



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Utvecklingen av bakteriefloran i magtarmkanalen hos kalvar

Jenny Augustsson

*Uppsala
2016*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2016:33*

Utvecklingen av bakteriefloran i magtarmkanalen hos kalvar

Development of the microflora in the gastrointestinal tract of calves

Jenny Augustsson

Handledare: Johan Dicksved, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Biträdande handledare: Bengt-Ove Rustas, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examinator: Kjell Holtenius, Institutionen för husdjurens utfodring och vård

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0755

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2016

Delnummer i serie: Examensarbete 2016:33

ISSN: 1652-8697

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Tarmflora, kalvar, T-RFLP, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus*, Segmenterade filamentösa bakterier

Key words: Gut flora, calves, T-RFLP, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus*, Segmented Filamentous Bacteria

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för husdjurens utfodring och vård

SAMMANFATTNING

Syftet med studien var att undersöka hur tarmfloran hos kalvar varierar med ålder och segment i magtarmkanalen samt att undersöka förekomsten av *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. och segmenterade filamentösa bakterier (SFB). Tidigare studier har visat att dessa bakterier har viktiga funktioner för utvecklingen av immunförsvaret i tarmen hos vissa däggdjur samt för försvaret mot kolonisation av patogener. Bakteriefloren i magtarmkanalen hos unga kalvar är hittills väldigt lite studerad.

Fem kalvar avlivades och provtogs vid en ålder av 2 dagar och fyra kalvar vid 7 dagars ålder. Från dessa kalvar samlades prov från slemhinnan/epitelet i abomasum, rumen, duodenum, ileum, cecum och colon samt träck. Ytterligare träckprover togs från andra kalvar vid en ålder av 2, 7, 14 och 28 dagar samt vid avvänjning och vid 6 månaders ålder. Bakteriefloren karakteriserades med hjälp av T-RFLP-analys (terminal restriction fragment length polymorphism) av genen som kodar för 16S ribosomalt RNA, där T-RFLP användes för att få en profil över bakteriefloren. Dessutom användes PCR för att specifikt detektera *F. prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. och SFB.

Resultaten visar att bakteriefloren varierar med åldern och att floren i prover från samma segment av magtarmkanalen hos olika individer liknade varandra mer än prover från olika segment inom samma kalv. *Lactobacillus* spp. och *F. prausnitzii* förekom hos samtliga kalvar från och med 7 dagars ålder. SFB påvisades i träckprover från flera kalvar från 28 dagars ålder och uppåt men inte i några vävnadsprover. Tarmfloran hos kalvar utvecklas med åldern, varierar med olika segment i magtarmkanalen och innehåller bakterier som kan vara viktiga för kalvens hälsa.

SUMMARY

The aim of this study was to investigate how the intestinal flora of calves varies with age and localization within the gastrointestinal tract. In addition, the presence of *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* spp., Segmented Filamentous Bacteria (SFB) was investigated. Earlier studies have shown that these bacteria have important functions for the development of local immune defense in other mammals and for the protection against pathogen colonization. The intestinal flora of young calves is so far not well investigated.

Five calves were euthanized at the age of 2 days and four at the age of 7 days. From these calves scrapings from the mucosa of the abomasum, rumen, duodenum, ileum, cecum and colon as well as feces were collected. Additional fecal samples were collected from other calves at the age of 2, 7, 14 and 28 days, at weaning and at 6 months of age. The intestinal flora was characterized by T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) analysis of the gene that encodes for 16S ribosomal RNA and T-RFLP was used to generate a profile of the gut flora. PCR was used to specifically detect *F. prausnitzii*, *Lactobacillus* spp., and SFB.

The results show that the intestinal flora varies with age and that the flora in the same segment of the gastrointestinal tract have higher similarity to the same segment in other calves compared to different segments within one calf. *Lactobacillus* spp. and *F. prausnitzii* were found in all calves 7 days and older while SFB was found in several fecal samples from calves aged 28 days and older but in no tissue samples. The intestinal flora of calves develops with age, varies with different segments in the gastrointestinal tract and contains bacteria that can be important for calf health.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	2
Bakteriefloran och dess betydelse för hälsa	2
Bakteriefloran hos kalvar	2
Gynnsamma bakteriegrupper	3
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	3
<i>Lactobacillus</i> spp.....	3
Segmenterade filamentösa bakterier	4
Metoder för att studera tarmfloran	5
MATERIAL OCH METODER.....	6
Provtagning	6
DNA-extraktion.....	6
Polymerase chain reaction.....	7
T-RFLP.....	8
Sekvensering	8
Odling.....	8
Statistik.....	8
RESULTAT	9
T-RFLP.....	9
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	14
<i>Lactobacillus</i> spp.....	14
Segmenterade filamentösa bakterier	15
Odling.....	15
DISKUSSION	16
Slutsats	18
REFERENSER.....	19

INLEDNING

Redan tidigt i livet läggs grunden som avgör om en kviga kommer kunna producera maximalt under sin livstid. En kalv som är frisk under uppväxten har en högre tillväxt vilket leder till ökad mjölkproduktion senare i livet (Soberon *et al.*, 2012). Mag-tarm-sjukdomar är en av de vanligaste dödsorsakerna hos unga kalvar i Sverige (Svensson *et al.*, 2006) och man letar ständigt nya metoder för att förebygga sjukdom. En faktor som tros vara viktig för kalvars hälsa är sammansättningen av bakteriefloran i tarmen.

Bakteriefloran i tarmen har flera viktiga uppgifter, exempelvis kan tarmfloran skydda mot sjukdomsframkallande mikroorganismer, den har även en metabolisk funktion och dessutom bidrar den till utvecklingen av immunförsvaret i tarmen. Vissa bakteriegrupper har särskilt viktiga funktioner. Exempel på sådana bakterier är segmenterade filamentösa bakterier (SFB) som bidrar till utvecklingen av immunförsvaret i tarmen (Talham *et al.*, 1999) och är ett viktigt skydd mot kolonisation av patogener (Heczko *et al.*, 2000; Garland *et al.*, 1982), *Faecalibacterium prausnitzii* som verkar antiinflammatoriskt i tarmen (Sokol *et al.*, 2008; Segain *et al.*, 2000) och *Lactobacillus* spp. som setts skydda mot infektion av bland annat *Escherichia coli* och *Salmonella typhimurium* (Shu & Gill, 2002; Hudault *et al.*, 1997).

Laktobaciller används ofta som probiotika vilket definieras som ”tillskott av levande mikroorganismer som i tillräcklig mängd har en positiv effekt på hälsan” (Guarner & Schaafsma, 1998). Donovan *et al.* (2002) jämförde tillväxt, foderåtgång och frekvens av diarré hos kalvar som fått antibiotika i förebyggande syfte och kalvar som istället fått probiotika. I studien såg man ingen skillnad mellan grupperna på någon punkt.

Tarmfloran hos kalvar är i dagsläget inte väl utforskad och de studier som gjorts har framför allt fokuserat på bakteriefloran i träck. Malmuthuge *et al.* (2012) visade att bakteriefloran i tarminnehållet skiljer sig från den som finns på slemhinnan/epitelet, dessutom varierar bakteriefloran mellan olika avsnitt i tarmen (Malmuthuge *et al.*, 2014) vilket gör att träckprover är otillräckliga för att fullständigt kartlägga tarmfloran.

Syftet med denna studie var att kartlägga bakteriefloran i mag-tarmkanalen (MTK) hos kalvar med hjälp av en DNA-profilerings-metod, terminal-restriction length polymorphism (T-RFLP) för att se hur den varierar med ålder och segment i MTK. Dessutom undersöktes i vilken utsträckning tre specifika bakteriegrupper, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. samt segmenterade filamentösa bakterier (SFB), förekom och vid vilka åldrar samt på vilka platser i MTK.

LITTERATURÖVERSIKT

Bakteriefloran och dess betydelse för hälsa

Fostret anses vara sterilt innan förlossningen för att sedan koloniserar av bakterier från modern vid förlossningen och tiden efter (Mackie *et al.*, 1999). Det finns dock studier på möss och människor som antyder att det kan finnas bakterier både i fostervätskor och i tarmbeck (mekonium) hos friska foster vilket skulle betyda att fostren kommer i kontakt med bakterier redan i livmodern (Jimenez *et al.*, 2008; Jimenez *et al.*, 2005).

En mycket viktig roll mikroberna har hos idisslare är att de möjliggör utnyttjandet av växtfibrer för energi och andra näringsämnen. Mikroberna i rumen producerar enzymer som gör att de kan bryta ner växtpartiklar och använda dem för sin tillväxt, denna process sker till stor del utan tillgång på syre och kallas fermentation. Vid fermentationen bildas biprodukter som kan användas av värdjuret. Till exempel bildas de flyktiga fettsyrorna propionat, acetat och butyrat som utgör viktiga energikällor för idisslare. De bakterier som dör förs vidare till tunntarmen där de bryts ner och blir en viktig källa till protein (Sjaastad *et al.*, 2010).

Viktiga funktioner hos tarmfloran är att den kan syntetisera vitaminer som värden inte själv kan bilda (Deguchi *et al.*, 1985) och att den genom fermentation av vissa kolhydrater ökar biotillgängligheten och absorptionen av calcium och magnesium (Younes *et al.*, 2001).

Mikroberna i tarmen bildar dessutom ett skydd mot kolonisation av patogener genom att konkurrera om platser för att binda in till slemhinnan (Heczko *et al.*, 2000; Bernet *et al.*, 1994; Garland *et al.*, 1982) och genom att konkurrera om tillgängliga näringsämnen (Hooper *et al.*, 1999). Vissa bakteriestammar verkar även kunna producera och utsöndra substanser som verkar antibakteriellt på patogener (Lievin *et al.*, 2000).

