Трансплантацията на фекален микробиом от диви свине на домашни прасета като алтернатива за подобряване на чревния микробиом и повлияване на инфекциозни заболявания като ASF и PCV-2

Научна информация

Смъртността на прасенцата е основен проблем за промишленото свиневъдство в световен мащаб и доскоро основният метод за подобряване на ефективността на растежа и намаляване на заболяванията в търговската практика е съсредоточен върху употребата на антимикробни средства. Резистентността към антибиотици е глобален проблем и като такъв животновъдните производства търсят алтернативи на антибиотиците за справяне с инфекциите.

Различните подходи, които се разглеждат, включват и поддържане на хомеостазата на чревният микробиом. Стомашно-чревната микробиота участва в безброй процеси, които оказват влияние върху здравето и благосъстоянието на животните. Напоследък интересът към поддържането на здрав микробиом с цел подобряване на здравето на стадата се увеличава както и към методи като трансплантацията на фекален микробиом като а метод за манипулиране и подобряване на стомашно-чревната микрофлора при прасета с цел подобряване на здравето и производителността.

Понастоящем 11–15% от всички живородени прасенца умират преди отбиването в този отрасъл по цял свят. Това представлява сериозен проблем за благосъстоянието и голяма икономическа загуба за промишлеността. Към днешна дата има много изследвания и научни проучвания с цел намаляване на тези загуби, но с различен успех. Настоящите методи за намаляване на смъртността при прасетата, причинени от бактериални заболявания или вирусни инфекциии се свежда до прилагане на антибиотици, като тяхната употреба често е терапевтична и профилактична. Организации като Световната здравна организация, Американският център за контрол и превенция на заболяванията и Европейският център за превенция и контрол на заболяванията определиха антибиотичната резистентност като глобална грижа, тъй като някога често лечимите инфекции сега стават животозастрашаващи. Като такива трябва да бъдат проучени алтернативи на антибиотиците. В чревния тракт се помещават богати съобщества от микроорганизми, които съставляват така наречения чревен микробиом. Тези микроорганизми включват бактерии, гъби, археи, протозои и вируси. Чревният микробиом участва в безброй процеси, някои от които включват поддържане и развитие на имунната система, чревна бариерна функция, метаболизъм на хранителни вещества и предпазване от различни патогени. Докато антибиотиците са ефективни при отстраняването на патогени, те също влияят върху коменсалния микробиом. Ако се поддържа здрав микробиом, необходимостта от терапевтични интервенции като приложение на антибиотици ще бъде намалена и имунната му система ще е подготвена

за инвазивността на патогенните причинители и външните стресови фактори. В тази връзка се разширява интересът към методите за въздействие върху микробиома чрез методи като трансплантация на фекален микробиом или прием на пре- и пробиотици. FMT метода е показал ефикасност при лечението на инфекции с *Clostridium difficile* при хора. FMT включва трансфер на фекална маса от здрав донор в стомашно-чревния тракт на реципиент. Това може да се направи или орално или ректално чрез клизма. Целта е полезните бактерии в донорските изпражнения конкурентно да изключат патогенните причинители в болен реципиент, като по този начин променят микробиома, а в някои случаи, например инфекции с *C. difficile*, лекуват болестта. Този метод може да се използва и за промяна на микробиома на реципиента, за да наподобява тази на донора с цел да се създаде фенотипна промяна.

За първи път FMT е описан от *Ge Hong* през 4-ти век в Китай за лечение на хранителни отравяния и тежка диария. Днес FMT е широко известен със своята ефикасност за лечение на инфекции с *C. difficile* при хора. FMT е показал успеваемост > 90% при пациенти с повтаряща се *C. difficile*, когато употребата на антибиотици е била неуспешна поради образуването на спори. Използването на FMT в други области на човешкото здраве и превенцията на болести става все по-популярно; обаче ефикасността му при лечението на други заболявания при хората към днешна дата не е толкова висока. Въпреки че случаят е такъв, разследването за употребата му при животни (свине) се увеличава.

Последните проучвания, изследващи употребата му в свиневъдството, показаха обещаващи резултати. Няколко изследователски групи демонстрираха, че прилагането на множество орални FMT на прасенца от раждането може да увеличи средния дневен прираст, да намали честотата на диария и да подобри чревната бариера и имунната система.

Важно условие обаче при тази техника е, че трябва да се обърне особено внимание при избора на подходящия донор, тъй като рискът от предаване на нежелани черти е висок.

Друг положителен ефект от FMT е публикуван от *Niederwerder et al.*, който екип установява, че FMT е ефективен превантивен метод срещу свински цирковирусни инфекции, коинфектирани със свински цирковирус тип-2 и вируса, причиняващ свински репродуктивен и респираторен синдром. Прасетата, които са получавали една доза FMT дневно в продължение на седем дни след отбиването от здрави свине-донори, имат значително намаляване на заболеваемостта и смъртността и повишени нива на антитела.

Brunse et al. докладват в своето проучване, че ректалната FMT от 10-дневни прасета донори на недоносени прасенца, родени чрез цезарово сечение, променя метаболизма на въглехидратите от лактат към производство на пропионат, повишавайки pH на дебелото черво. Ректалната FMT също осигурява депа от муцинови клетки и намалява честотата на некротизиращ ентероколит.

Geng et al. демонстрират, че FMT намалява чувствителността към епителни увреждания и модулира метаболизма на триптофан при прасета с възпалително заболяване на червата. FMT при свинете не само променя богатството на микробиома на реципиента, но също има ефект върху метаболизма на реципиента, чревната бариерна функция и имунната система.

Въпреки че FMT е обещаваща перспектива, той не е търговски приложим в сегашната си форма, поради риск за нарушение в биосигурността, затова са необходими стриктни тестове, за да се предотврати и пренасянето на болести или контаминацията с патогени.

Свинете са възприемчиви към доста инфекциозни заболявания, причинявани от различни патологични причинители като например вирусът на африканска чума по свинете. Вирусът на африканската чума по свинете (ASFV) е причинител на опустошителната хеморагична болест (ASF), която засяга както домашните свине, така и дивите. ASFV циркулира субклинично при диви свине, включително брадавичести свине, които са естествен резервоар за ASFV. Заедно с генетичните различия, други фактори могат да участват в различната чувствителност към ASF, наблюдавана сред видовете от семейство *Suidae* като *Sus scrofa* и *Phacochoerus africanus*. Предварителните доказателства, получени от доста изпитвания, достъпни в научната литература потвърждават ефекта, който факторите на околната среда могат да окажат върху инфекцията с ASFV. Поради това домашните свине, отглеждани в специални боксове и халета, със спазени всички изисквания за биосигурност и биобезопасност, свободни от патогени (SPF), са изключително чувствителни към силно атенюираните щамове ASFV, които са неинвазивни за генетично идентични домашни свине, отглеждани в конвенционални стопанства.

Тъй като полезният микробиом играе важна роля в поддържането на чревната хомеостаза, регулирането на имунната система и функционалността на вродените/адаптивните имунни реакции, трансплантацията на фекален микробиом (FMT) при домашни свине, като методология, би могла да повлияе чувствителността и възприемчивостта и към ASFV.

Обстойно проучване на тема: „***Fecal microbiota transplantation from warthog to pig confirms the influence of the gut microbiota on African swine fever susceptibility***“ с авторки колектив: *Jinya Zhang, Fernando Rodríguez, Maria Jesus Navas, Mar Costa-Hurtado, Vanessa Almagro, Laia Bosch-Camós, Elisabeth López, Raul Cuadrado, Francesc Accensi, Sonia Pina-Pedrero, Jorge Martínez & Florencia Correa-Fiz,* ясно показва, че FMT с трансплант от брадавичести свине не е вредно за домашните отбити прасенца, като променя техните микробиоми и че FMT от диви свине на домашни прасета осигурява частична защита срещу атенюирани щамове ASFV. Необходима е обаче бъдеща работа за изясняване на точните защитни механизми, осигурявани от FMT.

Африканската чума по свинете (ASF) е опустошително заболяване при домашните и дивите свине, причинено от вируса на африканската чума по свинете (ASFV). ASF е болест, подлежаща на уведомление пред Световната организация за здравето на животните (OIE) и днес се счита за най-сериозното ограничение и проблем за промишленото свиневъдство. Настоящото разпространение на африканската чума по свинете се разпростира в повече от 50 държави от Африка, Азия, Европа и Океания.

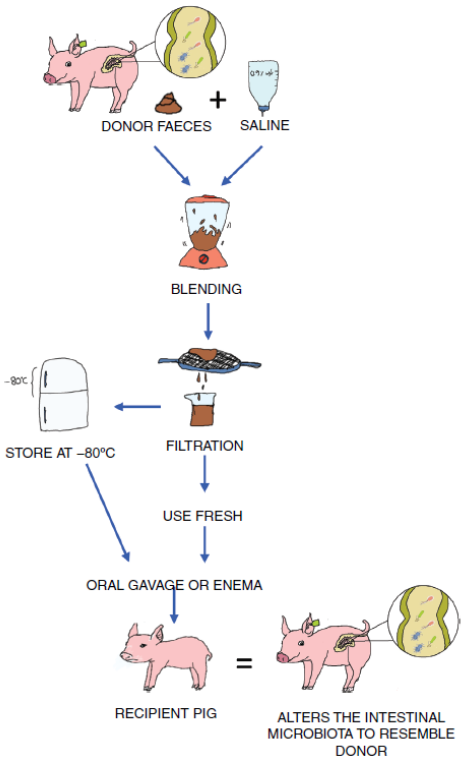
ASFV е голям обвит вирус с размери приблизително 260 до 300 nm в диаметър, с размер на генома между 170 и 193 kbp, кодиращ най-малко 150 различни протеини и е единственият известен ДНК арбовирус. ASF е описан за първи път през 1921 г. като ново заболяване, засягащо домашните свине в Кения.

Преди да бъдат отглеждани домашни свине в Африка, ASFV циркулира посредством силватичен цикъл между меките кърлежи от род *Ornithodoros* и африканските брадавичести свине (*Phacochoerus africanus*). Брадавичестите свине и речната свиня (храстово прасе *Potamochoerus porcus*) се явяват като естествени резервоари ASFV в дивата природа. В зависимост от вирусния изолат домашните свине, заразени с ASFV, могат да развият заболяване, което варира от хронично или субклинично до субакутно и хипер-акутно, което води до до 100 % смъртност при прасета. Механизмите за устойчивост към ASF, показани при брадавичестите свине и речната свиня (храстово прасе), все още не са изяснени напълно, макар да са взети предвид както генетичните така и факторите на околната среда. В научната литература се срещат предварителни експериментални доказателства, описани при местни породи свине в Африка, за по-малко податливи на инфекция с някои генотипове ASFV породи свине. Във връзка с това следва да се отбележи, че прасетата без наличие на специфичен патоген (SPF) са били по-податливи на инфекция с атенюирани щамове на ASFV, отколкото генетично идентичните свине, отглеждани в конвенционални стопанства, което дава възможност да се предположи, че заедно с генетиката, микробиома на брадавичестите свине може да допринесе за устойчивостта към ASF.

