

Received: 12.08.2020
Accepted: 16.02.2021
Published: 07.05.2021

Modelowe badania mikrobiomu świń według koncepcji wspólnego zdrowia „One Health” ludzi i zwierząt

Model research of the pig’s microbiome based on “One Health” concept in the light of the shared human and animal health

Marta Satora¹, Anna Rząsa², Krzysztof Rypuła¹, Katarzyna Płoneczka-Janeczko¹

¹Zakład Chorób Zakaźnych i Administracji Weterynaryjnej, Katedra Epizootologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

²Zakład Immunologii i Prewencji Weterynaryjnej, Katedra Immunologii, Patofizjologii i Prewencji Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

Streszczenie:

Mikrobiom człowieka pod względem liczebności bakterii przewyższa liczbę komórek ludzkiego organizmu. Określany jest jako dodatkowy, „zapomniany narząd” i odgrywa podstawową rolę w utrzymaniu wysokiego statusu zdrowotnego, co jest uwarunkowane zachowaniem pożądanych proporcji i naturalnych relacji między bakteriami a komórkami organizmu gospodarza. Nowe metody diagnostyczne umożliwiają profilowanie nie tylko mikrobiomu człowieka, ale i zwierząt gospodarskich. Coraz szersze zastosowanie w badaniach mikrobiomu ma innowacyjna metoda analityczna, jaką jest sekwencjonowanie nowej generacji NGS (next generation sequencing). Wiele bakterii określa się jako „niehodowalne” lub „niemożliwe do wyhodowania”, metagenomika odegrała istotną rolę w poznaniu tych bakterii, a także przyczyniła się do opracowania nowych pożywek, umożliwiających ich hodowlę. Głównym zastosowaniem NGS w mikrobiologii jest zastąpienie konwencjonalnej charakterystyki patogenów, opartej o ocenę morfologii, właściwości barwienia i cech metabolicznych, ich opisem związanym z genomem. Istnieje kilka platform, tj. „narzędzi diagnostycznych” wykorzystujących zróżnicowane technologie sekwencjonowania DNA m.in. Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), Pacific Biosciences (PacBio) oraz Illumina MiSeq. Badania mikrobiomu trzody chlewnej z wykorzystaniem nowoczesnych technologii sekwencjonowania wydają się więc szczególnie istotne w związku ze zbliżającymi się nieuchronnie zmianami w postępowaniu profilaktycznym i terapeutycznym u zwierząt. Analizy tego typu umożliwiają wnikliwą ocenę wpływu określonych czynników na populację drobnoustrojów jelitowych oraz poznanie, jak „kształtować” skład mikrobiomu w celu poprawy jakości chowu i utrzymania prawidłowego statusu zdrowotnego świń, wpisując się w koncepcję wspólnego zdrowia ludzi i zwierząt.

Słowa kluczowe:

bakterie, genom, mikrobiota, sekwencjonowanie, trzoda chlewna

Summary:

The human microbiome in terms of the number of bacteria exceeds the number of cells in the human body. It is defined as an additional “forgotten organ” and plays a key role in maintaining a high health status, which is conditioned by the maintenance of certain proportions and natural relations between bacteria and cells of the host organism. New diagnostic methods can enable profiling not only the human microbiome, but also livestock. An innovative analytical method, which is next generation sequencing (NGS), is increasingly used in the study of the microbiome. Many bacteria are referred to as “uncultivated” or “non-culturable” and

Keywords:	metagenomics has played an important role in detecting these bacteria and has contributed to the development of new media for their cultivation. The main application of NGS in microbiology is to replace the conventional characterization of pathogens based on the assessment of morphology, staining properties and metabolic traits with their genome related characteristics. There are several platforms, i.e. “diagnostic tools”, that use a variety of DNA sequencing technologies, among others Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), Pacific Biosciences (PacBio) and Illumina MiSeq. In the case of swine microbiome, studies of the microbiome with the use of modern sequencing technologies seem to be particularly interesting in the aspect of the upcoming, inevitable changes in preventive and therapeutic procedures in animals. Analyses of this type integrate with the concept of the shared human and animal health and enable an in-depth assessment of the impact of specific factors on the population of intestinal microbes and learning how to “form” the composition of the microbiome in order to improve the quality of husbandry and to maintain the pig’s proper health status.
GICID DOI: Word count: Tables: Figures: References:	01.3001.0014.8758 10.5604/01.3001.0014.8758 4 945 – – 51

Adres autorki: dr hab. Katarzyna Płoneczka-Janeczko, profesor uczelni, Zakład Chorób Zakaźnych i Administracji Weterynaryjnej, Katedra Epizootiologii z Kliniką Ptaków i Zwierząt Egzotycznych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Plac Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław; e-mail: katarzyna.ploneczka-janeczko@upwr.edu.pl

Wykaz skrótów: **ARG** – gen oporności na antybiotyki, **CNV** – zmienność liczby kopii DNA, **DNA** – kwas deoksyrybonukleinowy, **FMT** – przeszczep mikrobioty jelitowej, **NGS** – sekwencjonowanie nowej generacji, **NSP** – nieskrobiowe polisacharydy, **PCR** – reakcja łańcuchowa polimerazy, **PGM** – Personal Genome Machine, **RNA** – kwas rybonukleinowy, **SAM** – specyficzne środowisko aksjalne, **SMRT** – sekwencjonowanie pojedynczej cząsteczki DNA w czasie rzeczywistym, **UE** – Unia Europejska, **WHO** – World Health Organization, **ZMW** – falowody trybu zerowego.