Tarmfloran bidrar till utvecklingen av immunsystemet i slemhinnan. När bakteriefria möss koloniserar av tarmbakterier ökar antalet lymfocyter i slemhinnan (Umesaki *et al.*, 1993), Peyerska plack växer till och man får en ökad produktion av IgA (Shroff *et al.*, 1995).

Bakteriefloran hos kalvar

Bakteriefloran hos kalvar skiljer sig från den hos vuxna idisslare både vad gäller diversitet och totalantal bakterier (Uyeno *et al.*, 2010). Under de första veckorna i livet ökar diversiteten och totalantalet bakterier i tarmen (Edrington *et al.*, 2012; Uyeno *et al.*, 2010) och man ser att sammansättningen av tarmfloran förändras från att passa en enkelmagad individ som äter mjölk till att passa en idisslare som äter mycket fibrer. Tidigt är bakteriefloran till viss del fakultativt anaerob men går sedan över till att bli mer strikt anaerob (Uyeno *et al.*, 2010).

Det finns också vissa likheter mellan bakteriefloran hos kalvar och hos vuxna idisslare, till exempel ser man redan tidigt att *Firmicutes* och *Bacterioides* är de fylum som dominerar (Edrington *et al.*, 2012; Uyeno *et al.*, 2010) och dessa fylum dominerar även hos vuxna idisslare (Ozutsumi *et al.*, 2005).

Mayer *et al.* (2012) undersökte hur bakteriefloran i träck förändrades hos kalvar från födseln till 42 dagars ålder. Man såg att *Leuconostoc* spp., som var en av de dominerande

bakteriegrupperna direkt efter födseln, snabbt minskade för att efter 24 timmar inte längre kunna påvisas. Detta gällde också flera andra bakteriegrupper som försvann från florans under de första dagarna. Bakteriefloren gick från att domineras av mjölksyrabakterier till att domineras av coliforma bakterier. Efter 7 dagars ålder var diversiteten så stor att det var svårt att se några tydliga trender i utvecklingen.

Även Lukas *et al.* (2007) undersökte hur bakteriefloren utvecklas hos kalvar och fann i sitt försök att de första som koloniserade tarmen var *E. coli*, *Bifidobacterium animalis* och *F. prausnitzii*.

Mayer *et al.* (2012) undersökte också om genetiken påverkar sammansättningen av tarmfloran genom att jämföra tvillingar med varandra och med andra kalvar. Det visade sig att likheten var större mellan bakteriefloren hos två tvillingar än mellan en tvilling och en annan kalv i samma miljö.

Gynnsamma bakteriegrupper

Faecalibacterium prausnitzii

Faecalibacterium prausnitzii är en gram-negativ, strikt anaerob och icke mobil stavformad bakterie (Duncan *et al.*, 2002). Bakterien tillhör fylumet *Firmicutes* som har visats vara en av de vanligast förekommande bakteriegrupperna i magtarmkanalen hos kalvar (Oikonomou *et al.*, 2013). Oikonomou *et al.* (2013) visade att förekomst av *F. prausnitzii* under den första levnadsveckan var associerat till en högre tillväxt och lägre frekvens diarré under de första veckorna i livet.

Bakterien använder acetat som substrat och producerar bland annat butyrat (Duncan *et al.*, 2002). Den största delen av det butyrat som produceras används av colonocyterna för energiförsörjning (Roediger, 1980).

F. prausnitzii kan verka antiinflammatoriskt i tarmen genom att stimulera produktionen av det anti-inflammatoriska cytokinet IL-10 samt hämma aktiveringen av NF- κ B och sekretionen av IL-8 som båda är pro-inflammatoriska. Detta har gjort att man ser en potential hos *F. prausnitzii* att fungera som probiotika vid inflammatoriska tarmsjukdomar hos människa (Sokol *et al.*, 2008), särskilt eftersom bakterien ofta finns hos friska individer men saknas hos patienter med inflammatorisk tarmsjukdom. Butyrat som produceras av bakterien har i sig en anti-inflammatorisk effekt genom att hämma aktiveringen av NF- κ B (Segain *et al.*, 2000).

***Lactobacillus* spp.**

Lactobacillus spp. är grampositiva, fakultativt anaeroba stavar som tillhör fylumet *Firmicutes*. Det finns många arter av laktobaciller och de tillhör gruppen mjölksyraproducerande bakterier dit även genus som *Leuconostoc*, *Lactococcus* och *Streptococcus* hör. De tillhör normalfloran hos kalvar och är en av de första bakterierna som koloniserar mag-tarmkanalen efter födseln (Mayer *et al.*, 2012). Bakteriefloren utvecklas efterhand till att bli mer strikt anaerob och laktobacillerna minskar då i antal (Uyeno *et al.*, 2010).

Lactobacillus spp. har flera positiva effekter på hälsan och används som probiotika både till djur och människor. Till exempel har de setts lindra effekterna av infektion med *Salmonella typhimurium* (Hudault *et al.*, 1997) och *E. coli* (Shu & Gill, 2002) hos möss. Hos kalvar har man sett att tillskott av *Lactobacillus* spp. gör att de får en högre tillväxt och minskad frekvens diarré jämfört med kalvar som inte fått tillskottet (Kawakami *et al.*, 2010; Abe *et al.*, 1995).

Laktobacillerna har också stimulerande effekter på immunförsvaret i tarmen. Probiotika innehållande laktobaciller har setts öka aktiviteten hos T-celler och natural killer-celler (NK-celler) samt öka produktionen av cytokiner (Qadis *et al.*, 2014; Dong *et al.*, 2010).

För att fungera som probiotika måste bakteriestammen i fråga uppfylla vissa kriterier. Maldonado *et al.* (2012) undersökte vilka mjölksyraproducerande bakterier som skulle fungera som probiotika utifrån några sådana kriterier. Exempelvis undersökte man bakteriernas förmåga att adherera till slemhinnan, att växa i närvaro av gallsyror samt förmågan att producera antibakteriella substanser. Flera laktobaciller uppfyllde kriterierna, bland annat specifika stammar av *L. johnsonii*, *L. mucosae* och *L. salivarius* ansågs ha potential som probiotika.

Segmenterade filamentösa bakterier

De segmenterade filamentösa bakterierna (SFB) är fylogenetiskt klassade som *Candidatus artromitus*. De är gram-positiva, filamentösa bakterier vars ena segment har en struktur som kan fästa till epitelcellerna i tarmen utan att orsaka inflammation eller förstöra cellerna. De hittas framför allt i distala ileum (Farkas *et al.*, 2015) och i störst antal kring avväjningen. Eftersom man inte förrän nyligen har lyckats odla bakterierna på labb vet man inte så mycket om deras livscykel. Man tror att de förökar sig via sporer som släpps till tarmlumen och sedan inokulerar nästa värd. SFB upptäcktes först hos möss men har sedan påvisats hos ett flertal andra arter inklusive människa och nöt (Ericsson *et al.*, 2014; Smith, 1997).

SFB påverkar immunförsvaret i tarmen på flera sätt. Man har sett att SFB kan ha en skyddande effekt mot infektion med *Salmonella enteritidis* hos möss (Garland *et al.*, 1982) samt *Escherichia coli* hos kaniner (Heczko *et al.*, 2000). Detta eftersom båda dessa patogener måste binda in till epitelet för att orsaka infektion och SFB konkurrerar om platserna.

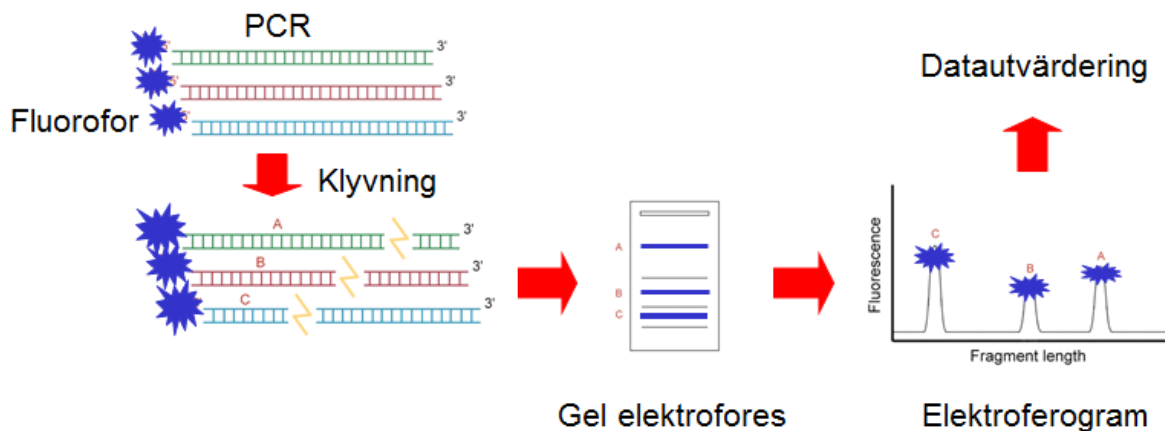
Möss koloniserade med SFB har fler lymfocyter och fler IgA-producerande celler i tunntarmen jämfört med bakteriefria möss (Umesaki *et al.*, 1999; Klaasen *et al.*, 1993). Den totala produktionen av IgA stiger när bakteriefria möss koloniserar av SFB (Talham *et al.*, 1999; Klaasen *et al.*, 1993) men bara en liten del av denna ökning består av SFB-specifika IgA vilket kan tolkas som att SFB är en viktig faktor i det ospecifika försvaret i tarmen (Talham *et al.*, 1999). Även en specifik patogenfri (SPF) tarmflora utan SFB ökade produktionen av IgA jämfört med hos bakteriefria möss, men denna ökning var inte lika stor som hos mössen med SFB (Klaasen *et al.*, 1993).

SFB stimulerar till utveckling av germinala center i Peyerska plack, en reaktion där B-celler i flera steg mognar till minnesceller eller antikroppsproducerande celler, samt bidrar till aktiveringen av CD4+ T-celler i Peyerska plack (Talham *et al.*, 1999).

