

PROBIOTIKÁ A BAKTERIOCÍNY – NOVÉ MOŽNOSTI PREVENCIE KOKCIDIÓZ U KRÁLIKOV

Simonová, M., Lauková, A., Vasíková, Z.* , Chrastinová, L. **

Ústav fyziologie hospodárskych zvierat, SAV, Šoltésovej 4-6, 040 01 Košice

* Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice

** Slovenské centrum poľnohospodárskeho výskumu, Ústav malých hospodárskych zvierat, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovenská republika

Kokcidióza je najčastejším, najrozšírenejším a ekonomicky najzávažnejším ochorením parazitárneho pôvodu u chove králikov. Pôvodcom tohto ochorenia je parazit z triedy *Coccidia*, čeľade *Eimeriidae*; sú to oocysty oválne alebo vajcovité obalené dvojvrstvovou membránou, ktorá podporuje ich odolnosť a umožní prežívanie vo vonkajšom prostredí aj niekoľko mesiacov až rokov. Vývoj kokcidií je zložitý, má externú fázu – sporogóniu (vo vonkajšom prostredí) a internú fázu so striedením nepohlavného - schizogónia (merogónia) a pohlavného rozmnzožovania - gametogónia (v organizme hostiteľa). Oocysty sú vylúčené trusom nakazeného zvieraťa do

vonkajšieho prostredia, kde za vhodných podmienok (teplota od 5 °C, vlhkosť prostredia min. 70 % a prítomnosť kyslíka) prebehne sporogónia, pričom vznikajú infekčné oocysty. Dĺžka externej fázy u jednotlivých druhov môže byť rôzna a závisí najmä od teploty prostredia; u *Eimeria stiedae* trvá 3 dni pri 26 °C, u *E. perforans* len 1 deň (Süvegová, 2004). Zvieratá sa nakazia z vonkajšieho prostredia alimentárne (znečistené krmivo, voda) alebo olizovaním srsti či klietok infekčnými oocystami, ktoré sa v čreve excystujú a za vhodných podmienok ako sú teplota (37–40 °C), CO₂, pH (7,5–8,5), prítomnosť trypsínu a žlče a mechanické rozbitie steny

oocyst, uvoľnia sa sporozoit a dochádza k ich deleniu v bunkách tráviaceho traktu alebo pečene (Letková a kol., 1997). Počet týchto delení je rôzny a druhovo závislý (napr. *E. media* sa delí dvakrát, *E. irresidua* tri- až štyrikrát).

Kokcidié sú prísně špecifické parazity; afinitu majú k určitému druhu zvierat, ako aj k predilekčným miestam v organizme. Nie je možný prenos na iné druhy zvierat ani na človeka. V tráviacom trakte králikov parazituje 10 druhov kokcidií a jeden druh parazituje v pečeni (*E. stiedae*); tento druh sa vyskytuje najmä v drobných chovoch. Jednotlivé druhy črevných kokcidií sa vyznačujú

rôznu patogenitou, čo je dôležité pri diagnostike hnačiek.

E. exigua (celý črevný trakt), *E. vejvodovský* (ileum) a *E. coecicola* (colon) patria medzi apatogénne druhy. *E. perforans* (duodenum, jejunum) je mierne patogénna a spôsobuje mierny pokles prírastkov. Infekcie patogénnymi druhami - *E. irridescentia*, *E. media* (duodenum, jejunum), *E. magna* (ileum) a *E. piroiformis* (colon) sa prejavia hnačkami, poklesom prírastkov a zvýšenou mortalitou najmä pri masívnej infekcii, resp. po pridružení sekundárnej bakteriálnej infekcie. Medzi najpatogénnejšie druhy patria *E. intestinalis* (ileum) a *E. flavescens* (caecum, colon); hnačky a vysoká mortalita sa prejavia už pri nízkej intenzite. Typické klinické príznaky akútnej kokcidiózy sa najčastejšie zaznamenávajú na 4.-6. deň po infekcii a vrcholia na 8.-12. deň; sú to hnačky, tympania, následne strata vody, elektrolytov, strata až 20 % živej hmotnosti. V dôsledku poškodených sliznic čreva sa často pridružuje bakteriálna infekcia, niekedy sprevádzaná aj tvorbou toxínov - perakútne priebehy ochorenia končia letálne. Po prekonaní infekcie vzniká nesterilná bunková imunita a zvieratá ostávajú nositeľom eimerií. Infekcie sa vyskytujú predovšetkým u mladých králikov v období krátkeho po odstave; dospelé jedince súčasne nevykazujú klinické zmeny, ale sú vylučovateľmi oocyst, a tým sú nebezpečné pre chov. Šíreniu infekcie napomáhajú aj zlé zoohygienické podmienky - znečistenie kletok, prašnosť, zvýšená vlhkosť, zle vetranie, ako aj ľudský faktor - prenos na náradí, oblečenie, obuv resp. s novými zvieratami. V súčasnosti sú najrozšrenejšími patogénnymi druhami *E. media* a *E. magna*; infekcie sa vyskytujú najmä pri nedostatočnej prevencii alebo zlých zoohygienických podmienkach (Süvegová, 2004).