Mikrobiomem określa się materiał genetyczny ogółu drobnoustrojów, w tym bakterii (mikrobiota), które tworzą zróżnicowaną społeczność mikroorganizmów komensalnych, symbiotycznych i patogennych, bytujących w danej niszy [18, 20]. Kolonizują organizm człowieka i zwierząt, a ich unikalna kompozycja warunkuje wiele aktywności biologicznych danego osobnika [16]. Mikrobiom człowieka pod względem liczebności bakterii przewyższa liczbę komórek ludzkiego organizmu, a dzięki pełnionej funkcji, określany jest często jako dodatkowy, „zapomniany narząd” [1, 33]. Bierze udział w procesach obronnych, metabolicznych, fizjologicznych i troficznych [18, 36]. Uważa się, iż odgrywa także główną rolę w utrzymaniu wysokiego statusu zdrowotnego, co jest uwarunkowane zachowaniem pożądaných proporcji i naturalnych relacji między bakteriami a komórkami organizmu gospodarza. Skład flory bakteryjnej zasiedlającej przewód pokarmowy zależy od spożywanego pokarmu i zawartego w nim błonnika, ale pozostaje też w związku z szeroko pojętymi warunkami środowiskowymi, w tym wszechobecnymi czynnikami stresogennymi. Mikrobiom wydają się kształtować także predyspozycje osobnicze, jak również wiek czy gatunek zwierząt.

Wszystkie te czynniki w różnym stopniu stwarzają optymalne warunki do rozwoju lub redukcji liczebności określonych bakterii; pojawiania się jednych populacji i zanikania innych. Współzawodniczą ze sobą, kolonizując organizm gospodarza i modulując w ten sposób m.in. jego układ odpornościowy. Drobnoustroje korzystają z substancji odżywczych dostarczanych z pokarmem. Przy ich deficycie „konkurują” wręcz w pewien sposób z gospodarzem. Rozkładają niektóre związki, konwertując te nieprzyswajalne w absorbowalne składniki odżywcze (np. krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe SCFA), wpływając przez to na metabolizm gospodarza [6, 11, 29, 35]. W celu ustalenia innych, niezbadanych dotąd zależności i powiązań między mikrobiomem a gospodarzem, wykorzystuje się najnowsze zdobycze metagenomiki (genomika populacyjna drobnoustrojów środowiskowych, która bada cały zbiorczy genom mikrobiota na podstawie DNA pozyskanego bezpośrednio z danego środowiska) [5].

Dostęp do nowych metod diagnostycznych, pozwalających współcześnie profilować nie tylko mikrobiom człowieka, ale i zwierząt gospodarskich, umożliwia ustalenie

zależności, między wpływem czynników zewnętrznych, takich jak pasza, środowisko czy podjęte działania terapeutyczne, a uzyskiwanymi parametrami produkcyjnymi. Ocena mikrobiomu jelitowego świń zyskała w ostatnich latach na znaczeniu, uwzględniając to, że świnię służą nie tylko jako ważne źródło żywności pochodzenia zwierzęcego, ale także jako doskonałe modele biomedyczne dla zdrowia ludzi [24, 34].

Badania te wpisują się również w koncepcję „jedno zdrowie” (One Health), która odnosi się do ochrony zdrowia człowieka, przy współdziałaniu ochrony zdrowia zwierząt [44]. W ujęciu „One Health” zwraca się uwagę m.in. na możliwość transferu zarówno patogennych, jak i niepatogennych składowych mikrobiomu między ludźmi, zwierzętami a środowiskiem. Ograniczenie stosowania antybiotyków u zwierząt służących do produkcji żywności, ma na celu zminimalizowanie występowania bakterii opornych na antybiotyki. Podobnych zależności poszukuje się w populacji ludzi, jednak biorąc pod uwagę niewielką liczbę badań, trudno ocenić implikacje dla zdrowia publicznego. Tym niemniej, dostępne dane wpłynęły na opracowanie przez WHO (World Health Organisation) wytycznych, dotyczących stosowania antybiotyków u zwierząt przeznaczonych do konsumpcji [42]. Wydaje się, że takich wytycznych może być coraz więcej, bo już dawno zauważono zależność między żywieniem i leczeniem zwierząt, a zdrowiem i mikrobiomem człowieka. Dalsze nieuzasadnione stosowanie środków przeciwdrobnoustrojowych u zwierząt zwiększa pulę genów oporności na antybiotyki, a także częstość ich występowania, ponieważ bakterie w większości migrują do środowiska [27]. W hodowli świń stwierdzono np. znaczący związek mikrobiomu jamy nosowej zatrudnionych na fermach pracowników ze środowiskiem fermowym. Zdefiniowano jednocześnie tzw. rdzenny mikrobiom ferm trzody chlewnej, kształtujący mikrobiom dróg oddechowych człowieka. Różnił się on znacząco nie tylko między indywidualnymi obiektami, ale wykazywał też większą bioróżnorodność niż w badanych fermach bydła, czy u osób niemających kontaktu z hodowlą świń [21]. Badania Tan i wsp. [41] również wykazały, iż długotrwała ekspozycja i praca z trzodą chlewną wpływają na kompozycję mikrobiomu jelitowego pracowników, choć nie pociągało to za sobą istotnych zmian w ich metabolomie, wskazując tym samym na dużą plastyczność funkcjonalną przemian metabolicznych. Odpowiedź na pytanie: czy przesunięcia związane z bliskim kontaktem ze środowiskiem fermowym mogą się odbijać na zdrowiu człowieka, wymaga niestety długotrwałego monitorowania mikrobiomu. Badania takie rozwiną się zapewne dopiero w przyszłości. Zrozumienie implikacji związków mikrobiomu ze środowiskiem a zdrowiem ludzi i zwierząt w nim zamieszkujących, stwarza możliwości innowacyjnego i holistycznego podejścia do diagnostyki, leczenia czy podejmowania jakiegokolwiek interwencji. Badania wskazują, iż na skład mikrobiomu ludzi i zwierząt wpływa kilka procesów, a są to: ekspozycja na określone drobnoustroje (np. mikrobiom rodzicielski, populacji, zwierząt czy środowiska), filtracja tej ekspozycji oparta o wybrane cechy drobnoustrojów i żywiciela (np. metabolizm, odporność) oraz skutki konkurencyjnych