Metoder för att studera tarmfloran

Tidigare har odling varit den primära metoden för att undersöka bakteriefloran i MTK, denna metod påvisar dock bara en bråkdel av de bakterier som finns (Eckburg *et al.*, 2005). Dessutom är metoden dyr och tidskrävande. Moderna molekylärbiologiska så kallade fingerprinting- och sekvenseringsmetoder har gjort det möjligt att kartlägga tarmfloran i mycket större detalj och att fånga upp även de bakterier som inte går att odla.

Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) är en fingerprinting-metod som bygger på PCR. PCR-produkten märks med en fluorescerande markör genom att minst en primer i reaktionen har en fluorescerande ände. Ett restriktionsenzym klyver produkten och de fragment (terminal restriction fragment, TRF) som bildas separeras med gelelektrofores och registreras av en fluorescensdetektor (se figur 1). Fragmenten varierar i längd mellan olika bakteriearter och tack vare fluorescensen detekteras endast de märkta terminala fragmenten vilket bidrar till att man från varje prov erhåller en profil över längderna på dessa märkta fragment. Denna profil redovisas i ett diagram, ett så kallat elektroferogram. Styrkan på fluorescensen kan också mätas och man får på så sätt ett mått på den relativa mängden av de olika fragmenten i provet. Den relativa mängden av olika fragment överförs till en datamatrix och med hjälp av multivariat statistik kan data analyseras för att identifiera mönster kopplat till provernas TRF-profiler.



Figur 1. Flödet i en T-RFLP-analys.

Metoden har visats ha hög reproducerbarhet (Osborn *et al.*, 2000) och fungerar bra när man vill jämföra bakteriefloran exempelvis mellan olika platser eller före och efter en viss behandling. En nackdel med metoden är att en specifik TRF kan härstamma från olika bakteriearter. Eftersom T-RFLP inte ger någon information om vilka arter som motsvarar de olika fragmenten kombineras metoden ofta med kloning och sekvensering för att få reda på vilka bakterier som representerar varje topp i diagrammet.

MATERIAL OCH METODER

Provtagning

Kalvarna som ingick i försöket var födda på Lövsta Forskningscentrum under 2015. Kalvarna som inkluderades föddes med normal förlossning och var efter kor som ej sintidsbehandlats. De flesta kalvarna var av mjölkkras (Holstein eller Svensk Rödbrokig Boskap, SRB) men några hade köttras inkorsat. Kalvarna ingick i ett sondmatningsförsök där de fick en av följande tre behandlingar:

- Första målet råmjölk via sond och sedan via napphink
- Första målet med nappflaska och sedan med napphink
- Första målet med nappflaska och sedan dia modern

I denna studie har behandlingarna inte tagits med i analysen då antalet djur var för få. Kalvarna hade inte tillgång till grov- eller kraftfoder utan utfodrades enbart med mjölk. De stod på spån i ensamboxar. Försöket hade beviljats etiskt tillstånd från Uppsala djurförsöksetiska nämnd, diarienummer C44/14.

Fem tjurkalvar avlivades och provtogs vid en ålder av 2 dagar och fyra vid en ålder av 7 dagar. Träckprov togs från kalvarna i samband med avlivningen. Kalvarna avlivades med pentobarbital och provtagningen skedde i direkt anslutning till avlivningen. Prov togs från rumen, abomasum, duodenum (vid plica duodenocolica), ileum (vid plica ileocecalis), cecum och distala colon (vid plica duodenocolica) genom att med steril sax klippa en bit om ca 3x3 cm som sedan fästes på en steril metallskena med klämmor. Slemhinnan/epitelet sköljdes ren från tarminnehåll med steril koksaltlösning och skrapades sedan med skalpell för insamling av mukusslem varefter skrapet överfördes till ett provrör.

För odling klipptes ytterligare vävnadsbitar som förvarades i rör på is direkt efter provtagning och under transport till laboratoriet där de genast bereddes vidare (se nedan). Odlingsprover togs från tre kalvar som var 7 dagar gamla.

Träckprov togs också från kvigkalvar vid en ålder av 2, 7, 14 och 28 dagar samt vid avvänjning (7-8 veckor) och 6 månaders ålder, 2-8 kalvar per åldersgrupp.

Proverna förvarades på is direkt efter provtagning och under transport för att sedan förvaras i minus 80 °C fram till provberedningen.

DNA-extraktion

Extraktionen av DNA utfördes med hjälp av QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Tyskland). DNA-isoleringen utfördes enligt tillverkarens protokoll men med vissa modifieringar. Uppvärmningssteget för att lysa cellväggen hos bakterierna ersattes med bead beating, 2 gånger 1 minut, 8000 RPM (varv per minut) med 5 minuter kylning på is emellan. För att maximera utbytet av DNA dubblerades mängden reagenser och lysat i efterföljande reningssteg. För bead beatingen användes Precellys Evolution Homogeniser (Bertin Corp. USA) och 0,1 mm Zirconium/silica-kulor.

Efter DNA-extraktion förvarades proverna i minus 20 °C fram till PCR.

Polymerase chain reaction

Polymerase chain reaction (PCR) användes för att amplifiera markörgener för bakterier generellt och specifikt för vissa grupper av bakterier (se tabell 1). I varje reaktion blandades 7 µl dH₂O, 10 µl Dream Taq master mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl forward primer (10 µM), 1 µl reverse primer (10 µM) och 1 µl templat.

Tabell 1. Primers som användes för de olika PCR-reaktionerna

	Primernamn	Primersekvens	Referens
16S rRNA	Bact_8f_FAM 926r	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG CCGTCAATTCCTTTRAGTTT	(Muyzer <i>et al.</i> , 1993; Edwards <i>et al.</i> , 1989)
<i>F. prausnitzii</i>	FPR-2F Fprau645R	GGAGGAAGAAGGTCTTCGG AATCCGCCTACCTCTGCACT	(Ramirez-Farias <i>et al.</i> , 2009)
<i>Lactobacillus</i> spp.	S-G-Lab-0159-a-S-20 S-G-Lab-0677-a-A-17	GGAAACAG(A/G)TGCTAATACCG CACCGCTACACATGGAG	(Heilig <i>et al.</i> , 2002)
SFB	SFBf1 SFBr3	GGAGTCTGCGGCACATTAG GTACTTATTGCGTTTGCGACG	(Jonsson, 2013)

I varje PCR inkluderades en positiv och en negativ kontroll. För de generella primrarna användes extraherat DNA från *E. coli*, för SFB och *F. prausnitzii* användes DNA från träckprover som tidigare konstaterats positiva för dessa bakterier och för *Lactobacillus* spp. användes extraherat DNA från *L. reuteri* eller *L. gasseri*.

- För 16S rRNA användes följande PCR-protokoll: 94°C i 3 min, (94 °C i 40 sek, 55 °C i 40 sek, 72 °C i 60 sek) x 35 cykler, 72 °C i 7 min. Duplikat gjordes på varje prov.
- För *F. prausnitzii* användes följande PCR-protokoll: 95 °C i 3 min, (95 °C i 30 sek, 60 °C i 30 sek, 72 °C i 30 sek) x 35 cykler, 72 °C i 7 min.
- För *Lactobacillus* spp. användes följande PCR-protokoll: 94 °C i 5 min, (94 °C i 30 sek, 56 °C i 20 sek, 68 °C i 40 sek) x 35 cykler, 68 °C i 7 min (Heilig *et al.*, 2002).
- För SFB användes följande PCR-protokoll: (95 °C i 30 sek, 65 °C i 30 sek, 72 °C i 2 min) x 35 cykler, 72 °C i 10 min (Jonsson, 2013).

Efter PCR kördes en gel-elektrofores på produkterna för att säkerställa att det fanns en produkt inför T-RFLP, samt att produkten hade rätt storlek. För de specifika bakteriegrupperna (*F. prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. och SFB) blev PCR det konfirmerande steget och gelen visade vilka prover som var positiva.

T-RFLP

PCR-produkterna klövs med restriktionsenzymet BsuRI 3000 U (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Till varje reaktion blandades 2,5 µl Buffert RI, 0,5 µl enzym, 12 µl dH₂O och 10 µl PCR-produkt. Blandningen inkuberades vid 37 °C i 2 timmar varefter 10 µl av klyvreaktionen späddes med 40 µl vatten och därefter lämnades proverna till Uppsala Genome Center för T-RFLP-analys. T-RFLP-analysen kördes på en ABI3730XL DNA Analyser (Applied Biosystems) med MapMarker[®] som intern storleksstandard. Data analyserades i Peak Scanner Software v1.0 (Applied Biosystems). Fragment mellan 30 och 1000 baspar inkluderades i analysen. Data exporterades sedan till Excel där den relativa mängden av varje fragment beräknades genom att dividera varje topps area med den totala arean av samtliga toppar i provet. Ett tröskelvärde sattes och endast toppar med en relativ mängd över 0,5 % inkluderades i den vidare analysen. Fragmentstorleken avrundades till heltal och en datamatrix skapades i Microsoft Access med relativ mängd och toppstorlek för varje prov. I vissa fall då det var svårt att avgöra om närliggande toppar blivit felaktigt registrerade som olika TRF:er slogs den relativa mängden för dessa toppar ihop.

Sekvensering

För att konfirmera detektionen av SFB kördes sekvensering av PCR-produkterna. PCR-produkterna renades med QIAquick PCR Purification Kit (50) (Qiagen, Hilden, Tyskland) enligt tillverkarens protokoll och proverna skickades sedan till sedan Uppsala Genome Center för sekvensering. Sekvensdata analyserades i FinchTV (Geospiza inc., Seattle, USA) och sekvenserna matchades mot bakterier med kända sekvenser i databasen BLAST för att ta reda på vilken art som förekom i proverna.