Ochorenie v súčasnosti dokážeme tlmiť, avšak jeho eradikácia je takmer nemožná. Hoci používaním antikokcidík - najmä od roku 1980, kedy sa v Európe začal používať prípravok Cycostat® s obsahom robenidínu - sa zaznamenalo značný pokles pomeru morbidity a mortality, subklinické infekcie stále pretrvávali (Cere a kol., 1997). Dospelí na liečbu kokcidiózy sa používajú prípravky s obsahom sulfónamidov a terapeutické dávky antikokcidík (napr. Baycox). Väčší význam má však prevencia kokcidióz vo forme preventívnych dávok antikokcidík (robenidín, salinomycinát sodný, diclazuril) v granulovanom krmive, pričom sa odporúča striedanie týchto látok v chovoch po 1-1,5 roku. Aj napriek dobrým výsledkom preventívnej aplikácie syntetických kokcidiostatík nastáva problém, a to rezistencia kokcidií na antikokcidiká (Coudert, 1989; Peeters a kol., 1987; Peeters, Geeroms, 1992). Keďže úplná eradikácia kokcidiózy v chovoch králikov nie je možná a stále väčší problém znamená aj rozširujúca sa rezistencia na antikokcidiká,

Tab. 1 Výskyt a počty oocyst kokcidií *Eimeria* sp. v truse králikov z fariem – Occurrence and counts of *Eimeria* sp. coccidial oocysts in faeces of rabbits

Farmy	Nález oocyst (OPG)	Farmy	Nález oocyst (OPG)
Beladice	3,2x10 ⁴ ± 2,3x10 ⁴	Partizánske	6,6x10 ³ ± 4,4x10 ³
Biskupovce	2,0x10 ² ± 2,8x10 ²	Prievidza	1,4x10 ⁵ ± 3,4x10 ⁵
Budiš	2,6x10 ³ ± 3,6x10 ²	Rumanová	5,0x10 ² ± 2,2x10 ²
České Budějovice	4,9x10 ² ± 2,6x10 ²	Šalgovce	2,9x10 ³ ± 1,8x10 ³
Dubnica nad Váhom	1,5x10 ² ± 1,0x10 ²	Šoporňa	5,0x10 ¹ ± 0,0
Háj	1,7x10 ¹ ± 2,9x10 ¹	Šurany	2,7x10 ² ± 3,8x10 ¹
Leopoldov	nedetegované	Tlumanová	5,0x10 ¹ ± 0,0
SOPV Nitra	1,1x10 ² ± 1,3x10 ²	Topoľčany	1,3x10 ¹ ± 1,5x10 ¹
Nitrianske Pravno	3,8x10 ² ± 7,6x10 ¹	Trnava	1,0x10 ² ± 5,0x10 ¹

hľadajú sa nové cesty pri riešení tejto problematiky. Navyše, Európska Únia plánuje od roku 2010 ukončiť ich používanie, čím sa potvrdzuje potreba a uplatnenie sa iných alternatív. Uvažuje sa o vývoji vakcín, o aplikácii prírodných látok a o zvyšovaní prirodzejnej imunity zvierat šľachtením (Süvegová, 2004). Naše pracovisko - Laboratórium živočíšnej mikrobiológie na Ústave fyziologie hospodárskych zvierat SAV v Košiciach už dlhodobo rieši problematiku udržania, resp. zlepšenia zdravotnej kondície zvierat cez prevenciu ochorení tráviaceho traktu, a to selekciou, charakterizáciou a aplikáciou nových, bakteriocinogénnych a probiotických izolátov, ich produktov - bakteriocínov a rastlinných extraktov (Lauková a kol., 1993; Lauková a kol., 2004; Stropková a kol., 2004; Lauková a kol., 2006; Marciňáková a kol., 2006; Simonová a kol., 2008; Szabóová a kol., 2008). Tieto substancie majú výhodu nielen v ich antimikrobiálnom a anti-parazitickom pôsobení, ale aj v tom, že počas resp. po ukončení ich aplikácie nezanechávajú reziduá v produktoch živočíšneho pôvodu, na rozdiel od niektorých syntetických prípravkov.