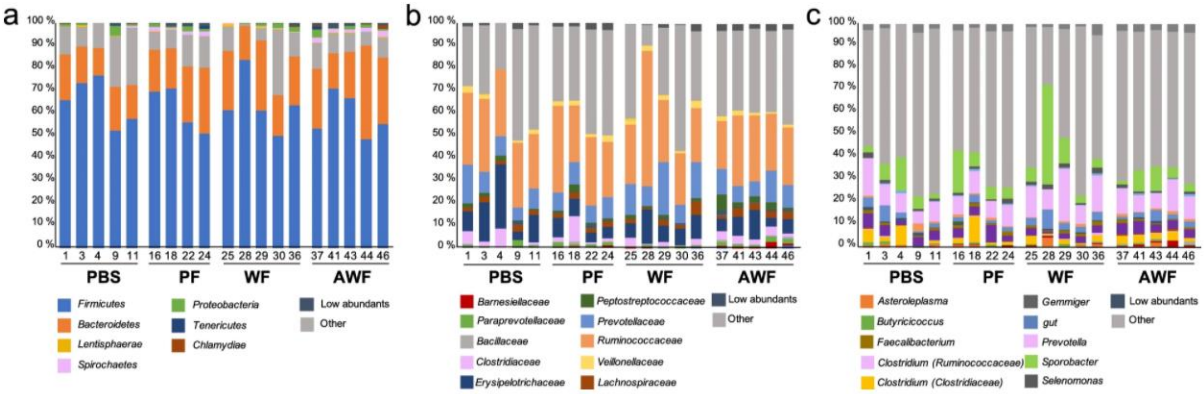
Чревният микробиом повлиява хомеостазата на организма чрез неговото влияние върху вродената имунна система. Наскоро бе разкрит състава на чревната микробиота на посочените по-горе животински видове, т.е. брадавичести свине, както и SPF- и домашни свине, които показват съществени различия в състава на микробиома.

Фекалната микробиомна трансплантация (FMT) по своята същност представлява трансплантация/пренос на донорен микробиом в реципиент, за да се подобри или възстанови чревната хомеостаза, или да се „насели“ стомашно-чревния тракт с потенциално полезни бактерии. Интересът към новия метод FMT за превенция и лечение на чревни разстройства се увеличава все повече и повече в хуманната медицина, например, за контрол на *Clostridium difficile* инфекции или възпалително заболяване на червата. Все повече клинични приложения на FMT са предоставили убедителни доказателства, че модификацията на чревната микробиома е ефективна терапия за заболявания, свързани с чревната дисбиоза. При свинете публикуваните проучвания с FMT са оскъдни, но те дават доказателства за способността на FMT да препрограмира чревната микробиота при свинете, променяйки имунния фенотип на гостоприемника.

Принцип на FMT, схематично представен процеса на трансплантация и снимка на орално проведен FMT посредством орогастрална тръба на 20-дневни прасенца:



В проучване на тема „***Fecal microbiota transplantation from warthog to pig confirms the influence of the gut microbiota on African swine fever susceptibility***“ първо на отбитите прасенца е трансплантирана фекална маса от брадавичеста свиня или домашни свине, и второ, те са заразени с вирулентен или атенюиран щам на ASFV, за да се сравняват техните резултати от протичане на заболяването. Не са наблюдавани разлики след интрамускулно заразяване с E75, вирулентен щам ASFV, независимо от FMT. Обратно, много значимо намаляване на вируса в серума, е забелязано при интраназалното вирусно постъпване, а клиничните признаци са наблюдавани, когато прасета, трансплантирани с фекална маса, са били подложени на интрамускулно заразяване с E75CV1, атенюиран щам ASFV, в сравнение с прасетата, трансплантирани с фекална маса от домашни свине. Проучването предоставя доказателства за защитния потенциал от ASF на трансплантацията с донорски микробиом от брадавичести свине.



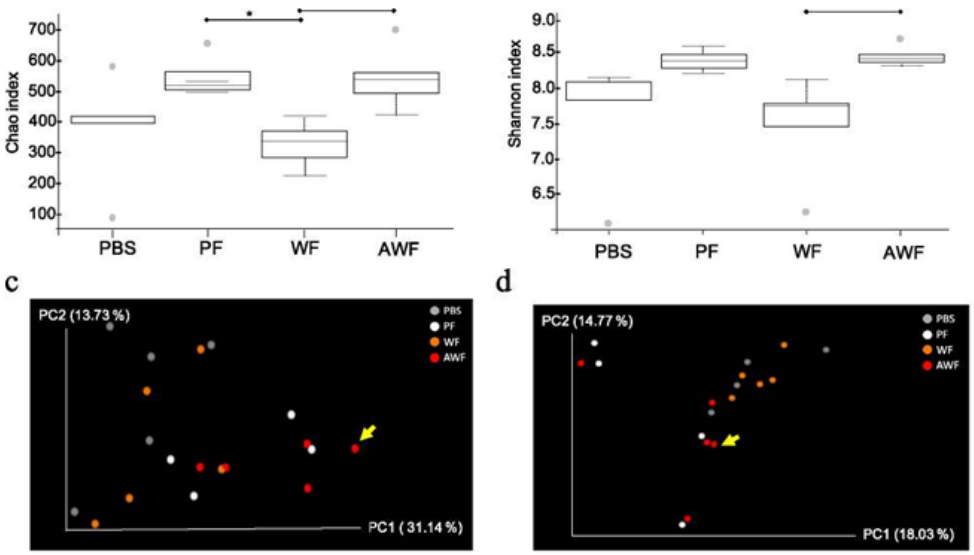
Фигура 1: Състав на фекална микробиота 15 дни след трансплантацията на фекален микробиом (dpft) в групите WF, AWF, PF и PBS. Всеки пик от диаграмата представлява относителното изобилие на таксономични групи, намерени в изпражненията на

различни таксономични нива: тип (a), семейство (b), род (c). Таксоните, намерени с по-малко от 1 % от относителното изобилие, са в ниска концентрация. Десетте сравнително изобилни таксони са показани в легендата.

Резултатите от това проучване сочат, че FMT променя разнообразието на чревният микробиом при свинете, подложени на трансплантация. Четиридесет и осем 21-дневни животни, разделени в четири групи, са перорално третирани в продължение на три последователни дни с пул от фекална маса от брадавичести свине-донори (WF група), пул от фекална маса от домашни свине (PF група) и PBS (контролна група). Четвъртата група прасета е третирана с „коктейл“ от антибиотици един ден преди инокулация с фекален микробиом (AWF група), с цел да се улесни трансплантацията на фекалната микробиота от донори брадавичести свине. Фекалните проби от 5 прасета от всяка група (PF, WF, AWF и PBS) са събрани на 15-тия ден след фекалната трансплантация (*dpft*) и тяхната фекална микробиота е сравнена. 16S рибозомалната ДНК (рРНК гени) е секвенирана поотделно от всички проби. След качествени процеси на обработка на секвенциите са получени 730 952 висококачествени последователности за 20 фекални проби. Броят на данните за всяка проба варира от 1425 до 60 027, със средна честота 36 548.

Наблюдаваните таксони на различни таксономични нива за различните групи са разпределени в 15 вида, 60 семейства и 77 рода. *Firmicutes* и *Bacteroidetes* са двете доминиращи видове за всички групи, последвани от *Spirochaetes* или *Proteobacteria*. В относително отношение, най-разпространеното семейство във всички групи е *Ruminococcaceae*, а второто най-разпространено семейство е *Prevotellaceae* за всички трансплантирани групи (PF, WF и AWF) и *Erysipelotrichaceae* за PBS. *Prevotella* е доминиращ род в PBS, WF и AWF, докато *Sporobacter* е доминиращ за групата PF.

Алфа разнообразието е оценено за всички групи на 15 dpft чрез индекс *Chao1,* който отчита богатството на микробиома и *Shannon* индекс, който разглежда както богатството, така и равномерността на разпределение. Богатството показва тенденция да бъде по-висока както при PF, така и в AWF в сравнение с PBS (съответно P = 0,08 и P =0, 007), като се оказва статистически по-висока от WF (съответно P = 0,01 и P = 0.009). Това увеличение на богатството на трансплантa е придружено от увеличение на разнообразието му, само за AWF, показващ индекс на *Shannon* статистически по-висок от Wf (P = 0.009) и тенденцията да бъде по-висок от PBS (P = 0.07).



Фигура 2. Алфа и бета разнообразие на фекални проби, 15 дни след фекална трансплантация (dpft) в групите WF, AWF, PF и PBS. Алфа разнообразие, изчислено чрез индекса на Chao1 (a) или показателите на Шанън-Уайнер (b). Пунктираните линии представляват стандартното отклонение, а отклоненията са обозначени със сиви кръгове. P < 0.05 и **P < 0.01. Бета разнообразието е изчислено чрез претеглено (в) и непретеглено (г) разстояние на Унифрак на 15dpft.*

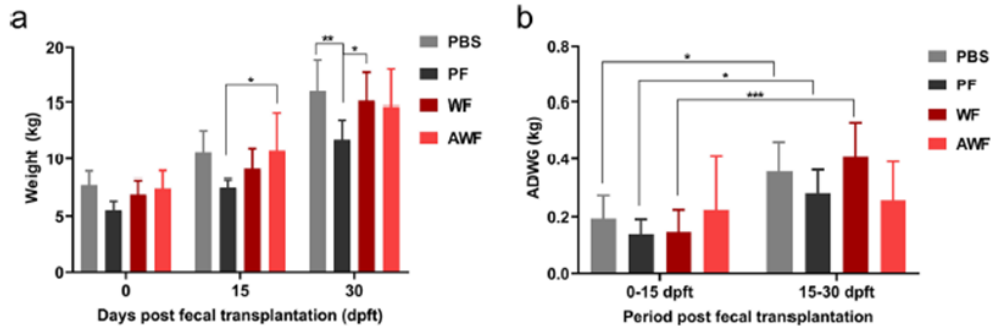
Пространствените промени в бактериалните общности сред групите са изследвани чрез PCoA. Анализът на бета разнообразието е направен с помощта на претеглени или непретеглени *Unifrac* филогенетични разстояния (*weighted or unweighted Unifrac phylogenetic distances*). PCoA е извършен за визуализиране на разликите в *Unifrac* филогенетични разстояния за всички проби след 15 dpft. Анализът на бета разнообразието показва отделен клъстер, сравняващ различните групи, обяснявайки 28,44% от разликите в количествения анализ (претеглен, P = 0.007) и 21,87 % в качествения анализ (непретеглен, P = 0.021).

