



Żywe kultury mikroorganizmów podane *in ovo* – wybrane aspekty kliniczne

Nieuchronnie nadciągająca konieczność ograniczenia stosowania antybiotyków, bądź nawet pojawiająca się potrzeba wycofania niektórych środków przeciwdrobnoustrojowych, zmusiła naukowców do poszukiwania alternatywnych substancji mogących je zastąpić, oraz wdrażania nowych rozwiązań technologicznych efektywnie poprawiających zdrowotność zwierząt. Szczególnym zainteresowaniem cieszy się powszechnie znana i od wielu lat badana, metoda konkurencyjnego wykluczania (*competitive exclusion*) – dzięki niej powstają nowe ścieżki wykorzystania bakterii probiotycznych wykazujących korzystne działanie na organizm gospodarza. Ich „konkurencyjność” polega na rywalizacji bakterii korzystnych z patogennymi o miejsce do bytowania czy składniki odżywcze. W naturze intensywna kolonizacja bakteriami naturalnego mikrobiomu następuje u ptaków podczas pierwszych kontaktów pisklęcia z nioską oraz środowiskiem gniazda (Mills i wsp., 1999). Współczesny intensywny system produkcji piskląt drobiu zdecydowanie wyklucza powyższą możliwość, a pozwala jedynie na kontakt z drobnoustrojami bytującymi w wylęgarni.

Bardzo liczne doniesienia naukowe ostatnich lat dowodzą o niezwykłym znaczeniu prawidłowego i szybkiego rozwoju mikrobiomu przewodu pokarmowego u drobiu. Właściwy skład bakterii zasiedlających, rozwijający się przewód pokarmowy pisklęcia wpływa znacząco na wyniki produkcyjne i odporność rosnącego organizmu. Kluczowym jest też moment wprowadzenia właściwej mikroflory – optymalnym jest, jak najwcześniejszy, czyli okres okołolęgowy tj. kilka dni przed kluciem i zaraz po

wykluciu (Schneitz i wsp., 1992; Oliveira i wsp., 2013). Kolejnym utrudnieniem w kształtowaniu się korzystnej mikrobioty jest specyfika pracy wylęgarni i transport piskląt na fermę powodujący opóźnienie czasu pobrania pierwszej paszy nawet o 48-72 godziny. Stres z tym związany skutkować może zahamowaniem rozwoju przewodu pokarmowego i opóźnienie zasiedlenia go przez korzystną mikroflorę (Roto i wsp., 2016).

Od wielu lat powszechnie znanym zjawiskiem jest możliwość zainfekowania zarodków drogą pionową, przez drobnoustroje powodujące stan zapalny układu rozrodczego nioski (np. *Salmonella* spp. czy *Mycoplasma* spp.) (Keller i wsp., 1995). Takie zasiedlenie któregośkolwiek elementu tworzącego się jaja (żółtko, białko, skorupa) skutkuje zainfekowaniem rozwijającego się zarodka. Ta wiedza zasugerowała, że skoro przekazywane mogą być bakterie patogenne to również bakterie komensalne czy probiotyczne mogłyby być przekazywane z nioski na potomstwo.

Metoda wprowadzenia *in ovo* różnych biologicznie aktywnych materiałów do środowiska jaja, zminimalizować może krytyczny okres głodówki wylutych piskląt a nawet ułatwiać wprowadzenie optymalnej mikroflory przewodu pokarmowego jeszcze przed ekspozycją młodego organizmu na bakterie patogenne obecne w środowisku zewnętrznym. Wprowadzenie takich korzystnych substancji do jaja wspomaga rozwój tworzącego się przewodu pokarmowego, przyspiesza tworzenie się mikrobiomu jelitowego, skutkując wzmocnieniem odporności jelitowej i minimalizując wpływ opóźnionego dostępu pisklęcia do paszy. W mo-



mencie klucia przewód pokarmowy nie jest ostatecznie wykształcony a szybki dostęp do pokarmu przyspiesza nie tylko jego rozwój, ale także rozwój mięśni, układu odpornościowego czy też wykorzystanie żółtka (Binek i wsp., 2017).

