

- Inhibice růstu patogenních bakterií
- Nesmí být toxické
- Neměly by zatěžovat životní prostředí
- Bez vedlejších účinků
- Nesmí způsobovat rezistence
- Musí být snadno metabolizovatelné
- Měly by být pro zvířata chutné
- Zvyšování odolnosti zvířat k nemocem
- Zlepšení konverze krmiva
- Neměly by negativně ovlivňovat normální střevní mikroflóru
- Stabilní v krmivu i trávicím traktu zvířat
- Technologická zpracovatelnost
- Nízká cena



Možnosti:

- imunomodulátory – stimulace nebo potlačení imunitní odpovědi organismu (vakcíny)
- bakteriofágy
- antimikrobiální peptidy
- rostlinné extrakty, enzymy, organické kyseliny
- **prebiotika, probiotika, synbiotika**

Probiotika

- **Živé mikroorganismy (kvasinky, houby, bakterie), které pokud jsou podávány v dostatečném množství, příznivě ovlivňují zdraví svého hostitele (FAO, WHO, ISAPP)**
- Mající příznivý efekt na organismus
- Nepatogenní a netoxické
- Schopné přežívat průchod trávicím traktem
- Schopné přilnout ke sliznicím střeva a kolonizovat ho
- Vliv na složení střevního mikrobiomu
- Stimulují imunitní systém hostitelského organismu
- Zvyšují rezistenci organismu k patogenním agens
- Snižují vylučování patogenů a klinické příznaky
- Zlepšují zdravotní stav zvířat
- Zlepšují konverzi krmiva



Food and Agriculture
Organization of the
United Nations



Projekt NAZV MZe



- 2019-2023
- **Divoká a domácí prasata** jako zdroj **probiotických kultur** a vliv technologických postupů přípravy a skladby **synbiotického krmiva** na jeho efektivitu a funkčnost

- Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno



- Výzkumný ústav potravinářský, Praha

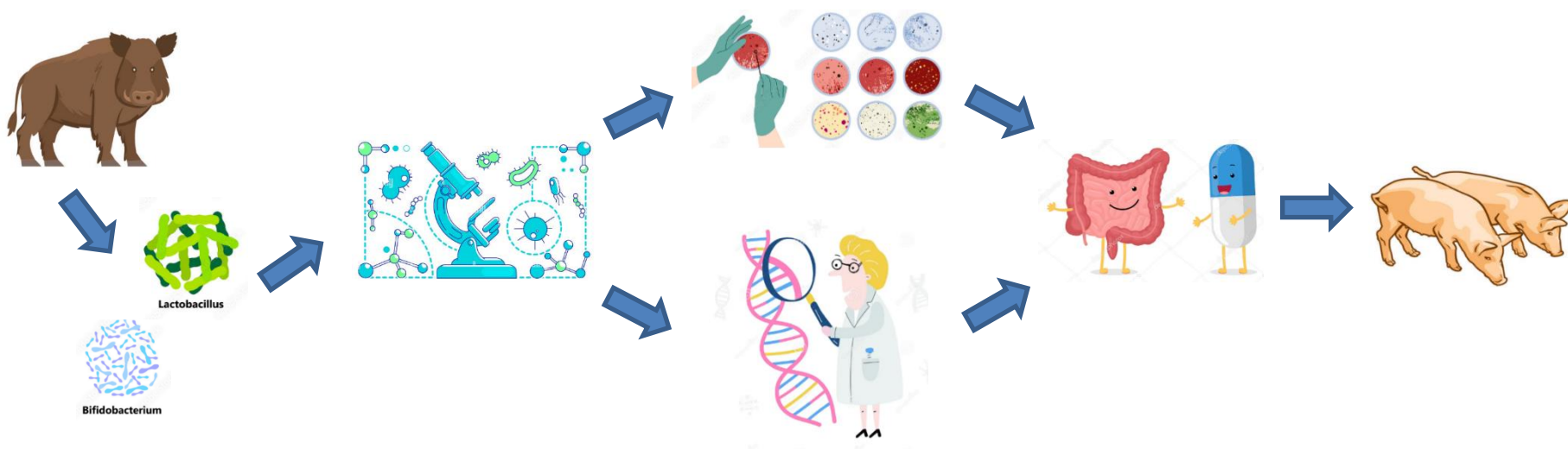


- Mikrop, Čebín



Cíle projektu

- Izolovat bakterie mléčného kvašení (BMK) z trávicího traktu divokých a domácích prasat
- Charakterizovat vhodné kandidáty s potenciálně probiotickými vlastnostmi
- Vytvořit synbiotickou směs (krmivo + probiotika) – testování na selatech po odstavu