Odling

Slemhinnan/epitelet sköljdes med steril koksaltlösning för att avlägsna löst material. En yta på 2 gånger 2 centimeter skrapades ytligt med en skalpell och skrapet överfördes till ett provrör innehållande 900 µl steril koksaltlösning. Blandningen späddes i 10-spädningssteg varefter utvalda spädningsracklades på Wilkins-Chalgren anaerob-agar. Plattorna inkuberades i anaerobklockor vid 37 °C under 72 timmar. Totalantalet colony forming units (CFU) räknades sedan på plattorna och omvandlades till CFU/cm².

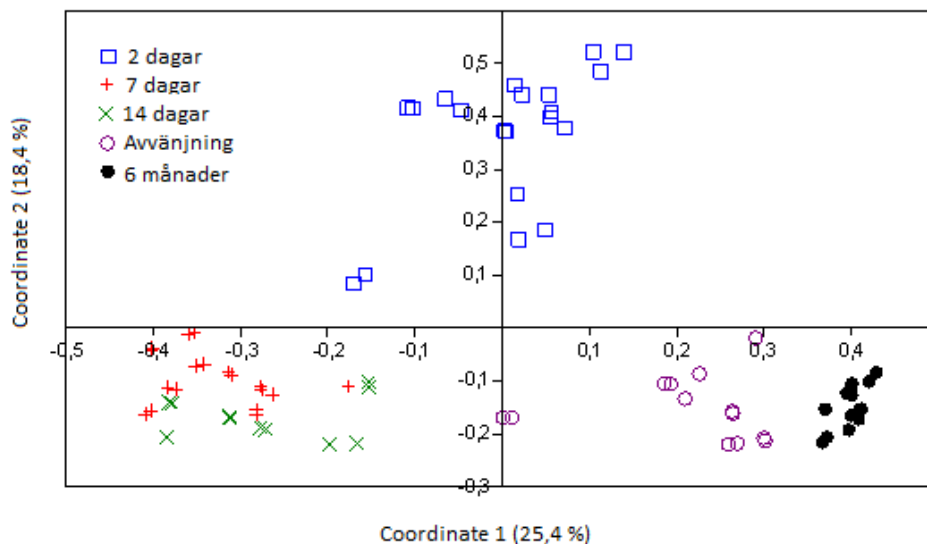
Statistik

TRF-data-matrisen analyserades med hjälp av multivariat statistik för att hitta klustringsmönster bland proverna. Principal Coordinate Analysis (PCoA) och Bray Curtis likhetsindex användes för att hitta likheter och skillnader och för detta ändamål användes statistikprogrammet Palaeontological Statistics (PAST).

RESULTAT

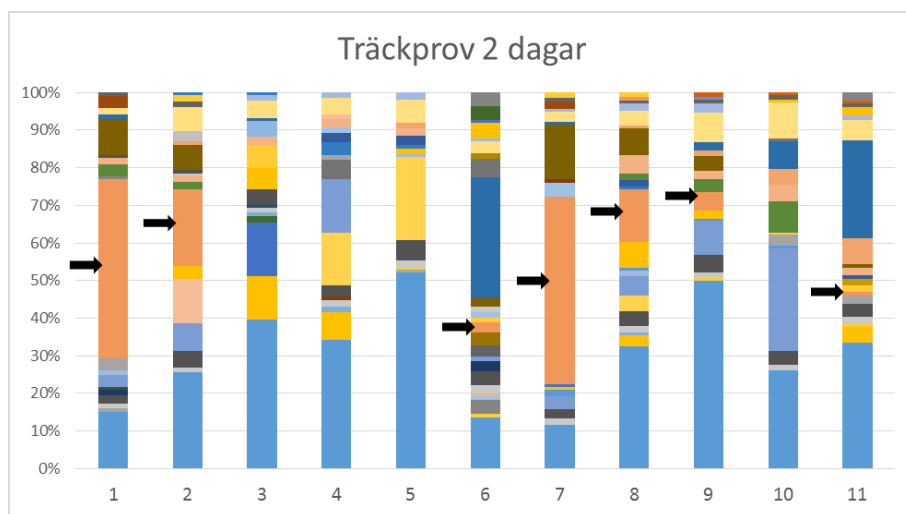
T-RFLP

Med hjälp av den statistiska analysen av T-RFLP-data hittades tydliga mönster av gruppering mellan prover. Figur 2 visar en PCoA-graf där de olika symbolerna representerar träckprover insamlade från kalvar vid olika åldrar. Duplikat gjordes på samtliga prov och duplikaten grupperar nära varandra i grafen. Träckprover från 2 dagars ålder bildade ett kluster medan 7-dagars- och 14-dagars-proverna bildade kluster som var svåra att skilja åt vilket tyder på att dessa kalvars tarmflora har liknande sammansättning. Avvänjningsprover och 6-månadersprover bildade var sitt kluster men dessa kluster låg nära varandra vilket innebär att dessa prover har liknande profiler vilket tyder på liknande sammansättning. Flera prover är insamlade från samma individ vid olika åldrar, i dessa data ses inga tecken på klustring efter individ utan bakteriefloran verkar förändras med stigande ålder. Ett avvänjningsprov skiljer sig från övriga i samma grupp och ligger betydligt närmare 7- och 14-dagarsproverna än övriga. Detta prov är från den yngsta individen i avvänjningsgruppen vilket indikerar att tarmfloran förändras kontinuerligt snarare än att förändras plötsligt vid avvänjningen.

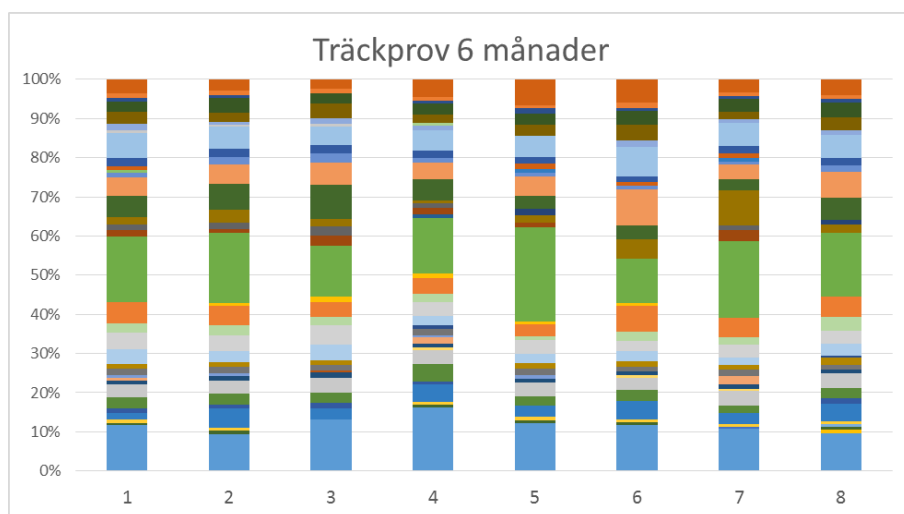


Figur 2. PCoA-plot över T-RFLP-data från träckprover från olika åldersgrupper. Varje symbol motsvarar ett prov och varje åldersgrupp representeras av en typ av symbol och en färg. Duplikat grupperar nära varandra. Procentsatsen anger hur stor del av variationen i data som förklaras av x- respektive y-axeln.

Träckproverna från 2 dagars ålder hade en större variation i TRF-profil än träckproverna från 6 månaders ålder (se figur 3 och 4). Detta ses även i figur 2 där det kluster som består av 2-dagars-prover är mer spritt än klustren för de andra proverna. 2-dagars-proverna skiljer sig åt både i vilka TRF:er som dominerar och vilka TRF:er som förekommer vilket tyder på en varierande sammansättning av bakteriefloran hos dessa kalvar. Denna individuella skillnad sågs inte hos 6-månaders-kalvarna (figur 4) där profilerna är lika varandra både vad gäller vilka TRF:er som finns representerade och vilka som dominerar. Även hos 2-dagars-kalvarna fanns dock vissa likheter mellan proverna, exempelvis återfanns den TRF som markerats med pilar i figur 3 i ett flertal prover men med olika relativ mängd. Den TRF som representeras av den nedre blå stapeln i figur 3 fanns hos alla individer och hade en relativ mängd på mer än 10 procent hos samtliga individer.

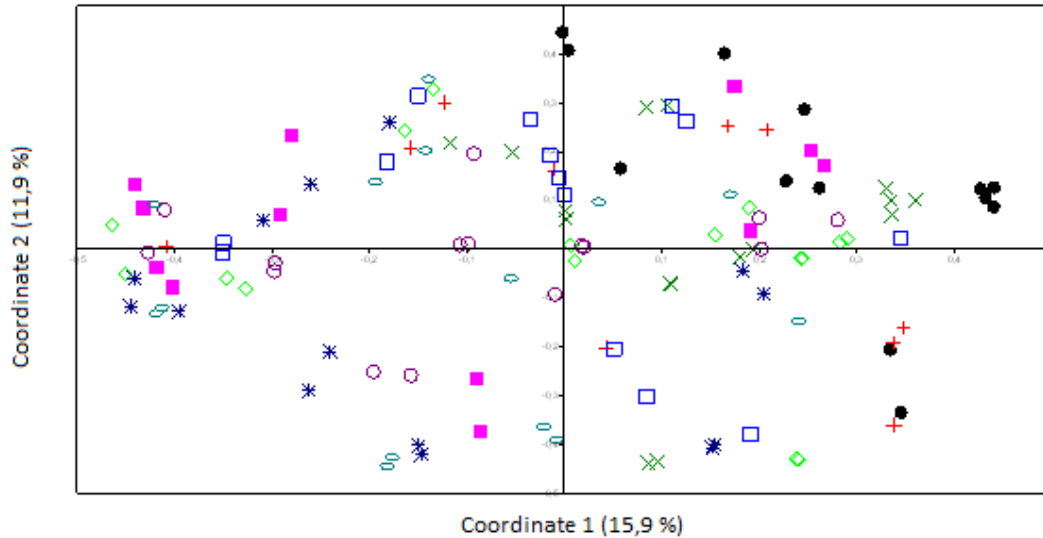


Figur 3. Variationen av olika TRF:er i träckprov från kalvar 2 dagar gamla. Varje färg motsvarar en TRF-storlek och varje stapel representerar TRF-profilen i ett prov. Pilarna pekar på en specifik TRF i olika prover.