lub kooperacyjnych interakcji między drobnoustrojami a fagami występującymi w środowisku gospodarza [43].

Metoda sekwencjonowania nowej generacji NGS (next generation sequencing) wykorzystywana do badań nad mikrobiomem, oparta jest na technice molekularnej, pozwalającej na analizę wybranych regionów genomu, całych eksomów (DNA kodujące), a nawet całych genomów, dzięki czemu możliwe jest oszacowanie składu mikroflory [13]. Obecnie w celu uzyskania referencyjnego katalogu genów mikrobiomu jelitowego świń stosuje się sekwencjonowanie całkowitego metagenomu. Warto podkreślić, że przeprowadzone dotąd badania wykazały, iż referencyjny katalog mikrobiomu jelita świni dzielił więcej niedundantnych genów (niepowielonych, niezmienionych) między człowiekiem a świnią, niż człowiekiem a myszą. Dlatego też świnią jest doskonałym modelem badawczym, podobnym pod względem anatomii, immunologii i fizjologii do ludzi [8].

Wiele bakterii określa się jako „niehodowalne” lub „nie-możliwe do wyhodowania” (uncultivable), ponieważ nie zostały jeszcze poznane lub są znane, ale nie można ich rozmnożyć w warunkach laboratoryjnych. Metagenomika odegrała istotną rolę w ich poznaniu, a także przyczyniła się do opracowania nowych pożywek, umożliwiających ich hodowlę. Klasycznym przykładem jest przypadek *Tropheryma whipplei*, Gram-dodatniej laseczki, której hodowla możliwa jest jedynie w obrębie linii komórkowej fibroblastów ludzkich. Dane genomu tej bakterii wykorzystano do zidentyfikowania jednostkowych niedoborów metabolicznych, umożliwiając wytworzenie specyficznego środowiska aksjalnego (SAM) [7].

Platformy NGS wykonują jednocześnie sekwencjonowanie milionów małych fragmentów DNA. Aby je połączyć, stosuje się analizy bioinformatyczne i mapowanie indywidualnych odczytów do poznanych już genomów referencyjnych. Ogromną dokładność zapewnią wielokrotne sekwencjonowanie każdej z występujących w genomie zasad. Metoda NGS może być wykorzystana do sekwencjonowania całych genomów lub jedynie ich wybranych części, w tym wszystkich 22 000 genów kodujących (cały eksom) lub niewielkiej liczby pojedynczych genów, dzięki czemu jest bardzo użyteczna diagnostycznie [2]. Głównym zastosowaniem NGS w mikrobiologii jest zastąpienie konwencjonalnej charakterystyki patogenów opartej o ocenę morfologii, właściwości barwienia i cech metabolicznych, ich charakterystyką związaną z genomem. Znając genom można precyzyjnie rozpoznać daną bakterię. Można też poszukiwać genetycznych markerów potencjalnej patogenności np. genów odpowiedzialnych za wytwarzanie toksyn. Metoda sekwencjonowania ma jednak ograniczenia, są to m.in. ciągle wysokie koszty badań, a więc i ograniczona liczba prób poddawanych analizie. Należy także wspomnieć o braku możliwości identyfikacji niektórych gatunków tylko na podstawie otrzymanej sekwencji. Wyzwaniem jest również analiza danych sekwencji generowanych na różnych platformach, z różnymi marginesami błędów oraz szczegółowa walidacja odmiennych metod przygotowywania bibliotek.

Liczba badań NGS przeprowadzanych na różnych platformach rośnie. Szczególnie potrzebne są te, które obejmują identyfikację szczepów, ich charakterystykę i typowanie w celu stworzenia referencyjnych baz danych. Zdecydowanie brakuje obecnie standardów jakości sekwencji uzgodnionych na szczeblu międzynarodowym oraz analizy i interpretacji danych kluczowych dla badań klinicznych.