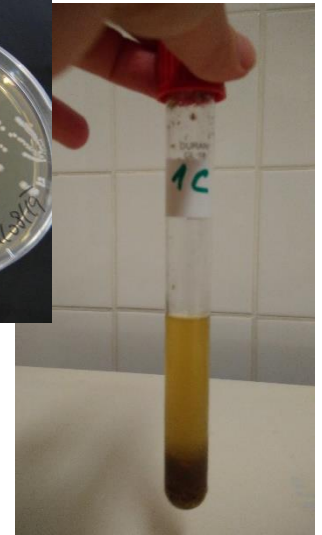
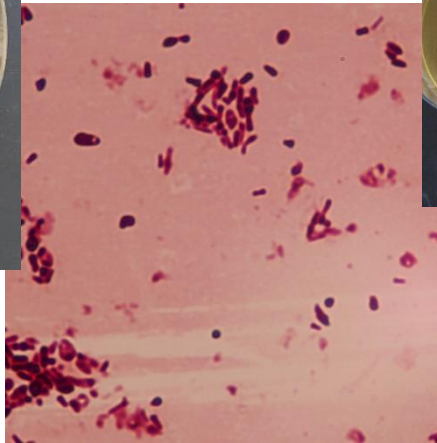
Odběr vzorků

- obsah tenkého a tlustého střeva divokých a domácích prasat
- divoká prasata – naháňky, soukromé obory, volná příroda
- domácí prasata - jatky, vybrané farmy
- především mladí jedinci, obojího pohlaví



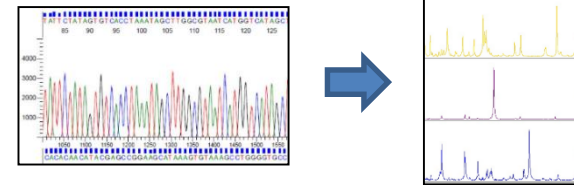
Kultivace

- transport do laboratoře
- selektivní kultivace (TPY agar, Wilkins-Chalgren agar, Rogosa agar)
- anaerobní či mikroaerofilní podmínky, 37°C
- čistota izolátů kontrolována mikroskopií



Identifikace izolátů

- Nyní více než 1200 izolátů
- Identifikace - sekvenace genu pro 16S rRNA
- Poté MALDI-TOF/MS



- Nejčastěji identifikovány: *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus mucosae*, *Lactobacillus amylovorus*
- Výběr izolátů :
 - co nejvyšší variabilita kmenů
 - co největší počet lokalit
 - z různých dárců
- Vybráno přes 100 izolátů, které byly dále charakterizovány

Charakterizace vybraných izolátů I.

- **Kultivační vlastnosti** – schopnost růstu v tekutých médiích
- **Biochemické vlastnosti** - utilizace substrátů, profil aktivních enzymů (biochemické komerční testy API 50 CH, API ZYM, RAPID ID 32 A)
- **Stanovení minimální inhibiční koncentrace k vybraným antimikrobiálním látkám** - mikrodiluční metoda, ampicilin, streptomycin, tetracyklin, erytromycin, klindamycin, vankomycin, chloramfenikol, kanamycin, gentamicin a ciprofloxacin
- **Stanovení antimikrobiální aktivity** - enterotoxigenní *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* a *Yersinia enterocolitica*



Charakterizace vybraných izolátů II.