Трансплантацията на фекален микробиом не е вредна!

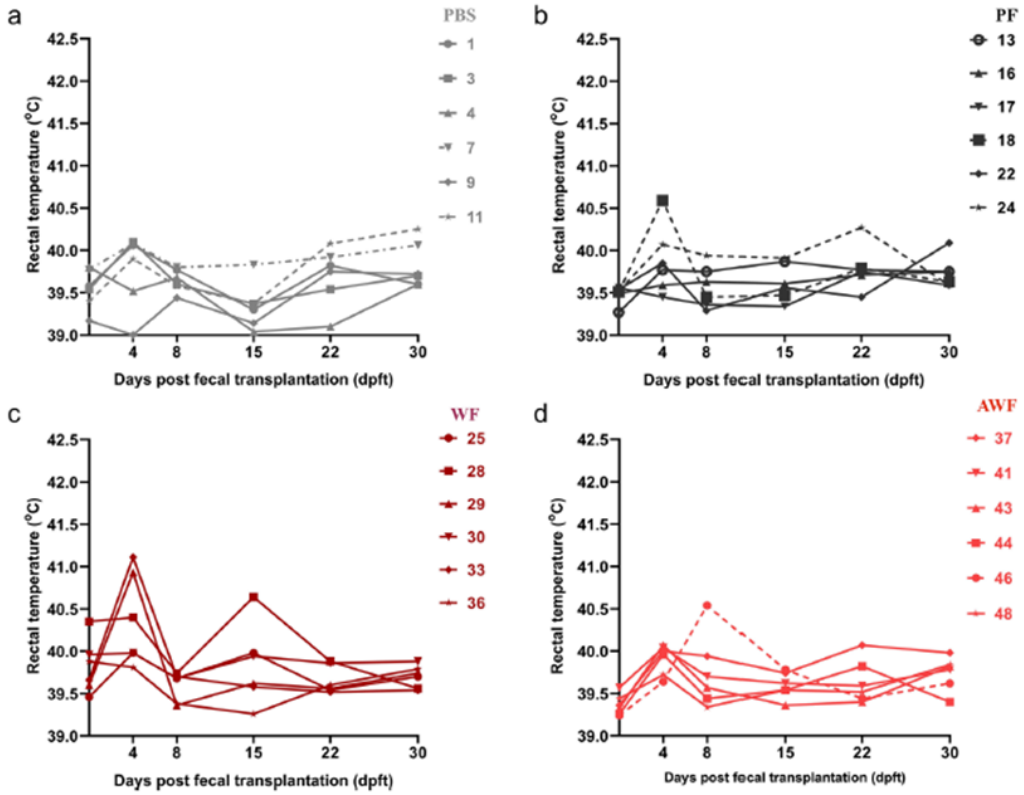
Трансплантацията е извършена с отбити прасенца (на 21 дни) и клиничните параметри са регистрирани в продължение на 30 дни. Въпреки деликатния преход, претърпян по време на отбиването, трансплантацията на фекален микробиом от брадавичести прасета не вреди на животните. Диарията, наблюдавана в групата AWF, продължава 2—3 дни, започвайки с антибиотично лечение и завършване на третия и последния ден от FMT. Не са наблюдавани значителни разлики между свинете, трансплантирани с фекален микробиом (WF и AWF) и групата на PBS по отношение на средното тегло или средно дневно наддаване на тегло (ADWG) от 0 до 30 dpft. Средното тегло на групата PF е по-ниско от групата AWF при 15 dpft и е най-ниското от всички останали групи при 30 dpft. ADWG се е увеличила значително във времето за WF, PBS и PF групи в сравнение с първата и втората седмица. Докато AWF групата показа същата

тенденция на наддаване на тегло по време на периода, WF групата показва различна динамика на растежа, тъй като животните в тази група са наддали по-малко тегло през първите 15 дни, но техният растеж се подобрява драстично през вторите две седмици. От друга страна, PF свинете са наддали по-малко тегло (групата, която има диария) от контролната група PBS през целия период на наблюдение.

Някои трансплантирани прасета, показват кратко увеличение на ректалната температура (RT) в периода от 4 до 8 dpft, които не се наблюдават при животните на PBS. Обратно, от 15 до 30 dpft температурата остава нормална и постоянна при прасета WF, AWF и PF, докато температурата на PBS е показала явни флуктоации.



Фигура 3: FMT от брадавичести свине-донори не повлиява зле на домашните свине по отношение на теглото и средното дневно наддаване на тегло (ADWG). Сравнение на средното тегло при 0, 15 и 30 dpft (a) и ADWG, изчислено за два периода: 0 до 15 dpft и 15 до 30 dpft в групи PBS, PF, WF и AWF.

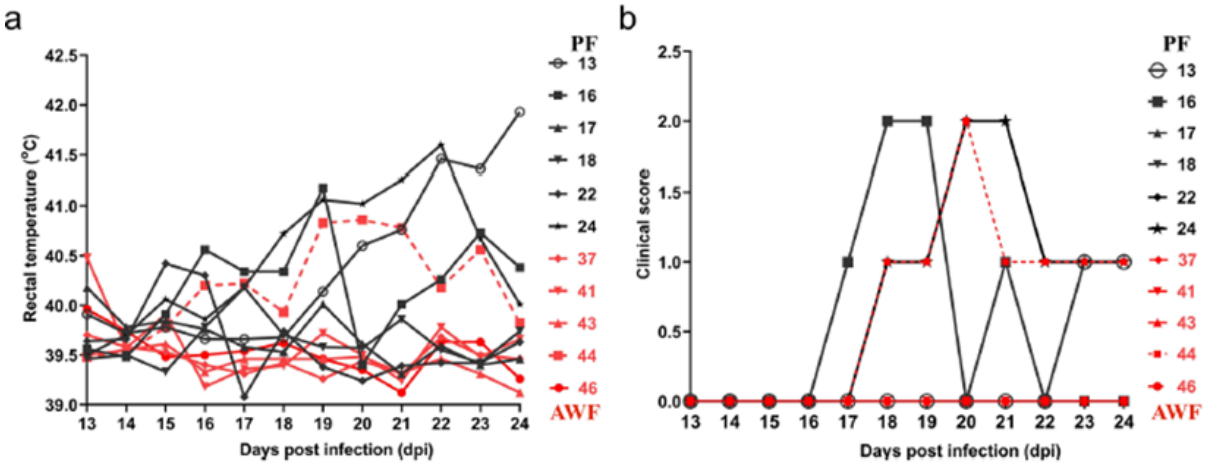


Фигура 4: Сравнение на ректалните температури между групите в различни дни след фекалната трансплантация (dpft). Ректалната температура е измерена на 0, 4, 8, 15,

22 и 30 dpft за PBS (a); PF (b); WF (c); и AWF групи (d). Трансплантираните прасета (PF, WF и AWF) показват постоянна ректална температура в късния период след FMT.

Трансплантацията на фекална микробиота осигурява частична защита срещу ASF in vivo.

За да се оценят ефектите на FMT върху възприемчивостта на свинете към ASF, трансплантираните домашни свине са били инфектирани с вирулентен щам E75 или с E75CV1 адаптиран клетъчнокултурален щам. Тридесет дни след FMT животните са транспортирани до съоръженията с ниво на биосигурност BSL3. PF и AWF са подложени на интрамускулно заразяване със 100 хемаглутининови единици (HAU) от атенюирания щам E75CV1, което улеснява наблюдението на потенциалните антивирусни ефекти на фекалната микробиота; Докато PBS и WF прасетата са били заразени с 10^4 HAU на щама на вирус E75, по-тежко остро протичащо и с летален изход „предизвикателство“ от ASFV. Животните са наблюдавани ежедневно съгласно изискванията за хуманно отношение към животните, за да се следи тяхното здравословно състояние и да бъдат записвани клиничните признаци след инфекцията на ASFV. В корелация с предишни наблюдения, след интрамускулна инокулация на 100 HAU от E75CV1, 50 % от PF показват последователно повишена ректална температура късно след инфекция, започваща от 15 dpi (дни след инфекцията) и продължаваща до ден 23 dpi, като само при едно животно се наблюдава треска до края на експеримента (24 dpi). Обратно при прасета от PF групата, само едно животно има треска. Наблюдавани са леки клинични признаци, характерни за хроничен ASF, които перфектно съвпадат с наблюдавания профил на треската при прасета PF и AWF, показващи тестикулно възпаление и ставни възпаления късно след инфекцията. С изключение на едно починало животно не са регистрирани други значими клинични находки в групата AWF.



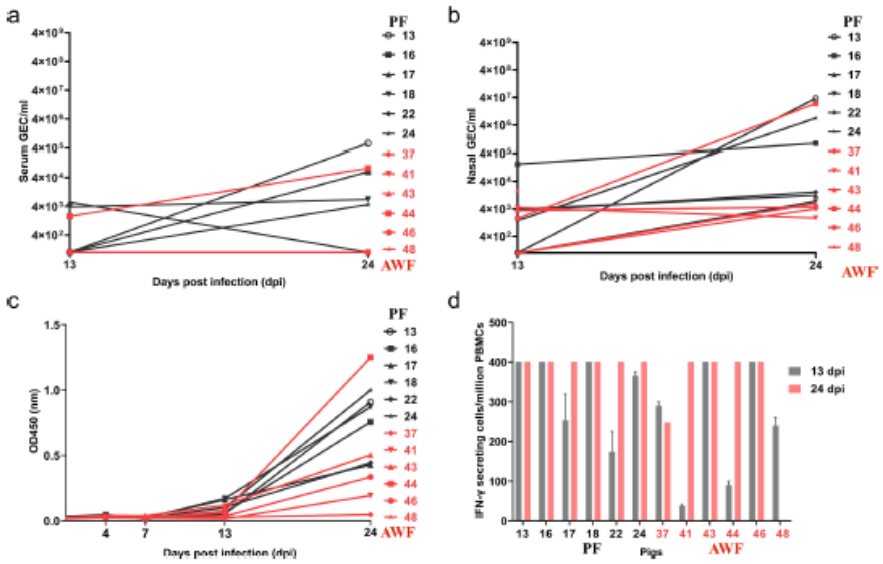
Фигура 5: Сравнение на ректалните температури (a) и хроничните ASF-клинични признаци (b) от групите PF (в черно) и AWF (в червено) след инфекция с атенюиран щам E75CV1. Клиничните резултати са изчислени, като се вземат предвид телесното тегло, поведението, храносмилателните дихателни и други значими клинични признаци, включително артрит, дерматит, тестикулно възпаление и др.

При 24 dpi всички животни са били евтаназирани, но при никое животно не са наблюдавани груби или микроскопични лезии.