Przekonanie, że wylęzione jednodniowe pisklęta powinny być wolne od bakterii (germ-free), pomimo, że rozpowszechnione, zwłaszcza wśród producentów drobiu, nie jest założeniem zgodnym z aktualnym stanem wiedzy. Pojawiło się wiele danych obalających tę tezę. Mikroorganizmy odnajdywane w woreczku żółtkowym embrionów wielu gatunków ptasich, są również spotykane w organizmach zdrowych, dorosłych ptaków. Potwierdziło to również, że mikrobiom jelitowy nie zaczyna się kształtować w dniu wylęgu, ale wcześniej – już w okresie embrionalnym (Pedroso, 2009; Bohorquez, 2010). Możliwe jest to drogą horyzontalną jak i wertykalną, ponieważ mikroorganizmy obecne w środowisku klucia, równie dobrze jak i te pochodzące z organizmu nioski, mogą penetrować skorupę jaja i osiągać białko, żółtko i kolonizować przewód pokarmowy embrionu.

Już w roku 1973 Nurmi i Rantala zauważyli, że podanie pojedynczego szczepu *Lactobacillus* nie wpłynęło jednoznacznie korzystnie na ochronę przed infekcją *Salmonella* w pierwszym tygodniu życia, natomiast podanie mikrobiomu jelitowego pochodzącego od zdrowego osobnika dorosłego, skutkowało opornością na zakażenie *Salmonellą*. Ta praca badawcza zaowocowała powstaniem koncepcji konkurencyjnego wykluczania („competitive exclusion”) – której głównymi mechanizmami jest: tworzenie niesprzyjającego środowiska do rozwoju bakterii patogennych, konkurencja o miejsce bytowania, tworzenie substancji hamujących rozwój niepożądanych drobnoustrojów i konkurencja o składniki odżywcze. Tak więc podanie, jak najwcześniej kultur bakterii jelitowych skutkuje przyspieszeniem „dojrzewania” mikroflory przewodu pokarmowego i zwiększoną protekcją przed drobnoustrojami inwazyjnymi – stąd wizja jak najszybszego podania mikrobioty jelitowej czy wyosobnionych z niej pojedynczych kultur bakterii.

Iniekcje *in ovo* florą bakteryjną lub poszczególnymi wyselekcjonowanymi z niej gatunkami drobnoustrojów mogą spowodować zasiedlenie przewo-