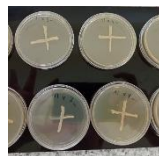
- **Stanovení enzymatické aktivity** - proteáza, amyláza, lipáza



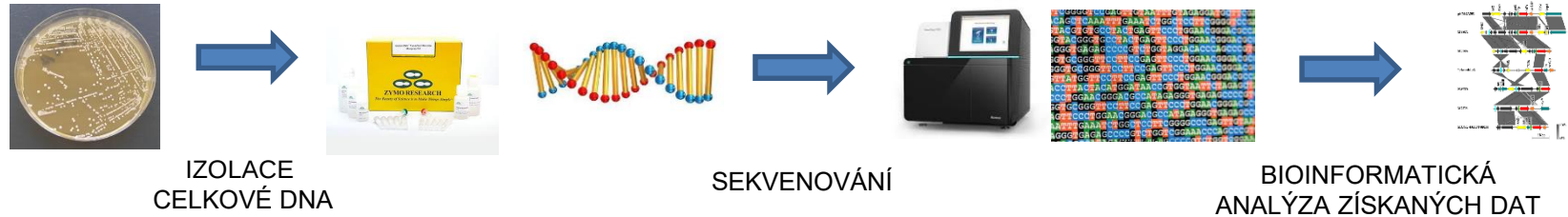
- **Stanovení hemolytické aktivity**



- **Rezistence ke žlučovým solím, nízkému pH a k vysokým teplotám**
- **Stanovení schopnosti adheze na tkáňových kulturách** - buněčné linie Caco-2 a HT29
- **Ko-kultivační experimenty**



Whole genome sequencing



- cílené vyhledávání genů souvisejících s probiotickými vlastnostmi:
 - produkce bakteriocinů – krátké peptidy – antimikrobiální aktivita vůči patogenům (*Salmonella*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium*)
 - adheze na mukózní vrstvu střeva hostitele
 - produkce hydroláz žlučových solí
 - produkce glykosidové hydroláz - rozklad polysacharidů – zvýšení stravitelnosti krmiv
 - nepřítomnost genů kódujících rezistence vůči antibiotikům

Finální výběr

- přítomnost (počet) „probiotických“ genů v genomu
- schopnost vysokých nárůstů biomasy
- odolnost vůči zamražení při -80°C
- druhová rozmanitost izolátů
- specifické vlastnosti pro daný kmen
- typické vlastnosti daného druhu
- tak, aby se vlastnosti jednotlivých izolátů vhodně doplňovaly



Top 6

Označení kmene	Identifikace	Probiotická kompozice	
M477A	<i>Lactobacillus amylovorus</i>	1	3
M494A	<i>Lactobacillus salivarius</i>		
M587A	<i>Lactobacillus paracasei</i>		
M65A	<i>Lactobacillus mucosae</i>	2	
M624A	<i>Lactobacillus amylovorus</i>		
M51A	<i>Pseudoscardovia radai</i>		



VU VeL

Neinfekční pokus na selatech

- 60 selat – 5 skupin po 12 kusech, 28denní, po odstavu
- 42 dní – trvání pokusu

- Probiotika:

- první 3 dny perorálně, pak přimíchány v krmivu
- podávány každý den po dobu trvání pokusu
- 10^9 - 10^{10} CFU/ml

- Krmivo:

- Pig Startér Premium x Pig Startér Super (prvních 14 dnů)
- ČOS (dalších 14 dnů)
- A1 (posledních 14 dnů)

- Sledováno:

- zdravotní stav
- skóre trusu
- spotřeba krmiva (konverze)
- tělesná teplota
- hmotnost
- odběr trusu – složení mikrobiomu

