نشریه دامپزشکی
(پژوهش و سازندگی)
شماره ۹۰، بهار ۱۳۹۰

کارایی روش های مختلف تجویز زودهنگام پروبیوتیک بر کاهش استقرار سالمونلا در بلدرچین ژاپنی

• **کاظم سیفی**
دانش آموخته گروه پرورش و تولید طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
• **محمد امیر کریمی ترشیزی** (نویسنده مسئول)
استادیار گروه پرورش و تولید طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
تاریخ‌دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۸ تاریخ‌پذیرش: اردیبهشت ماه ۱۳۹۰
تلفن تماس نویسنده مسئول: ۰۹۱۲۵۹۹۴۴۶۱
Email : karimitm@modares.ac.ir

چکیده

تعداد ۲۷۰ عدد تخم نطفه دار بلدرچین در ۹ گروه ۳۰ تایی در دستگاه جوجه کشی خوابانیده شدند. گروه های آزمایشی شامل: شاهد منفی (بدون چالش با سالمونلا)، شاهد (چالش با سالمونلا) و گروه های دریافت کننده پروبیوتیک (تزریق به تخم، افشانه بر روی جوجه یک روزه، گاواژ دهانی، تلقیح به کلوآک و سه گروه تلفیقی: تلقیح به کلوآک و تزریق به تخم، تلقیح به کلوآک و افشانه و تلقیح به کلواک و گاواژ دهانی) بودند. به هر گروه ۱۵ قطعه جوجه اختصاص داده شد. جوجه های تمامی گروه های آزمایشی به جز گروه شاهد منفی، ۳۶ ساعت پس از دریافت پروبیوتیک، با $۱/۷۵\times۱۰^{۴}$ واحد تشکیل دهنده کلنی در میلی لیتر کشت تازه سالمونلا انتریتیدیس از راه دهان چالش داده شدند. بررسی جای گیری سالمونلا در محل لوزه های سکومی، یک روز پس از چالش، با استفاده از محیط های کشت غنی کننده و اختصاصی سالمونلا بر روی ۱۲ قطعه جوجه بلدرچین انجام شد. در سن ۸ روزگی، وزن بدن و اندام های بورس فابریسیوس، طحال و جگر ثبت گردید. کارایی روش های مختلف تجویز زودهنگام پروبیوتیک بر جای گیری سالمونلا در دستگاه گوارش بلدرچین معنی دار بود ($P<۰/۰۱$). تنها کاربرد پروبیوتیک به روش افشانه کاهش فاحشی در استقرار سالمونلا در مقایسه با سایر روش های تجویز پروبیوتیک داشت. بالاترین وزن بدن در گروه دریافت پروبیوتیک از راه دهان مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). روش تجویز پروبیوتیک بر وزن نسبی جگر و بورس تاثیر معنی داری داشت ($P<۰/۰۵$).

کلمات کلیدی: بلدرچین، پروبیوتیک، سالمونلا، روش تجویز، پیشگیری.

www.SID.ir

Veterinary Journal (Pajouhesh & Sazandegi) 90 pp: 40-47

Efficiency of early (in hatchery) probiotic administration methods against salmonella colonization in Japanese quail.

By: Kazem Seifi, Graduated from Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University Mohammad Amir Karimi Torshizi, (Corresponding Author; Tel: +989125994461), Assistant Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University.

Total of 270 quail fertile eggs were set in hatchery. Experimental groups including: Negative control (neither received probiotic treatment nor challenged by Salmonella), positive control (challenged by Salmonella but not probiotic treatment) and 7 in hatchery administration methods: in ovo injection, spray, oral gavage, cloacal drinking (cloacal inoculation), cloacal drinking – in ovo injection, cloacal drinking– spray and cloacal drinking – oral gavage. Each group included 15 day old chicks. All chicks were challenged by 1.75104□ cfu / ml *Salmonella eneteritidis* using oral gavage except negative control 36 h post probiotic treatment. 12 chicks from each group were euthanized by CO2 inhalation 24 h postchallange. Cecal tonsil aseptically collected and colonisation of Salmonella were probed using culture technique. The spray method significantly reduced Salmonella enteritidis colonization (P<0.01). On 8th day higher BW were observed in oral group (P<0.05). The administration methods were significantly effective on the liver and bursa of Fabricius weight (P<0.05). In conclusion probiotic administration using spray on quails day old chicks were the most effective in prevention of Salmonella colonization.

Key words: Japanese quail, Probiotic, Salmonella, Administration methods, Prevention

مقدمه

با افزایش جمعیت دنیا فراهم نمودن غذا به موضوعی مهم در سیاست گزاری کشورها و جامعه جهانی تبدیل شده است. در این راستا تولید غذاهایی که دارای بیشینه مواد مغذی مورد نیاز انسان باشند و همچنین احتمال شیوع بیماری های مشترک را به مقدار کمینه برسانند اهمیت فراوانی دارند. یکی از محصولات غذایی پر ارزش برای انسان به لحاظ مواد مغذی به ویژه پروتئین، گوشت پرندگان است. بدین جهت پرورش طیور به ویژه مرغ (گوشتی و تخم گذار) جایگاه ویژه ای یافته است؛ اما به دلیل برخی مشکلات مانند نگرانی از حضور قابل ملاحظه کلسترول در فراورده های گوشت و تخم مرغ و نیز تا اندازه ای تنوع بخشیدن به ذائقه افراد، نیاز به پرورش پرنده های دیگر احساس می شود. بلدرچین علاوه بر تولید گوشت و تخم، به دلیل سرعت رشد بالا و فاصله نسلی کوتاه، به عنوان پرنده آزمایشگاهی هم کاربرد دارد (NRC، ۱۹۹۴).

پرندگان در چرخه انتقال باکتری های بیماریزا به انسان نقش واسطه ای دارند. از مهم ترین این باکتری ها انواع سالمونلا می باشند که عامل عفونت های آنتروکولیک در انسان هستند.