du pokarmowego jeszcze przed przybyciem piskląt na fermę. Powyższe doniesienia zaowocowały rozpoczęciem szeregu prac badawczych, w celu określenia optymalnego: miejsca podania, czasu podania, składu (które kultury zastosować?, może tylko prebiotyk?, może synbiotyk?) także odpowiedniej ilości i rozcieńczenia podawanych kultur czy substancji - podanie *in ovo* nie może bowiem wpływać negatywnie na wylęgowość czy powodować zamieranie zarodków. Jednym z ciekawszych opracowań w tym zakresie jest praca de Oliveira i wsp. (2014), na temat podania (po 17 dniach i 12 godzinach inkubacji) *in ovo* embrionom kurczym bakterii probiotycznych i ocena tego zabiegu na wrażliwość piskląt na eksperymentalne zakażenie salmonellą. Badaniu temu poddano siedem komercyjnie dostępnych na rynku probiotyków, spośród których wytypowano tylko dwa możliwe do podania drogą *in ovo*. Kryterium takiego wyboru był brak wpływu na wylęgowość i tu optymalnymi okazały się preparaty zawierające *Enterococcus faecium* (E.f.) i *Bacillus subtilis* (B.s.). Jest ważne, że oba te szczepy bakterii odnajdywane są jako część fizjologicznej, zdrowej mikrobioty kurcząt. W celu wszechstronnej oceny ich działania ochronnego autorzy utworzyli 6 grup badawczych, kontrolną negatywną (bez zabiegu), kontrolną dodatnią (pisklątom poddawano antybiotyk apralan w paszy) i 4 grupy doświadczalne (oznaczone, jako grupa 3, 4, 5, 6,) otrzymujące dany probiotyk w paszy i dodatkowo te dwa produkty probiotyczne zaordynowane zostały *in ovo* zarodkom, z których wylęziono ptaki przydzielone do grup 4 (B.s.) i 6 (E.f.). Wszystkie grupy zostały zakażone doświadczalnie *Salmonellą enteritidis* w czwartej dobie życia. Oceniano wpływ podawania tych probiotyków na parametry produkcyjne i zdrowotność ptaków podczas 17 dniowego okresu odchowu. Ogólny wniosek jaki wyciągnęli cytowani autorzy z przeprowadzanych badań jest taki, że wydajność produkcyjna (dziennie przyrosty, spożycie paszy, FCR, masa ciała i EWW) wszystkich grup kurcząt, które otrzymały probiotyk, niezależnie od rodzaju bakterii (*Enterococcus faecium* lub *Bacillus subtilis*) lub metody podania (w paszy i/lub *in ovo*) była liczbowo lepsza od kontroli negatywnej zakażonej *Salmonella Enteritidis* dla wszystkich ocenianych



parametrów. Stwierdzono między innymi pozytywny wpływ podawania testowanych probiotyków *in ovo* – objawiający się dwukrotnie większą liczbą bakterii w drugiej dobie po inokulacji (w żołądku embrionu) oraz w dniu klucia (jelita ślepe). Obydwie bakterie zostały odnalezione w żołądkach embrionów, jednak *B. subtilis* w większej ilości. Badania potwierdziły mniejsze siewstwo *S. enteritidis* u ptaków po podaniu *Bacillus subtilis in ovo* i/lub w paszy. Podanie *E. faecium in ovo* i po wylęgu także powodowało zmniejszenie siewstwa bakterii. Wcześniejsze podanie tego probiotyku *in ovo*, skutkowało większą liczbą bakterii w jelitach ślepych i zmniejszoną obecnością pałeczek *Salmonella* w wymazach z kloaki w 17 dniu życia ptaków. Autorzy wiążą to z konkurencyjnym wykluczeniem, jednak wyniki produkcyjne w tej grupie były niższe niż w grupie otrzymującej *B. subtilis*.

Autorzy podkreślają, że niezależnie od rodzaju badanego probiotyku ich zastosowanie w paszy po wylęgu jest także efektywne, co potwierdza szeroko praktyka drobiarska.

Podanie *in ovo* połączenia probiotyku z prebiotykiem jest również możliwe i procentować może przyspieszonym zasiedlaniem przewodu pokarmowego korzystnymi bakteriami. W tym obszarze badacze polscy odnotowali spore osiągnięcia, dotyczy to zwłaszcza pioniera badań w tym zakresie Profesora Marka Bednarczyka i Jego Zespołu z UPT w Bydgoszczy. Z tej grupy badawczej pochodzi ciekawa publikacja Dunisławskiej i wsp. (2017), przedstawiająca wpływ podania synbiotyku *in ovo* na odpowiedź układu odpornościowego gospodarza. Praca ta opisuje, jak pojedyncza iniekcja prebiotyku czy synbiotyku *in ovo* wpływa na rozwój embrionalny oraz jak moduluje odpowiedź układu odpornościowego podczas całego życia gospodarza. „Zaprojektowane” przez autorów do podania zarodkom synbiotyki (*Lactobacillus salivarius* z galaktooligosacharydami GOS – oznaczony jako S1; *Lactobacillus plantarum* z oligosacharydami z rodziny rafinoz RFO- oznaczony jako S2) inokulowano *in ovo* w 12 dobie inkubacji a zastosowana technika iniekcji i dobór synbiotyków nie wpłynęły znacząco na wylęgowość w porównaniu z grupą kontrolną. Masa urodzeniowa piskląt była nieznacznie większa w pierwszej grupie (otrzymującej