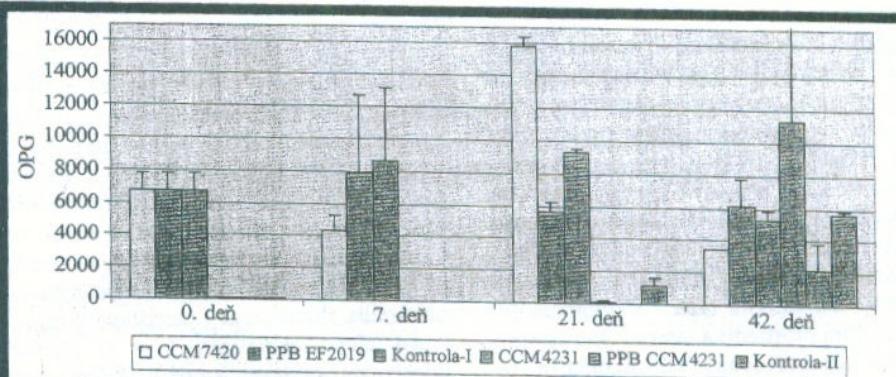
Našim zámerom bolo získať, resp. rozšíriť informácie o výskute, resp. druhovom zastúpení oocyst *Eimeria* sp. v tráviacom trakte králikov z jednotlivých fariem na Slovensku. Ďalším krokom bolo otestovať, resp. overiť účinok našich izolátov - bakteriocinogénnych kmeňov s probiotickými účinkami *Enterococcus faecium* CCM7420 a CCM4231 ako aj nimi produkovaných bakteriocínov na výskyt

a počty oocyst kokcidií u králikov v podmienkach farmového chovu, ako aj sledovať prípadný vplyv sezónnosti (pokusy uskutočnené na jar a na jeseň). Tieto ciele vyplývali z výsledkov testovania antimikrobiálneho (Lauková a kol., 1993; Simonová, Lauková, 2007) a antikokcidiálneho účinku izolátov za *in vitro* podmienok (Stropková a kol., 2007) ako aj po experimentálnej aplikácii kmeňa CCM7420 králikom počas modelového pokusu (ÚFHZ SAV; Simonová a kol., 2008).

MATERIÁL A METODIKY

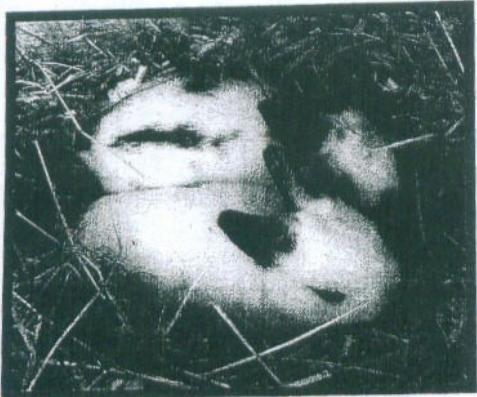
Vzorky trusu králikov pochádzali od 1 drobnochovateľa (Prievidza) a zo 16 farmových chovov lokalizovaných na západnom Slovensku (Beladice, Biskupová, Budiš, Dubnica nad Váhom, Háj, Leopoldov, Nitra, Nitrianske Pravno, Partizánske, Rumanová, Šalgovce, Šoporňa, Šurany, Tlumanová, Topoľčany, Trnava). Na testovanie boli zaradené aj vzorky trusu z farmy v Českých Budějovicach (Česká republika). Vzorky z farmových chovov boli získané prostredníctvom bitúnka pre králikov v Hlohovci. Zvieratá boli rôznej vekovej kategórie (2-4 mesiace), pohlavia a plémena Hy-plus. Zvieratá boli ustajnené v podmienkach extenzívneho, ako aj intenzívneho chovu. V celkovom počte 170 vzoriek trusu odobratých od 620 králikov od drobnochovateľa a z fariem (zmesné vzorky od 2 až 8 zvierat) bola sledovaná prítomnosť oocyst kokcidií.