(Revolledo و همکاران ۲۰۰۶) و به نظر می رسد فرآورده های طیور به ویژه گوشت و تخم مرغ از منابع اصلی ایجاد عفونت در انسان باشند (Betancor و همکاران ۲۰۰۵؛ Buck و همکاران ۲۰۰۴).

سازمان بهداشت جهانی WHO در سال ۲۰۰۶ میلادی گزارش نمود سالانه ۱/۴ میلیون نفر در ایالات متحده با بیماری سالمونلوز درگیر می باشند و هزینه اقتصادی مبارزه با این بیماری (که شامل افت تولید نیز است)، سالانه ۳ میلیارد دلار برآورد شده است (Higgins و همکاران ۲۰۰۸). در ایران نیز ارقام فزاینده تلفات در مرغداری ها که گاهی به ۸۰ درصد هم می رسد، علاوه بر خسارات هنگفت ناشی از هزینه دارو، تلفات و کاهش وزن جوجه ها، در نهایت آلودگی مواد غذایی و کمبود پروتئین را نیز باعث گردیده است و از راه انتقال آلودگی، گسترش بیماری و بروز مسمومیت های غذایی در انسان، صدمات جبران ناپذیری بر بهداشت تغذیه و سلامت جامعه وارد می کند. علاوه بر این تولید گوشت عاری از هر گونه آلودگی میکروبی، هدف بنیادی در صنعت پرورش طیور محسوب می شود (Rahimi و همکاران ۲۰۰۷). گفته شده است که سروتیپ انتریتیدیس *S.enterica*، دومین سروتیپ معمول در عفونت های انسانی می باشد (Center for Disease و Prevention، ۲۰۰۵).

صنعت پرورش طیور و سیاست دولت ها بر کاهش میزان سالمونلا در پرنده زنده تمرکز یافته است (Higgins و همکاران ۲۰۰۷a,b). در این راستا استفاده از آنتی بیوتیک ها در مقیاس کمتر از درمان به منظور پیشگیری از برخی بیماری ها و تحریک رشد مرسوم گشته است. این روش به دلایل: ۱- مقاوم شدن باکتری ها به آنتی بیوتیک پس از چندین دوره مصرف ۲- ماندگاری در محصولات طیور و از این راه انتقال به انسان، رضایت بخش نیست. فشارسازمان های بهداشتی و تمایل مصرف کنندگان به استفاده از فراورده های عاری از آنتی بیوتیک، منجر به پیشرفت و توسعه روش های جایگزین، به ویژه پروبیوتیک ها، به منظور کاهش عوامل بیماری زا شده است.

پروبیوتیک ها، باکتری های مفیدی هستند که با بهبود سلامت روده، نتایج مثبتی بر سلامت و رشد میزبان بر جای می گذارند (Fuller، ۱۹۸۹). ایده استفاده از پروبیوتیک ها در طیور، در سال ۱۹۷۳ و زمانی که نورمی و رانتالا جوجه های جوان را در معرض

www.SID.ir
Archive of SID

باکتری های روده پرنده بالغ قرارداده و شاهد جلوگیری از عفونت آن ها بودند شـکل گرفت (Higgines و همکاران ۲۰۰۷). اثر مفید پروبیوتیک‌ها از راه هایی چون تحریک سیسـتم ایمنی، رقابت با میکروب های بیماری‌زا در روده، تولید آنزیم‌های گوارشـی و بهبود عملکرد طیور گزارش شـده است (Rolfe، ۲۰۰۰؛ Coates و Fuller، ۱۹۷۷).

در آزمایشـی باکتری های اسیدلاکتیک جداسـازی شده از دستگاه گـوارش پرنده بالـغ موجب کاهش ۶۰ الی ۷۰ درصدی سـالمونلا تیفی موریـوم و ۸۹ الی ۹۵ درصدی *S.entritidis*، ۲۴ سـاعت پس از تیمار کردن جوجه ها شد (Higgins و همکاران ۲۰۰۷a). کاربرد پروبیوتیک در دان، منجـر بـه کاهـش کلنـی هـای *S.typhimorium* در روده بلدرچین تخم گذار گردید (Bamba و Miyakawa، ۱۹۹۴). استفاده از پروبیوتیـک در جیره غذایی باعث بهبود نسـبت خـوراک مصرفی به افزایش وزن، کاهش جمعیت سـالمونلا و بهبود عملکرد شد (Grimes و همکاران ۲۰۰۸).

روش هـای معمـول اسـتفاده از پروبیوتیـک ها به صـورت افزودن بـه خـوراک و آب آشـامیدنی اسـت. اما بر اسـاس فرضیه اسـتفاده از پروبیوتیـک هـا، یعنـی جـای گیری سـریع تـر باکتری هـای مفید (پروبیوتیـک هـا) در دسـتگاه گـوارش (بـه ویـژه روده) و اتصـال به گیرنـده ها و به این ترتیب مانع شـدن از اتصال باکتری های بیماری زا به بافت پوششـی دسـتگاه گوارش، بهتر اسـت کاربرد پروبیوتیک ها در اولین فرصت پس از خروج جوجه ها از تخم و حتی با نگاهی آرمانی تر و اقتباس از نحوه تزریق واکسن مارک در دوران جنینی، به روش تزریق به تخم جنین دار اعمال شود. روش هایی که با فرضیه استفاده از پروبیوتیک ها همخوانی بیشـتری دارند، عبارتند از: تزریق به تخم جنین دار، افشانه بر روی جوجه های تازه تفریخ شده، گاواژ دهانی و تلقیح کلوآکی. تزریق *Lactobacillus roteri* به تخم مرغ جنین دار موجب افزایش جمعیت باکتری مذکور و کاهش میزان سالمونلا و *E.coli* در جوجه های گوشتی شد و نیز تلفات را در جوجه های درگیر شده با سالمونلا و *E.coli* کاهش داد (Edens و همـکاران ۱۹۹۷). Casas و همـکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند استفاده از پروبیوتیک در روز اول پس از خروج از تخم، باعث کاهش ۱ تا ۲ لگاریتم در جمعیت سـالمونلا تیفی موریوم در جوجه بوقلمون ها گردید، در حالی که اسـتفاده از پروبیوتیک در روز پنجم کارایی کمتری داشـت (Grimes و همکاران ۲۰۰۸). در آزمایشـی باکتری *L. roteri* را بـه بخش های مختلف تخم مـرغ جنین دار (جنین، مایع آمنیوتیک و اتاقـک هوایی) تزریق کردند. بهتریـن نتیجه از تزریق به اتاقک هوایی به دسـت آمد (Edens و همـکاران ۱۹۹۷). تجویز 10^6 و 10^8 واحد کلنی باکتری های اسـید لاکتیک بـا روش گاواژ دهانی، در جوجه های درگیر شده با سالمونلا اثر بخش بود (Higgines و همکاران ۲۰۰۷a). اولین بار روش افشانه کشت های حذف رقابتی با استفاده از مواد چینه دان و سکوم و یا مخلوط کشت های هوازی و بی هوازی میکروارگانیسم های روده ای مرغ های بالغ استفاده شد (Pivnick و Nurmi، ۱۹۸۲).