} denně

} 1x týdně

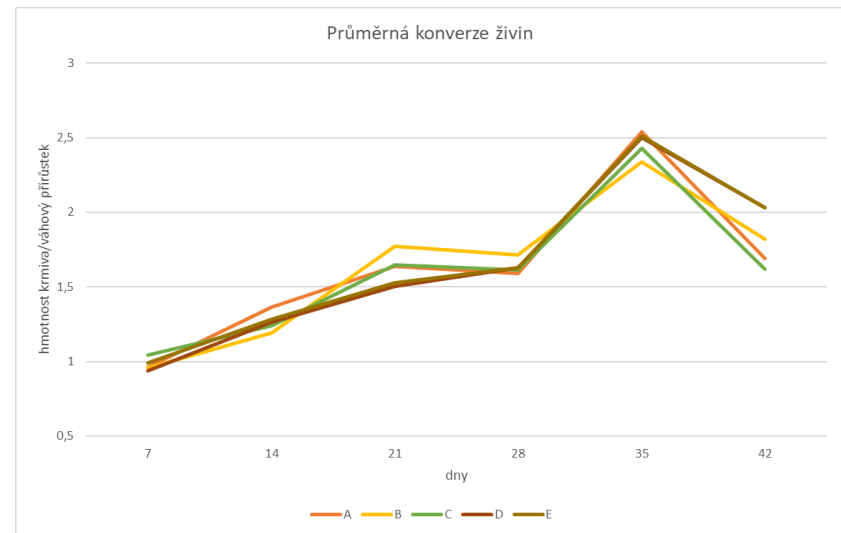
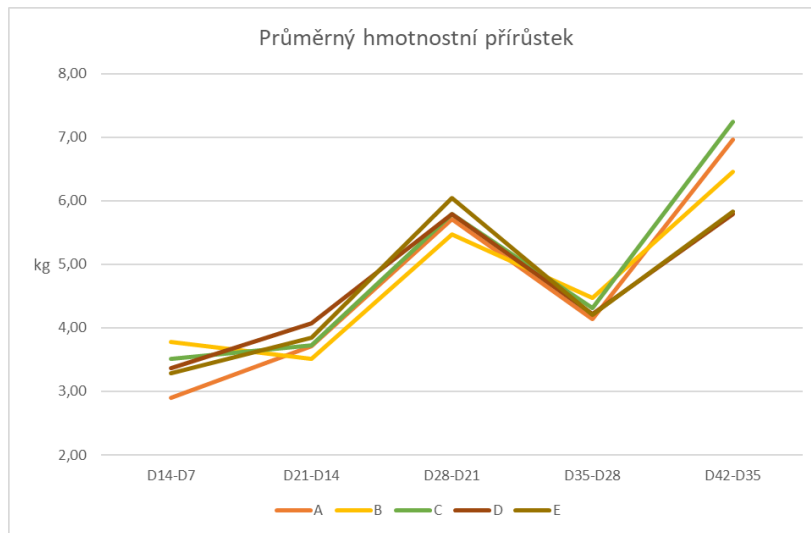
skupina	probiotická kompozice č.	Pig Starter
A	1 (3 kmeny)	Premium
B	2 (3 kmeny)	Premium
C	3 (6 kmenů)	Premium
D	-	Premium
E	-	Super



Výsledky neinfekčního pokusu

skupina	probiotická kompozice č.	Pig Starter
A	1 (3 kmeny)	Premium
B	2 (3 kmeny)	Premium
C	3 (6 kmenů)	Premium
D	-	Premium
E	-	Super

**Probiotická kompozice č. 3
– 6 kmenů**

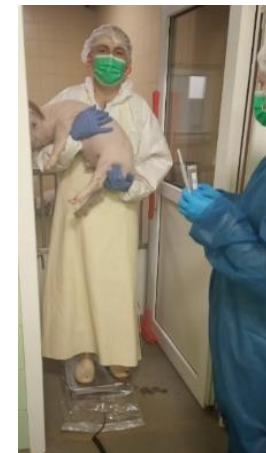


Infekční pokus

- 40 selat – 4 skupiny po 10 kusech, 28denní, po odstavu
- 42 dní – trvání pokusu
- Probiotika (6 kmenů):
 - první 3 dny perorálně, pak přimíchány v krmivu
 - podávány každý den po dobu trvání pokusu
 - 10^9 - 10^{10} CFU/ml
- Krmivo:
 - Pig Startér Premium x Pig Startér Super
 - ČOS
 - A1
- Infekce *E. coli*:
 - ETEC, klinický izolát
 - přirozeně nalidixin rezistentní
 - 5. den aplikace probiotik
 - $1,5 \cdot 10^9$ CFU/ml
- Sledováno:
 - zdravotní stav
 - skóre trusu
 - spotřeba krmiva (konverze)
 - tělesná teplota
 - hmotnost
 - odběr trusu – počty vylučované *E.coli*, složení mikrobiomu

