

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

تاریخ دریافت: بهمن ماه ۱۳۸۸ تاریخ پذیرش: 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 کلواک و سه گروه تلفیقی: تلقیح به کلواک و تزریق به تخم، تلقیح به کلواک 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 $10^2 \times 1/75$ 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 ($P < 0/01$). 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 ($P < 0/05$). روش تجویز پروبیوتیک بر وزن نسبی جگر و بورس تاثیر معنی داری داشت ($P < 0/05$).

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

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 1.75104×10^4 cfu / ml *Salmonella enteritidis* using oral gavage except negative control 36 h post probiotic treatment. 12 chicks from each group were euthanized by CO2 inhalation 24 h postchallenge. 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 سیاست‌گذاری 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 بیماری‌های 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 تخم‌گذار) جایگاه ویژه‌ای یافته است؛ اما به دلیل برخی مشکلات مانند نگرانی از حضور قابل‌ملاحظه کلسترول در فرآورده‌های گوشت و تخم مرغ و نیز تا اندازه‌ای تنوع بخشیدن به ذائقه افراد، نیاز به پرورش پرنده‌های دیگر احساس می‌شود. بلدرچین علاوه بر تولید گوشت و تخم، به دلیل سرعت رشد بالا و فاصله نسلی کوتاه، به عنوان پرنده آزمایشگاهی هم کاربرد دارد (NRC, 1994).

پرندگان در چرخه انتقال باکتری‌های بیماری‌زا به انسان نقش واسطه‌ای دارند. از مهم‌ترین این باکتری‌ها انواع سالمونلا می‌باشند که عامل عفونت‌های آنتریکولیک در انسان هستند.

(Revolledo و همکاران ۲۰۰۶) و به نظر می‌رسد فرآورده‌های 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 می‌باشند 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 مرغداری‌ها که گاهی به ۸۰ درصد هم می‌رسد، علاوه بر خسارات هنگفت ناشی از هزینه دارو، تلفات و کاهش وزن جوجه‌ها، در نهایت آلودگی مواد غذایی و کمبود پروتئین را نیز باعث گردیده است و از راه انتقال آلودگی، گسترش بیماری و بروز مسمومیت‌های غذایی در انسان، صدمات جبران‌ناپذیری بر بهداشت تغذیه و سلامت جامعه وارد می‌کند. علاوه بر این تولید گوشت عاری از هر گونه آلودگی میکروبی، هدف بنیادی در صنعت پرورش طیور محسوب می‌شود (Rahimi و همکاران ۲۰۰۷). گفته شده است که سروتیپ انتریتیدیس *S. enterica*، دومین سروتیپ معمول در عفونت‌های انسانی می‌باشد (Center for Disease and Prevention, ۲۰۰۵).

صنعت پرورش طیور و سیاست دولت‌ها بر کاهش میزان سالمونلا در پرنده زنده تمرکز یافته است (Higgins و همکاران ۲۰۰۷a,b). در این راستا استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها در مقیاس کمتر از درمان به منظور پیشگیری از برخی بیماری‌ها و تحریک رشد مرسوم گشته است. این روش به دلایل: ۱- مقاوم شدن باکتری‌ها به آنتی‌بیوتیک پس از چندین دوره مصرف ۲- ماندگاری در محصولات طیور و از این راه انتقال به انسان، رضایت‌بخش نیست. فشار سازمان‌های بهداشتی و تمایل مصرف‌کنندگان به استفاده از فرآورده‌های عاری از آنتی‌بیوتیک، منجر به پیشرفت و توسعه روش‌های جایگزین، به ویژه پروبیوتیک‌ها، به منظور کاهش عوامل بیماری‌زا شده است.

پروبیوتیک‌ها، باکتری‌های مفیدی هستند که با بهبود سلامت روده، نتایج مثبتی بر سلامت و رشد میزبان بر جای می‌گذارند (Fuller, ۱۹۸۹). ایده استفاده از پروبیوتیک‌ها در طیور، در سال ۱۹۷۳ و زمانی که نورمی و رانتالا جوجه‌های جوان را در معرض

مستقل^۱، ورود جمعیت میکروبی به دستگاه گوارش پرنده امکان می یابد؛ این عمل به آشامیدن کلواکی^۲ معروف است (Corrier و همکاران ۱۹۹۴). در آزمایشی پرنده ها با *Styphimorium* از راه دهان چالش داده شدند و در همان روز گروهی از پرندگان با پروبیوتیک و گروهی هم با فاژ WT۴۵ از طریق کلواک تیمار شدند. در انتهای آزمایش مشاهده شد که هر دو تیمار کلواکی (پروبیوتیک و فاژ) به طور معنی داری میزان عفونت *S.entritidis* را کاهش دادند (Andereatti و Filho و همکاران ۲۰۰۷). استفاده از مقادیر مختلف پروبیوتیک از ۱۰^۲ تا ۱۰^۷ واحد کلنی از راه کلواک 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 مشابهی بر روی جوجه های گوشتی روش تلقیح به کلواک در میان سایر روش های تجویز زودهنگام پروبیوتیک در کنترل *S.entritidis* کارآمدتر اعلام گردید (Hashemzaheh و همکاران ۲۰۱۰).