Istnieje kilka platform, tj. „narzędzi diagnostycznych” wykorzystujących zróżnicowane technologie sekwencjonowania DNA. Wśród nich najpowszechniej używanymi są: Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM), Pacific Biosciences (PacBio) oraz Illumina MiSeq. Ion Torrent PGM wykorzystuje technologię półprzewodnikową, która opiera się na mierzeniu zmian pH powstałych wskutek uwalniania jonów wodorowych po włączeniu nukleotydów podczas syntezy. Fragmenty DNA ze specyficznymi sekwencjami adaptacyjnymi są łączone, a następnie klonalnie amplifikowane za pomocą PCR emulsyjnego na powierzchni kulek o średnicy 3 mikronów, znanych jako cząsteczki sferyczne jonów [37]. PacBio przeprowadza proces umożliwiający sekwencjonowanie pojedynczej cząsteczki w czasie rzeczywistym (single molecule real time, SMRT). W tym procesie cząsteczki polimerazy DNA, związane z matrycą DNA, są mocowane do dna studzienek o szerokości 50 nm, zwanych falowodami trybu zerowego (zero-mode waveguides, ZMW). Każda polimeraza może przeprowadzić syntezę drugiej nici DNA w obecności fluorescencyjnie znakowanych nukleotydów γ -fosforanu [37, 38]. Natomiast w Illumina, stosuje się metodę „sekwencjonowania przez syntezę”, wykorzystując fluorescencyjnie znakowane nukleotydy z odwracalnym terminatorem, na klonowo powielonych matrycach DNA, unieruchomionych na powłoce akryloamidowej na powierzchni szklanej komórki przepływowej. Platforma zawiera wiele instrumentów o różnej przepustowości i długości odczytu. Instrumenty MiniSeq i MiSeq mają niską i średnią przepustowość próbek, przeznaczone są dla mniejszych laboratoriów i rynku diagnostyki klinicznej [37]. Znacznie droższe urządzenia NextSeq, HiSeq i NovaSeq zostały zaprojektowane z myślą o dużo większej przepustowości, zmniejszając koszt analizy pojedynczej próbki, wymagają jednak dodatkowej automatyzacji – przygotowania biblioteki [4]. Obecność bakteryjnego DNA w badanych próbach potwierdzana jest metodą real-time PCR. W reakcji stosuje się uniwersalne startery, amplifikujące fragment bakteryjnego genu 16S rRNA [2, 10]. Zgodnie z protokołem Illumina analizę metagenomiczną bakteryjnego genu kodującego 16S rRNA przeprowadza się na bazie hiperzmiennego regionu V3-V4 genu 16S rRNA. Analiza składa się z 3 etapów: automatycznego demultipleksowania próbek, generowania plików fastq, zawierających surowe odczyty oraz klasyfikacji odczytów typu paired-end, w poszczególnych kategoriach taksonomicznych (klasy, rodzina, rodzaj, królestwo, rząd, typ gatunek) [31].

W przypadku trzody chlewnej badania mikrobiomu z wykorzystaniem nowoczesnych technologii sekwencjonowania wydają się szczególnie istotne z powodu zbliżających się nieuchronnych zmian w postępowaniu profilaktycznym i terapeutycznym. 28 stycznia 2022 r. zacznie

obowiązywać Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2019/6 z dnia 11 grudnia 2018 r. w sprawie weterynaryjnych produktów leczniczych, mające na celu bardziej rygorystyczne zwalczanie oporności na środki przeciwdrobnoustrojowe. Wprowadza ono m.in. zakaz metafilaktycznej podaży antybiotyków zwierzętom i też kolejne wyłączenie niektórych chemioterapeutyków z produktów weterynaryjnych. Występowanie biegunek, wolne tempo wzrostu, jak i słabe wykorzystanie paszy powodują straty i pogorszenie efektywności chowu i hodowli. W związku z narastającym problemem antybiooporności, prawidłowa diagnostyka mikrobiologiczna jest niezwykle istotna. Mikroflora jelitowa to „cel” patogenów, ale także obraz odzwierciedlający stan zdrowia i odporność danego osobnika. W żywieniu świń coraz większą uwagę przykładą się do różnych dodatków paszowych działających immunoprotektywnie bądź immunostymulująco w świetle przewodu pokarmowego. Taką grupą dodatków są pro-, pre- i symbiotyki, których korzystne działanie jest szczegółowo opisane [9, 47]. Analiza metagenomowa drobnoustrojów jelitowych u prosiąt, którym podawano bakterie *Lactobacillus plantarum* potwierdziła ich wpływ na zmianę składu drobnoustrojów mikroflory kałowej. Wykazano również większą bioróżnorodność mikroorganizmów oraz słabszą ekspresję genów warunkujących zapalenie jelit, tym samym wpływając na ich prawidłowy rozwój i przeciwdziałając stanom zapalnym. U prosiąt po odsadzeniu, które otrzymywały bakterie *L. plantarum* potwierdzono większą koncentrację immunoglobulin IgG w surowicy krwi [39]. U starszych osobników, już po odsadzeniu, stosuje się enzymy paszowe, takie jak fitaza, amylaza, enzymy degradujące polisacharyd nieskrobiowy (NSP) (np. ksyłanaza, β -glukanaza i β -mannanaza), proteazy i lizozym. Substancje te wpływają m.in. na zmianę składu mikroflory jelitowej lub jej szybsze dojrzewanie [12]. Innymi substancjami zyskującymi zainteresowanie badaczy są fitobiotyki, wśród których znalazły się zioła, takie jak: oregano czy tymianek, a także czosnek [25].