در مـورد تجویـز پروبیوتیـک از راه کلـوآک، پژوهش هـای زیادی انجام نشده اسـت (Andereatti Filho و همکاران ۲۰۰۷؛ Karimi Torshizi و همـکاران ۲۰۱۰). در شـرایط طبیعی، با تغذیه مسـتقیم جوجه‌ها توسـط والدیـن و نیز حرکت مکشـی مقعد در پرنـدگان غیر مسـتقل[1]، ورود جمعیـت میکروبـی به دسـتگاه گوارش پرنـده امکان مـی یابد؛ ایـن عمل به آشـامیدن کلواکی[2] معروف اسـت (Corrier و همـکاران ۱۹۹۴). در آزمایشـی پرنده ها بـا *S.typhimorium* از راه دهان چالش داده شـدند و در همان روز گروهی از پرندگان با پروبیوتیک و گروهـی هم با فـاژ WT۴۵ از طریق کلوآک تیمار شـدند. در انتهای آزمایش مشـاهده شد که هر دو تیمار کلوآکی (پروبیوتیک و فاژ) به طور معنی داری میزان عفونت *S.entritidis* را کاهش دادند (Andereatti Filho و همکاران ۲۰۰۷). اسـتفاده از مقادیر مختلف پروبیوتیک از 10^2 تا 10^7 واحد کلنی از راه کلوآک موجب کاهش معنی دار جمعیت سالمونلا در جوجه ها گردید و در ضمن تفاوتی بین مقادیر مختلف پروبیوتیک در کاهش سالمونلا مشاهده نشد (Higgins و همکاران ۲۰۰۸). در آزمایش مشـابهی بر روی جوجه های گوشـتی روش تلقیح به کلـوآک در میان سـایر روش های تجویز زودهنگام پروبیوتیـک در کنترل *S.entritidis* کارامدتر اعلام گردید (Hashemzaheh و همکاران ۲۰۱۰).

دلیـل انجام ایـن آزمایش بر بلدرچیـن، جایگاه ویـژه آن در تولید محصولات طیور و سـهولت پرورش و مقاومت به عموم بیماری های رایج طیور می باشـد که منجر به پرورش صنعتی و آزمایشـگاهی این پرنده شـده اسـت. با توجه به این که اطلاعات و نتایج منتشر شده، اثر پذیری کارایـی پروبیوتیک ها بر کاهش اسـتقرار عوامل بیمـاری زا را از زمان و روش تجویز تایید می نمایند و همچنین آزمایشـی که کارایی روش های مختلف تجویز پروبیوتیک بر بلدرچین را بررسـی نماید، منتشـر نشـده اسـت، این آزمایش با هدف بررسـی کارایی روش هـای مختلف تجویز زودهنگام (که با ایده اسـتفاده از پروبیوتیک ها همخوانی بیشتری دارد) پروبیوتک بر کاهش استقرار *S.entritidis* در بلدرچین ژاپنی پی ریزی شده است.

مواد و روش ها

تعـداد ۳۰۰ عـدد تخم نطفه دار بلدرچین با متوسـط وزنی مشـابه از مزرعـه تحقیقاتـی دانشـگاه تهـران خریـداری و پـس از ضدعفونی بـا گاز فرمالدهیـد ۲۷۰ عـدد از آنها در داخل دسـتگاه جوجه کشـی خوابانیـده شـدند. در این آزمایـش از فـراورده تجاری پروتکسـین به عنوان پروبیوتیک اسـتفاده شـد. دلیل اصلی انتخاب این فراورده امکان اسـتفاده از آن بـه صورت تعلیق در آب و در دسـترس بـودن اطلاعات آزمایش های انجام شده با آن بود. این فراورده بر اساس ادعای سازنده از میکروارگانیسـم های متنوعـی به تعداد برابر و شـمارش نهایی Cfu/g 2×10^9 تشکیل شده است. این میکروارگانیسم ها عبارتند از:

Aspergillus oryzae PXN ۶۸
Lactobacillus acidophilus PXN ۳۵
L. rhamnosus PXN ۵۴
L. plantarum PXN ۴۷
L. bulgaricus PXN ۳۹
Bifidobacterium bifidum PXN ۲۳
Enterococcus faecium PXN ۳۳
Streptococcus thermophilus PXN ۶۶
Candida pintolopesii PXN ۷۰