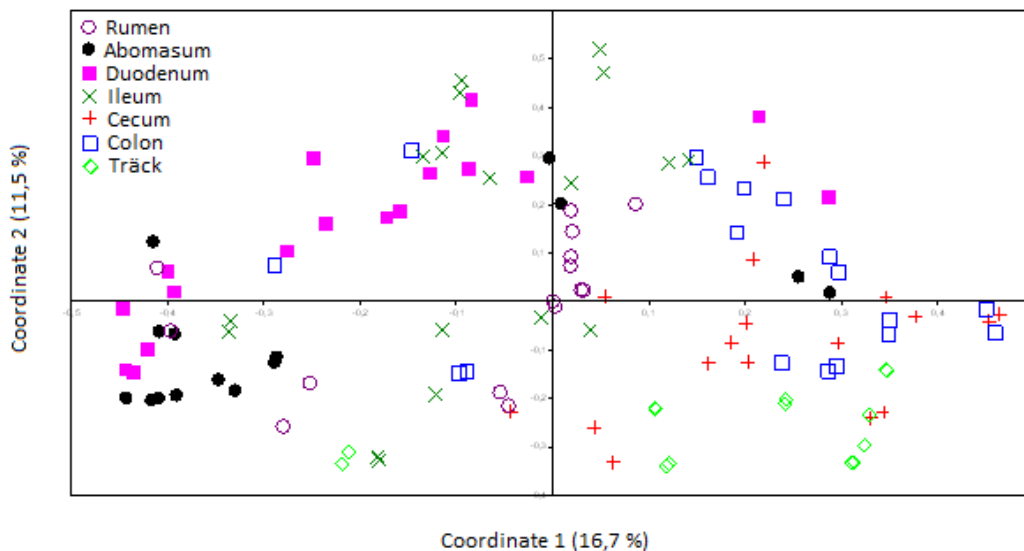


Figur 4. Variationen av olika TRF:er i träckprov från kalvar 6 månader gamla. Varje färg motsvarar en TRF-storlek och varje stapel representerar TRF-profilen i ett prov.

När T-RFLP-profilerna från vävnadsprover från olika delar av MTK och träckprover från dessa provtagna kalvar (2 respektive 7 dagar gamla) jämfördes syntes inget uppenbart mönster av individuell klustring (se figur 5). När däremot varje provtagningsplats jämfördes tenderade proverna att gruppera sig efter provtagningsplats (se figur 6).

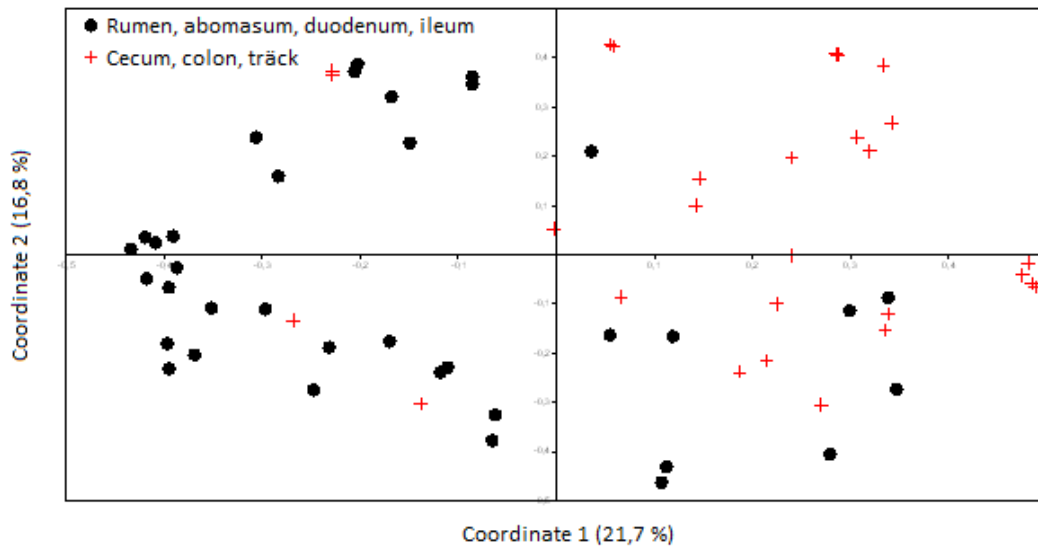


Figur 5. PCoA-plot över T-RFLP-data från vävnads- och träckprover från provtagna tjurkalvar, både 2 och 7 dagar gamla. Varje symbol motsvarar ett prov och varje individ representeras av en typ av symbol och en färg. Inget mönster av individuell klustring ses. Procentsatsen anger hur stor del av variationen i data som förklaras av x- respektive y-axeln.

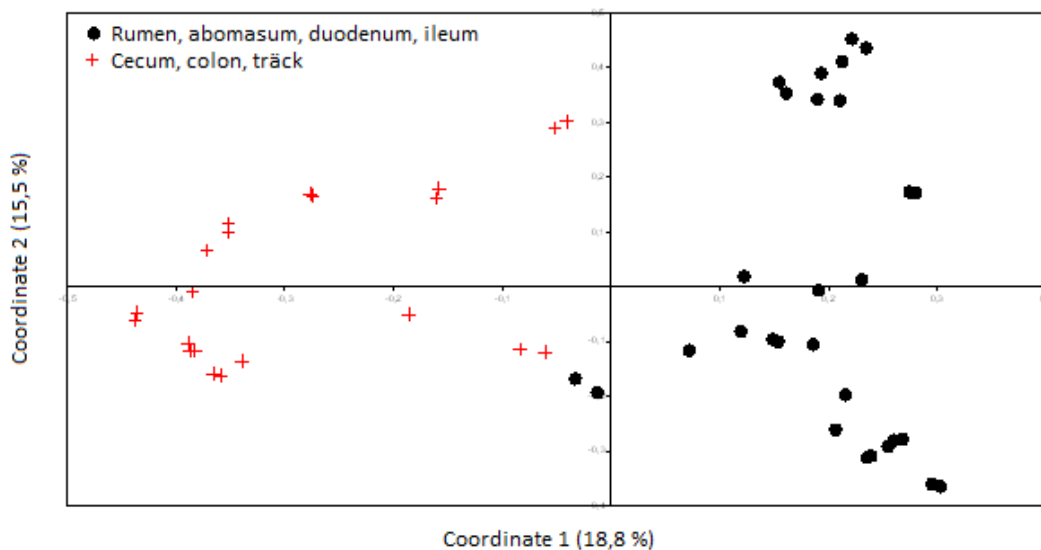


Figur 6. PCoA-plot över T-RFLP-data från vävnads- och träckprover från provtagna tjurkalvar, både 2 och 7 dagar gamla. Varje symbol motsvarar ett prov och varje provtagningsplats representeras av en typ av symbol och en färg. Procentsatsen anger hur stor del av variationen i data som förklaras av x- respektive y-axeln.

När de olika provtagningsplatserna jämfördes hos 2- respektive 7-dagars-kalvarna kunde man också se att prover från övre MTK (rumen, abomasum, duodenum och ileum) liknade varandra men skiljer sig i profil från proverna från nedre MTK (cecum, colon och träck). Detta mönster var mer uttalat hos 7-dagarskalvarna och tydliggörs i figur 7 och 8.



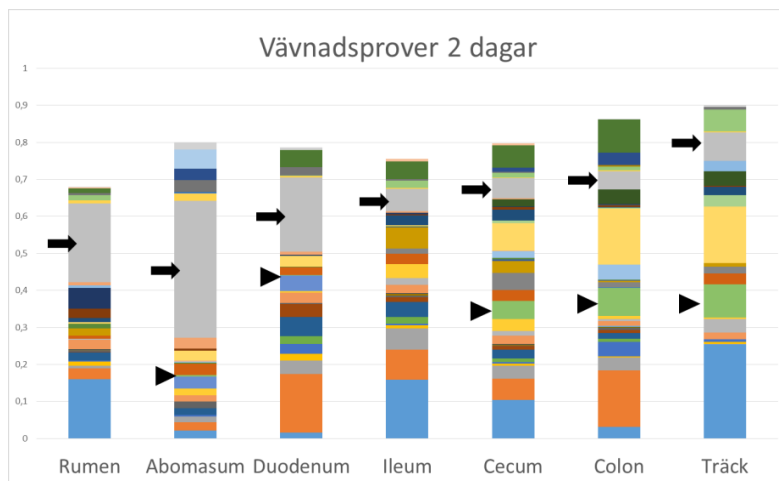
Figur 7. PCoA-plot över T-RFLP-data från vävnads- och träckprover från kalvar 2 dagar gamla. Varje symbol motsvarar ett prov och varje symboltyp och färg representerar en del av MTK. Procentsatsen anger hur stor del av variationen i data som förklaras av x- respektive y-axel.