Skład mikroflory (rozpatrując profil osobników zdrowych) nie jest stały i podlega zmianom, zależnym nie tylko od stanu zdrowia, genotypu i fenotypu odpornościowego, wieku, ale także od czynników środowiskowych, takich jak dieta, stosowanie antybiotyków czy czynniki stresowe [40]. Dowiedziono, że mikroorganizmy zasiedlające przewód pokarmowy zmieniają się od urodzenia do osiągnięcia dojrzałości organizmu gospodarza [51]. Kim i wsp. [19] wykazali, iż w badanych próbkach kału prosiąt wraz z wiekiem populacja bakterii zmienia się z przewagi tlenowców na przewagę beztlenowców; zmniejsza się również różnorodność mikrobiologiczna. Technologia NGS umożliwia ocenę wpływu czynników zewnętrznych na kompozycję i różnorodność mikrobiomu jelitowego. Na przykład, badacze postawili hipotezę, że zakwaszanie do paszy przeznaczonej dla świń sprzyja rozwojowi pożądanym bakterii (takich jak *Lactobacilli*) i zmniejszając liczbę drobnoustrojów „szkodliwych” (niektóre *E. coli*), obniżając pH żołądka lub bezpośrednio wpływając na bakterie chorobotwórcze. Jednak badania *in vivo* oparte na metodzie NGS wykazały spadek liczby bakterii *Lactobacilli* [26].

Natomiast Yu i wsp. [49] oceniali wpływ długoterminowego ograniczenia białka w diecie warchlaków na morfologię jelit, enzymy trawienne, hormony jelitowe i mikroflorę okrężnicy. Badanie wykazało znaczący wpływ diety na skład mikroflory jelitowej. Poziom białka paszowego w treści jelita grubego świń nie rzutował na różnorodność mikroflory. Redukcji uległa natomiast liczba bakterii *Streptococcus*, *Lactobacillus* i *Bacteroides*, podczas gdy wzrosła liczba *Prevotella* i *Ruminococcus*. Cytowani autorzy sugerują, że bakterie z rodzaju *Bacteroides* mogą reagować na liczbę spożywanych kalorii oraz że mikroflora jelitowa może potencjalnie zmaksymalizować wchłanianie energii z paszy bogatej w węglowodany.

Część badań dotyczących mikrobiomu, poświęcona jest ustaleniu „bazowego” składu mikroflory jelitowej świń. W doświadczeniu Holmana i wsp. [14] wśród co najmniej 90% próbek pobranych z przewodu pokarmowego, wykryto rodzaj: *Clostridium*, *Blautia*, *Lactobacillus*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, *Roseburia* oraz *Rikenellaceae* (grupa jelita RC9) i *Subdoligranulum*. Inne badania częściowo to potwierdziły - u prosiąt dominował rodzaj *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Subdoligranulum*, *Peptostreptococcaceae*, *Escherichia*, *Lachnospiraceae* oraz *Cyanobacteria* [23]. W badaniu Crespo-Piazuelo i wsp. [8] przewód pokarmowy świń najczęściej zasiedlony był bakteriami z rodzaju *Akkermansia*, *CF231*, *Phascolarctobacterium*, *Prevotella*, *SMB53* i *Streptococcus*. Badania przeprowadzone u ludzi wykazały, iż obecność rodzaju *Prevotella* jest powiązana z dużym spożyciem błonnika złożonego. Równie powszechnie występującym u ludzi rodzajem, wytwarzającym krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe jest *Phascolarctobacterium* [8]. Określenie tzw. *status quo* mikrobiomu jelitowego jest podstawą do dalszych badań, w których ocenie podlegają jego zmiany w wyniku stosowania różnych mieszanek paszowych, jak i leków.

Dalsze kierunki badawcze dotyczą oceny skuteczności przeszczepu mikrobioty jelitowej (FMT, Fecal Microbiota Transplantation), którego celem jest uzyskanie optymalnego składu drobnoustrojów w świetle jelit, a zarazem ograniczenie infekcji bakteryjnych, wirusowych oraz uzyskanie korzystnych wyników hodowlanych [22, 29, 32]. Prowadzone są również wspólne badania mikrobioty jelitowej zwierząt i ludzi pod kątem horyzontalnego transferu mobilnych genów oporności na antybiotyki (ARGs, antibiotic resistance genes) i tzw. *resistome* – jak określa się całość genów oporności na antybiotyki, występujących w populacjach bakterii chorobotwórczych i niechorobotwórczych. Poszukuje się takich genów ARG, które wspólnie pojawiają się u człowieka i wybranych gatunków zwierząt. Wykazano, że do grupy tej należy m.in. gen oporności na aminoglikozydy ant-6 Ia, zidentyfikowany w mikrobiota świń i ludzi [15, 50].

Innym istotnym przykładem zastosowania NGS są badania zmienności liczby kopii DNA (copy number variations, CNVs), tj. różnic w sekwencji genomowej, wynikającej ze zwiększenia liczby lub utraty przez delecję lub duplikację, określonych fragmentów DNA. Zmienność liczby kopii DNA

jest powiązana z występowaniem wielu schorzeń u ludzi i zwierząt [28]. Jiang i wsp. [17] podjęli się przeprowadzenia dogłębnej charakterystyki CNVs świń. Tym samym umożliwili wgląd w zmienność genomu świni oraz mechanizmów CNVs, wykorzystując ten gatunek jako biomedyczny model chorób ludzi.

