

Fodringsstrategi baseret på fermenteret korn og probiotika til forbedring af tarmsundhed og reducere af fravænningsdiarré hos grise - slutrapport

Rådgivningsnotat fra DCA - Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug

Af Nuria Canibe

Institut for Husdyr- og Veterinærvidenskab, AU

Datablad

Titel:	Fodringsstrategi baseret på fermenteret korn og probiotika til forbedring af tarmsundhed og reducere af fravænningsdiarré hos grise - slutrapport
Forfatter:	Seniorforsker Nuria Canibe, Institut for Husdyr- og Veterinærvidenskab, AU
Fagfællebedømmelse:	Lektor Jan Værum Nørgaard, Institut for Husdyr- og Veterinærvidenskab, AU
Kvalitetssikring, DCA:	Specialkonsulent Anna Feldberg Marsbøll, DCA Centerenheden
Rekvirent:	Fødevarestyrelsen
Dato for levering:	14.09.2022
Journalnummer:	2020-0126253
Finansiering:	Finansieringen til AU's projekter i regi af Veterinærforlig III forskningsprojekter hentes delvist fra "Rammeaftalen om forskningsbaseret myndighedsbetjening" indgået mellem Ministeriet for Fødevarer, Landbrug og Fiskeri (FVM) og Aarhus Universitet dækkende perioden fra 2019-2022 og delvist fra midler finansieret af Landbrugsstyrelsen jvf. tilsagn om tilskud til: Forskningsaktiviteter vedr. MRSA jvf. Veterinærforlig III (af 9. december 2019 - journalnummer 33010-NIFA-19-738) og jvf. samarbejdsaftale mellem Aarhus Universitet og Miljø- og Fødevarerministeriet - Fødevarestyrelsen (underskrevet 19. august 2020)
Ekstern kommentering:	Nej
Eksterne bidrag:	Nej
Kommentarer til besvarelse:	<p>Projekterne under Veterinærforlig III har været fulgt af en overordnet styregruppe med deltagelse af de tre forskningsinstitutioner (Aarhus Universitet, Københavns Universitet og Statens Serum Institut) samt Fødevarestyrelsen.</p> <p>Der har været indsendt en statusrapport (leveret: 30.01.2022 - kan ses via dette LINK) samt udgivet en rapport som sammenskriver resultaterne fra den tværfaglige forskningsindsats under Veterinærforlig III (leveret 29.04.2022 - kan ses via dette LINK).</p> <p>Notatet præsenterer resultater, som ved notatets udgivelse ikke har været i eksternt peer review eller er publiceret andre steder. Ved en evt. senere publicering i tidsskrifter med eksternt peer review vil der derfor kunne forekomme ændringer. Resultaterne er offentliggjort ved konferencer.</p>

Citeres som:

Canibe, N. 2022. Fodringsstrategi baseret på fermenteret korn og probiotika til forbedring af tarmsundhed og reducere af fravænningsdiarré hos grise - slutrapport. 13 sider. Rådgivningsnotat fra DCA – Nationalt Center for Fødevarer og Jordbrug, Aarhus Universitet, leveret: 14.09.2022

Rådgivning fra DCA:

Læs mere på <https://dca.au.dk/raadgivning/>

1. Projekttitle

Titel: Fodringsstrategi baseret på fermenteret korn og probiotika til forbedring af tarmsundhed og reducere af fravænningsdiarré hos grise

Forligstema: Veterinærforlig III

2. Resumé

Formålet med projektet var, at undersøge effekten af at fodre med vådfoder baseret på fermenteret korn tilsat probiotika og/eller enzymer fra diegivning til 4 uger efter fravæning. Effekten af foderstrategien blev undersøgt på mavetarmsundhed, immunologisk respons, produktivitet, og specifikt på fravænningsdiarré ved at gennemføre et *E. coli* infektionsforsøg.

1) *In vitro* forsøg

Flere bakterier (9) under forskellige temperatur og tid blev undersøgt i to indledende forsøg. I det sidste forsøg viste *Pediococcus acidilactici* de bedste kombinerede resultater, dvs. voksede op til $\sim 10^9$ cfu/g vådfoder, lavt pH, høj koncentration af mælkesyre og antibakteriel effekt mod colibakterier. Tre kulhydratspaltende enzymer blev testet, men viste ikke nogen effekt på indhold af opløselige, uopløselige og lavmolekylære ikke-stivelsespolysaccharider, og blev derfor ikke inkluderet i strategien. Ud fra disse resultater blev foderet fremstillet på følgende måde: blanding af korn og *P. acidilactici*, inkubering i 24 timer ved 30°C (**FERM**). Fermenteret korn blev blandet med de øvrige foderredienser og justeret med vand til et tørstofindhold på ca. 20% inden fodring.