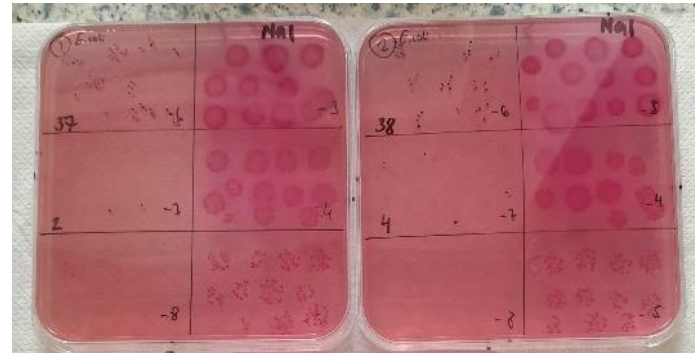
} denně

skupina	probiotická kompozice č.	Pig Starter
F	3 (6 kmenů)	Premium
G	3 (6 kmenů)	Super
H	-	Premium
I	-	Super



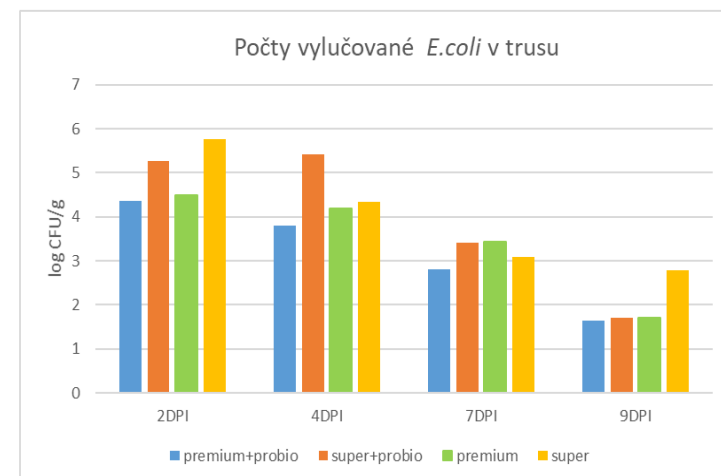
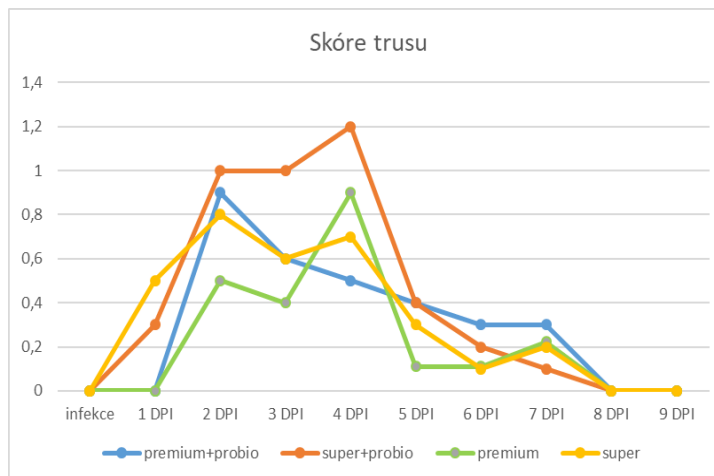
Výsledky infekčního pokusu I.

skupina	probiotická kompozice č.	Pig Starter
F	3 (6 kmenů)	Premium
G	3 (6 kmenů)	Super
H	-	Premium
I	-	Super