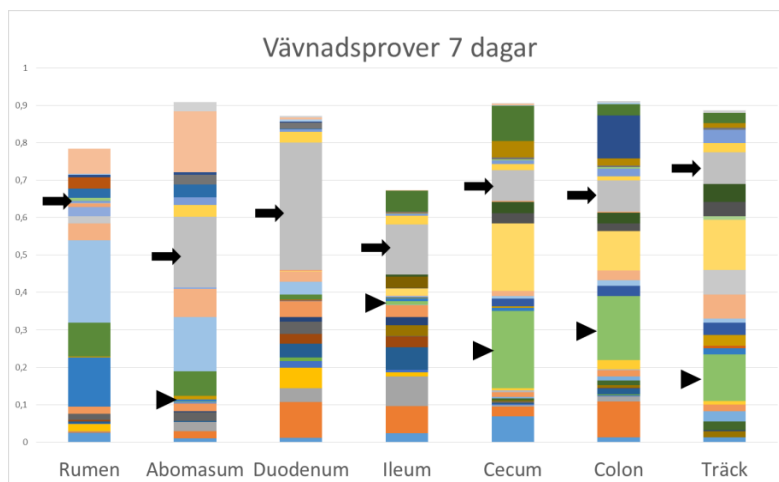
Figur 8. PCoA-plot över T-RFLP-data från vävnads- och träckprover från kalvar 7 dagar gamla. Varje symbol motsvarar ett prov och varje symboltyp och färg representerar en del av MTK. Procentsatsen anger hur stor del av variationen i data som förklaras av x- respektive y-axeln.

För att studera hur TRF-profilerna såg ut för de olika regionerna i MTK skapades en konsensus-profil för de olika regionerna hos 2- respektive 7-dagars-proverna, dessa profiler plottades som ett stapeldiagram (se figur 9 och 10). TRF:er som hade en relativ mängd på mindre än 2 % hos samtliga regioner exkluderades för att underlätta tolkandet av diagrammet. Av diagrammet framgår att det finns både skillnader och likheter mellan olika regioner. Pilarna i figur 9 och 10 markerar en TRF som finns i samtliga prover, hos 2-dagars-kalvarna är detta den dominerande TRF:en i rumen, abomasum och duodenum medan en mindre men betydande relativ mängd finns i övriga tarmavsnitt och i träck. Hos 7-dagars-kalvarna är samma TRF endast en mycket liten del av profilen i rumen men den mest dominerande i abomasum, duodenum och ileum. Även hos 7-dagars-kalvarna finns den i mindre men betydande mängd i cecum, colon och träck.

Pilspetsarna i figur 9 och 10 markerar ett exempel på en TRF som både hos 2- och 7-dagars-kalvarna framför allt finns i cecum, colon och träck.



Figur 9. Genomsnittlig profil för varje del av tarmen hos 2-dagars-kalvarna. Varje stapel visar ett genomsnitt av profilerna för varje provtagningsplats. Varje färg motsvarar en storlek på TRF. TRF:er med en relativ mängd på mindre än 2 % exkluderades.



Figur 10. Genomsnittlig profil för varje del av tarmen hos 7-dagars-kalvarna. Varje stapel visar ett genomsnitt av profilerna för varje provtagningsplats. Varje färg motsvarar en storlek på TRF. TRF:er med en relativ mängd på mindre än 2 % exkluderades.

Faecalibacterium prausnitzii

F. prausnitzii påvisades endast i de distala delarna av tarmen (colon och cecum) samt i träck. Bakterien förekom i träck hos alla kalvar 7 dagar och äldre men också hos flera av de som var 2 dagar gamla (se tabell 2).

Tabell 2. *Förekomst av F. prausnitzii vid olika åldrar och på olika platser i MTK. Antal positiva (antal provtagna)*

Prov	Ålder					
	2 dagar	7 dagar	14 dagar	28 dagar	Avvänjning	6 mån
Rumen	0 (5)	0 (4)	-	-	-	-
Abomasum	0 (5)	0 (3)	-	-	-	-
Duodenum	0 (5)	0 (4)	-	-	-	-
Ileum	0 (5)	0 (4)	-	-	-	-
Cecum	1 (5)	3 (4)	-	-	-	-
Colon	2 (5)	2 (4)	-	-	-	-
Träck	4 (12)	8 (8)	6 (6)	2 (2)	6 (6)	8 (8)

***Lactobacillus* spp.**

Lactobacillus spp. förekom i en stor del av proverna (se tabell 3). Från dag 7 förekom de i träcken hos samtliga provtagna kalvar. Från dag 28 och framåt var dock banden på elektroforesgelen betydligt svagare vilket antyder att mängden laktobaciller minskar från den åldern. Laktobacillerna förekom i minst ett prov från samtliga kalvar utom en där endast träckprov togs och detta var negativt. Det verkar inte finnas något mönster när det gäller var i MTK laktobacillerna finns varken vid 2 eller 7 dagars ålder. Hos en 2-dagars-kalv och en 7-dagars-kalv fanns laktobacillerna i prov från samtliga regioner och träck.

Tabell 3. *Förekomst av Lactobacillus spp. vid olika åldrar och på olika platser i MTK. Antal positiva (antal provtagna)*

Prov	Ålder					
	2 dagar	7 dagar	14 dagar	28 dagar	Avvänjning	6 mån
Rumen	3 (5)	2 (4)	-	-	-	-
Abomasum	4 (5)	3 (3)	-	-	-	-
Duodenum	3 (5)	2 (4)	-	-	-	-
Ileum	3 (5)	2 (4)	-	-	-	-
Cecum	3 (5)	4 (4)	-	-	-	-
Colon	3 (5)	3 (4)	-	-	-	-
Träck	11 (12)	8 (8)	6 (6)	2 (2)	6 (6)	8 (8)

Segmenterade filamentösa bakterier

SFB påvisades inte i några vävnadsprover. De påvisades däremot i träck hos 1 av 2 kalvar 28 dagar gamla, 3 av 6 kalvar i avvänjningsålder samt hos 6 av 8 kalvar i åldern 6-7 månader (se tabell 4).

Tabell 4. *Förekomst av SFB i träckprover vid olika åldrar. Antal positiva (antal provtagna)*

Ålder	2 dagar	7 dagar	14 dagar	28 dagar	Avvänjning	6 mån
Träck	0 (13)	0 (8)	0 (6)	1 (2)	3 (6)	6 (8)

Sekvensering utfördes på 4 av de SFB-prover som var positiva på gelelektroforesen, två avvänjningsprover, ett 28-dagars-prov och ett 6-månaders-prov. Resultatet visade att DNA:t i samtliga prover till 97-99 % liknade den fullständigt sekvenserade arten *Candidatus Arthromitus* sp. SFB hos råtta.

Odling

Totalantalet anaerobier redovisas i tabell 5 som ett medelvärde beräknat från de tre kalvar som provtogs. Störst antal bakterier fanns i cecum och colon medan ileum var den region med minst totalantal.

Tabell 5. *Totalantal anaerobier*

	CFU/cm ²
Abomasum	$9,8 \cdot 10^6$
Rumen	$2,7 \cdot 10^7$
Duodenum	$1,0 \cdot 10^6$
Ileum	$1,8 \cdot 10^5$
Cecum	$2,0 \cdot 10^8$
Colon	$3,4 \cdot 10^8$

DISKUSSION

Resultaten från T-RFLP-analysen visar att bakteriefloran i träck varierar med åldern (se figur 2). Mellan dag 2 och 7 sker en stor förändring i bakteriefloran i träcken medan förändringen inte är lika stor mellan dag 7 och 14. Träckproverna från avvänjningsålder och 6 månaders ålder klustrar nära varandra i diagrammet trots att det skiljer mycket i ålder mellan dessa individer. Trots större åldersskillnad har alltså kalvar i avvänjningsålder en bakterieflora som är mer lik den hos 6-månaders-kalvar än den hos exempelvis 14-dagars-kalvar. Detta skulle kunna förklaras av att kalvar i avvänjningsålder har gått över till en diet som mer liknar den vuxna idisslarens och därmed även har anpassat sin tarmflora efter den nya dieten. Att bakteriefloran ändras och anpassar sig efter en ny diet har visats i flera försök (Kocherginskaya *et al.*, 2001; Tajima *et al.*, 2000). De två proverna (dubbletter) från den yngsta kalven i avvänjningsgruppen skiljer sig från de övriga kalvarna i gruppen genom att dessa prov ligger närmare proverna från 7- och 14-dagars-kalvarna. Detta kan tyda på en succesiv anpassning av bakteriefloran till den nya dieten som efterhand till allt större del består av fast föda.

Den största variationen i TRF-profil mellan träckprover från olika kalvar inom samma åldersgrupp ses hos 2-dagars-kalvarna (se figur 2). Även Lukas *et al.* (2007) konstaterar i sin studie att nyfödda kalvar har en varierande och föränderlig tarmflora. En förklaring till detta skulle kunna vara att bakteriefloran hos mamman har stor betydelse i början och att dieten sedan får större effekt. Bakteriefloran i mjölk, på juver och på spenar kan tänkas skilja relativt mycket mellan olika kor och detta borde då kunna bidra till etableringen av den nyfödda kalvens tarmflora. En annan förklaring är att det är något av en slump vilken bakterie som först lyckas etablera sig och växa till i tarmen hos varje individ och att detta så småningom jämnar ut sig när bakteriefloran stabiliseras så att skillnaderna blir mindre hos äldre kalvar. En tredje möjlighet är att de olika behandlingar som kalvarna fick har påverkat utvecklingen av deras tarmflora. Dessa behandlingar har inte tagits med i några analyser i detta arbete då det inkluderade för få djur, men kan förstås ha påverkat resultaten. Eftersom det enda som skiljde de olika grupperna åt var utfodringsmetoden vid det första målet råmjölk är det inte orimligt att denna skillnad inte längre ses vid 7 dagars ålder.

I en studie där man undersökte hur bakteriefloran i tarminnehållet varierade mellan olika platser i MTK hos kor såg man att det fanns större likheter mellan specifika segment hos olika individer jämfört med mellan olika segment hos samma individ (Frey *et al.*, 2010). Detta stämmer väl överens med resultaten i denna studie där det inte heller fanns någon likhet mellan prover inom en individ men däremot mellan olika segment av MTK hos olika individer. Proverna från övre MTK (rumen, abomasum, duodenum och ileum) grupperade sig i en del av diagrammet medan proverna från nedre MTK (cecum, colon och träck) grupperade sig tillsammans i en annan del av diagrammet. Detta mönster fanns vid både 2 och 7 dagars ålder men mer uttalat vid 7 dagars ålder (se figur 7 och 8). Eftersom ileum bildar länken mellan tunntarm och tjocktarm kan man tänka sig att floran här ibland mer liknar tunntarmens och ibland tjocktarmens. I figur 7 och 8 är flera av de prover som ligger i mitten av diagrammet prover från ileum vilket antyder att de har en flora som har likheter med både övre och nedre segmenten i MTK.