2) *E. coli* infektionsforsøg

Resultaterne viste ikke nogen effekt af FERM behandling på udskillelse af *E. coli* F4 i fæces. Der blev heller ikke set nogen effekt af behandling på fæces-score (diarré indikator). Andre parametre, der indikerer niveau af immunrespons inkl. akutfaseproteiner, cytokiner og hematologiske parametre, eller epitel barriere funktion (diaminoxidase og LPS i blodet), var generelt ikke signifikant forskellige mellem TØRT (fodret den samme blanding men som tørt) og FERM grupperne.

3) Effekt på tarmsundhed

Ugentlige vejninger viste ingen forskel mellem TØRT og FERM. Den daglige tilvækst var højere i den fjerde uge efter fravæning i FERM gruppen end i TØRT gruppen. Den daglige foderoptagelse var højere den første og fjerde uge efter fravæning i FERM gruppen, og der var en tendens til lavere daglig foderoptagelse den anden uge efter fravæning i FERM gruppen.

Fæces score målt i tre grise per kuld var signifikant højere på dag 35 and 42 i FERM gruppen (jo højere score jo tyndere konsistens). Antallet af *E. coli* bakterier havde en tendens ($P < 0.10$) til at være højere i FERM gruppen på dag 42. Forgrenede fedtsyrer, skatol, indol og cresol koncentration, som alle er produkter af proteolytisk mikrobiel aktivitet, var lavere i FERM gruppen. Resultater fra en test, hvor FITC og mannitol og lactulose blev givet oralt (som en

bolus) viste, at TØRT gruppen ikke havde ødelagt epitel barrier, og der var ingen forskel mellem grupperne.

Resultaterne fra disse forsøg viste ikke væsentlig positiv effekt af den testede strategi på fravænningsdiarré. Nogle resultater pegede på en negativ effekt på tarmsundhed, f.eks. høj fæces score, mens andre pegede på en positive effekt, f.eks, højere tilvækst uge 4 efter fravæning og lavere koncentration af nogle metabolliter fra proteolytisk mikrobiel aktivitet i tyktarmen. Foderoptagelse inden fravæning var lav og nogle faktorer som en bedre placering af truget og bedre adgang til foderet end det, der var tilfældet i dette forsøg, kunne muligvis øge foderoptagelsen og derfor øge en potentielt gavnlig effekt af en strategi baseret på fermenteret vådfoder.

3. Oversigt over projektets samlede resultater

1) *In vitro* forsøg

Ud fra resultaterne fra to indledende forsøg, hvor ni forskellige bakterier blev testet, blev endnu et forsøg gennemført med fire udvalgte bakterier og ét enzymprodukt, og den udvalgte temperatur og inkubationstid.

Fire probiotiske stammer (10^7 cfu/g blanding) og et beta-glucanase-xylanase produkt (Enz) i to doser (1x, 2x) blev tilsat til en blanding af korn og vand (1:2,75): 1) Kontrol; 2) *Lactobacillus farciminis*; 3) *Pediococcus* (P.) *acidilactici*; 4) *P. acidilactici*+Enz-1x; 5) *P. acidilactici*+Enz-2x; 6) *Enterococcus* (E.) *faecium* M74; 7) E. *faecium* 10415; 8) E. *faecium* 10415+Enz-1x; 9) E. *faecium* 10415+Enz-2x. Duplikater blev inkuberet i 1 L bioreaktorer ved 30°C i 48 timer. *P. acidilactici* voksede fra 6.95 log kopier/g ved tid 0 til 9.16 log kopier/g efter 24 timer (**Fig. 1**). E. *faecium* voksede til 8.4 log kopier/g; der kunne dog ikke skelnes mellem de tilsatte stammer og *Enterococcus* i baggrunden. Væksten af *L. farciminis* kunne ikke bestemmes fordi vi ikke fandt en primer specifik for denne bakterie (en primer, som teoretisk burde matche). Efter 24 timer havde *P. acidilactici*-bioreaktorer den laveste pH ($p < 0,05$), og Enterobakterier cfu-tal var reduceret til under detektionsniveauer (sammen med *L. farciminis*). Mælkesyrekoncentrationen var numerisk højere i *P. acidilactici* og *L. farciminis* bioreaktorerne. *L. farciminis* øgede eddikesyrekoncentrationen ($p < 0,05$) og den var høj allerede ved tid 0 (lige efter at korn, *L. farciminis* og vand var blev blandet og omrørt i få minutter). Analysen af *L. farciminis* produktet viste, at det indeholdt en meget høj koncentration af eddikesyre udover bakterien. Biogene aminer koncentrationen var lavere ($p < 0,08$) i alle undtagen behandling 9 sammenlignet med kontrollen. Tilsætning af enzymet påvirkede ikke indholdet af opløselige, uopløselige og lavmolekylære ikke-stivelsespolysaccharider. Tilsammen viste *P. acidilactici* de mest gavnlige egenskaber og blev derfor valgt. Ud fra disse resultater blev fermenteret korn til *in vivo* forsøgene fremstillet på følgende måde: blanding af korn og *P. acidilactici*, inkubering i 24 timer ved 30°C (FERM) og uden enzym. Der blev lavet nogle tests med vådfoderanlægget inden *in vivo* forsøgene, hvor den mikrobiologiske kvalitet af fermenteret korn blandet med de øvrige foderingsredienser blev analyseret. Resultaterne viste gode egenskaber, inkl. høj mælkesyre- og relativ lav koncentration af biogene aminer, og lavt antal af Enterobacteria.