Archive of SID

گروه های آزمایشی شامل: شاهد منفی (بدون چالش با سالمونلا)، شاهد مثبت (چالش یافته با سالمونلا) و گروه های دریافت کننده پروبیوتیک (تزریق به تخم، افشانه بر روی جوجه یک روزه، گاواژ دهانی، تلقیح به کلواک و سه گروه تلفیقی تلقیح به کلواک - تزریق به تخم، تلقیح به کلواک - افشانه و تلقیح به کلواک - گاواژ دهانی) بودند. در روز ۱۴ جوجه کشی تخم های گروه تزریقی قبل از قرار گیری در هچری با تنتور ید در محل اتاقک هوایی ضدعفونی شده و عمل تزریق با ۲×۱۰^{۶} cfu فراورده پروبیوتیکی با حجم ۵۰ µl در محل اتاقک هوایی انجام شد. همچنین تخم های گروه تلفیقی کلوآکی - تزریقی با همان روش قبلی ۱×۱۰^{۶} cfu فراورده پروبیوتیکی در حجم ۵۰ µl دریافت نمودند. در روز هفدهم جوجه کشی و پس از خروج جوجه ها از تخم تعداد پانزده قطعه جوجه برای هر گروه در نظر گرفته شد و تجویز پروبیوتیک بی درنگ به شرح زیر انجام شد:

جوجه های گروه افشانه، مقدار cfu $۷/۲\times۱۰^{۶}$ فراورده پروبیوتیکی را به روش افشانه (اسپری) برای هر جوجه دریافت نمود. جوجه های گروه تلقیح کلوآکی، مقدار cfu ۲×۱۰^{۶} تعلیق باکتری را در حجم ۵۰µl پس از تخلیه محتویات کلوآک با فشار ملایم بر شکم جوجه ها، از راه کلوآک (مقعد) دریافت نمودند. برای گروه گاواژ دهانی، مقدار cfu ۲×۱۰^{۶} فراورده پروبیوتیکی در حجم ۶۰µl از راه دهان تجویز شد. گروه های تلفیقی که در روز ۱۴ جوجه کشی cfu ۱×۱۰^{۶} باکتری پروبیوتیکی را به روش تزریق به اتاقک هوایی دریافت کرده بودند، در روز خروج از تخم نصف میزان تعلیق میکروارگانیسم اما به همان حجم و روش تعریف شده برای گروه های مشابه غیر تلفیقی را دریافت نمودند. گروه های شاهد مثبت و شاهد منفی پروبیوتیک دریافت نکردند.

در ابتدای آزمایش به منظور اطمینان از سلامت کامل تخم ها از نقطه نظر آلودگی به سالمونلا، بر روی ۱۰ عدد از تخم ها آزمایش های میکروبی جستجوی سالمونلا انجام شد. این کار در مرحله ای از دوران رشد جنینی و پس از تفریخ نیز تکرار شد. نمونه ای از دان هم پیش از شروع آزمایش جهت آلودگی اولیه به سالمونلا مورد بررسی قرار گرفت. در طول آزمایش، دان و آب مصرفی جوجه ها با استفاده از دستگاه اتوکلاو سترون شد. برای کمینه نمودن گردش سالمونلا در گروه های آزمایشی، بستر همه گروه ها روزانه چهار مرتبه تعویض می شد. همچنین در این راستا و به منظور نگهداری گروه شاهد منفی به صورت قرنطینه، محل این گروه جدا از سایر گروه ها بود و تمامی فعالیت های دست ورزی این گروه قبل از سایر گروه ها انجام می شد.

تمامی گروه ها ۳۶ ساعت پس از خروج جوجه ها از تخم، با cfu $۱/۷۵\times۱۰^{۴}$ *S.entritidis* از راه دهان چالش داده شدند. باکتری مورد استفاده از گنجینه میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد (RITCC ۱۶۲۴). زمان ۲۴ ساعت پس از درگیر شدن با *S.entritidis*، پرنده ها به تفکیک گروه ها وزن شده و سپس با استفاده از گاز دی اکسید کربن بی جان گشته و پس از باز کردن لاشه، لوزه سکومی هر پرنده (به تفکیک گروه های آزمایشی) به طور کامل هموژن شده و به لوله های استریل حاوی ۹ میلی لیتر محلول بافر آب پپتون منتقل شدند. پس از ۲۴ ساعت ۱۰۰ µl از محلول به لوله های حاوی ۱۰ml محلول آبگوشت راپاپورت وازیلیادیس (مرک آلمان) منتقل و به مدت ۲۰ ساعت داخل گرمخانه ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (Bell و Kyriakidae، ۲۰۰۲). پس از خارج کردن پلیت ها از گرمخانه، وجود و یا عدم وجود سالمونلا و مقایسه بین گروه ها انجام شد. به منظور تایید کلنی های مشکوک به سالمونلا (کلنی های سیاه رنگ)، آزمون های تکمیلی بر روی محیط های کشت TSI و اوره انجام گردید (Zahraei Salehi، ۱۹۹۹). روش نمره دهی پلیت ها به این صورت بود که در صورت عدم مشاهده کلنی سیاه به آن پلیت نمره یک داده شد، پلیت هایی که بین یک تا ۵۰ کلنی سیاه رنگ داشتند نمره ۲ و پلیت هایی که ۵۱ تا ۱۰۰ و ۱۰۱ تا ۳۰۰ کلنی سیاه دارا بودند و آن هایی که کلنی های سیاه آن ها به اندازه ای بود که شمارش امکان پذیر نبود، به ترتیب نمره های ۳، ۴ و ۵ گرفتند (Fulton و همکاران ۲۰۰۲).

در روز هشتم، سه پرنده باقی مانده از هر گروه، پس از وزن کشی، با همان روش قبل بی جان گشته و بعد از باز کردن لاشه طول بخش های مختلف روده (دوازدهه، ژژونوم و ایلیوم)، طول و وزن سکوم ها، وزن جگر، وزن بورس و وزن طحال مشخص شد. یافته های آزمایش با استفاده از نرم افزار SAS تجزیه و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد (SAS Institute ۱۹۹۰). داده های مربوط به تعداد (نسبت) پرندگان آلوده به کل پرندگان با روش کای مربع مورد تجزیه آماری قرار گرفتند. در تمام آزمون های آماری سطح معنی داری ۰/۰۵ درنظر گرفته شد.