synbiotyku S1), by następnie nie wykazywać różnic między grupami podczas całego cyklu odchowu. Tymczasem śmiertelność była niższa (S1-0,83% w grupie S1 oraz 1,17% u ptaków, które otrzymały S2) w grupach, którym podano synbiotyki niż w grupie kontrolnej, gdzie wynosiła 1,83%. Podanie *in ovo* *Lactobacillus salivarius* z GOS wywołało wyraźne zwiększenie ekspresji genów interleukin IL6, IL18, IL1 β , IFN γ i IFN β w śledzionie, natomiast w grupie z wykorzystaniem *L. plantarum* i RFO (S2) nie odnotowano wzmożonej ekspresji genów powiązanych z odpornością. W migdałkach jelit ślepych pod wpływem *L. salivarius* + GOS zanotowano znaczne wyhamowanie ekspresji genów IL12, IL8, IL1 β w 42 dniu życia i IFN β w dniu 14. Podanie *in ovo* *L. plantarum*+RFO nie wpłynęło na zwiększenie regulacji ekspresji genów w migdałkach jelit ślepych. Cytowani badacze (14) wykazali więc, że mikroflora ma pośredni modulujący efekt na układ odpornościowy. Synbiotyku S1 wywołał zwiększoną ekspresję genów w śledzionie, natomiast obniżył ją w migdałkach jelit ślepych. Autorzy wskazują, że taka odmienna tendencja obu narządów związana jest z różnym poziomem ekspozycji obu tkanek w warunkach fizjologicznych na antygeny – na przykład w przeciwieństwie do śledziony, migdałki jelit ślepych mają ciągłą styczność z mikroorganizmami światła jelit. Migdałki jelit ślepych szybciej reagowały na kontakt z bakterią, natomiast splenocyty dłużej przedstawiały efekty regulacji genów. Podanie synbiotyku *in ovo* zapewnia bardzo wczesny kontakt GALT z bakteriami probiotycznymi, skutkując rozwinięciem między innymi mechanizmów tolerancji dla bakterii korzystnych. Powyższe doniesienie naukowe dowodzi, że nie tylko odpowiednie kultury probiotyczne są konieczne do wywołania właściwej odpowiedzi układu immunologicznego, ale także istotny jest trafny dobór substancji prebiotycznej, nie wszystkie one mają bowiem ten sam potencjał stymulujący układ odpornościowy. GOS charakteryzuje się zwiększonym potencjałem immunomodulacyjnym a jego podanie skutkuje zmianą ekspresji genów związanych z GALT.

Bardzo ważne jest stwierdzenie, że podanie synbiotyku *in ovo* zaowocowało korzystnymi zmianami w kształtowaniu składu populacji mikroflory



jelitowej podczas życia gospodarza. By zwiększyć wydajność brojlerów kurzych, gęstość i aktywność mikrobiomu powinna być mniejsza w górnych odcinkach przewodu pokarmowego (j. cienkie), a znacznie zwiększona w odcinkach dolnych – tj. w jelitach ślepych, gdzie zachodzi proces fermentacji. Wykazano, że podanie pierwszego synbiotyku (S1) prowadziło do korzystnego kształtowania się liczby bakterii w poszczególnych odcinkach jelit z istotnym wzrostem liczby mikroorganizmów z podgrupy *Clostridium leptum*, przyjmowanej, jako bardzo pożądany wskaźnik statusu zdrowotnego przewodu pokarmowego. Aktywność tej podgrupy bakterii wiąże się z produkcją krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych w jelitach ślepych i mniejszą konkurencją z gospodarzem o składniki odżywcze w jelicie cienkim. Podobny wpływ zastosowania pierwszego synbiotyku zaobserwowano na bakterie z grupy (klastra) *Eubacterium rectale* będącego też pewnego rodzaju indykatorem zdrowia jelit. Grupa ta jest producentem m.in. maślanów, octanów, mleczanów, jako produktów fermentacji włókna. Pośrednio wpływa więc on na strukturę komórek epitelialnych, głównie w dolnych odcinkach przewodu pokarmowego. Autorzy stwierdzili także, że zastosowanie *Lactobacillus salivarius* z GOS *in ovo*, pozwoliło zmniejszyć liczebność mikroorganizmów podgrupy *Bacteroides-Prevotella* (wśród których znajduje się wiele gatunków patogennych) w jelicie cienkim i jelitach ślepych, natomiast wykorzystanie *Lactobacillus plantarum* z RFO obniżyło występowanie tej grupy tylko w jelitach cienkich.