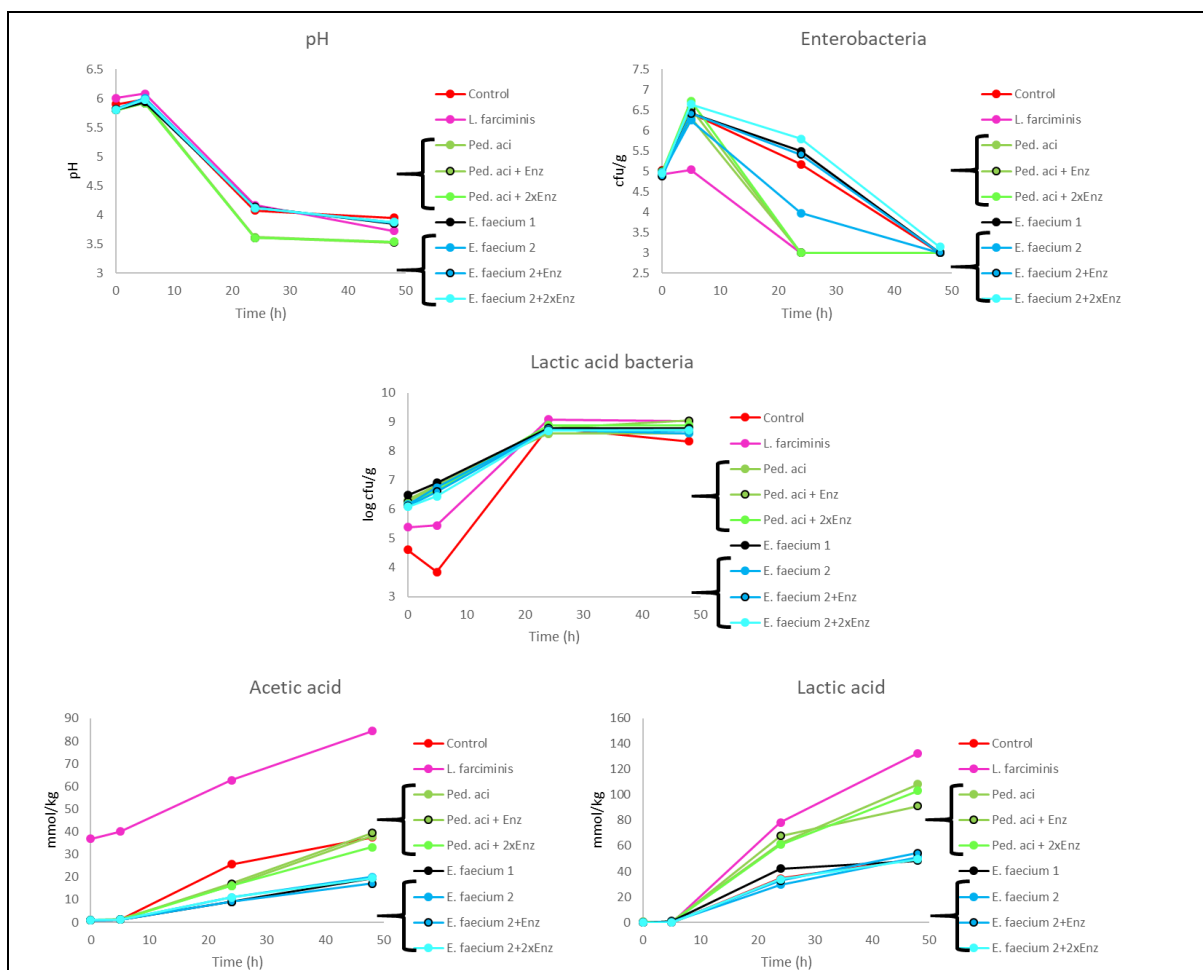


Fig 1. pH, antal af Enterobacteria og mælkesyrebakterier, og koncentration af eddikesyre og mælkesyre i kornblandingen tilsat eller ej probiotika og enzym under inkubering i 48 timer ved 30°C.

2) *E. coli* infektionsforsøg

De *E. coli* F4 challenged grupper havde signifikant ($P < 0.05$) højere antal af *E. coli* F4 i fæces den første uge efter fravæning sammenlignet med de ikke-challenged grupper og nåede de højeste niveauer mellem dag 2 til 5 efter challenge, dvs. 7.62 og 8.39 cfu/ g fæces i forhold til niveauer under detektionsgrænsen på 5 log cfu/ g på dag 0, hvorefter de faldt til niveauer mellem 5.36-5.79 på dag 7 i begge grupper (**Fig. 2**). Der blev ikke observeret signifikante forskelle i niveauerne af *E. coli* F4, tørstof eller score i fæces mellem de challenged grupper TØRT+ og FERM+. Fæces score over 3 (betragtet som diarré) blev målt på dag 3 og dag 6 hos TØRT+ gruppen og dag 4 hos FERM+ gruppen, desuden havde FERM- en score over 3 på dag 6. Der blev ikke målt signifikante forskelle mellem disse to grupper med hensyn til niveauet af plasma haptoglobin og C-reaktivt protein, hæmatologiske parametre eller parametre relateret til epitelbarriere, dvs. plasmaniveauer af diaminoxidase (DAO) og lipopolysaccharid (LPS). Niveauerne af cytokinerne IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-10, og TNF- α var ikke forskellige mellem TØRT+ og FERM+ grupperne. IL-12 koncentration var højere i FERM+ end i TØRT+ på dag 0 og 3. Der var ikke forskel på daglig tilvækst mellem grupperne, mens

effekt af foder havde en signifikant effekt ($P < 0.05$) på foderoptagelse den første uge efter fravæning med højere værdier for de to grupper fodret med FERM foder (168, 97, 183, 101 g/d for TØRT-, TØRT+, FERM- og FERM+). Værdierne i de to resterende uger var også numerisk højere for de to grupper fodret med fermenteret foder, men ingen signifikant forskel blev påvist.