نتایج

گروه شاهد منفی از نظر وجود سالمونلا صد در صد منفی بود (جدول ۱). روش تجویز پروبیوتیک بر تعداد پرندگان آلوده تاثیر معنی داری داشت به طوری که تعداد (نسبت) پرندگان سالونلا مثبت در روش های افشانه، کلوآکی - افشانه و کلوآکی - تزریقی در مقایسه با گروه شاهد مثبت کاهش داشت ($P<۰/۰۵$)، در حالی که سایر روش های تجویز با شاهد مثبت تفاوت معنی داری نداشتند. در بین گروه های آزمایشی تفاوت معنی داری در مورد نمره های پلیت های آلوده به سالمونلا وجود داشت، بدین ترتیب که کمترین نمره مربوط به گروه افشانه بود و سایر گروه ها تفاوت معنی داری با گروه شاهد مثبت نداشتند. بر اساس یافته های مرحله دوم نمونه گیری (روز هشتم) وزن بدن در بین گروه های آزمایشی اختلاف چشمگیری داشت ($P<۰/۰۵$) به طوریکه بالاترین وزن بدن مربوط به گروه تجویز دهانی بود. بین گروه های شاهد مثبت و منفی تفاوت معنی داری وجود نداشت (جدول ۲). تجویز پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد منفی موجب افزایش معنی دار وزن نسبی جگر گردید ($P<۰/۰۵$). همچنین وزن نسبی جگر در گروه شاهد مثبت مشابه با گروه های دریافت کننده پروبیوتیک بود. وزن نسبی طحال و بورس به عنوان دو اندام لمفوئیدی به طور متفاوتی در پاسخ به روش تجویز پروبیوتیک عکس العمل نشان داد. به این ترتیب که وزن نسبی طحال تحت تاثیر پروبیوتیک قرار نگرفت ($P<۰/۰۵$)، اما روش های تجویز پروبیوتیک بر وزن نسبی بورس تاثیر معنی داری داشتند. تجویز پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد منفی موجب افزایش معنی دار وزن نسبی بورس شد($P<۰/۰۵$). در گروه شاهد مثبت نیز افزایش وزن مشابهی مشاهده شد.

Archive of SID

جدول ۱- کارایی روش های مختلف تجویز زودهنگام پروبیوتیک بر بازیابی *S.entritidis* از لوزه سکومی بلدرچین یک روز پس از چالش

	تعداد کل پرنده های چالش داده شده / تعداد پرنده های آلوده (درصد)	نمره (انحراف معیار ± میانگین)
شاهد منفی	۰ / ۱۲ (۰) [d]	۰/۰۰ ± ۰/۰۰ [c]
شاهد مثبت	۱۱ / ۱۲ (۹۱/۷) [a]	۳/۷۵ ± ۱/۲۸ [a]
دهانی	۱۰ / ۱۰ (۱۰۰/۰) [a]	۴/۶۰ ± ۰/۸۴ [a]
کلوآکی - دهانی	۱۲ / ۱۲ (۱۰۰/۰) [a]	۴/۰۸ ±۱/۳۷ [a]
تزریقی	۶ / ۶ (۱۰۰/۰) [a]	۳/۶۰ ± ۰/۸۱ [a]
کلوآکی	۱۱ / ۱۲ (۹۱/۷) [a]	۳/۵۰ ± ۱/۱۶ [a]
کلوآکی - تزریقی	۷ / ۸ (۸۷/۵) [ab]	۳/۵۰ ± ۱/۶۰ [a]
کلوآکی - افشانه	۱۰ / ۱۲ (۸۳/۳) [ab]	۴/۲۵ ± ۱/۵۴ [a]
افشانه	۳ / ۱۲ (۲۵/۰) [c]	۱/۶۶ ± ۱/۳۷ [b]
معنی داری	××	××

abc میانگین های با حروف نا مشابه در هر ستون، از نظر آماری متفاوتند (P< ۰/۰۱).

جدول ۲- کارایی روش های مختلف تجویز زودهنگام پروبیوتیک بر وزن بدن و وزن نسبی اندام های درونی بلدرچین در ۸ روزگی

	شاهد منفی	شاهد مثبت	دهانی	کلوآکی - دهانی	افشانه	کلوآکی - افشانه	کلوآکی	SEM	P-Value
وزن بدن (گرم)	۴۳/۵ [bc]	۴۱/۳ [c]	۴۹/۹ [a]	۴۶/۸ [ab]	۴۳/۲ [bc]	۴۴/۴ [bc]	۴۶/۳ [ab]	۰/۷۵	۰/۰۲
وزن نسبی اندام های درونی (گرم در ۱۰۰ گرم وزن بدن)									
جگر	۳/۵۴ [b]	۴/۸۱ [ab]	۵/۶۴ [a]	۶/۱۱ [a]	۵/۵۷ [a]	۶/۱۱ [a]	۴/۹۲ [a]	۰/۲۱	۰/۰۰۰۵
طحال	۰/۰۵۳	۰/۰۵۷	۰/۱۰۵	۰/۰۹۲	۰/۰۵۴	۰/۱۰۳	۰/۰۶۱	۰/۰۰۷	۰/۰۸۵
بورس	۰/۰۴۸ [c]	۰/۰۹۱ [ab]	۰/۱۲۶ [a]	۰/۰۹۵ [ab]	۰/۰۸۲ [b]	۰/۱۱۴ [ab]	۰/۰۹۸ [ab]	۰/۰۰۶	۰/۰۱۸

abc میانگین های با حروف نا مشابه در هر ردیف، از نظر آماری متفاوتند (P< ۰/۰۱).