Oocysty kokcidií boli vyšetrované kvantitatívou metódou podľa Manuálu Veteri-



Obraz. 1 Výskyt *Eimeria* sp. oocyst v truse králikov po aplikácii kmeňov CCM7420 a CCM4231 a ich bakteriocínov PPB EF2019 a PPB CCM4231 – Occurrence of *Eimeria* sp. oocysts in faeces of rabbits after application of strains CCM7420 and CCM4231 as well as their bacteriocins PPB EF2019 and PPB CCM4231

nárných Parazitologických laboratórnych techník (1986) s využitím McMasterových komôrok. Detekcia druhov bola robená podľa Levina (1988). Počty oocyst sú vyjadrené ako priemerná hodnota oocyst vyskytujúcich sa v grame fekálnej vzorky (OPG).



Experimentálna aplikácia bakteriocinogénnych izolátov *E. faecium* CCM7420 (izolát z trusu králika; Simonová, Lauková, 2004; kmeň EF2019 deponovaný v českej zbierke mikroorganizmov v Brne) a *E. faecium* CCM4231 (izolát z bachorového obsahu teľaťa; Lauková a kol., 1993) s probiotickými vlastnosťami a ich čiastočne purifikovaných bakteriocínov PPB EF2019 (Mareková a kol., 2003) a PPB CCM4231 (Lauková a kol., 1997) sa uskutočnila na farme v spolupráci s pracovníkmi Ústavu malých hospodárskych zvierat Slovenského centra poľnohospodárskeho výskumu v Nitre. Do pokusu bolo zaradených 144 samcov králikov plemena Hyplus vo veku 5 týždňov. Králiky boli rozdelené do 6 skupín po 24 zvierat; v jednej klietke boli ustajnené 2 zvieratá. Experiment trval 42 dní. Prvej experimentálnej skupine bol podávaný rifampicín rezistentný variant kmeňa CCM7420 (rif; 1×10^9 KTJ/ml; 500 l/ks/deň) a 2. pokusnej skupine bakteriocínová substancia PPB EF2019 produkovaná kmeňom CCM7420 (aktivita 25600 AU/ml; 50 µl/ks/50 ml) v pitnej vode; králiky v 3. skupine tvorili kontrolné zvieratá, bez prídavku substancií (K1). Inokulácia trvala 21 dní. Tento pokus sa uskutočnil na jeseň. Počas jarného experimentu, králikom v 4. skupine bol aplikovaný kmeň CCM4231 (rif; 1×10^9 KTJ/ml) a v 5. skupine bakteriocín PPB CCM4231 (aktivita 3200 AU/ml), za rovnakých podmienok ako na jeseň; 6. skupina bola kontrolná. Králiky v 5. skupine tvorili kontrolné zvieratá (K2). Zvieratá prijímalia komerčne dostupnú granulovanú kfmnu zmes bez kokcidiostatika pre odchov králikov (ANPROFEED, VKZ Bučany, Slovensko) a prijímalia vodu *ad libitum*.

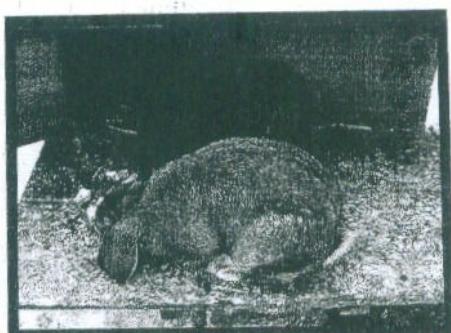
Vzorky sa odoberali v nultý deň, resp. prvý deň, po týždni aplikácie, po 3 týždňoch podávania a na konci experimentu (42. deň, t.j. 3 týždne od nepodávania); oocysty boli vyšetrované podľa vyššie uvedenej metodiky.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Oocysty kokcidií sa bežne vyskytujú v králičích chovoch; infekcie (často subklincné) sa zaznamenávajú najmä počas odstavu. Hoci prítomnosť oocyst kokcidií bola zaznamenaná na každej farme okrem Leopoldova (Tab. 1), ich počty boli pomerne nízke ($1,7 \times 10^1$ – $1,4 \times 10^5$ OPG) a zvieratá nevykazovali príznaky kokcidiózy, čo môže byť vysvetlené aj dôkladnou starostlivosťou zo strany chovateľov, t.j. preventívnu aplikáciou antikokcidií.