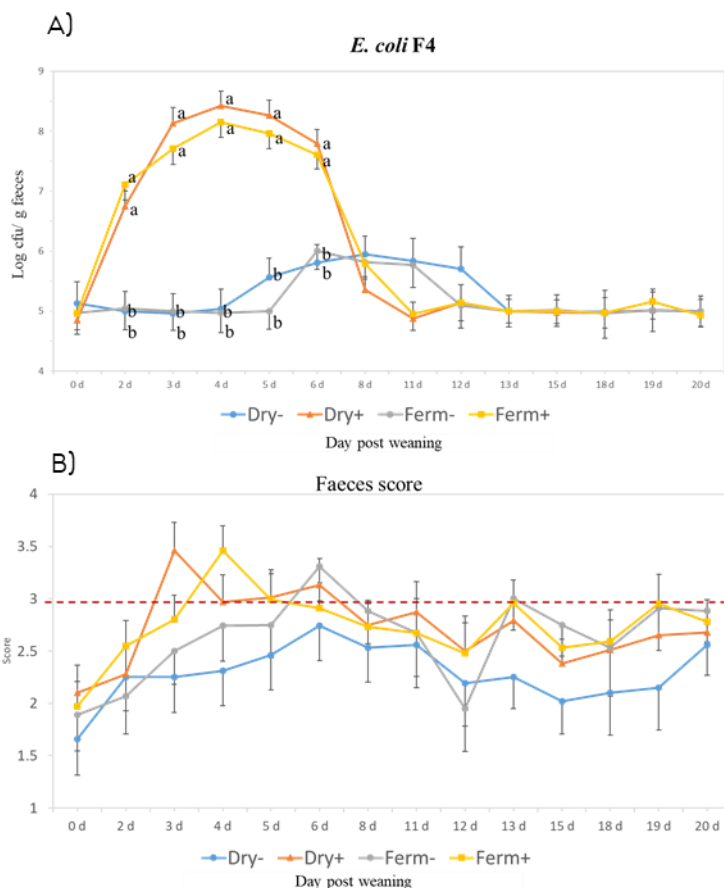


Fig. 2. Fæces udskillelse af *E. coli* F4 (A) og fæces score B) hos grisene i de fire grupper. En skala fra 1 til 7 blev anvendt til at score fæces prøverne, og en score over 3 betragtes som diarré. ^{a,b} $P < 0.05$.

3) Effekt på tarmsundhed

I dette delforsøg af projektet var der to grupper FERM og TØRT (ingen challenged grupper). Resultaterne viste at foderoptagelse inden fravæning var meget lille i begge grupper. Denne observation blev understøttet af farven på fæces prøverne taget fra tre grise per kuld. Der blev tilsat kromoxid til foderet for at kunne undersøge om grisene havde spist inden fravæning (fæces med grøn farve indikerer at foder er blevet optaget). Inden fravæning var ingen af fæces prøverne grøn/grønlig farve, hvorimod efter fravæning var næsten alle prøver grønne. Ugentlige væjninger af tre grise fra kuld (de samme grise som fik taget ugentlige blod- og fæces prøver) var ikke forskellige i de to grupper. Den daglige tilvækst var højere i den fjerde uge i FERM gruppen end i TØRT gruppen (559 versus 374 g/d).

Fæces score målt i de tre grise per kuld var signifikant højere på dag 35 og 42 i FERM gruppen (score over 3 klassificeres som diarré) (**Fig. 3**). Antal af *E. coli* bakterier havde en tendens ($P < 0.10$) til at være højere i FERM gruppen på dag 42. Der var ingen forskel i antal mælkesyrebakterier i fæces, mens antal af *P. acidilactici* var signifikant højere i FERM gruppen fra dag 28. Angående den mikrobielle sammensætning, var B-diversitet i mave, tyndtarm, blindtarm og midt-colon signifikant forskellige mellem grupperne. Koncentration af mælkesyre i maven havde en tendens ($P < 0.10$) til at være højere i FERM gruppen (35.1 mmol/kg) end i TØRT gruppen (14.7 mmol/kg). Koncentration af de forgrenede fedtsyrer, skatol, indol og cresol, som alle er produkter af proteolytisk mikrobiel aktivitet, var lavere ($P < 0.05$ eller $P < 0.10$) i colon i FERM gruppen. Ammoniak, og biogene aminer i mavetarmkanalen var ikke forskellige mellem grupperne.

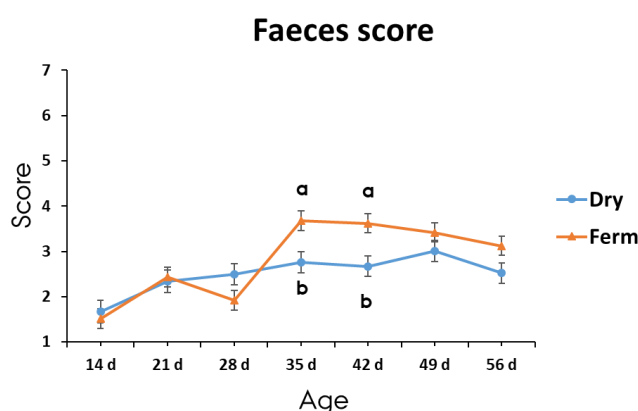


Fig 3. Faeces score fra tre grise per kuld i de to grupper. En skala fra 1 til 7 blev anvendt til at score fæces prøverne, og en score over 3 betragtes som diarré. ^{a,b} $P < 0.05$

Der var ikke forskel på brush border enzymer eller pankreas enzymer mellem grupperne ($P > 0.05$). FITC og sukre testen, der blev brugt til at undersøge effekten af FERM på epitelbarriere viste ingen effekt. Der blev ikke påvist mannitol i nogen plasma prøver, hvilket indikerer at TØRT gruppen ikke havde en 'leaky' tarm (ødelagt epitelbarriere), hvilket er et udgangspunkt, der gør det svært, at skabe en forbedring.