В допълнение наличието на значимо количество вирус в серума и вирусното излъчителство също са високи за някои животни от PF групата и едно животно от AWF групата, паралелно с треска и клинични признаци при заразените прасета. Прасета PF и AWF, независимо от произхода на материала за трансплантация, проявяват осезаем клетъчен и хуморален отговори срещу ASFV. Количеството на специфичните антитела срещу ASFV, открити в серума на заразените с E75CV1 прасета, изглежда корелира с титрите на вируса, открити в серумните и носните тампон проби от група PF и AWF, показващи най-високите титри на антитела до ден 24 dpi. Не са наблюдавани разлики при специфичния Т-клетъчен отговор към ASFV, независимо от произхода на фекалния микробиом. Специфични за ASFV Т-клетки се откриват при всички прасета от IFNγ-ELISPOT още на 13 dpi и остават налице до края на експеримента.

Трябва да се отбележи, че съотношението *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, често е използван като здравен индикатор, след проведена трансплантация на фекален микробиом. Това дава обяснение и на причините, поради които в този експеримент има едно умряло прасе, тъй като дава стойност 1,16 за AWF при 15 dpft, много по-ниско от останалите прасета в групата AWF, което показва средно съотношение 2,323.

Въпреки че няма преки и категорични *in vitro* корелации за взаимовръзка между трансплантацията на фекален микробиом и имунната защита срещу ASFV, още веднъж е потвърдено в това проучване, че FMT с донорски микробиом от брадавичеста свиня може да подобри имунитета на лигавицата на стомашно-чревния тракт. По този начин общите нива на IgA, открити в серуми от прасета, трансплантирани с фекален микробиом от брадавичести свине (WF и AWF групи), показват тенденция да се увеличават в сравнение с тази в PF и PBS групи. Количеството IgA, специфични за ASFV, открити в серумите на E75CV1 инфектирани прасета е паралелно наблюдавано и за IgG и с вирусните титри, открити в серумните и назалните тампон проби.



Фигура 6: Сравнение на титруването на вируса в серумни проби (а), назалната екскреция на вируса (б), ASFV-специфичните антитела, открити чрез ELISA (с), и

специфичните Т-клетъчни отговори, измерени в IFNγ-ELISPOT (d) между PF (в черно) и AWF (в червено) групи след инфекция с атенюиран щам E75CV1. Границата на откриване на qPCR е 1 генно еквивалентно копие (GEC) на ASFV геном/µl серумен или назален тампон хомогенат.

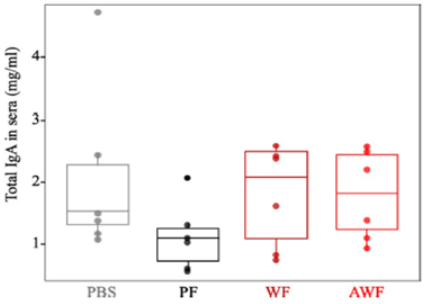
За да се оцени по-внимателно антивирусната ефикасност на трансплантацията на фекална микробиота от донори брадавичести свине, две допълнителни групи прасета (PBS и WF) са заразени с летална доза от 10^4 HAU от щама E75. PBS прасетата развиват остри клинични признаци на ASF от 4 dpi, включително анорексия, депресия, зачервяване и петехии по кожата и висока ректална температура. Свинете WF имат клинични признаци, идентични с описаните за прасетата PBS. Прасетата PBS и WF са евтаназирани съобразно хуманното отношение към животните на 7 dpi. При аутопсията прасетата показват сходни лезии сред групите, състоящи се от множество кръвоизливи по серозалните повърхности, леки асцити, интерстициална едема на белия дроб и мезентерият, умерена до маркирана спленомегалия и хеморагии в гастрохепаталния лимфен възел. Няма разлика в честотата на репликация на вируса.

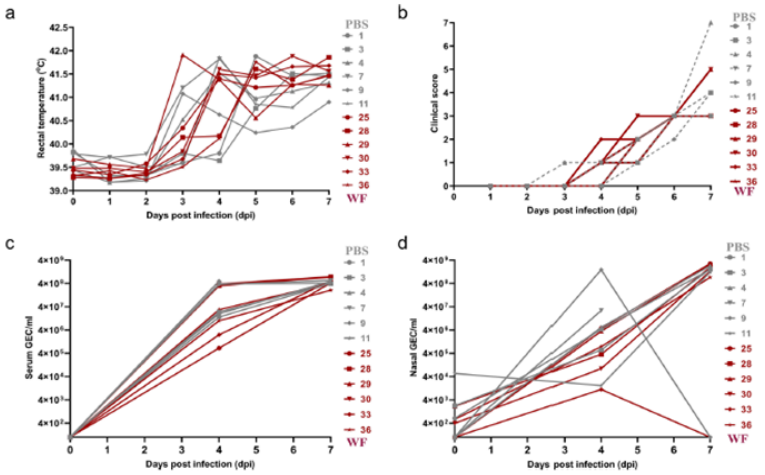
Молекулярна характеристика на състава на микробиота при PF и AWF.

Въз основа на по-горе представените резултати от това обстойно проучване, характеризирането на промените във фекалната микробиота, наблюдавани с течение на времето в групите AWF (E75CV1-устойчиви) и PF (E75CV1-чувствителни), включва и секвентен анализ на 16S rDNA от AWF и PF фекални проби на 15 dpft и проби за секвентен анализ, взети преди трансплантацията и проби, взети 8 дни след трансплантацията. След процесите на подравняване и биоинформатичен анализ на получените секвенции са получени 808 8856 висококачествени последователности за тези 20 фекалини проби. Този молекулярен анализ на микробиома от нулев, 8-ми и 15-ти ден след трансплантацията, показва че богатството на микроорганизми в трансплантирания микробиом в групи AWF и PF намалява между 0 и 8 dpft (P = 0,08), и се възстановява между 8 и 15 dpft. Подобна тенденция е наблюдавана по отношение на биоразнообразието на микробиома при AWF групата, при сравняване на 0 и 8 dpft (P = 0, 1), което показва също възстановяване между 8 и 15 dpft (P = 0, 1). PF разнообразието на тази група показва тенденция към увеличаване с течение на времето, въпреки че не е статистически значимо (0 до 8 dpft, P = 0,6; и 8 до 15 dpft, P = 0.08). Анализът ANCOM (количествен) анализ, сравняващ състава на микробиота на AWF и PF в 15-тия dpft, идентифицира четири диференциални таксона, присъстващи в AWF: *Mycoplasma* и *Chlamydia*, заедно с един неидентифициран вид от семейство *Enterobacteraceae* и от род *Proteobacteria*. Не са установени количествени разлики чрез ANCOM анализът за 0-вия или 8-мия ден след трансплантацията (dpft).

Бета анализът на разнообразието обаче, използвайки определени *Unifrac* разстояния, показва, че съставът на микробиома се е променил по времето от 0-вия, 8-мия и 15-тия dpft. Така съставът на микробиома на AWF групата при 0 dpft е различен от състава при 8 dpft (PERMANOVA, P = 0.05) и при 15 dpft (P = 0.01). Разликите за PF групата стават очевидни само при сравняване на 0 и 15 dpft (PERMANOVA, P = 0.02).

В опит да се намерят качествено различни таксони сред тестовите групи животни, които са определени първо, основните таксономични групи, намерени в AWF и PF и в сравнение със състава на таксоните в инокулума за FMT от донорски брадавичести свине (pWF) и FMT инокулумът от домашни свине (pPF), използван за трансплантацията, шест рода са присъствали в pWF, но са липсващи при pPF: *Desulfovibrio Roseburia, Ruminococcus, Actinobacillus, Faecalibacterium, Butyricicoccus*. След фекалната трансплантация, само *Faecalibacterium* е открита при AWF на 8 и 15 dpft, докато *Roseburia* и *Desulfovibrio* са открити само на 15 dpft.

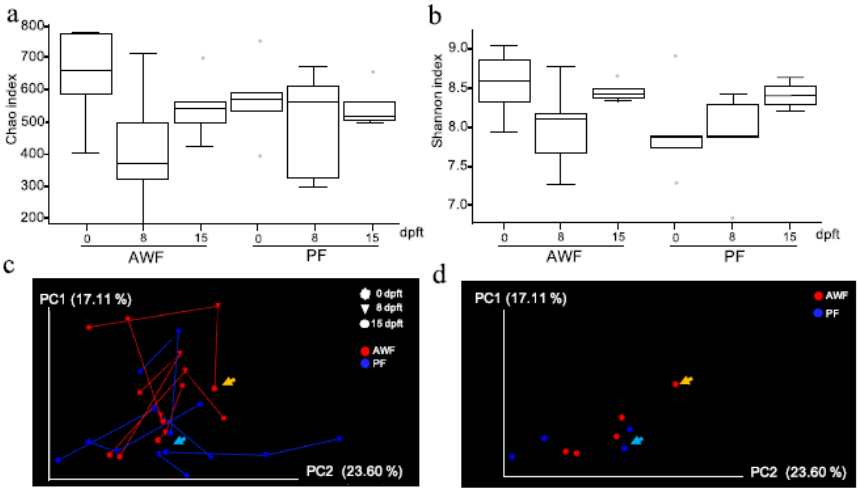




Фигура 7: Ефект на FMT върху имунитета на лигавицата. Установена е повишена тенденция за нивата на IgA при прасета, трансплантирани с донорски материал от брадавичести свине (WF и AWF) в сравнение с трансплантирани животни с донорски материал от домашни прасета (PF) или контролни прасета (PBS).

Фигура 8: Сравнение на ректалните температури (a), клиничните признаци, присъщи на остро заболяване (b), титруване на вируса в серум (c) и назални тампон проби (d) между PBS (в сиво) и WF (в тъмно червено) групи след инфекция с вирулентен щам E75.

Четири рода са открити само в pPF, т.е. *Asteroleplasma, Paraprevotella Gemmiger* и *Treponema*. С изключение на *Gemminger*, всички тези родове са открити и в двете трансплантирани групи на 15 dpft с подобно относително изобилие, но *Treponema* е установена в по-ниско относително изобилие в групата AWF. Когато е направен сравнителен анализ на основния състав на двете трансплантирани групи на 15 dpft, са открити четири рода като „ексклузивни“ членове на микробиома на PF: *Campylobacter, Clostridium* (от семейство *Lachnospiraceae*), *Actinobacillus* и *Succinispira*. *Barnesiella, Desulfovibrio, Anaerorhabdus* и *Roseburia* (част от състава на микробиома на AWF групата на 15 dpft). *Barnesiella и Anaerorhabdus* изглежда предпочитат да колонизират прасетата в контекста на pWF FMT, тъй като те са били намерени изключително при AWF на 15 dpft, въпреки че те са присъствали на същото относително изобилие както в pPF, така и в инокулума на pWF.