Z hľadiska druhového zastúpenia eimérií, na farmách Šoporňa a Tlumanová bol detegovaný druh *E. media*, v Trnave *E. coecicola*. Vo vzorkách z farmy v Nitre boli detegované tri druhy: *E. coecicola* (55 %), *E. intestinalis* (24 %) a *E. magna* (21 %). Spomínané druhy sa bežne vyskytujú v králičom ekosystéme (Percy a kol., 1993; Pakandl a kol., 2001; Renaux a kol., 2001); časte sú infekcie spôsobené naraz aj viacerými druhami (Percy a kol., 1993). Hoci na jednotlivých farmách boli detegované aj patogénne druhy eimérií (*E. magna*, *E. media* a *E. intestinalis*), ich počty boli nízke na vyvolanie infekcií.

Počas *in vivo* experimentu, v pokusných



skupinách bola zaznamenaná výrazná redukcia oocyst kokcidií v truse oproti kontrolným hodnotám, a to najmä na 7. deň pokusu (Obr. 1). Zvýšenie počtu oocyst v skupine CCM7420 na 21. deň experimentu mohlo byť spôsobené ukončením aplikácie kmeňa a následnými zmenami v bakteriálnom zastúpení resp. koncentrácií organických kyselín. Sezónne rozdiely v počtoch oocyst sa tiež ukázali počas prvej polovici experimentu; vo vzorkách skupín z jarného experimentu (CCM4231, PPB CCM4231 a K2) sa detegovali veľmi nízke počty oocyst (0. deň: 65 OPG; 7. deň – CCM4231: 20 OPG, PPB CCM4231: 20 OPG, K2: 0 OPG; 21. deň – CCM4231: 120 OPG, PPB CCM4231: 0 OPG, K2: 1184 OPG). Po skončení podávania aditív došlo k pozvoľnému nárustu v počte oocyst až do konca experimentu. Môžeme ale skonštatovať, že všetky použité aditíva prejavili redukčný efekt na oocysty kokcidií u králikov, pričom najintenzívnejšia redukcia bola v skupinách králikov prijímaniačích enterocíny PPB EF2019 a PPB CCM7420.

Počas jarného experimentu, t.j. v skupine CCM4231 bol na 21. deň zaznamenaný iba

druh *Eimeria magna*; tento druh na 42. deň v danej skupine tvoril iba 4 %, 96 % tvorili *E. media* (60 %) a *E. perforans* (36 %). Tieto dva druhy boli zachytené aj v ostatných skupinách (PPB CCM4231 a K2) v ostatných odberových dňoch.

ZÁVER

Naše výsledky – redukcia oocyst potvrzujú možné využitie bakteriocínov a probiotických mikroorganizmov pri prevencii kokcidií v chovoch králikov. Tieto výsledky sú významné teda nielen z hľadiska zistenia nových vlastností naturálnych aditív, napr. antikokcidiálneho účinku bakteriocínov, ktoré doposiaľ neboli testované, ale predstavujú slubnú náhradu syntetických, doposiaľ používaných kokcidiostatikov.

SUMMARY

SIMONOVÁ, M., LAUKOVÁ, A., VASILKOVÁ, Z., CHRASTINOVÁ, L.: Probiotics and bacteriocins – new ways in rabbits coccidiosis prevention.

Our findings – reduction of oocysts counts confirm the use of bacteriocins and probiotics in the coccidiosis prevention in rabbit breedings. These results are important, because new properties of natural additives were found, e.g. the anticoccidial effect of bacteriocins which have not been described yet. These preparations could present a promising chance to replace synthetic coccidiostats used in rabbit breedings.

POĎAKOVANIE

Táto práca vznikla za podpory vedeckej agentúry VEGA, projekt č. 2/0008/08.

Literatúra u autorov

Lektor: Bomba, A., ŤEM Košice

Našej kolegyni a priateľke MVDr. Andrei Laukovej, PhD., pri príležitosti životného jubilea prajeme všetko najlepšie.

Ing. Ján Andrejkovič
Konatel spoločnosti IPC s.r.o.



IPC s.r.o. Košice
Floriánska 19
040 01 Košice