4. Diskussion og konklusion af resultaterne

1) *In vitro*- forsøg

Selvom *L. farciminis* viste gode resultater på flere parametre, havde produktet et meget højt indhold af eddikesyre, hvilket ikke er ønskeligt i foderet, fordi det anses for risiko for lav foderoptagelse pga. bidrag til forringet smag. Derudover, kunne vi ikke detektere denne bakterium med den primer, som burde detektere den. Dette betyder, at vi ikke kunne være sikre på, hvilken bakterium der var i produktet. Derfor blev *L. farciminis* produktet ikke valgt til næste forsøg. Ud fra parametre som lav pH, høj koncentration af mælkesyre og moderat koncentration af eddikesyre, samt lave antal coliforme bakterier, blev *P. acidilactici* valgt til in vivo forsøgene. Disse parametre betragtes som årsagen til det lave antal observerede Enterobakterier i tarmen hos grise fodret med fermenteret vådfoder i forhold til tørfoder (van Winsen et al., 2001; Canibe and Jensen 2003; 2012). Vi har tidligere set effekt af tilsætning af enzymer til vådfoder på NSP opløselighed (Jakobsen et al., 2015). I nærværende forsøg så vi ingen effekt og derfor blev enzymer ikke tilsat i *in vivo* forsøgene.

2) Infektionsforsøg med *E. coli* F4

Det højere antal af *E. coli* F4 i fæces hos TØRT+ og FERM+ grisene i forhold til TØRT- og FERM- grisene den første uge og det meget lave antal *E. coli* F4 hos de ikke-challenged grise viser, at infektionsforsøget virkede korrekt. På samme måde blev der påvist diarré i begge challenged grupper 3-4 dage efter challenge. Foderoptagelsen var også numerisk reduceret i de to challenged grupper. Alle disse parametre indikerer, at grisene blev påvirket af challenge.

Der var ikke forskel mellem grupperne fodret med fermenteret eller tørt foder på langt de fleste analyserede parametre, og det kan derfor konkluderes, at resultaterne af dette forsøg ikke viste en gavnlig effekt af FERM behandling sammenlignet med TØRT i forhold til risiko for fravænningsdiarré og ændringer observeret i relation til fravænningsdiarré (f. eks. epitel barriere, immun respons).

3) Effekt på tarmsundhed

En højere fæces score hos FERM grisene på flere tidspunkter efter fravæning og antal af total *E. coli* på dag 42 tyder i dette forsøg på en højere risiko for diarré hos FERM gruppen. Ingen af grisene havde dog behov for antibiotikabehandling. Disse resultater var ikke forventet og er svære at forklare ud fra den mikrobiologisk sammensætning af foderet. På den anden side, voksede grisene i FERM gruppen mere end i TØRT gruppen, specielt den fjerde uge efter fravæning. Endvidere havde grise fodret med FERM lavere koncentration af metabolitter fra mikrobiel protein fermentering i tyktarmen (forgrenede fedtsyrer, skatol, indol og cresol), som i høje koncentrationer kan være skadelige for tarmen. En lav koncentration af metabolitter fra proteolytisk mikrobiel aktivitet anses derfor som gavnlig i relation til tarmsundhed. Men der findes ikke data i litteraturen på hvor høje koncentrationer skal være for at påvirke tarmsundhed negativt.

Generelt:

En hypotese i dette forsøg var at grisene vil spise mere foder inden fravæning når de var fodret med FERM i forhold til TØRT. Det er svært at måle foderoptagelse før fravæning, men observationerne viste en meget lille foderoptagelse i begge grupper. Dette blev understøttet af, at vi ikke så grønne fæcesprøver inden fravæning efter at kromoxid havde været tilsat foderet. En blandt flere forklaringer, kan være, at fodertruget, hvor vådfoder blev fodret, ikke var tæt på soens trug, som kan stimulere foderoptagelse hos smågrisene (Oostindjer et al., 2011) og var omringet af metalgitter for at forhindre søerne i at spise foderet. Et bedre stidesign, hvor grisene har nemmere adgang til vådfoderet, kunne angiveligt føre til en højere foderoptagelse inden fravæning og derved til en formodet positiv effekt af fodringsstrategien testet i dette projekt.

Referencer

Canibe, N., and B. B. Jensen. 2003. Fermented and nonfermented liquid feed to growing pigs: Effect on aspects of gastrointestinal ecology and growth performance. *Journal of Animal Science* 81: 2019-2031.