Фигура 9. Анализ на фекални проби от AWF и PF групи. Алфа разнообразието се изчислява чрез индекс Chao1 (a) или индекс на Shannon – Wiener (b) на 0, 8 и 15 дни след фекалната трансплантация (dpft). Пунктираните линии представляват стандартното отклонение, а отклоненията са обозначени със сиви точки. Бета разнообразието е оценено чрез претеглени разстояния на Unifrac, сравняващи AWF и PF при 0, 8 и 15 dpft (c). Съставът на микробиома на всяко животно във всяка времева точка е представен с триъгълници за 0 dpft, сфери за 8 dpft и шестоъгълници за 15 dpft.

Изводите, които могат да се направят на база това обстойно проучване са, че фекалната трансплантация на микробиота се оказа **полезна за лечение на вирусни заболявания при хора и животни, хронични чернодробни заболявания, улцерозен колит и главно за борба с мултирезистентни *Clostridium difficile*** инфекции при хора. FMT потвърждава критично **важната роля, която микробиома играе за чревната микрофлора в малките отбити прасета за осигуряване на резистентност към диария**, използвайки все още ненапълно изяснени механизми.

Храненето на животни с фекална маса от един и същи или различни видове е била в миналото традиционна практика за угояване, която изчезва от индустриалното земеделие поради санитарни проблеми, особено когато се използват изпражнения от едни и същи животински видове.

Диарията, наблюдавана в групата PF, може да се дължи на нежеланата трансплантация на ентеропатогени, присъстващи в трансплантирания материал, въпреки че е избрана от здрави свине. *Clostridium perfingens* тип B е изолиран от болни животни, макар и най-вероятно други ентеропатогени могат да бъдат отговорни за наблюдаваната диария. Фактът, че групите WF и AWF не показват никаква заболяемост в сравнение с контролните прасета PBS, изглежда потвърждава безвредния характер на фекалната маса от брадавичести прасета за свинете.

Отбиването е един от най-деликатните периоди в живота на прасето, когато възникват много стресови събития, допринасящи за дисфункции на чревната и имунната системи, които водят до нарушено здраве, намален растеж и намалена консумация на фураж, особено през първата седмица след отбиването на прасенцата. Ранната интервенция с **FMT подобрява съзряването на имунната система**, облекчаваща стреса от отбиване и **намаляване на заболяемостта и смъртността**, свързана със свински цирковирус тип 2 (PCV-2). В сравнение с отбитите прасета от групата PBS, WF

животните показват **значително увеличение на ежедневното си наддаване** на тегло между 15 и 30 dpft. Групата PF обаче дава лоши резултати в сравнение с останалите групи, най-вероятно поради случайна трансплантация на специфични патогени по свинете. Предварителната употреба на антибиотици затруднява сравнението на AWF с останалите групи. Обратно на PBS, увеличението на ADWG на WF става очевидно от 15 dpft, а не в ранни етапи, в-съответствие с ранния и преходен пик на треската. Съвпадайки с ранното увеличение на RT, трансплантираните прасета показват по-висок процент моноцити в кръвта им при 4 dpft в сравнение с тези в групата PBS. Най-вероятно се касае за ранна и преходна възпалителна реакция, вече описана в литературата, след фекална трансплантация. Поддържането на еднаква и постоянна температура, във времевия диапазон 15 и 30 dpft при трансплантираните прасета, независимо от произхода на фекалните проби (домашни свине или диви), могат да отразяват **синхронизация в техните циркадни ритми**, както е описано при хората. Във връзка с това прасетата и и хората имат няколко сходни съставки на чревния микробиом като *Enterobacter aerogenes*, бактерия, която е чувствителна към епифизната жлеза и гастроинтестиналния мелатонинов хормон. Както се очакваше, животните от контролната група PBS показаха разлики в телесната си температура в рамките на физиологичния обхват.

Taxa		Inoculum		PF			AWF		
Family	Genus	pPF	pWF	0 dpft	8 dpft	15 dpft	0 dpft	8 dpft	15 dpft
Barnesiellaceae	*Barnesiella*	1.114	0.772	4.018	1.717		2.347	3.06	1.217
Campylobacteraceae	*Campylobacter*	0.05	0.021			0.15			
Clostridiaceae	*Clostridium*	0.823	1.38	4.499		3.969	3.641		2.943
Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio*		0.12	0.177					0.065
Erysipelotrichaceae	*Unclassified*	0.976	0.741		0.821	2.161	0.945	1.211	2.428
Erysipelotrichaceae	*Asteroleplasma*	0.371				1.096		0.302	0.893
Erysipelotrichaceae	*Anaerorhabdus*	0.438	0.421		0.483		0.253		0.241
Lachnospiraceae	*Clostridium*	0.248	2.841			0.227		0.369	
Lachnospiraceae	*Defluviitalea*	0.155	0.082				0.094		
Lachnospiraceae	*Roseburia*		0.958	0.248					0.539
Lachnospiraceae	*Ruminococcus*		0.415	0.482					
Paraprevotellaceae	*Paraprevotella*	1.961			2.263	0.923	1.267	2.949	1.023
Pasteurellaceae	*Actinobacillus*		0.023			0.078			
Peptostreptococcaceae	*Clostridium*	0.143	0.532				2.191		
Prevotellaceae	*Prevotella*	4.951	3.015	9.536	9.566	8.428	19.217	17.029	9.916
Ruminococcaceae	*Sporobacter*	2.617	1.25	2.48	4.346	7.694	2.783	5.897	6.109
Ruminococcaceae	*Clostridium*	4.247	8.514	4.111	5.255	4.127	3.036	5.178	4.275
Ruminococcaceae	*Papillibacter*	0.222	0.273	0.285	0.321	0.217	0.378		0.224
Ruminococcaceae	*Faecalibacterium*		0.303			1.303		1.147	0.791
Ruminococcaceae	*Butyricicoccus*		0.994	0.358		0.51	0.414		
Ruminococcaceae	*Gemmiger*	0.248						0.546	
Ruminococcaceae	*Bacteroides*	0.203	0.192	0.219					
Spirochaetaceae	*Treponema*	1.24				0.481			0.217
Veillonellaceae	*Selenomonas*					1.283			0.869
Veillonellaceae	*Succinispira*	0.529	0.462	0.575		0.485	0.349	0.37	

Таблица 1: Средно относително богатство и разпределение на основни родове микроорганизми от използвания за транспалнтацията инокулум и различните групи при различни времеви точки след FMT.

Въпреки промените, описани в това проучване, трансплантацията на фекален микробиом от брадавичести свине на домашни отбити 21-дневни прасенца не променя драстично микробиома на трансплантираните прасенца, или поне няма никакво обогатяване в таксоните. Тези резултати съвпадат с описаните в много научни съобщения, като се акцентира върху **полезните ефекти на трансплантацията на фекален микробиом и благотворното стимулиране на имунната система**. Животните от двете групи показват подобен **хуморален и клетъчен отговор срещу вируса на африканската чума по свине**, измерен съответно чрез ELISA и IFNγ-ELISPOT. Този резултат потвърждава още веднъж полезното влияние на този вид интервенция. Във връзка с това, научните разработки през последните десетилетия, позволиха да се охарактеризира Т-клетъчния имунен отговор като от решаващо значение за защитата от ASFV. По-специално изглежда, че **съществува пряка връзка между защитата, подобните на Thl отговори и индукцията на специфични CD8+ Т-клетки (цитотоксични Т-лимфоцити) срещу ASFV**. Експерименталната имунизация с атенюирани щамове също показва, че този възпалителен отговор идва заедно с индукцията на регулаторни **Т-клетки, които стриктно контролират всяко прекомерно възпаление и че това равновесие диктува по някакъв начин безопасността и ефикасността и дългосрочната продължителност на ваксината**. Интересно е, че повечето бактерии, специално открити при трансплантирани прасета на 15 dpft, точно преди ASFV инокулирането, са свързани с противовъзпалителни процеси. Такъв е случаят с *Faecalibacterium*, считан за конститутивен маркер на здравият статус на стомашно-чревният тракт и е свързан с противовъзпалителните свойства. Интересното е, че *Faecalibacterium* е основният таксон за AWF прасета на 8 dpft и 15 dpft. *Roseburia* е друг основен таксон, изолиран в 15dpft, бактерия, способна да произвежда късоверижни мастни киселини (SCFA), **метаболитни медиатори, балансиращи производството на възпалителните и противовъзпалителни Т-клетъчни подгрупи и антимикробни пептиди** (AMPs). Бактериите от род *Barnesiella,* участват пряко в **намаляването на патогенния ванкомицин- резистентен *Enterococcus***. Интересно е, че много от видовете бактерии, изолирани от микробиома на PF в 15 dpft включват различни видове, често свързани с болести по свинете, *като Campylobacter, Clostridium* и *Actinobacillus*.

В друго обстойно проучване върху ползите от трансплантацията на фекален микробиом със заглавие: „***Early Intervention Using Fecal Microbiota Transplantation Combined with Probiotics Influence the Growth Performance, Diarrhea, and Intestinal Barrier Function of Piglets***“ и авторски колектив: *Quanhang Xiang, Xiaoyu Wu, Ye Pan, Liu Wang, Yuwei Guo, Chenbin Cui, Lingling Hu, Lingling Zhu, Jian Peng и Hongkui Wei* е показана ясно огромната полза и потенциал на тази трансплантация при отбити прасенца. Ранната намеса посредством трансплантация на фекална маса (FMT) **подобрява ефективността на растежа и чревната бариерна функция на прасенцата**. Ускоряването на концентрацията на кислород в червата е от полза за симбиотичната бактериална колонизация. *Saccharomyces boulardii (SB)* е аеробна гъба, която може да допринесе за колонизацията на анаеробни симбиотични бактерии, като се конкурира за кислород.

Clostridium butyricum (CB) подобрява чревната бариерна функция и производителност, чрез регулиране на чревния микробиомен състав на прасенцата. Целта на това проучване е да се изследва ефектът от ранната интервенция с FMT, комбиниращ CB и SB върху растежа, диарията след отбиване и чревната бариерна функция при прасенца. Общо 77 котила новородени прасенца, са групирани за едно от шестте терапевтични и лечебни стратегии: 1. лекувани с антибиотици (AB), 2. плацебо (CON) и 3. FMT (FMT), 4. добавени FMT CB (FMT + C), 5. добавени FMT SB (FMT + S) и 6. добавени FMT CB и SB (FMT + C + S), съответно. Прасенцата, лекувани с FMT + C + S, са имали по-високо телесно тегло (BW) и среднодневно увеличение (ADG) както в периода на отбиване, така и във финиалния период и значително са повишили нивата на чревен муцин-2 (MUC2), както и на производството на чревни късоверижни мастни киселини (SCFA) и относителното изобилие от фекални *Lactobacillus* spp. и *Bifidobacterium* spp.. Нещо повече, ранната интервенция с FMT + C + S намалява честотата на диария. FMT + C + S също намалява нивото на плазмената диамин оксидаза (DAO) и D-лактат (D-LA) и относителното изобилие от чревни *E. coli* през периода на сучене. В обобщение, ранната интервенция с FMT, комбинираща CB и SB, подобрява ефективността на растежа, чревната бариерна функция, концентрацията на SCFA във фекалиите и фекалните *Lactobacillus* и *Bifidobacterium* на прасенца.