SEM: اشتباه معیار میانگین

www.SID.ir

بحث

جدا نشـدن سـالمونلا از لوزه سـکومی پرندگان گروه شـاهد منفی جدول ۱ با توجه به عدم چالش این پرندگان با *S.entritidis*، حکایت از رعایت موفقیت آمیز اصول قرنطینه بین گروه های آزمایشی چالش یافته می نماید بویژه اینکه کلیه پرندگان با آب و دان سترون شده تغذیه شده بوند. بنابراین انتقال متقاطع آلودگی[۴] سـالمونلا بین گروه های آزمایشی منتفی می باشد.

کاربرد پروبیوتیک به روش افشـانه موجب کمتریـن آلودگی از نظر تعداد پرنده آلوده و همچنین شدت آلودگی در مقایسه با سایر روش های تجویز پروبیوتیک و گروه شاهد مثبت شده است. در این گروه ۷۵ درصد پرندگان در برابر سـالمونلا محافظت شده بودند. نکته جالب توجه شدت کم آلودگی در ۲۵ درصد پرندگان آلودهٔ این گروه می باشـد. به طوریکه نمـره آلودگی در پرنـدگان این گروه بیانگر بیـش از یک چهارم کاهش شدت آلودگی در مقایسه با کمترین شدت آلودگی مشاهده شده در سایر گروه های آزمایشـی اسـت (نمره ۱/۶۶ در برابـر ۳/۵۰). کاربرد کلوآکی گرچه به تنهایی در برابر آلودگی سـالمونلایی حفاظت ایجاد نکرد، اما در ترکیب با روش های افشـانه و تزریقی کارایی آن به میزان اندکی افزایش یافـت، در حالی که ترکیـب روش کلواکی با روش دهانـی اثر حفاظتی نشان نداد.

در روش افشـانه، میکروارگانیسم های افشانده شده بر سطح بدن در پی رفتار پرآرایی[۵] توسط منقار به دستگاه گوارش راه می یابند. تاثیر مثبت افشـانه نمودن فراورده های حذف رقابتی بر کاهش آلودگی سالمونلایی توسـط (Nurmi و Pivnick، ۱۹۸۲) در جوجه های گوشتی گزارش شده اسـت. در برخی پژوهش های انجام شده بر روی جوجه مرغ، روش افشـانه در مقایسه با سـایر روش های تجویز پروبیوتیک کارایی مطلوبی نداشته اسـت (Moghaddam و همکاران ۲۰۱۰ Hashemzadeh و همـکاران ۲۰۱۰)، در حالیکـه یافته های پژوهـش حاضر با بلدرچین بهترین کارایی در حفاظت علیه آلودگی سـالمونلایی را با روش افشـانه نشـان داد. در توجیه تفاوت کارایی این روش بین جوجه مرغ و بلدرچین می توان به تفاوت اندازه در جوجه این پرندگان اشاره نمود. بدین ترتیب که متوسـط وزن جوجه های بلدرچین در تحقیق کنونی (۰/۳۵± ۸/۰۳ گرم) و در گزارش های جوجه مرغ به طور متوسط ۱/۷۱ ± ۴۲/۵۲ گرم بوده است. رابطه کاهش نسبت سطح به حجم در جسم کروی (به منظور سهولت نتیجه گیری بدن جوجه کروی شکل فرض شده است) با افزایش انـدازه، از طریق ریاضـی اثبات می گردد. به منظور بـراورد این روابط با فرض تبعیت شـکل و اندازه بدن جوجه تازه تفریخ شده از تخم، از رابطه معرفی شـده توسط Carter (۱۹۷۵) سـطح بدن جوجه ها تقریب زده شـد. این رابطه سطح تخم را به صورت زیر با استفاده از وزن تخم تعیین می نماید:

۰/۷۰۵۶(وزن تخم-گرم) × ۳/۹۷۸۲= سطح تخم (سانتی متر مربع)

چنانچه چنین رابطه ای را برای جوجه های بلدرچین و مرغ بپذیریم، مشـاهده می گردد که نسـبت سـطح به وزن بدن به طور متوسط برای جوجـه بلدرچیـن ۱/۶ برابر یا به عبارتی ۶۰ درصد بیشـتراز جوجه مرغ می باشد. بنابراین احتمال دریافت نسبی میکروارگانیسم های پروبیوتیکی افشانده بر سطح بدن جوجه در بلدرچین بیش از مرغ می باشد. همچنین به نظر می رسـد پوشـش پرهای نخسـتین در جوجه بلدرچین انبوه تر از جوجه مرغ اسـت و ایـن موضوع در صورت اثبات مـی تواند اندوخته بالاتری از میکروارگانیسـم های پروبیوتیکی را بـرای پرنده فراهم نماید. در محاسـبات فوق مواردی به ناچار به صورت غیر دقیق سـاده انگاشته شـده اند تا محاسبات با استفاده از روابط ریاضی مقدور گردد، نظیر عدم لحاظ ناهمواری سـطح بدن جوجه ها، تبعیت کامل شکل بدن جوجه از شـکل تخم و پرپوش های سـطح بدن جوجه. در عین حال تفاوت سطح نسـبی در این دو گونه مشـهود است. بدیهی اسـت که فرضیات بالا در شرایط برابری دوز تجویز پروبیوتیک افشانده شده صادق می باشد.

برخـلاف نتایج سـایرین که تزریـق تعلیق پروبیوتیـک را بر جوجه درآوری تخـم مرغ بی اثر گزارش نمودنـد (Edens و همکاران ۱۹۹۷)، اسـتفاده از این روش در مورد تخم بلدرچین هنگامی که ۵۰ میکرولیتر تعلیق پروبیوتیک تزریق شـد، منجر به جوجه درآوری حدود ۲۳ درصد در مقابـل ۷۲ درصد برای سـایر گروه ها گردید. به نظر می رسـد علت جوجه درآوری پایین تخم های تزریق شـده، انسداد منافذ غشای پوسته توسط تعلیق پروبیوتیک و خفگی جنین پیش از تفریخ باشد.