دلیل انجام این آزمایش بر بلدرچین، جایگاه ویژه آن در تولید محصولات طیور و سهولت پرورش و مقاومت به عموم بیماری های رایج طیور می باشد که منجر به پرورش صنعتی و آزمایشگاهی این پرنده شده است. با توجه به این که اطلاعات و نتایج منتشر شده، اثر پذیری کارایی پروبیوتیک ها بر کاهش استقرار عوامل بیماری زا را از زمان و روش تجویز تایید می نمایند و همچنین آزمایشی که کارایی روش های مختلف تجویز پروبیوتیک بر بلدرچین را بررسی نماید، منتشر نشده است، این آزمایش با هدف بررسی کارایی روش های مختلف تجویز زودهنگام (که با ایده استفاده از پروبیوتیک ها همخوانی بیشتری دارد) پروبیوتیک بر کاهش استقرار *S.entritidis* در بلدرچین ژاپنی پی ریزی شده است.

مواد و روش ها

تعداد ۳۰۰ عدد تخم نطفه دار بلدرچین با متوسط وزنی مشابه از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه تهران خریداری و پس از ضدعفونی با گاز فرمالدهید ۲۷۰ عدد از آنها در داخل دستگاه جوجه کشی خوابانیده شدند. در این آزمایش از فرآورده تجاری پروتکسین به عنوان پروبیوتیک استفاده شد. دلیل اصلی انتخاب این فرآورده امکان استفاده از آن به صورت تعلیق در آب و در دسترس بودن اطلاعات آزمایش های انجام شده با آن بود. این فرآورده بر اساس ادعای سازنده از میکروارگانسیم های متنوعی به تعداد برابر و شمارش نهایی Cfu/g ۲×۱۰^۹ تشکیل شده است. این میکروارگانسیم 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

باکتری های روده پرنده بالغ قرار داده و شاهد جلوگیری از عفونت آن ها بودند شکل گرفت (Higgins و همکاران ۲۰۰۷). اثر مفید پروبیوتیک ها از راه هایی چون تحریک سیستم ایمنی، رقابت با میکروب های بیماری زا در روده، تولید آنزیم های گوارشی و بهبود عملکرد طیور گزارش شده است (Rofle، ۲۰۰۰؛ Coates و Fuller، ۱۹۷۷).

در آزمایشی باکتری های اسیدلاکتیک جداسازی شده از دستگاه گوارش پرنده بالغ موجب کاهش ۶۰ الی ۷۰ درصدی سالمونلا تیفی موربیوم و ۸۹ الی ۹۵ درصدی *S.entritidis*، ۲۴ ساعت پس از تیمار کردن جوجه ها شد (Higgins و همکاران ۲۰۰۷a). کاربرد پروبیوتیک در دان، منجر به کاهش کلنی های *Styphimorium* در روده بلدرچین تخم گذار گردید (Bamba و Miyakawa، ۱۹۹۴). استفاده از پروبیوتیک در جیره غذایی باعث بهبود نسبت خوراک مصرفی به افزایش وزن، کاهش جمعیت سالمونلا و بهبود عملکرد شد (Grimes و همکاران ۲۰۰۸).