Резултатите от това проучване са представени в табличен вид (таблица 2):

Phases	Item	Treatments [1]						SEM	*p*-Value
		Control Groups			Treatment Groups				
		AB	CON	FMT	FMT+C	FMT+S	FMT+C+S		
Suckling period (Days 1–27)	Piglets	132	84	157	149	112	106		
	Sows	13	10	15	15	12	12		
	BW [2], kg								
	Day 1	1.55	1.57	1.55	1.53	1.55	1.54	0.01	0.9681
	Day 7	2.52	2.46	2.57	2.48	2.6	2.57	0.02	0.2404
	Day 14	4.11 [a,b]	4.01 [b]	4.31 [a]	4.17 [a,b]	4.25 [a]	4.26 [a]	0.03	0.0762
	Day 21	5.59 [b,c]	5.51 [c]	5.87 [a,b]	5.76 [b,c]	5.83 [a,b]	6.11 [a]	0.03	0.0017
	Day 27	6.88 [b,c]	6.85 [c]	7.26 [a,b]	6.96 [b,c]	7.14 [a,b,c]	7.51 [a]	0.04	0.0028
	ADG [3], g/d								
	Days 1–7	161.15	151.79	164	156.9	167.71	162.63	1.74	0.3105
	Days 8–14	227.37 [b,c]	220.66 [c]	247.81 [a]	241.51 [a,b]	235.31 [a,b,c]	242.4 [a,b]	2.17	0.0254
	Days 15–21	211.24 [b]	214.13 [b]	223.64 [b]	226.26 [b]	226.12 [b]	255.46 [a]	2.56	0.0007
	Days 22–27	214.80 [b,c]	223.29 [a,b,c]	230.57 [a,b]	200.49 [c]	219.17 [b,c]	243.40 [a]	2.62	0.0030
	Days 1–27	204.85 [b]	203.62 [b]	217.99 [a,b]	208.42 [b]	213.51 [b]	227.74 [a]	1.39	0.0032
	Diarrhea rate, %								
	Days 1–7	10.41	13.97	7.89	7.34	11.21	5.93	1.11	0.3757
	Days 8–14	5.14 [a]	4.27 [a,b]	2.81 [b,c]	1.98 [c]	3.76 [a,b,c]	1.96 [c]	0.33	0.0182
	Days 15–21	8.95 [a,b]	11.66 [a]	7.53 [b]	6.27 [b]	7.45 [b]	5.14 [b]	0.58	0.0144
	Days 22–27	4.93	4.93	4.93	4.93	4.93	4.93	0.35	0.6937
	Days 1–27	7.47 [a,b]	9.33 [a]	5.92 [b,c]	5.16 [b,c]	7.08 [a,b,c]	4.49 [c]	0.38	0.0047
	Diarrhea index								
	Days 1–7	0.52	0.6	0.47	0.47	0.58	0.46	0.09	0.9979
	Days 8–14	0.11 [a]	0.1 [a,b]	0.07 [a,b]	0.06 [a,b]	0.09 [a,b]	0.05 [b]	0.01	0.0830
	Days 15–21	0.17 [b]	0.27 [a]	0.18 [b]	0.15 [b]	0.17 [b]	0.12 [b]	0.01	0.0202
	Days 22–27	0.12	0.16	0.13	0.13	0.15	0.14	0.01	0.8997
	Days 1–27	0.23	0.29	0.22	0.21	0.25	0.19	0.03	0.9388

Phases	Item	Treatments [1]						SEM	*p*-Value
		Control Groups			Treatment Groups				
		AB	CON	FMT	FMT+C	FMT+S	FMT+C+S		
Post-weaning period (Days 28–63)	Piglets	81	71	83	83	84	78		
	Pans	4	4	4	4	4	4		
	BW, kg								
	Day 27	6.79 ^{c}	7.25 ^{b}	7.78 ^{a}	7.17 ^{b}	7.37 ^{b}	7.83 ^{a}	0.06	<0.0001
	Day 35	7.47 ^{d}	7.89 ^{c}	8.30 ^{b}	7.79 ^{c}	7.94 ^{c}	8.49 ^{a}	0.06	<0.0001
	Day 42	10.27 ^{c}	10.75 ^{b,c}	11.13 ^{b}	10.96 ^{b}	10.65 ^{b,c}	11.79 ^{c}	0.08	<0.0001
	Day 49	13.87 ^{d}	14.45 ^{c}	15.26 ^{b}	14.67 ^{c}	14.46 ^{c}	16.12 ^{a}	0.10	<0.0001
	Day 56	18.60 ^{d}	18.92 ^{c,d}	19.62 ^{b}	19.34 ^{b,c}	18.95 ^{c,d}	21.01 ^{a}	0.12	<0.0001
	Day 63	23.66 ^{c}	23.92 ^{c}	25.07 ^{b}	24.36 ^{b,c}	23.79 ^{c}	26.54 ^{a}	0.15	<0.0001
	ADG, g/d								
	Days 27–35	96.33	90.54	73.79	89.02	80.64	94.49	3.53	0.3333
	Days 36–42	400.77 ^{b}	405.71 ^{b}	405.71 ^{b}	456.10 ^{a}	393.00 ^{b}	462.54 ^{a}	4.80	<0.0001
	Days 43–49	503.09 ^{d}	529.34 ^{c,d}	587.14 ^{a,b}	527.21 ^{c,d}	552.67 ^{b,c}	617.25 ^{a}	5.86	<0.0001
	Days 50–56	682.17 ^{a,b}	634.53 ^{b,c}	622.79 ^{c}	667.30 ^{a,b,c}	642.52 ^{b,c}	698.55 ^{a}	6.54	0.0254
	Days 57–63	723.05 ^{a,b}	726.24 ^{a,b}	777.62 ^{a}	717.23 ^{a,b}	687.31 ^{b}	789.36 ^{a}	8.73	0.0211
	Days 27–63	481.27 ^{b}	476.74 ^{b}	494.37 ^{b}	490.71 ^{b}	471.06 ^{b}	530.74 ^{a}	3.47	<0.0001
	ADFI [4], g/d								
	Days 27–35	148.91	153.47	146.9	147.9	134.95	143.56	2.36	0.3301
	Days 36–42	466.58	472.92	475.98	486.33	488.87	520.17	6.7	0.2404
	Days 43–49	718.82	759.39	776.59	766.47	756.98	847.84	13.22	0.1060
	Days 50–56	966.53	937.12	956.86	967.15	929.34	1031.81	14.42	0.4080
	Days 57–63	1155.95 ^{b,c}	1176.29 ^{b,c}	1237.52 ^{a,b}	1150.79 ^{b,c}	1108.41 ^{c}	1290.33 ^{a}	17.98	0.0235
	Days 27–63	693.72	701.96	720.38	707.02	687.47	769.76	9.52	0.1284
	Diarrhea rate, %								
	Days 27–35	6.35 ^{b}	9.78 ^{a,b}	12.16 ^{a}	7.25 ^{b}	9.69 ^{a,b}	5.89 ^{b}	0.64	0.0209
	Days 36–42	3.48 ^{a}	6.60 ^{a}	6.12 ^{a,b}	4.59 ^{b,c}	4.30 ^{b,c}	2.59 ^{c}	0.33	0.0007
	Days 43–49	4.34 ^{a,b}	5.87 ^{a}	3.48 ^{a,b}	3.04 ^{b}	4.48 ^{a,b}	2.04 ^{b}	0.36	0.0374
	Days 50–56	2.21 ^{b,c}	5.56 ^{a}	3.53 ^{b}	1.99 ^{b,c}	2.41 ^{b,c}	1.12 ^{c}	0.3	<0.0001
	Days 57–63	2.08 ^{b}	5.56 ^{a}	4.42 ^{a}	1.03 ^{b}	2.41 ^{b}	1.05 ^{b}	0.37	<0.0001
	Days 27–63	3.75 ^{c,d}	6.67 ^{a}	5.96 ^{a,b}	3.69 ^{c,d}	4.67 ^{b,c}	2.60 ^{d}	0.23	<0.0001
	Diarrhea index								
	Days 27–35	0.17	0.24	0.29	0.22	0.27	0.18	0.02	0.1802
	Days 36–42	0.10 ^{b,c}	0.17 ^{a}	0.15 ^{a,b}	0.12 ^{b,c}	0.13 ^{a,b,c}	0.08 ^{c}	0.01	0.0039
	Days 43–49	0.10 ^{a,b}	0.13 ^{a}	0.09 ^{a,b}	0.08 ^{a,b}	0.12 ^{a}	0.05 ^{b}	0.01	0.0367
	Days 50–56	0.06 ^{b,c}	0.12 ^{a}	0.08 ^{b}	0.04 ^{c}	0.06 ^{b,c}	0.04 ^{c}	0.01	0.0002
	Days 57–63	0.05 ^{b}	0.13 ^{a}	0.11 ^{a}	0.03 ^{b}	0.06 ^{b}	0.03 ^{b}	0.01	<0.0001
	Days 27–63	0.10 ^{c,d}	0.16 ^{a}	0.14 ^{a,b}	0.10 ^{b,c,d}	0.13 ^{a,b,c}	0.08 ^{d}	0.01	0.0003

[1] AB = antibiotics control group; CON = placebo control group; FMT = fecal microbial transplantation control group; FMT+C = FMT added *C. butyricum*; FMT+S = FMT added *S.boulardii*; FMT+C+S = FMT added *C. butyricum* and *S.boulardii*; [2] BW=body weight; [3] ADG = average daily gain; [4] ADFI = average daily feed intake [a,b,c] Values within a row with different superscripts differ significantly at $p < 0.05$, All values are presented as means ± SEM.

Едни от важните **изводи**, които могат да се направят от това проучване са, че ранната интервенция с FMT + C + S може да **обогати основно произведените от SCFA бактерии**. Данните разкриват, че **сукцинатът играе важна роля в имунния отговор на вродените лимфоидни клетки (ILC2) от тип 2 в тънките черва**. В допълнение, нивата на сукцинат са увеличени при животни, подложени на трансплантация на фекален микробиом, което **предпазва от колонизация с бактериални патогени**. Следователно, в това проучване, повишените фекални SCFAs и концентрацията на сукцинат могат да допринесат за получаване на по-здрава и по-устойчива чревна среда при прасенца с проведена FMT + C + S. От друга страна, SCFAs могат да **стимулират чревния растеж и да подобрят чревната бариерна функция при свинете**.