McConkey agar s nalidixinem

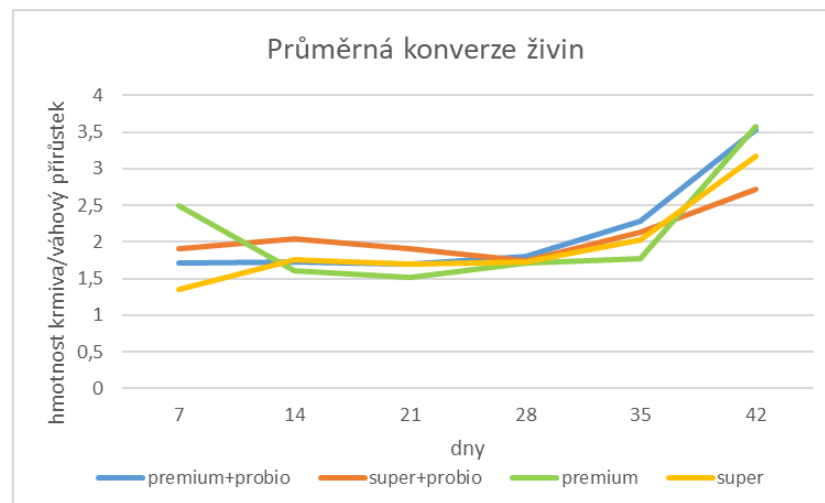
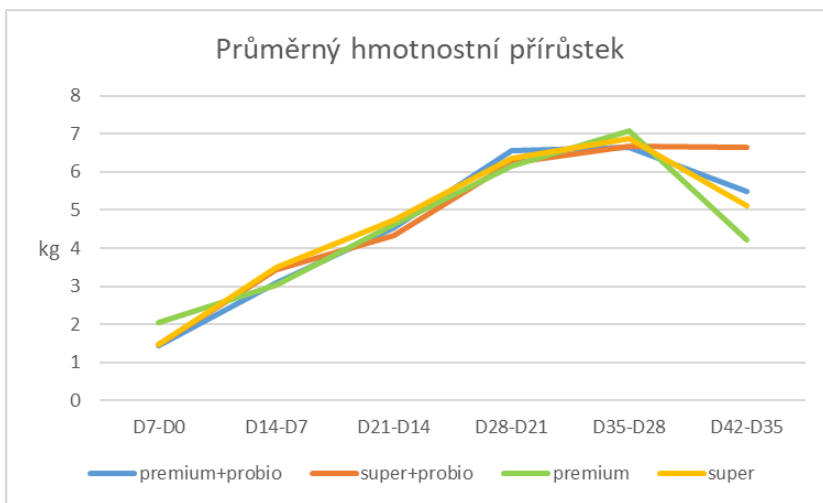
Skóre trusu	Kvalita trusu
0	Normální, pevný trus
1	Pastovité výkaly
2	Přítomnost tekuté složky, ale více pevných částic než tekuté složky
3	Přítomnost více tekuté složky než pevných částic
4	Tekuté, vodnaté výkaly



DPI – den po infekci

Výsledky infekčního pokusu II.

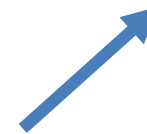
skupina	probiotická kompozice č.	Pig Starter
F	3 (6 kmenů)	Premium
G	3 (6 kmenů)	Super
H	-	Premium
I	-	Super



Synbiotická směs

- Inhibice růstu patogenních bakterií
- Nesmí být toxické
- Neměly by zatěžovat životní prostředí
- Bez vedlejších účinků
- Nesmí způsobovat rezistence
- Musí být snadno metabolizovatelné
- Měly by být pro zvířata chutné
- Zlepšení konverze krmiva ?
- Zvyšování odolnosti zvířat k nemocem ?
- Neměly by negativně ovlivňovat normální střevní mikroflóru
- Stabilní v krmivu i trávicím traktu zvířat
- Technologická zpracovatelnost
- Nízká cena ?