روش های معمول استفاده از پروبیوتیک ها به صورت افزودن به خوراک و آب آشامیدنی است. اما بر اساس فرضیه استفاده از پروبیوتیک ها، یعنی جای گیری سریع تر باکتری های مفید (پروبیوتیک ها) در دستگاه گوارش (به ویژه روده) و اتصال به گیرنده ها و به این ترتیب مانع شدن از اتصال باکتری های بیماری زا به بافت پوششی دستگاه گوارش، بهتر است 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 بیشتری دارند، عبارتند از: تزریق به تخم جنین دار، افشانه بر روی جوجه های تازه تفریح شده، گاوژ دهانی و تلقیح کلواکی. 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 همکاران ۱۹۹۷). Casas و همکاران (۱۹۹۸) گزارش کردند استفاده از پروبیوتیک در روز اول پس از خروج از تخم، باعث کاهش ۱ تا ۲ لگاریتم در جمعیت سالمونلا تیفی موربیوم در جوجه بوقلمون ها گردید، در حالی که استفاده از پروبیوتیک در روز پنجم کارایی کمتری داشت (Grimes و همکاران ۲۰۰۸). در آزمایشی باکتری *L. roteri* را به بخش های مختلف تخم مرغ جنین دار (جنین، مایع آمینوتیک و اتافک هوایی) تزریق کردند. بهترین نتیجه از تزریق به اتافک هوایی به دست آمد (Edens و همکاران ۱۹۹۷). تجویز ۱۰^۶ و ۱۰^۸ واحد کلنی باکتری های اسید لاکتیک با روش گاوژ دهانی، در جوجه های درگیر شده با سالمونلا اثر بخش بود (Higgins 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 میکروارگانسیم های روده ای مرغ های بالغ استفاده شد (Nurmi و Pivnick، ۱۹۸۲).

در مورد تجویز پروبیوتیک از راه کلواک، پژوهش های زیادی انجام نشده است (Andereatti Filho و همکاران ۲۰۰۷؛ Karimi و Torshizi و همکاران ۲۰۱۰). در شرایط طبیعی، با تغذیه مستقیم جوجه ها توسط والدین و نیز حرکت مکشی مقعد در پرندگان غیر

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 پرندۀ 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 میانگین ها به روش آزمون چند دامنه ای 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 در نظر 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 سالمونلا مثبت در روش های افشانه، کلواکی - افشانه و کلواکی - 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 طوری که 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 لمفونیدی 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.

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، گاوژ دهانی، تلقیح به کلواک و سه گروه تلفیقی تلقیح به کلواک - تزریق به تخم، تلقیح به کلواک - افشانه و تلقیح به کلواک - گاوژ دهانی) بودند. در روز ۱۴ جوجه کشی تخم های گروه تزریقی قبل از قرار گیری در هچری با تنبور بد در محل اتاقت هوایی ضد عفونی شده و عمل تزریق با 2×10^6 cfu فراورده پروبیوتیکی با حجم $50 \mu\text{l}$ در محل اتاقت هوایی انجام شد. همچنین تخم های گروه تلفیقی کلواکی - تزریقی با همان روش قبلی 1×10^6 cfu فراورده پروبیوتیکی در حجم $50 \mu\text{l}$ 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 $7/2 \times 10^6$ cfu فراورده پروبیوتیکی را به روش افشانه (اسپری) برای هر جوجه دریافت نمود. جوجه های گروه تلقیح کلواکی، مقدار 2×10^6 cfu باکتری را در حجم $50 \mu\text{l}$ پس از تخلیه محتویات کلواک با فشار ملایم بر شکم جوجه ها، از راه کلواک (مقعد) دریافت نمودند. برای گروه گاوژ دهانی، مقدار 2×10^6 cfu فراورده پروبیوتیکی در حجم $60 \mu\text{l}$ از راه دهان تجویز شد. گروه های تلفیقی که در روز ۱۴ جوجه کشی 1×10^6 cfu باکتری پروبیوتیکی را به روش تزریق به اتاقت هوایی دریافت کرده بودند، در روز خروج از تخم نصف میزان تلقیح میکروارگانیزم 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 تفریح 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 $10^4 \times 1/75$ S.entritidis از راه دهان چالش داده شدند. باکتری مورد استفاده از گنجینه میکروبی موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی تهیه شد (RITCC ۱۶۲۴). زمان ۲۴ ساعت پس از درگیر شدن با S.entritidis، پرندۀ 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 پرندۀ (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 $100 \mu\text{l}$ از محلول به لوله های حاوی ۱۰ ml محلول آبگوششت راپاپورت وازبیلادیس (مرک

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

نمره (انحراف معیار \pm میانگین)	تعداد کل پرنده های چالش داده شده / تعداد پرنده های آلوده (درصد)	
$0/00 \pm 0/00^c$	0 / 12 (0) ^d	شاهد منفی
$3/75 \pm 1/28^a$	11 / 12 (91/7) ^a	شاهد مثبت
$4/60 \pm 0/84^a$	10 / 10 (100/0) ^a	دهانی
$4/08 \pm 1/37^a$	12 / 12 (100/0) ^a	کلواکی - دهانی
$3/60 \pm 0/81^a$	6 / 6 (100/0) ^a	تزریقی
$3/50 \pm 1/16^a$	11 / 12 (91/7) ^a	کلواکی
$3/50 \pm 1/60^a$	7 / 8 (87/5) ^{ab}	کلواکی - تزریقی
$4/25 \pm 1/54^a$	10 / 12 (83/3) ^{ab}	کلواکی - افشانه
$1/66 \pm 1/37^b$	3 / 12 (25/0) ^c	افشانه
xx	xx	معنی داری

abc میانگین های با حروف نا مشابه در هر ستون، از نظر آماری متفاوتند ($P < 0/01$).