Badania Bergamaschi i wsp. [3] z wykorzystaniem metody sekwencjonowania, przeprowadzone w warunkach terenowych pozwoliły na ocenę zależności genom-mikrobiom oraz jej wpływ na kształtowanie się mikrobiomu jelitowego i rozwój świń. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, iż czynniki genetyczne wpływają zarówno na wzrost i otluszczenie badanych zwierząt, a także na kształtowanie się mikrobiomu jelitowego świń. Wykazano, że najbardziej powiązane z parametrami wzrostu i otluszczenia są trzy grupy bakterii: *Firmicutes*, *Bacteroidetes* oraz *Fusobacteria*. Na poziomie taksonomicznym rodzaju *Clostridium*, *Prevotella*, *Lactobacillus* i *Eubacterium* wydają się dodatnio powiązane z przyrostami. Powyższe badania dowiodły, iż geny odgrywają główną rolę w kształtowaniu się mikrobiomu jelitowego, jednak jego skład zmienia się pod wpływem wielu czynników. Najbardziej znaczącymi okresami w rozwoju świń, pod względem tych zmian są: laktacja u loch, okres do odsadzenia, okres po odsadzeniu oraz tucź [24]. Według Li i wsp. [24] w składzie mikrobiomu jelitowego świń dominuje rodzaj *Prevotella*, co potwierdzono także w innych pracach. Autorzy zaznaczają jednak, że *Prevotella* i *Megasphaera* występowały najliczniej na wszystkich etapach tucz. *Clostridiaceae* i *Bacteroidetes* występowały obficie po odsadzeniu i na etapie tucz, natomiast w okresie laktacji i przed odsadzeniem wykryto ich niewiele.

Należąca do rodziny *Clostridiaceae* bakteria *Clostridium difficile* występuje u różnych gatunków zwierząt gospodarskich, zwłaszcza u świń. Szczepi izolowane od zwierząt są bardzo podobne w swych właściwościach do szczepów izolowanych od ludzi. Sugeruje to możliwość transmisji między zwierzętami a człowiekiem, jednak nie wykazano, by szczepi odzwierzęce odgrywały wiodącą rolę w przypadku zachorowań u ludzi. Przyczyną zachorowań u ludzi, a także i zwierząt wydaje się endogenne ujawnianie właściwości chorobotwórczych szczepów *C. difficile* w następstwie dodatkowych czynników, takich jak leczenie antybiotykami lub zmiana sposobu żywienia [45]. Wpływ ewentualnych zmian diety na populację drobnoustrojów jelitowych także podlega wnikliwej ocenie w analizach z zastosowaniem NGS. Poznanie możliwości modulacji składu mikrobiomu jest istotne w celu poprawy jakości chowu zwierząt oraz utrzymania ich prawidłowego statusu zdrowotnego. Związane z wiekiem różnice we wpływie komponentów paszowych na skład flory bakteryjnej planuje się wykorzystać nie tylko przy optymalizacji receptur mieszanek paszowych, ale także w celu redukcji transmisji patogenów wśród zwierząt, uwzględniając również aspekt zoonotyczny. Jako przykład można tu wymienić infekcje wywołane przez pałeczki *Salmonella*. W wyniku spożywania zanieczyszczonej nietyfoidalnymi salmonellami żywności pochodzenia zwierzęcego, w tym pochodzących od świń - dochodzi do zatrucia pokarmowych człowieka. Jednocześnie następuje zakażenie populacji ludzkiej anty-

biotykoopornymi szczepami oraz przenoszenie genetycznej informacji determinującej te cechy do bakterii gospodarza (infectious drug resistance), a to obniża skuteczność antybiotykoterapii [30, 46].

Narzędzia, takie jak sekwencjonowanie nowej generacji umożliwiają prowadzenie innowacyjnych badań z powiązanych ze sobą dziedzin mikrobiologii środowiskowej, ludzi i zwierząt. Bioróżnorodność może