Osiągnięcie stabilnego mikrobiomu prowadzi do uzyskania homeostazy pomiędzy populacjami drobnoustrojów go tworzących i następnie konkurencyjne wykluczenie patogenów. W związku z tym szczególnie pożądane jest więc jak najszybsze wprowadzenie mikroflory korzystnej. To ona właśnie stymuluje dojrzewanie układu GALT w pierwszych dniach i rzutuje na całe życie gospodarza także podczas wykorzystania i przetworzenia pokarmu. Porównanie przewodów pokarmowych ptaków „germ-free” i „standardowych” ujawniło znaczne różnice. U tych pierwszych był on znacznie lżejszy i o cieńszych ścianach. U ptaków germ-free mikroskopi były krótsze a kryp-

ty płytsze (Płowiec, 2017). Podanie *in ovo* kultur bakterii probiotycznych prowadzi nie tylko do uzyskania lepszego statusu zdrowotnego ale może też wpływać na końcową masę ciała, czy wykorzystanie paszy. Osiągnięcie lepszego statusu zdrowotnego jest równie pożądanym efektem. Mikrobiom dorosłego zdrowego osobnika posiada w swoim składzie różne typy drobnoustrojów: pożyteczne, szkodliwe czy wręcz patogenne – żyjące w niestabilnej równowadze jedne obok drugich. Oddziałując na siebie nawzajem i miejscowo na gospodarza wzmacniają barierę jelitową, stymulują układ odpornościowy i modulują odpowiedź zapalną. Ustalenie więc tej delikatnej równowagi jak najwcześniej, wydaje się nie tylko istotnym ze względu na wynik ekonomiczny ale może przełożyć się na wynik zdrowotny stada. **Idea podania kultur bakterii korzystnych *in ovo* może okazać się kluczowym czynnikiem wpływającym na zdrowie i dobrostan gospodarza.** ■

Literatura dostępna na: www.polskie-drobiarstwo.pl

RB VAC
szczipionki autogeniczne | laboratorium weterynaryjne

RBVAC to laboratorium weterynaryjne założone w 2015 roku. Już w chwili powstania dysponowaliśmy ogromnym doświadczeniem naszego międzynarodowego zespołu ekspertów z SLW Biolab i Ripac Labor.

25 lat	doświadczenie w diagnostyce weterynaryjnej	15 lat	doświadczenie w diagnostyce i produkcji szczipionek autogenicznych	10 lat	kontrola jakości szczipionek weterynaryjnych
--------	--	--------	--	--------	--

- opracowanie i przygotowanie szczipionek autogenicznych
- badania mikrobiologiczne wymazów, martwych zwierząt wraz z określeniem lekowrażliwości
- badania parazytologiczne
- badania anatomopatologiczne
- po uzgodnieniu z lekarzem weterynarii wizyty na fermach w celu doboru odpowiednich próbek do produkcji szczipionek

RB VAC Sp. z o.o.
ul. Jana z Kolna 11C | 65-014 Zielona Góra
tel. +48 68 453 70 17 | www.rbvac.pl