Основополагащо проучване на тема: „***Fecal Microbiota Transplantation Is Associated With Reduced Morbidity and Mortality in Porcine Circovirus Associated Disease***“ на авторски колектив: *Megan C. Niederwerder, Laura A. Constance, Raymond R. R. Rowland, Waseem Abbas, Samodha C. Fernando, Megan L. Potter, Maureen A. Sheahan,*

Thomas E. Burkey, Richard A. Hesse и Ada G. Cino-Ozuna също свидетелства за **ползите от метода трансплантация на фекален микробиом при свине** с цел **борба с други инвазивни вируси като групата на цирковирусите**, засягащи основно свинете. Цирковирусната инфекция при сивне (PCVAD) е мултифакторен болестен синдром, причинен от свински цирковирус тип 2 (PCV-2), който може да бъде симулиран в експериментална среда чрез коинфекция на прасета с PCV-2 и вирус на репродуктивен и респираторен синдром (PRRSV). Получените PCVAD-засегнати прасета представляват субпопулация в коинфектираната група. При проучването на тази коинфекция, наличието на разнообразие от микробиоми е свързано с **намаляване на клиничните признаци**. В това проучване е изследвана трансплантацията на фекална микробиота (FMT) като **средство за терапия и повлияване на симптоматиката** и за **предотвратяване на PCVAD при свине**, коинфектирани с PRRSV и PCV-2d. Донори на материала за FMT са свине майки с документирана история на здрави животни. Анализът на донорния материал за FMT е показал отсъствие на придружаващи патогени, заедно с наличието на разнообразни микробни полезни видове и съобщества. През 42-дневния постинфекционен период, експериментално инокулираната с вирус група прасета, на които е проведена FMT е показала **по-малко животни, засегнати от PCVAD, значително намаляване на заболеваемостта и смъртността, заедно с повишени нива на антитела**. Като цяло, това проучване предоставя доказателства, че FMT **намалява тежестта на клиничните признаци след коинфекция с PRRSV и PCV-2 чрез намаляване на разпространението на PCVAD**.

При изследването на трансплантирания фекален микробиом са наблюдавани следните видове полезни бактерии: *Actlabacteria, Amoebozoa, Bacteroidetes, Basidiomycota, Euryarchaeota, Firmicutes, Fusobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes, Synergistetes и Tenericutes*. По-голямата част от откритите видове попадат в рамките на *Proteobacteria* (16/49; 32,7%), като вторият най-голям брой видове попада в *Firmicutes* (9/49; 18,4%) и третият най-голям брой видове, попадащи в *Tenericutes*. (6/49; 12,2%). В табличен вид (таблица 3) са представени откритите и охарактеризирнаи видове полезни бактерии от микробиома, изолирани от донорния материал:

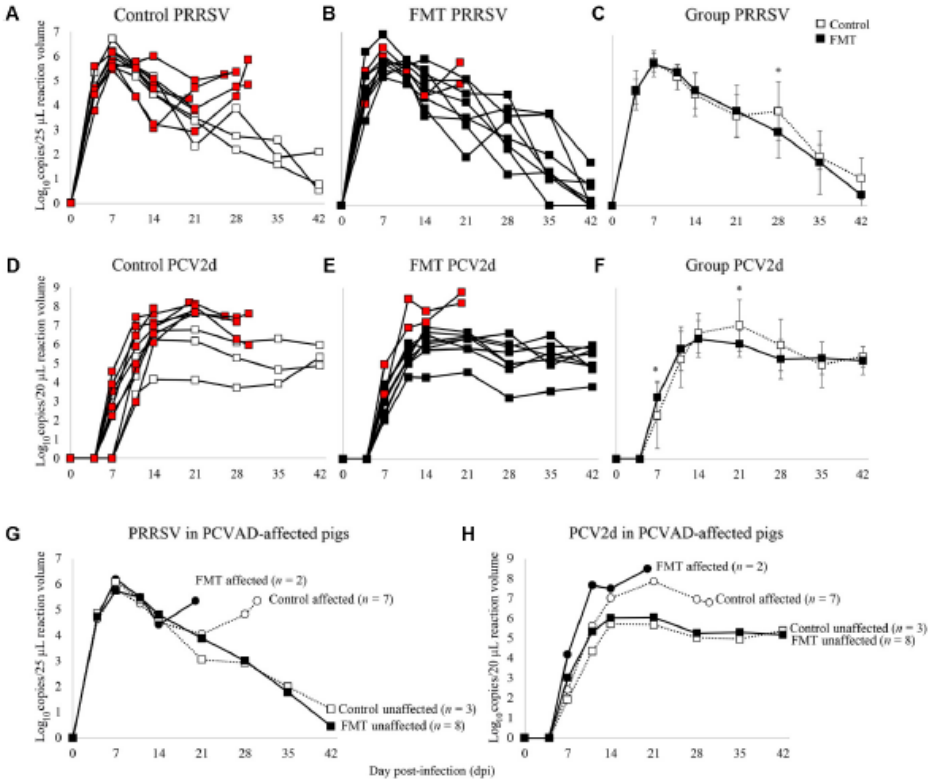
Phylum‡	Family	Genus species
Actinobacteria	*Bogoriellaceae*	*Georgenia* sp.
	Nocardiaceae	*Rhodococcus rhodnii*
Amoebozoa	*Entamoebidae*	*Entamoeba nuttalli*
Bacteroidetes	*Bacteroidaceae*	*Bacteroides graminisolvens*, *Bacteroidetes bacterium*
	Cyclobacteriaceae	*Algoriphagus marincola*
	Prevotellaceae	*Prevotella* sp.
	Rikenellaceae	*Rikenella microfusus*
Basidiomycota	*Ceratobasidiaceae*	*Rhizoctonia solani*
Euryarchaeota	*Methanobacteriaceae*	*Methanobrevibacter oralis*, *Methanobrevibacter smithii*
Firmicutes	*Carnobacteriaceae*	*Alkalibacterium* sp.
	Clostridiaceae	*Candidatus Clostridium anorexicamassiliense*, *Clostridiaceae bacterium*, *Clostridium* sp.
	Clostridiales	*Clostridiales bacterium*
	Lachnospiraceae	*Lachnospiraceae bacterium*
	Lactobacillaceae	*Lactobacillus amylovorus*
	Peptostreptococcaceae	*Clostridium bifermentans*, *Clostridium mangenotii*
Fusobacteria	*Fusobacteriaceae*	*Psychrilyobacter atlanticus*
Proteobacteria	*Anaplasmataceae*	*Candidatus Xenolissoclinum pacificiensis*
	Bradyrhizobiaceae	*Bosea* sp., *Bradyrhizobium* sp.
	Campylobacteraceae	*Campylobacter* sp., *Sulfurospirillum arcachonense*
	Desulfovibrionaceae	*Desulfovibrio alkalitolerans*
	Helicobacteraceae	*Helicobacter pametensis*
	Legionellaceae	*Legionella lansingensis*
	Piscirickettsiaceae	*Thiomicrospira kuenenii*, *Thiomicrospira* sp.
	Pseudomonadaceae	*Pseudomonas* sp., *Rhizobacter* sp.
	Sphingomonadaceae	*Sphingomonas* sp.
	Vibrionaceae	*Candidatus Photodesmus katoptron*
	Xanthomonadaceae	*Ignatzschineria larvae*, *Xanthomonadaceae bacterium*
Spirochaetes	*Spirochaetaceae*	*Borrelia parkeri*, *Spirochaeta* sp., *Treponema pedis*, *Treponema* sp.
Synergistetes	*Synergistaceae*	*Aminiphilus circumscriptus*
Tenericutes	*Acholeplasmataceae*	*Acholeplasma equifetale*, *Acholeplasma granularum*
	Mycoplasmataceae	*Mycoplasma conjunctivae*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma iowae*
	Spiroplasmataceae	*Spiroplasma apis*
Virus	*Circoviridae*	Fur seal feces-associated circular DNA virus

*Only those microbes identified at the phylum, family, and genus level are included. ‡Organized alphabetically by phylum; order listed when family unidentifiable.

Резултатите, представени в това проучване показват, че FMT **намалява броя на засегнати от PCVAD** прасета като степента на заболеваемост на контролите и FMT групите са сравнявани през първите 22 дни след коинфекция. Когато се вземат заедно, прасета, които са получили лечение с FMT, показват намаляване на PCVAD. За сравнение, някои от засегнатите прасета в контролната група са проявили симптоматика- бронхопневмония и фибринозен плеврит и тежък гноен ринит. За разлика от тях, **само 30% от FMT групата е имала тежка интерстициална пневмония и разширяване на лимфните възли при преглед, характерни за PCVAD**. Контролните прасета имат повече тежки груби и микроскопични лезии, свързани с PCVAD в сравнение със свине, получили донорския материал, което показва, че FMT **осигурява частична защита и от двете респираторни и лимфоидни заболявания**.

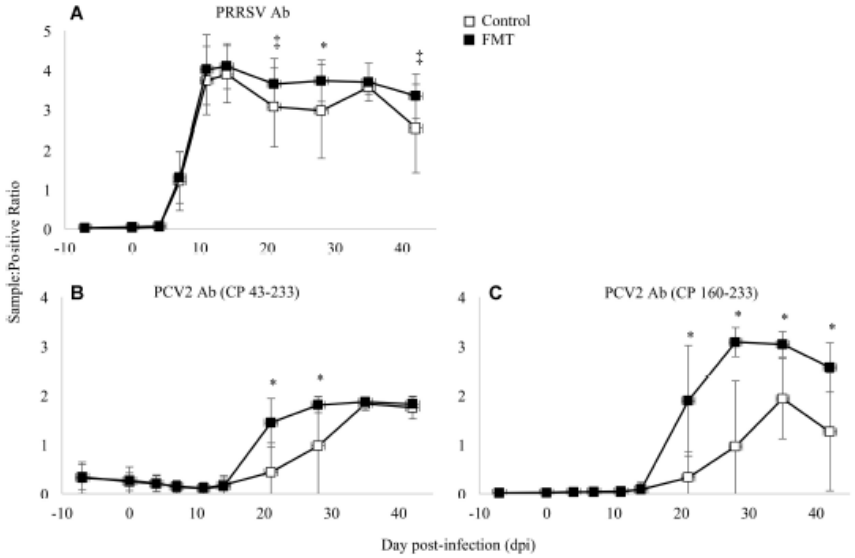
FMT **намалява репликацията на PRRSV и PCV-2 и увеличава производството на антитела**. PRRSV виремията следва типичния времеви ход, достигайки пик от 7 dpi преди постепенно намаляване през следващите 5 седмици. Интересното е, че повечето от засегнатите от PCVAD прасета са имали възстановяване на виремията с PRRS. Например, едно контролно прасе е имало пикова репликация на PRRSV при 7 dpi (5,8log10 брой копия/25 µl реакционен обем), постепенно намаляване на PRRSV репликация до минимум при 21 dpi (2,9log10 копия /25µl реакционен обем) и втори пик на репликация на PRRSV при 30 dpi (5,9 log10 брой копия/25 µl реакционен обем). При сравняване на средната репликация на PRRSV между групите, единствената значима разлика се наблюдава при 28 dpi, където контролната група има значително по-висока виремия; средна стойност от 3,9 и 3,0 log10 брой копия/25µl реакционен обем се