być powszechnie stosowaną miarą stabilności mikroflory jelitowej – większa różnorodność oznacza bowiem większą stabilność [48]. Nowoczesna metoda sekwencjonowania umożliwia zatem badania mające na celu nie tylko odkrywanie i poznawanie funkcji mikrobiomu jelitowego w celu poprawy zdrowia i hodowli zwierząt, ale także w świetle popularnej koncepcji wspólnego zdrowia („One Health”) oraz pozyskiwania wysokiej jakości produktów pochodzenia zwierzęcego.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Aluthge N.D., van Sambeek D.M., Carney-Hinkle E.E., Li Y.S., Fernando S.C., Burke T.E.: The pig microbiota and the potential for harnessing the power of the microbiome to improve growth and health. *J. Anim. Sci.*, 2019; 97: 3741–3757
- [2] Behjati S., Tarpey P.S.: What is next generation sequencing? *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.*, 2013; 98: 236–238
- [3] Bergamaschi M., Maltecca C., Schillebeeckx C., McNulty N.P., Schwab C., Shull C., Fix J., Tiezzi F.: Heritability and genome-wide association of swine gut microbiome features with growth and fatness parameters. *Sci. Rep.*, 2020; 10: 10134
- [4] Besser J., Carleton H.A., Gerner-Smidt P., Lindsey R.L., Trees E.: Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2018; 24: 335–341
- [5] Binek M.: Mikrobiom człowieka – zdrowie i choroba. *Post. Mikrobiol.*, 2012; 51: 27–36
- [6] Bischoff S.C.: Gut health: A new objective in medicine? *BMC Med.*, 2011; 9: 24
- [7] Cao Y., Fanning S., Proos S., Jordan K., Srikumar S.: A review on the applications of next generation sequencing technologies as applied to food-related microbiome studies. *Front. Microbiol.*, 2017; 8: 1829
- [8] Crespo-Piazuelo D., Migura-Garcia L., Estellé J., Criado-Mesas L., Revilla M., Castelló A., Muñoz M., García-Casco J.M., Fernández A.I., Ballester M., Folch J.M.: Association between the pig genome and its gut microbiota composition. *Sci. Rep.*, 2019; 9: 8791
- [9] Delia E., Tafaj M., Männner K.: Efficiency of probiotics in farm animals. W: *Probiotic in Animals*, red.: E. Rigobelo. IntechOpen, 2012, 256–267
- [10] Ferris M.J., Muyzer G., Ward D.M.: Denaturing gradient gel electrophoresis profiles of 16S rRNA-defined populations inhabiting a hot spring microbial mat community. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996; 62: 340–346
- [11] Flint H.J., Duncan S.H., Scott K.P., Louis P.: Links between diet, gut microbiota composition and gut metabolism. *Proc. Nutr. Soc.*, 2015; 74: 13–22
- [12] Foo J.L., Ling H., Lee Y.S., Chang M.W.: Microbiome engineering: Current applications and its future. *Biotechnol. J.*, 2017; 12: e1600099
- [13] Guz K., Orzińska A., Michalewska B., Pelc-Kłopotowska M., Brojer E., Łętowska M.: Molecular biology methods for blood cell antigen genotyping in reference laboratories. *J. Transf. Med.*, 2019; 12: 199–205
- [14] Holman D.B., Brunelle B.W., Trachsel J., Allen H.K.: Meta-analysis to define a core microbiota in the swine gut. *mSystems.*, 2017; 2: e00004–17
- [15] Hu Y., Yang X., Li J., Lv N., Liu F., Wu J., Lin I.Y., Wu N., Weimer B.C., Gao G.F., Liu Y., Zhu B.: The bacterial mobile resistome transfer network connecting the animal and human microbiomes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2016; 82: 6672–6681
- [16] Isaacson R., Kim H.B.: The intestinal microbiome of the pig. *Anim. Health. Res. Rev.*, 2012; 13: 100–109
- [17] Jiang J., Wang J., Wang H., Zhang Y., Kang H., Feng X., Wang J., Yin Z., Bao W., Zhang Q., Liu J.F.: Global copy number analyses by next generation sequencing provide insight into pig genome variation. *BMC Genomics*, 2014; 15: 593
- [18] Kil D.Y., Swanson K.S.: Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. *J. Anim. Sci.*, 2011; 89: 1498–1505
- [19] Kim H.B., Borewicz K., White B.A., Singer R.S., Sreevatsan S., Tu Z.J., Isaacson R.E.: Longitudinal investigation of the age-related bacterial diversity in the feces of commercial pigs. *Vet. Microbiol.*, 2011; 153: 124–133
- [20] Kim H.B., Borewicz K., White B.A., Singer R.S., Sreevatsan S., Tu Z.J., Isaacson R.E.: Microbial shifts in the swine distal gut in response to the treatment with antimicrobial growth promoter, tylosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012; 109: 15485–15490
- [21] Kraemer J.G., Ramette A., Aebi S., Oppliger A., Hilty M.: Influence of pig farming on the human nasal microbiota: Key role of air-borne microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 2018; 84: e02470–17
- [22] Lankelma J.M., Nieuwdorp M., de Vos W.M., Wiersinga W.J.: The gut microbiota in internal medicine: Implications for health and disease. *Neth. J. Med.*, 2015; 73: 61–68
- [23] Li K., Xiao Y., Chen J., Chen J., He X., Yang H.: Microbial composition in different gut locations of weaning piglets receiving antibiotics. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, 2017; 30: 78–84
- [24] Li Y., Wang X., Wang X.Q., Wang J., Zhao J.: Life-long dynamics of the swine gut microbiome and their implications in probiotics development and food safety. *Gut Microbes*, 2020; 11: 1824–1832
- [25] Lillehoj H., Liu Y., Calsamiglia S., Fernandez Miyakawa M.E., Chi F., Cravens R.L., Oh S., Gay C.G.: Phytochemicals as antibiotic alternatives to promote growth and enhance host health. *Vet. Res.*, 2018; 49: 76
- [26] Luise D., Correa F., Bosi P., Trevisi P.: A review of the effect of formic acid and its salts on the gastrointestinal microbiota and performance of pigs. *Animals*, 2020; 10: 887
- [27] Marshall B.M., Levy S.B.: Food animals and antimicrobials: Impacts on human health. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011; 24: 718–733
- [28] McCarroll S.A., Altshuler D.M.: Copy-number variation and association studies of human disease. *Nat. Genet.*, 2007; 39: S37–S42
- [29] McCormack U.M., Curião T., Wilkinson T., Metzler-Zebeli B.U., Reyer H., Ryan T., Calderon-Diaz J.A., Crispie F., Cotter P.D., Creevey C.J., Gardiner G.E., Lawlor P.G.: Fecal microbiota transplantation in gestating sows and neonatal offspring alters lifetime intestinal microbiota and growth in offspring. *mSystems*, 2018; 3: e00134–17
- [30] Miller G.Y., Liu X., Mcnamara P.E., Barber D.A.: Influence of *Salmonella* in pigs preharvest and during pork processing on human health costs and risks from pork. *J. Food Prot.*, 2005; 68: 1788–1798