Canibe, N., and B. B. Jensen. 2012. Fermented liquid feed-Microbial and nutritional aspects and impact on enteric diseases in pigs. *Animal Feed Science and Technology* 173: 17-40.

van Winsen, R.L., Urlings, B.A.P., Lipman, L.J.A., Snijders, J.M.A., Keuzenkamp, D., Verheijden, J.H.M., van Knapen, F., 2001. Effect of fermented feed on the microbial population of the gastrointestinal tracts of pigs. *Applied and Environmental Microbiology* 67, 3071-3076.

Oostindjer, M., Bolhuis, J.E., Mendl, M., Held, S., van den Brand, H., Kemp, B., 2011. Learning how to eat like a pig: Effectiveness of mechanisms for vertical social learning in piglets. *Animal Behaviour* 82, 503-511.

4a. Perspektivering

Fodring med fermenteret vådfoder hvor alle ingredienser bliver fermenteret, har tidligere vist en reduktion af Enterobakterier i tarmen hos grise (van Winsen 2001, Canibe and Jensen 2003, 2012). pH bliver højere, og koncentrationen af syrer bliver lavere når kun kornet fermenteres og blandes med de resterende ingredienser, hvilket resulterer i en mindre antibakteriel effekt. Udfordring med at fermentere hele blandingen kan være nedbrydning af syntetiske aminosyrer og en negativ effekt på foderoptagelse hvis blandingen fermenteres for meget. Derfor, på baggrund af litteraturen, kan fermentering af foder have potentiale til at bidrage med en antibakteriel effekt og stimulere foderoptagelse pga. konsistensen i forhold til tørt foder. Der skal dog findes den rette balance mellem den nærings- og mikrobiologiske kvalitet for at optimere resultatet.

5. Beskrivelse af projektets formål og hypoteser

Formålet med dette projekt var, at undersøge effekten af en foderstrategi til smågrise på fravænningsdiarré og tarmsundhed baseret på vådfoder indeholdende fermenteret korn og optimeret med tilsætning af probiotika og/eller enzymer fodret fra diegivningsperioden og til fire uger efter fravæning.

Hypotesen var at grise, der fik tildelt fermenteret foder:

- havde en lavere risiko for fravænningsdiarré målt i *E. coli* challenge forsøg
- havde en bedre tarmsundhed ved at have en mere gunstig mikrobiotasammensætning i tarmen, inklusiv et lavere antal colibakterier, og en bedre profil af mikrobielle metabolitter, bedre epitel barrier funktion, og immun respons, sammenlignet med grise fodret med det samme foder fodret som tørt.

6. Beskrivelse af projektets materialer og metoder

Projektet var delt i tre dele:

1) *In vitro* forsøg

In vitro tests blev gennemført for at identificere i) et probiotikum der vokser betydeligt under fermentering af korn (70% hvede + 20% byg +10% havregryn) og forbedrer den mikrobiologiske kvalitet af blandingen, og ii) et enzym, der øger den fermenterbare fiberdel. Testen blev gennemført i bioreaktorer med en volumen på 1 L. Først, blev et forsøg gennemført, hvor 8 forskellige bakterier og 3 forskellige kulhydratspaltende enzymprodukter testet med en inkuberingstemperatur på 20°C og med backslopping (en del af den foregående blanding bruges som podning til den næste). Respons parametre var pH, antal af mælkesyrebakterier, coliforme bakterier, enterococci, og gær; og koncentration af organiske syrer og biogene aminer. Fra dette forsøg, blev fire bakterier udvalgt og et andet forsøg blev kørt med en inkuberingstemperatur på 30°C og med backslopping. Ud fra disse resultater blev gennemført et nyt forsøg med de fire bakterier og i kombination med to doser af et kulhydratspaltende enzym produkt, beta-glucanase-xylanase. Temperaturen var 30°C og inkubationstiden 48 t uden backslopping. De samme parametre som i første forsøg, blev analyseret i de to sidste forsøg.

2) *E. coli* infektionsforsøg

To standard smågriseblandinger (6 til 9 kg og 9 til 15 kg) blev formuleret og fodret henholdsvis den første uge og de følgende to uger efter fravæning. Fire behandlinger blev designet: 1) Tørt ikke-challenged (**TØRT-**); 2) Tørt challenged (**TØRT+**); 3) Fermenteret ikke-challenged (**FERM-**); 4) Fermenteret challenged (**FERM+**). Gruppe 1 og 2 blev fodret diæterne i tør form, og gruppe 3 og 4 som vådfoder, hvor kornet var blevet fermenteret efter metoden beskrevet efter *in vitro* forsøgene. Fermenteret korn blev fremstillet ved at lave en blanding af hvede og byg tilsat 10^6 cfu *P. acidilactici*/g tørt korn blandet med vand og inkuberet i 24 timer ved 30°C. Det fermenterede kornprodukt blev derefter blandet med de resterende ingredienser af foderet, før det blev tilbudt til smågrisene. Grisene havde fået FERM eller TØRT foder fra dag 14 i farestalden og forsat med samme behandling efter fravæning.