наблюдава съответно за контролни и FMT групи. Виремията на свинският цирковирус тип 2 също следва типичния времеви ход, достигайки връх по-късно в периода на коинфекция между 14 и 21 dpi, последван от плато в края на проучването. Интересното е, че всички прасета, които са умрели, са имали значително по-високи нива на репликация на PCV-2 в сравнение със свине, които са оцелели в хода на това проучване. По-конкретно, оцелелите прасета поддържат <7 log10 брой копия/20µl реакционен обем в серума при всички измервания, докато прасетата, които са умрели, са имали > 7 log10 брой копия/20µl реакционен обем. При сравняване на средната репликация на PCV-2 на двете групи се забелязват значителни разлики при 7 и 21 dpi, където FMT групата има по-бързо нарастване на репликацията на PCV-2 със 7 dpi и по-бърз спад на репликацията на PCV-2 с 21 dpi. Като цяло, засегнатите от PCVAD прасета са имали високи нива на PCV-2 и PRRSV в серума по време на смърт или евтаназия, потвърждавайки ролята на вирусната инвазивност в хода на клиничното изпитване. Резултатите посочват, че като цяло, **репликацията на вируса по време на пиковете на заболяванията е намалена в групата на FMT, демонстрирайки защитен ефект на FMT върху вирусното натоварване**.



Фигура 10: Протичане на виремия на PRRSV и PCV-2d във времето. Данните са показани като log10 брой копия/PCR реакционен обем за отделни прасета както в контролната, така и в FMT групата (A, B за PRRSV; D, E за PCV-2d). Червените квадрати показват свине, които са умрели или са били хуманно евтаназирани по време на изпитването за коинфекция поради тежестта на заболяването. (C, F) Данните са показани като средно log10 брой копия/PCR реакционен обем 1 стандартно отклонение за всяка група. Звездичките са статистически значителни разлики за PRRSV и PCV-2d. (G, H) Данните са показани като PRRSV и PCV-2 виремия при засегнати от PCVAD (кръгове) и незасегнати от PCVAD (квадрати) прасета в контролната и FMT групи.

Антителата са измерени срещу PRRSV N протеин, PCV-2 цял капсиден протеин (CP 43-233) и PCV-2 епитоп (CP 160-233). PRRSV антитела са открити по подобен начин и в двете групи първоначално на 7 dpi и с пик между 11 и 14 dpi. PRRSV антитела са открити при по-високи нива при прасета с FMT на 21, 28 и 42 dpi. При сравняване на нивата на PCV-2 антитела, се наблюдава **тенденция с по-високи нива на антитела при групата на FMT прасета**, сравнени с контролите. Свинете с FMT са имали по-високи CP 43-233 антитела при 21 и 28 dpi, и по-високи CP 160-233 антитела от 21 dpi до заключение на изследването. В обощение **FMT насърчава производството в по-големи количества и по-устойчиви антитела насочени както към PRRSV, така и към PCV-2**.



Фигура 11: Откриване на антитела при трансплантирани и контролни свине. Данните са показани като усреднена проба: положително съотношение 1 стандартно отклонение за PRRSV (A), PCV-2 голям епитоп (B) и PCV-2 епитоп (C).

Обсъждане и изводи:

Необходими са допълнителни проучвания върху потенциалната роля на фекалната трансплантация за устойчивостта на ASFV, PRRSV, PCV-2 и други вирусни или бактериални патогени при свинете, тъй като сложността на цялата микробна мрежа и техните взаимодействия може да бъде от съществено значение за този ефект.

Трансплантацията на микробиом от един вид на друг е и древна практика в хуманната медицина. По-сложна и модерна форма на трансплантацията на микробиом при хората е приемът на пробиотици като *Bifidobacterium* или *Lactobacillus*, изолирани от различни животински видове. Като се има предвид тази информация и следвайки логиката, трябва да се идентифицират и охарактеризират отделните микроорганизми в състава на микробиома, за да се изясни и защитния им потенциал срещу различни патогенни агенти. Ако се потвърдят ползите от прилагането на тази методика, трябва да може да се разгадае и механизма на действие и потенциалната бъдеща употреба при прасетата в промишленото свиневъдство.

Както е описано и при хората, FMT подобрява метаболизма на червата, епителните бариери, производителността на свинете и мукозния имунитет. Увеличението на общия IgA, установено при прасета, трансплантирани с фекална маса от брадавичести свине, подкрепя това наблюдение. Фактът, че IgA и IgA+ плазмените клетки играят ключова роля не само в мукозния имунитет и състава на чревната микробиота, но и регулиращи вродения и адаптивен Т-клетъчен имунитет, може да даде обяснение за защитата срещу вирусните и бактериални инфекции. Като пример, IgA+ клетките са способни да индуцират експресията на IFN-γ, за който е известно, че и двата цитокини играят важна роля в защитата срещу вирусни инфекции като инфекции, предизвикани от ASFV, PRRSV, PCV-2. По-скорошните резултати, получени в лабораторни условия, потвърждават, че трансплантацията на фекален микробиом от брадавичеста свиня на домашни прасета, специфично стимулира мукозния имунитет като с това ново доказателство, в близко бъдеще се планира да се промени интрамускулния модел на ASFV-инокулация в модел за симулиране на контактна инфекция, и респективно увеличаване на възможностите за контрол на ASFV инфекцията на мястото на постъпване, като се използват или атенюирани или вирулентни щамове ASFV.

Изготвил:
Красимира Захариева
Главен експерт в дирекция ОРХВ към ЦОРХВ

Използвана литература:

- https://www.pigprogress.net/Health/Articles/2021/1/Warthog-faecal-microbiota-for-partial-protection-against-ASFv-692136E/
- Fecal microbiota transplantation from warthog to pig confirms the influence of the gut microbiota on African swine fever susceptibility - Jinya Zhang, Fernando Rodríguez, Maria Jesus Navas, Mar Costa-Hurtado, Vanessa Almagro, Laia Bosch-Camós, Elisabeth López, Raul Cuadrado, Francesc Accensi, Sonia Pina-Pedrero, Jorge Martínez & Florencia Correa-Fiz https://www.nature.com/articles/s41598-020-74651-3
- Capsulized faecal microbiota transplantation ameliorates post-weaning diarrhoea by modulating the gut microbiota in piglets - Wenjie Tang, Daiwen Chen, Bing Yu, Jun He, Zhiqing Huang, Ping Zheng, Xiangbing Mao, Yuheng Luo, Junqiu Luo, Quyuan Wang, Huifen Wang and Jie Yu - https://doi.org/10.1186/s13567-020-00779-9
- Faecal microbiota transplantation: is it the future for pig production? - Tanya L Nowland и Roy N Kirkwood
- Parallels between postpartum disorders in humans and preweaning
- piglet mortality in sows. - Daigle, C. (2018), Animals (Basel) 8, 22- doi:10.3390/ani8020022
- Newborn traits associated with pre-weaning growth and survival in piglets. Asian-Australas. J. Anim. Sci. 31, 237–244- Nuntapaitoon, M. et al. (2018) - doi:10.5713/ajas.16.0962
- The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. New Microbes New Infect. 6, 22–29. doi:10.1016/j.nmni.2015.02.007 - Roca, I. et al. (2015)

- The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. BMJ 356, j831. doi:10.1136/bmj.j831 - Young, V.B. (2017)
- Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. J. Mol. Biol. 426, 3892–39066. - Abeles, S.R. and Pride, D.T. (2014) - doi:10.1016/j.jmb.2014.07.002
- How colonization by microbiota in early life shapes the immune system, Science 352, 539–544. - Gensollen, T. et al. (2016) - doi:10.1126/science.aad9378
- Impact of early gut microbiota on immune and metabolic development and function - Wang, M. et al. (eds) (2016)
- An overview of fecal microbiota transplantation: techniques, indications, and outcomes. Brandt, L.J. and Aroniadis, O.C. (2013) - doi:10.1016/j.gie.2013.03.1329
- Potential relevance of pig gut content transplantation for production and research. - Canibe, N. et al. (2019) - J. Anim. Sci. Biotechnol. 10, 55. doi:10.1186/s40104-019-0363-4
- Early intervention with faecal microbiota transplantation: an effective means to improve growth performance and the intestinal development of suckling piglets. - Cheng, C.S. et al. (2019) Animal 13, 533–541. doi:10.1017/S1751731118001611
- Exogenous fecal microbiota transplantation from local adult pigs to crossbred newborn piglets. - Hu, L. et al. (2018) doi:10.3389/fmicb.2017.02663
- Hu, J. et al. (2018) A microbiota-derived bacteriocin targets the host to confer diarrhea resistance in early-weaned piglets. doi:10.1016/j.chom.2018.11.006
- Improvement of feed efficiency in pigs through microbial modulation via fecal microbiota transplantation in sows and dietary supplementation of inulin in offspring. - McCormack, U.M. et al. (2019) doi:10.1128/AEM.01255-19
- Fecal microbiota transplantation is associated with reduced morbidity and mortality in porcine circovirus associated disease - M.C.Niederwerder, et al. (2018) Front. Microbiol. 9, 1631. doi:10.3389/fmicb.2018.01631
- Effect of fecal microbiota transplantation route of administration on gut colonization and host response in preterm pigs. - Brunse, A. et al. (2019) - doi:10.1038/s41396-018-0301-z
- Faecal microbiota transplantation reduces susceptibility to epithelial injury and modulates tryptophan metabolism of the microbial community in a piglet model. - Geng, S. et al. (2018) - doi:10.1093/ecco-jcc/jjy103
- Early Intervention Using Fecal Microbiota Transplantation Combined with Probiotics Influence the Growth Performance, Diarrhea, and Intestinal Barrier Function of Piglets - Quanhang Xiang, Xiaoyu Wu, Ye Pan, Liu Wang, Yuwei Guo, Chenbin Cui, Lingling Hu, Lingling Zhu, Jian Peng, and Hongkui Wei
- Research in Food Safety EFSA webinar

- **Повече информация за всички публикувани проучвания, свързани трансплантация на фекален микробиом може да бъде достъпена на следният линк:** https://read.qxmd.com/keyword/4004/3