- [31] Mizrahi-Man O., Davenport E.R., Gilad Y.: Taxonomic classification of bacterial 16S rRNA genes using short sequencing reads: Evaluation of effective study designs. *PLoS One*, 2013; 8: e53608
- [32] Niederwerder M.C., Constance L.A., Rowland R.R., Abbas W., Fernando S.C., Potter M.L., Sheahan M.A., Burkey T.E., Hesse R.A., Cino-Ozuna A.G.: Fecal microbiota transplantation is associated with reduced morbidity and mortality in porcine Circovirus associated disease. *Front. Microbiol.*, 2018; 9: 1631
- [33] O'Hara A.M., Shanahan F.: The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.*, 2006; 7: 688–693
- [34] Pliszczyk-Król A., Rząsa A., Gemra M., Król J., Łuczak G., Zyzak A., Zalewski D., Iwaszko-Simonik A., Graczyk S.: Age-related changes of platelet and plasma coagulation parameters in young pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2016; 28: 561–567
- [35] Pluske J.R., Turpin D.L., Kim J.C.: Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig. *Anim. Nutr.*, 2018; 4: 187–196
- [36] Pokrzywnicka P., Gumprecht J.: Intestinal microbiota and its relationship with diabetes and obesity. *Clin. Diabetol.*, 2016; 5: 164–172
- [37] Quail M.A., Smith M., Coupland P., Otto T.D., Harris S.R., Connor T.R., Bertoni A., Swerdlow H.P., Gu Y.: A tale of three next generation sequencing platforms: Comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*, 2012; 13: 341
- [38] Rhoads A., Au K.F.: PacBio sequencing and its applications. *Genom. Proteom. Bioinf.*, 2015; 13: 278–289
- [39] Shin D., Chang S.Y., Bogere P., Won K., Choi J.Y., Choi Y.J., Lee H.K., Hur J., Park B.Y., Kim Y., Heo J.: Beneficial roles of probiotics on the modulation of gut microbiota and immune response in pigs. *PLoS One*, 2019; 14: e0220843
- [40] Sirisinha S.: The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pac. J. Allergy Immunol.*, 2016; 34: 249–264
- [41] Tan S.C., Chong C.W., Yap I.K., Thong K.L., Teh C.S.: Comparative assessment of faecal microbial composition and metabonome of swine, farmers and human control. *Sci. Rep.*, 2020; 10: 8997
- [42] Tang K.L., Caffrey N.P., Nóbrega D.B., Cork S.C., Ronksley P.E., Barkema H.W., Polachek A.J., Ganshorn H., Sharma N., Kellner J.D., Ghali, W.A.: Restricting the use of antibiotics in food-producing animals and its associations with antibiotic resistance in food-producing animals and human beings: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Planet. Health*, 2017; 1: e316–e327
- [43] Trinh P., Zaneveld J.R., Safranek S., Rabinowitz P.M.: One Health relationships between human, animal and environmental microbiomes: A mini review. *Front. Public Health*, 2018; 6: 235
- [44] Truszczyński M., Pejsak Z.: “Jedno zdrowie” – koncepcja łącząca działalność naukową i praktyczną z zakresu ochrony zdrowia i zwierząt. *Zycie Wet.*, 2015; 90: 280–283
- [45] Truszczyński M., Pejsak Z.: Chorobotwórczość *Clostridium difficile* u człowieka i zwierząt w ocenie ewentualnych wzajemnych powiązań. *Med. Weter.*, 2012; 68: 451–455
- [46] Truszczyński M., Pejsak Z.: Rezerwuar *Salmonella Typhimurium* u świń i jego znaczenie w wywoływaniu zatruc pokarmowych ludzi. *Med Weter.*, 2009; 65: 439–443
- [47] Turner J.L., Dritz S.S., Minton J.E.: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. *Profes. Anim. Scien.*, 2001; 17: 217–226
- [48] Vandeputte D., Falony G., Vieira-Silva S., Tito R.Y., Joossens M., Raes J.: Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut*, 2016; 65: 57–62
- [49] Yu D., Zhu W., Hang S.: Effects of long-term dietary protein restriction on intestinal morphology, digestive enzymes, gut hormones, and colonic microbiota in pigs. *Animals*, 2019; 9: 180
- [50] Zeineldin M., Aldridge B., Lowe J.: Antimicrobial effects on swine gastrointestinal microbiota and their accompanying antibiotic resistance. *Front. Microbiol.*, 2019; 10: 1035
- [51] Zhao W., Wang Y., Liu S., Huang J., Zhai Z., He C., Ding J., Wang J., Wang H., Fan W., Zhao J., He M.: The dynamic distribution of porcine microbiota across different ages and gastrointestinal tract segments. *PLoS One*, 2015; 10: e0117441

 Autorzy deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.