I alt 46 smågrise fra 15 søer blev inkluderet (gruppe 1 og 3, n=8, gruppe 2, n=14, gruppe 4 n=16) og opstaldet parvis. På dag 1 og 2 efter fravænning (28 dage) blev TØRT+ og FERM+ grupper podet oralt med 5×10^9 cfu *E. coli* O149 ST2, LT2, F4ac/ml. Grupperne TØRT- og FERM- fik den samme mængde saltvand som placebo. Fæcesprøver blev indsamlet direkte fra endetarmen hver dag i den første uge og hver anden dag de resterende to uger. Blodprøver blev taget ved punktering af halsvenen på dag 0 (fravænningsdag) og 3 og 13 efter challenge. Antal *E. coli* F4, faeces score og tørstof blev målt i fæcesprøverne. Hematologi og koncentration af cytokiner, akutfase proteiner (CRP og haptoglobin), diamine oxidase og LPS blev analyseret i blodprøverne. Individuel vægt og foderoptagelse i stierne blev registreret.

3) Effekt på tarmsundhed

Grise fra de samme kuld (17 kuld i alt) som blev anvendt i *E. coli* infektionsforsøget blev også anvendt her. Der blev lavet to grupper: 1) **FERM** og 2) **TØRT**. Alle grise var blevet tilbudt deres respektive foder fra dag 14 og fortsatte med den samme behandling til dag 56 (4 uger efter fravænning). En gris per kuld blev aflivet på dag 6 efter fravænning for at teste effekten af behandling på epitel barrieren. Dette blev testet ved at tage en blodrøve inden og 4 timer efter at en bolus indeholdende manitol, lactulose og fluorescein-5-isothiocyanate (FITC) blev givet til grisene. En gris fra hvert kuld blev slagtet på dag 7 efter fravænning for at tage prøver fra tarmindehold og undersøge parametre relateret til tarmsundhed. Prøver fra forskellige dele af tarmen blev analyseret for total antal bakterier, total *E. coli* og *P. acidilactici* ved qPCR; mikrobiota sammensætning ved 16S rRNA amplicon sekventering, mikrobielle metabolitter (organiske syrer, biogene aminer, indoler, ammonia), og genekspression af cytokiner, tight junctions og gener relateret til næringsstofabsorption i tarmmukosa. Aktiviteten af pankreas og brush border enzymer blev også analyseret. Desuden blev der taget ugentlige blod- og fæcesprøver fra 3 grise per kuld fra dag 14 til dag 56. Vægt og foderoptagelse blev registreret ugentligt.

7. Projektstart og afslutning

Projektets startdato: 1/5/2018 Projektets slutdato: 31/3/2021

8. Kontaktperson på projektet

Seniorforsker Nuria Canibe,
Aarhus Universitet, Blichers Allé 20, Tjele
Tlf. 87158058

Nuria.Canibe@anis.au.dk

9. Offentliggørelse

- Et abstrakt er blevet sendt til 15th International Symposium on Digestive Physiology in Pigs, 17 – 20 May 2022, Rotterdam, med titlen ‘*Using probiotics and enzymes to improve liquid fermented feed for piglets*’.

<https://doi.org/10.1016/j.anscip.2022.03.358>

- Et abstrakt er blevet sendt til Zero Zinc Summit 2022-Healthy weaning without antibiotics, 22-23 June 2022, Copengagen, men titlen ‘*Liquid fermented cereals added probiotics to reduce post-weaning diarrhoea in pigs - an E. coli challenge study*’

<https://medialib.cmcdn.dk/medialibrary/EC265C2F-44D0-479F-90EA-B518CE821BD7/653404A5-87F7-EC11-84B6-00155D0B0940.pdf>

- Peer reviewed paper: Effekt af foderstrategien på diarré og relateret parametre i en *E. coli* challenge forsøg (Planlagt submission Oktober 2022)
- Peer-reviewed paper: Effekt af foderstrategien på tarmmikrobiota og aktivitet, og tarmsundhed (Planlagt submission April 2023)

De to papers vil indgå i en PhD afhandling (Jiajia Xu)