عدم تفاوت معنی دار در وزن بدن پرندگان گروه های شـاهد مثبت و منفی بیانگر عدم تاثیر چالش سـالمونلا بر وزن بدن در سـن ۸ روزگی می باشد (جدول ۲). در سایر تحقیقات نیز چالش با سالمونلا بر وزن بدن پرندگان بدون تاثیر بود که در توافق با نتیجه حاضر می باشد (Grimes و همکاران ۲۰۰۸؛ Vicente و همکاران ۲۰۰۷).

جگر به عنوان اندام حیاتی نقشـی اساسی در متابولیسم مواد مغذی بویـژه چربـی و پروتئین ایفای می نماید. علاوه بر این سـم زدایی نیز از کنـش های اصلی این عضو می باشـد. رابطه افزایـش فعالیت اندام ها با اندازهٔ آنها تحت مکانیسـم های هایپرتروفی و هایپرپلازی شـناخته شده می باشد(Gore و Qureshi، ۱۹۹۷؛ Awad و همکاران ۲۰۰۹). رشد بالاتـر در پرندگان دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسـه با گروه شـاهد مثبت (وزن بدن) نیازمند تامین مواد مغذی بیشتر در مقایسه با پرندگان این گروه می باشـد. فعالیت جگر در تامین سوبسـترای بیشتر به منظور تکافـوی نیازهای افـزوده غذایی می تواند یکی از علـل احتمالی افزایش وزن ایـن عضـو در در گروه های دریافت کننـده پروبیوتیک در آزمایش حاضـر باشـد. البته Grimes و همـکاران (۲۰۰۸) در آزمایش خود به عدم تاثیرپذیری وزن نسبی جگر بوقلمون از دریافت پروبیوتیک رسیدند، امـا در تحقیق Awad و همـکاران (۲۰۰۹) افزایش معنی داری در وزن نسبی جگر گروه دریافت کننده پروبیوتیک با گروه شاهد مشاهده گشت. از سـوی دیگر، پدیده مزدوج زدایی[۶] رخداد شـناخته شده ای در برخی باکتـری های خانواده اسـید لاکتیک می باشـد (De smet و همکاران ۱۹۹۵؛ Sanford، ۱۹۹۲). از آنجا که عمده میکروارگانیسم های تشکیل دهنـده پروبیوتیک مورد اسـتفاده در این تحقیق به ایـن خانواده تعلق دارد، جایگزینی این باکتری ها در دسـتگاه گوارش پرنده می تواند سبب تجزیـه نمک های صفـراوی و افزایش دفع مدفوعی آنهـا گردد. بنابراین نیاز به جایگزینی نمک های صفراوی سـبب سـاخت بیشتر این نمک ها توسـط جگر و در نتیجه افزایش اندازه آن می گردد (Sanford، ۱۹۹۲؛ Gilliland و همکاران ۱۹۸۵). افزایش مشاهده شده در اندازه نسبی جگر پرندگان گروه شاهد مثبت می تواند انعکاسی از افزایش کنش سم زدایی

Archive of SID

www.SID.ir

هپاتوسیت ها در پاسخ به سم داخلی[7] (لیپوپلی ساکارید) رها شده توسط سالمونلا در جگر باشد(Leeson و Leeson، ۱۹۸۱). مکانیسم اخیر می تواند در افزایش وزن نسبی جگر مشاهده شده در گروه های دریافت کننده پروبیوتیک نیز سهیم باشد. بورس فابریسیوس از نظر موقعیت تشریحی و ارتباط با انتهای مجرای گوارش و همچنین کنش ایمنی با طحال تفاوت های بنیادی دارد (Glick، ۲۰۰۰ ;Gore و Qureshi، ۱۹۹۷) و در مقایسه با طحال به طور موثرتری می تواند تحت تاثیر عوامل مرتبط با دستگاه گوارش (میکروارگانیسم ها و آنتی ژن ها) قرار گیرد (Klasing، ۱۹۹۸). تحریک این اندام می تواند توسط هر دوی میکروارگانیسم های بیماریزا (سالمونلای چالش داده شده) و میکروارگانیسم های پروبیوتیکی اتفاق افتاده باشد. نتایج بدست آمده افزایش وزن نسبی بورس را در گروه های دریافت کننده پروبیوتیک و همچنین گروه شاهد مثبت نشان می دهد، اما Awad و همکاران (۲۰۰۹) تاثیرپذیری وزن نسبی بورس فابریسیوس از دریافت پروبیوتیک را رد نمودند.

نتیجه گیری کلی

کارایی روش های مختلف تجویز پروبیوتیک در جوجه مرغ و بلدرچین متفاوت است و بر اساس نتایج حاضر استفاده از پروبیوتیک در جوجه بلدرچین به روش افشانه بهترین نتایج را در حفاظت علیه آلودگی سالمونلا ایجاد نمود. از نظر وزن بدن نیز کارامدترین روش های تجویز در مورد بلدرچین به ترتیب روش تجویز دهانی، تلفیق روش های دهانی-کلوآکی و کلوآکی بودند.

پاورقی ها

1- Altrial
2- Cloacal drinking
3- Razi instute type culture collection
4- Cross contamination
5- Preening
6- Deconjugation
7- Endotoxin

منابع مورد استفاده

1- Andereatti Filho, R. L., Higgings, J. P. and Higgings, S. E. (2007) Ability of bacteriophages isolate from different source to reduce *Salmonella enteritidis in vitro and in vivo*. Poultry Science. 86:1904-1909.

2- Awad, W. A., Ghareeb, K., Abdel-Raheem, S. and Bhm, J. (2009) Effects of dietary inclusion of probiotic and synbiotic on growth performance,organ weights, and intestinal histomorphology of broiler chickens. *Poultry Science*. 88:49–55.

3- Betancor, L., Schelotto, F. and Fernandez, M. (2005) An attenuated *Salmonella enteritidis* strain derivative of the main genotype circulating in Uruguay is an effective vaccine for chickens. *Veterinary Microbiology*. 107(1):81-89.