Vissa bakteriergrupper har tidigare visats ha speciellt viktiga funktioner för utvecklingen av immunförsvaret i tarmen och för skydd mot kolonisation av patogener (Qadis *et al.*, 2014; Sokol *et al.*, 2008; Hudault *et al.*, 1997; Klaasen *et al.*, 1993). Både *F. prausnitzii*, *Lactobacillus* spp. och SFB har flera sådana viktiga funktioner och därför valde vi i detta försök att specifikt leta efter dessa bakterier. En obalans i tarmfloran eller avsaknad av en eller flera av dessa bakterier kan påverka kalvens hälsa och tillväxt (Oikonomou *et al.*, 2013; Kawakami *et al.*, 2010; Abe *et al.*, 1995) vilket i sin tur kan påverka mjölkproduktionen senare i livet (Soberon *et al.*, 2012).

F. prausnitzii påvisades hos alla kalvar från 7 dagars ålder och uppåt men hos mindre än hälften av kalvarna vid 2 dagars ålder. Eftersom förekomst av *F. prausnitzii* under den första levnadsveckan är associerat med högre tillväxt och lägre frekvens diarré (Oikonomou *et al.*, 2013) kan man tänka sig att de kalvar där bakterien inte förekommer före senare i livet löper en större risk att drabbas av diarré och sämre tillväxt. Dessutom har man sett att *F. prausnitzii* tack vare sina anti-inflammatoriska egenskaper kan förhindra återfall av inflammatoriska tarmsjukdomar hos människa (Sokol *et al.*, 2008). Det gör att det borde finnas stor potential för en väl komponerad probiotika som innehåller *F. prausnitzii* och är anpassad för kalvar att ge mer lika förutsättningar till alla individer att klara av de utmaningar de stöter på i form av patogener, stress och foderbyten.

Till skillnad från Uyeno *et al.* (2010) som inte kunde detektera *Lactobacillus* efter 7 veckors ålder förekom i detta försök laktobacillerna upp till 6 månaders ålder om än i mindre mängd än tidigt i livet. Kanske är det så att mjölken är en källa till laktobaciller eller en förutsättning för att de ska trivas så att de minskar i antal direkt efter avvänjningen. En felkälla som inte minst är relevant när det gäller laktobacillerna är risken för ospecifik inbindning av primers under PCR-reaktionen. Det är inte helt osannolikt att dessa primers fångar upp vissa andra species av de mjölksyraproducerande bakterierna.

SFB har tidigare setts förekomma hos olika däggdjur och studier från möss och andra gnagare har visat att mängden SFB verkar kulminera kring avvänjningen (Ericsson *et al.*, 2014). Detta kan förklara varför inte bakterien kunnat påvisas i vävnadsproverna från olika delar av tarmen då de kalvar som provtogs endast var 2 respektive 7 dagar gamla. SFB detekterades först i träckprover från 28 dagar gamla kalvar. Avvänningsproverna gav också de starkaste banden på gelelektroforesen jämfört med banden för äldre och yngre kalvar. Att bakterien däremot påvisades hos flera av kalvarna i åldern 6 månader kan tyda på att bakterien fortsatt har betydelse för kalven även efter avvänjningen. Det hade varit intressant att ta vävnadsprover även från äldre kalvar för att få veta mer om förekomst och lokalisation i tarmen. Detta är dock svårt att utföra praktiskt och ekonomiskt då kalvarna måste avlivas för att dessa prover ska kunna tas.

Syftet med odlingen var att få en uppfattning om totalantalet bakterier på slemhinnan/epitelet och hur det varierar mellan olika avsnitt i tarmen. Då tarmfloran hos unga kalvar till stor del är fakultativt anaerob (Uyeno *et al.*, 2010; Lukas *et al.*, 2007) bör resultatet vara relevant trots att strikta anaerober troligen inte överlevde tiden i syre från provtagningen till att de sattes i anaerobklocka. Endast ett fåtal kalvar provtogs och variationen var stor i hur mycket det växte

på samma plats hos olika individer varför ytterligare studier krävs för att kunna dra någon slutsats kring hur totalantalet anaerober varierar mellan olika avsnitt i MTK.

Ett avgörande steg i alla metoder som bygger på amplifiering och detektion av 16S rRNA hos bakterier är extraktionen av DNA. Bead beating har visats vara en av de mest lämpliga metoderna för att lysa cellväggen på grampositiva bakterier (Zoetendal *et al.*, 2001) men tiden måste optimeras. Om man kör för länge finns risken att DNA slås sönder och om man kör för kort tid riskerar man istället att inte alla celler lyseras. I framför allt träckprover förekommer ibland PCR-inhiberade faktorer som kan hämma uppförökningen av DNA och ge falskt negativa prover. För att utesluta att sådana faktorer påverkade våra resultat kördes vissa prover med tillsats av BSA (bovine serum albumin) eller DMSO (dimetyl-sulfoxid) och jämfördes med samma prover utan tillsats. Ingen skillnad sågs efter tillsats av BSA eller DMSO.

Slemhinnan/epitelet på olika platser i MTK har väldigt olika struktur. I rumen är epitelet väldigt grovt vilket gjorde det svårt att skrapa loss något material därifrån. Slemhinnan i abomasum var tvärt om relativt skör och veckad. Dessa skillnader kan ha påverkat resultaten och jämförelserna mellan olika platser. När det gäller T-RFLP-data har jämförelserna gjorts mellan relativa mängder vilket borde minimera risken för påverkan av provtagningen eller efterföljande steg. Vid vissa tillfällen var tarminnehållet segt och svårt att skölja av slemhinnan/epitelet, i dessa fall kan en del av bakteriefloran i tarminnehållet vara med i analysen och på så sätt speglas inte endast bakteriefloran på ytan i resultaten.

Slutsats

Resultaten från T-RFLP-analysen visar att bakteriefloran i MTK hos kalvar varierar med åldern men att vissa åldersgrupper har en liknande profil. Analysen visade också att bakteriefloran i prover från olika segment inom samma kalv inte bildade kluster medan prover från samma segment hos olika individer bildade kluster. *F. prausnitzii* visade sig vara vanligt förekommande i cecum, colon och träck hos kalvar från 7 dagar och uppåt men förekom även hos 2 dagar gamla kalvar. Även *Lactobacillus* spp. var mycket vanligt förekommande både i träck- och vävnadsprover från alla olika åldersgrupper. SFB påvisades inte i några vävnadsprover men i träckprover från kalvar vid 28 dagars ålder, i avvänjningsålder samt 6 månaders ålder.

Sammanfattningsvis utvecklas tarmfloran hos kalvar med åldern, varierar med olika segment i magtarmkanalen och innehåller bakterier som kan vara viktiga för kalvens hälsa.

REFERENSER

- Abe, F., Ishibashi, N. & Shimamura, S. (1995). Effect of administration of bifidobacteria and lactic acid bacteria to newborn calves and piglets. *Journal of Dairy Science*, 78(12), pp. 2838-2846.
- Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. & Servin, A.L. (1994). Lactobacillus-acidophilus LA1 binds to cultured human intestinal-cell lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*, 35(4), pp. 483-489.
- Deguchi, Y., Morishita, T. & Mutai, M. (1985). Comparative studies on synthesis of water-soluble vitamins among human species of Bifidobacteria. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49(1), pp. 13-19.
- Dong, H., Rowland, I., Tuohy, K.M., Thomas, L.V. & Yaqoob, P. (2010). Selective effects of Lactobacillus casei Shirota on T cell activation, natural killer cell activity and cytokine production. *Clinical and Experimental Immunology*, 161(2), pp. 378-388.
- Donovan, D.C., Franklin, S.T., Chase, C.C.L. & Hippen, A.R. (2002). Growth and health of Holstein calves fed milk replacers supplemented with antibiotics or Enteroguard. *Journal of Dairy Science*, 85(4), pp. 947-950.
- Duncan, S.H., Hold, G.L., Harmsen, H.J.M., Stewart, C.S. & Flint, H.J. (2002). Growth requirements and fermentation products of Fusobacterium prausnitzii, and a proposal to reclassify it as Faecalibacterium prausnitzii gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, pp. 2141-2146.
- Eckburg, P.B., Bik, E.M., Bernstein, C.N., Purdom, E., Dethlefsen, L., Sargent, M., Gill, S.R., Nelson, K.E. & Relman, D.A. (2005). Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*, 308(5728), pp. 1635-1638.
- Edrington, T.S., Dowd, S.E., Farrow, R.F., Hagevoort, G.R., Callaway, T.R., Anderson, R.C. & Nisbet, D.J. (2012). Development of colonic microflora as assessed by pyrosequencing in dairy calves fed waste milk. *Journal of Dairy Science*, 95(8), pp. 4519-4525.
- Edwards, U., Rogall, T., Blocker, H., Emde, M. & Bottger, E.C. (1989). Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes - characterization of a gene coding for 16S-ribosomal RNA. *Nucleic Acids Research*, 17(19), pp. 7843-7853.
- Ericsson, A.C., Hagan, C.E., Davis, D.J. & Franklin, C.L. (2014). Segmented Filamentous Bacteria: Commensal Microbes with Potential Effects on Research. *Comparative Medicine*, 64(2), pp. 90-98.
- Farkas, A.M., Panea, C., Goto, Y., Nakato, G., Galan-Diez, M., Narushima, S., Honda, K. & Ivanov, I.I. (2015). Induction of Th17 cells by segmented filamentous bacteria in the murine intestine. *Journal of Immunological Methods*, 421, pp. 104-111.
- Frey, J.C., Pell, A.N., Berthiaume, R., Lapierre, H., Lee, S., Ha, J.K., Mendell, J.E. & Angert, E.R. (2010). Comparative studies of microbial populations in the rumen, duodenum, ileum and faeces of lactating dairy cows. *Journal of Applied Microbiology*, 108(6), pp. 1982-1993.
- Garland, C.D., Lee, A. & Dickson, M.R. (1982). Segmented Filamentous Bacteria in the rodent small-intestine - their colonization of growing animals and possible role in host-resistance to Salmonella. *Microbial Ecology*, 8(2), pp. 181-190.
- Guarner, F. & Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *International Journal of Food Microbiology*, 39(3), pp. 237-238.
- Heczko, U., Abe, A. & Finlay, B.B. (2000). Segmented filamentous bacteria prevent colonization of enteropathogenic Escherichia coli O103 in rabbits. *Journal of Infectious Diseases*, 181(3), pp. 1027-1033.
- Heilig, H., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L. & de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of Lactobacillus spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as

- determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), pp. 114-123.
- Hooper, L.V., Xu, J., Falk, P.G., Midtvedt, T. & Gordon, J.I. (1999). A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(17), pp. 9833-9838.
- Hudault, S., Lievin, V., BernetCamard, M.F. & Servin, A.L. (1997). Antagonistic activity exerted in vitro and in vivo by *Lactobacillus casei* (strain GG) against *Salmonella typhimurium* C5 infection. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(2), pp. 513-518.
- Jimenez, E., Fernandez, L., Marin, M.L., Martin, R., Odriozola, J.M., Nueno-Palop, C., Narbad, A., Olivares, M., Xaus, J. & Rodriguez, J.M. (2005). Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Current Microbiology*, 51(4), pp. 270-274.
- Jimenez, E., Marin, M.L., Martin, R., Odriozola, J.M., Olivares, M., Xaus, J., Fernandez, L. & Rodriguez, J.M. (2008). Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Research in Microbiology*, 159(3), pp. 187-193.
- Jonsson, H. (2013). Segmented filamentous bacteria in human ileostomy samples after high-fiber intake. *Fems Microbiology Letters*, 342(1), pp. 24-29.
- Kawakami, S.-I., Yamada, T., Nakanishi, N. & Cai, Y. (2010). Feeding of Lactic Acid Bacteria and Yeast on Growth and Diarrhea of Holstein Calves. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 9(7), pp. 1112-1114.
- Klaasen, H., Vanderheijden, P.J., Stok, W., Poelma, F.G.J., Koopman, J.P., Vandenbrink, M.E., Bakker, M.H., Eling, W.M.C. & Beynen, A.C. (1993). Apathogenic, intestinal, segmented, filamentous bacteria stimulate the mucosal immune-system of mice. *Infection and Immunity*, 61(1), pp. 303-306.
- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I. & White, B.A. (2001). Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. *Anaerobe*, 7(3), pp. 119-134.
- Lievin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.R. & Servin, A.L. (2000). Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47(5), pp. 646-652.
- Lukas, F., Koppova, I., Kudrna, V. & Kopecny, J. (2007). Postnatal development of bacterial population in the gastrointestinal tract of calves. *Folia Microbiologica*, 52(1), pp. 99-104.
- Mackie, R.I., Sghir, A. & Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69(5), pp. 1035S-1045S.
- Maldonado, N.C., Silva de Ruiz, C., Claudia Otero, M., Sesma, F. & Elena Nader-Macias, M. (2012). Lactic acid bacteria isolated from young calves - Characterization and potential as probiotics. *Research in Veterinary Science*, 92(2), pp. 342-349.
- Malmuthuge, N., Griebel, P.J. & Guan, L.L. (2014). Taxonomic Identification of Commensal Bacteria Associated with the Mucosa and Digesta throughout the Gastrointestinal Tracts of Preweaned Calves. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(6), pp. 2021-2028.
- Malmuthuge, N., Li, M., Chen, Y., Fries, P., Griebel, P.J., Baurhoo, B., Zhao, X. & Guan, L.L. (2012). Distinct commensal bacteria associated with ingesta and mucosal epithelium in the gastrointestinal tracts of calves and chickens. *Fems Microbiology Ecology*, 79(2), pp. 337-347.
- Mayer, M., Abenthum, A., Matthes, J.M., Kleeberger, D., Ege, M.J., Hoelzel, C., Bauer, J. & Schwaiger, K. (2012). Development and genetic influence of the rectal bacterial flora of newborn calves. *Veterinary Microbiology*, 161(1-2), pp. 179-185.

- Muyzer, G., Dewaal, E.C. & Uitterlinden, A.G. (1993). Profiling of complex microbial-populations by denaturing gradient gel-electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes-coding for 16S ribosomal-RNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), pp. 695-700.
- Oikonomou, G., Teixeira, A.G.V., Foditsch, C., Bicalho, M.L., Machado, V.S. & Bicalho, R.C. (2013). Fecal Microbial Diversity in Pre-Weaned Dairy Calves as Described by Pyrosequencing of Metagenomic 16S rDNA. Associations of Faecalibacterium Species with Health and Growth. *Plos One*, 8(4).
- Osborn, A.M., Moore, E.R.B. & Timmis, K.N. (2000). An evaluation of terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) analysis for the study of microbial community structure and dynamics. *Environmental Microbiology*, 2(1), pp. 39-50.
- Ozutsumi, Y., Hayashi, H., Sakamoto, M., Itabashi, H. & Benno, Y. (2005). Culture-independent analysis of fecal microbiota in cattle. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 69(9), pp. 1793-1797.
- Qadis, A.Q., Goya, S., Yatsu, M., Kimura, A., Ichijo, T. & Sato, S. (2014). Immune-Stimulatory Effects of a Bacteria-Based Probiotic on Peripheral Leukocyte Subpopulations and Cytokine mRNA Expression Levels in Scouring Holstein Calves. *Journal of Veterinary Medical Science*, 76(5), pp. 677-684.
- Ramirez-Farias, C., Slezak, K., Fuller, Z., Duncan, A., Holtrop, G. & Louis, P. (2009). Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of Bifidobacterium adolescentis and Faecalibacterium prausnitzii. *British Journal of Nutrition*, 101(4), pp. 541-550.
- Roediger, W.E.W. (1980). Role of anaerobic-bacteria in the metabolic welfare of the colonic mucosa in man. *Gut*, 21(9), pp. 793-798.
- Segain, J.P., de la Bletiere, D.R., Bourreille, A., Leray, V., Gervois, N., Rosales, C., Ferrier, L., Bonnet, C., Blottiere, H.M. & Galmiche, J.P. (2000). Butyrate inhibits inflammatory responses through NF kappa B inhibition: implications for Crohn's disease. *Gut*, 47(3), pp. 397-403.
- Shroff, K.E., Meslin, K. & Cebra, J.J. (1995). Commensal enteric bacteria engender a self-limiting humoral mucosal immune-respons while permanently colonizing the gut. *Infection and Immunity*, 63(10), pp. 3904-3913.
- Shu, Q. & Gill, H.S. (2002). Immune protection mediated by the probiotic Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20 (TM)) against Escherichia coli O157 : H7 infection in mice. *Fems Immunology and Medical Microbiology*, 34(1), pp. 59-64.
- Sjaastad ØV., Sand O. & Hove K. (2010). *Physiology of Domestic Animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.
- Smith, T.M. (1997). Segmented filamentous bacteria in the bovine small intestine. *Journal of Comparative Pathology*, 117(2), pp. 185-190.
- Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R.W. & Van Amburgh, M.E. (2012). Prewaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 95(2), pp. 783-793.
- Sokol, H., Pigneur, B., Watterlot, L., Lakhdari, O., Bermudez-Humaran, L.G., Gratadoux, J.-J., Blugeon, S., Bridonneau, C., Furet, J.-P., Corthier, G., Grangette, C., Vasquez, N., Pochart, P., Trugnan, G., Thomas, G., Blottiere, H.M., Dore, J., Marteau, P., Seksik, P. & Langella, P. (2008). Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(43), pp. 16731-16736.
- Svensson, C., Linder, A. & Olsson, S.O. (2006). Mortality in Swedish dairy calves and replacement heifers. *Journal of Dairy Science*, 89(12), pp. 4769-4777.

- Tajima, K., Arai, S., Ogata, K., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Aminov, R.I. & Benno, Y. (2000). Rumen bacterial community transition during adaptation to high-grain diet. *Anaerobe*, 6(5), pp. 273-284.
- Talham, G.L., Jiang, H.Q., Bos, N.A. & Cebra, J.J. (1999). Segmented filamentous bacteria are potent stimuli of a physiologically normal state of the murine gut mucosal immune system. *Infection and Immunity*, 67(4), pp. 1992-2000.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S., Imaoka, A. & Itoh, K. (1999). Differential roles of segmented filamentous bacteria and clostridia in development of the intestinal immune system. *Infection and Immunity*, 67(7), pp. 3504-3511.
- Umesaki, Y., Setoyama, H., Matsumoto, S. & Okada, Y. (1993). Expansion of alpha-beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology*, 79(1), pp. 32-37.
- Uyeno, Y., Sekiguchi, Y. & Kamagata, Y. (2010). rRNA-based analysis to monitor succession of faecal bacterial communities in Holstein calves. *Letters in Applied Microbiology*, 51(5), pp. 570-577.
- Younes, H., Coudray, C., Bellanger, J., Demigne, C., Rayssiguier, Y. & Remesy, C. (2001). Effects of two fermentable carbohydrates (inulin and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *British Journal of Nutrition*, 86(4), pp. 479-485.
- Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L., Abee, T. & de Vos, W.M. (2001). DNA isolation Protocols affect the detection limit of PCR approaches of bacteria in samples from the human gastrointestinal tract. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(3), pp. 405-410.