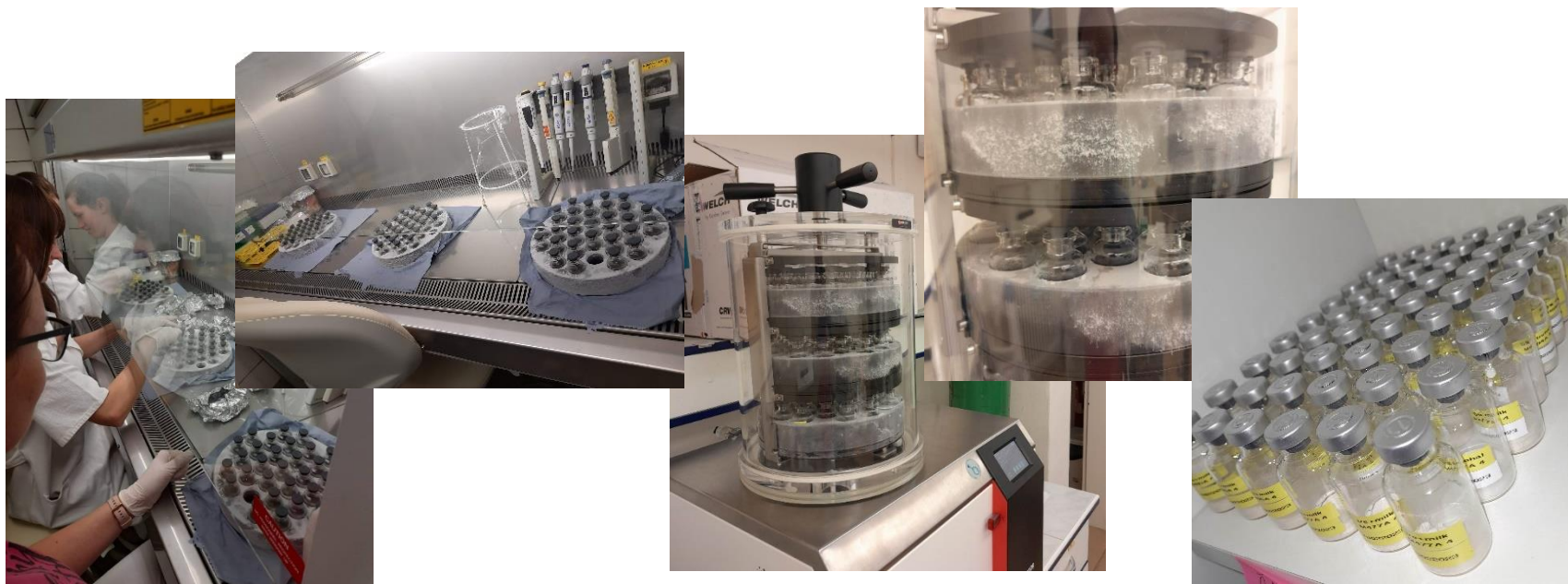
sekvenace V3/V4 genu pro 16S rRNA



} lyofilizace

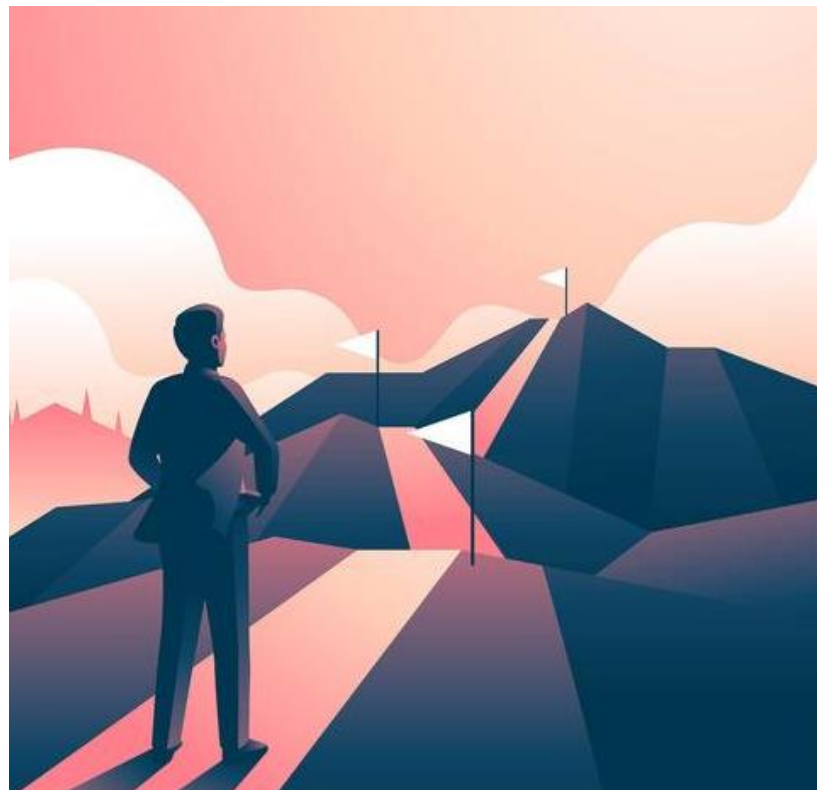
Lyofilizace

- Kmeny zamraženy v -80°C - sledována životnost po dobu až 21 týdnů
- Lyofilizace
 - 10 % skim milk
 - 5 % trehalóza
 - 10 % skim milk + 5 % trehalóza



Co dál?

- Velká databáze
- Stabilita a zpracovatelnost
- Nový projekt
- Jiné izoláty
- Kvasinky



DĚKUJI ZA POZORNOST

magdalena.crhanova@vri.cz
www.vri.cz