4- Buck, J., Van, F. and Immerseel, F. (2004) Colonization of the chicken reproductive tract and egg contamination by Salmonella. *Applied Microbiology*. 97: 233–245.

5- Carter, T. C. (1975) The hen's egg. Estimation of shell superficial area and egg volume using measurements of fresh egg weight and shell length and breadth alone or in combination. *British Poultry Science.* 16: 541-543.

6- Center for Disease Control and Prevention. (2005) *Salmonella Surveillance*: Annual Summary, 2004. US Dept. Health Human Service, Atlanta, GA.

7- Coates, M.E. and Fuller, R. (1977) *The gnoto animal in the study of gut microbiology.* In: R.T.J. Clarke and T. Bauchop (Eds). Microbial Ecology of the Gut. Academic Press. London, pp: 311-346.

8- Corrier, D.E., Hollister, A.G., Nisbet, D.J., Scanlan, C.M., Beier, R.C. and Deloch, J.R. (1994) Competitive exclusion of *Salmonella enteritidis* in leghorn chicks: comparison of treatment by crop gavage, drinking water, spray, or lyophilized alginate beads. *Avian Disease.* 38: 297-303.

9- Corrier, D. E., Nisbet, D. J., Hollister, A. G. Beier, R. C., Scanlan, C. M. Hargis, B. M. and Deloach, J. R. (1994) Resistance against *Salmonella enteritidis* cecal colonization in Leghorn chicks by vent lip application of cecal bacteria culture. *Poultry Science.* 73: 648-652.

10- De Smet, I., van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christiaens, H. and Verstraete, W. (1995) Significance of bile-salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*. 79:292-301.

11- Edens, F.W., Parkhurst, C.R., Casas, I.A. and Dobrogosz, W.J. (1997) Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administraition of Lactobacillus reuteri. *Poultry Science.*76:179-196.

12- Fuller, R. (1989) A review: Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*. 66:365-378

13- Gilliland, S.E., Nelson, C.R. and Maxwell, C. (1985) Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus* bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 49:337-381.

14- Glick, B. (2000) *Immunophysiology*. In:Sturkie's avian physiology. Edited by G.C.,Whittow. Academic press. California. USA. Pp. 657-670.

15- Gore, A. B. and Qureshi, M. A. (1997) Enhancement of humoral and cellular mmunity by vitamin E after embryonic exposure. *Poultry Science*, 76: 984-991.

16- Grimes, J. L., Rahimi, S., Oviedo, E., Sheldon, B. W., and Santos, B. O. (2008) Effect of direct-fed microbial (primalac) on

Archive of SID

23- Klasing, K.C. (1998) *Comparative Avian Nutrition.* CABI, New York , USA. PP. 30-33.

24- Leeson, T. S. and Leeson, C. R. (1981) *Histology*. 4th ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company. USA.

25- NRC, (1994) *Nutrient requirements of poultry*. 9th revised ed. National Academy Press. Washington, DC.

26- Pivnick, H. and Nurmi, E. (1982) *The Nurmi concept and its role in the control of Salmonella in poultry*. In: R. Davis (Ed). Development in food microbiology. Applied Science Publishers. London. PP: 41-70.

27- Rahimi, S., Moghadam Shiraz, Z., Zahraei, T., Karimi Torshizi, M. A. and Grimes, J. L. (2007) Prevention of salmonella infection in poultry by specific egg-derived antibody. *International Journal of Poultry Science*. 6 (4): 230-235.

28- Revolledo, L., Ferreira, A. J. P. and Mead, G. C. (2006) Prospects in Salmonella control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *Journal of Applied Poultry Research.* 15(2): 341-351.

29- Rolfe, R. E. (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *Journal of Nutrition*. 130:396-402.

30- Sanford, P. A. (1992) *Digestive system physiology*. 2nd edition. Edward Arnold. UK.

31- Vicente, J., Wolfenden, A., Torres-Rodriguez, A., Higgins, S., Tellez, G. and Hargis, B. (2007) Effect of a Lactobacillus species-based probiotic and dietary lactose prebiotic on turkey poult performance with or without *Salmonella enteritidis* Challenge. *Journal of Applied Poultry Research*. 16:361–364.

32- Zahraei Salehi, T. (1999) *Salmonellae*. University of Tehran Press. Tehran. Pp. 9-120.

turkey poult performance and susceptibility to oral salmonella challenge. *Poultry Science*, 87: 1464-1470.

17- Hashemzadeh, Z., Karimi Torshizi, M. A., Rahimi, Sh., Razban, V. and Zahraei Salehi, T. (2010) Perevention of Salmonella in neonatal broiler chicks by probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. *Journal of Agricultural Science and Technology*. (Accepted for publication)

18- Higgins, P., Higgins, S. E., Vicente, J. L., Wolfenden, A. D., Tellez, G., and Hargis, B. M. (2007) Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on Salmonella in neonatal broilers. *Poultry Science*. 86(8): 1662-1666.

19- Higgins, S.E., Erf, G. F., Higgins, J. P., Henderson, S. N., Wolfenden, A. D., Gaona-Ramirez, G. and Hargis, B. M., (2007) Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of Salmonella enteritidis by abdominal exudate Cells. *Poultry Science*, 86:2315-2321.

20- Higgins, S.E., Higgins, J. P., Wolfenden, A. D., Henderson, S. N., Torres-Rodriguez, A., Tellez, G., and Hargis, B. (2008) Evaluation of a lactobacillus-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poultry Science*, 87: 27-31.

21- Isolauri, E., Suitias, Y., Kankaanpaa, P. and Salmienen, S. (2001) Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73:444S–450S.

22- Karimi Torshizi, M. A., Moghaddam, A. R., Rahimi, Sh., Mojgani, N. (2010) Assessing the effect of administering probiotics in water or as a feed supplement on broiler performance and immune response. *British Poultry Science*. 51(2):178-184.

Archive of SID

www.SID.ir