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

P-Value	SEM	کلواکی	کلواکی - افشانه	افشانه	کلواکی - دهانی	دهانی	شاهد مثبت	شاهد منفی	
0/02	0/175	46/3 ^{ab}	44/4 ^{bc}	43/2 ^{bc}	46/8 ^{ab}	49/9 ^a	41/3 ^c	43/5 ^{bc}	وزن بدن (گرم)
وزن نسبی اندام های درونی (گرم در 100 گرم وزن بدن)									
0/0005	0/21	4/92 ^a	6/11 ^a	5/57 ^a	6/11 ^a	5/64 ^a	4/81 ^{ab}	3/54 ^b	جگر
0/085	0/007	0/061	0/103	0/054	0/092	0/105	0/057	0/053	طحال
0/018	0/006	0/098 ^{ab}	0/114 ^{ab}	0/082 ^b	0/095 ^{ab}	0/126 ^a	0/091 ^{ab}	0/048 ^c	بورس

abc میانگین های با حروف نا مشابه در هر ردیف، از نظر آماری متفاوتند ($P < 0/01$).

SEM: اشتباه معیار میانگین

بحث

جدا نشدن سالمونلا از لوزه سکومی پرندگان گروه شاهد منفی جدول ۱ با توجه به عدم چالش این پرندگان با *Sentritidis*، 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 بودند. بنابراین انتقال متقاطع آلودگی^۲ سالمونلا بین گروه های آزمایشی منتفی می باشد.

کاربرد پروبیوتیک به روش افشانه موجب کمترین 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 سالمونلا محافظت شده بودند. نکته جالب توجه شدت کم آلودگی در ۲۵ درصد پرندگان آلوده این گروه می باشد. به طوریکه نمره آلودگی در پرندگان این گروه بیانگر بیش از یک چهارم کاهش شدت آلودگی در مقایسه با کمترین شدت آلودگی مشاهده شده در سایر گروه های آزمایشی است (نمره ۱/۶۶ در برابر ۳/۵۰). کاربرد کلواکی گرچه به تنهایی در برابر آلودگی سالمونلایی محافظت ایجاد نکرد، اما در ترکیب با روش های افشانه و تزریقی کارایی آن به میزان اندکی افزایش یافت، در حالی که ترکیب روش کلواکی با روش دهانی اثر حفاظتی نشان نداد.

در روش افشانه، میکروارگانیزم های افشانه شده بر سطح بدن در پی رفتار پرآرایی^۵ توسط منقار به دستگاه گوارش راه می یابند. تاثیر مثبت افشانه نمودن فراورده های حذف رقابتی بر کاهش آلودگی سالمونلایی توسط (Pivnick و Nurmi، ۱۹۸۲) در جوجه های گوشتی گزارش شده است. در برخی پژوهش های انجام شده بر روی جوجه مرغ، روش افشانه در مقایسه با سایر روش های تجویز پروبیوتیک کارایی مطلوبی نداشته است (Moghaddam و همکاران ۲۰۱۰ Hashemzadeh و همکاران ۲۰۱۰)، در حالیکه یافته های پژوهش حاضر با بلدرچین بهترین کارایی در حفاظت علیه آلودگی سالمونلایی را با روش افشانه نشان 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 متوسط وزن جوجه های بلدرچین در تحقیق کنونی ($8/03 \pm 0/35$ گرم) و در گزارش های جوجه مرغ به طور متوسط $42/52 \pm 1/71$ 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 اندازه، از طریق ریاضی اثبات می گردد. به منظور برآورد این روابط با فرض تبعیت شکل و اندازه بدن جوجه تازه تفریخ شده از تخم، از رابطه معرفی شده توسط Carter (۱۹۷۵) سطح بدن جوجه ها تقریب زده شد. این رابطه سطح تخم را به صورت زیر با استفاده از وزن تخم تعیین می نماید:

$$0/7056 (\text{وزن تخم-گرم}) = 3/9782 \times \text{سطح تخم (سانتی متر مربع)}$$

چنانچه چنین رابطه ای را برای جوجه های بلدرچین و مرغ بپذیریم، مشاهده می گردد که نسبت سطح به وزن بدن به طور متوسط برای جوجه بلدرچین ۱/۶ برابر یا به عبارتی ۶۰ درصد بیشتر از جوجه مرغ می باشد. بنابراین احتمال دریافت نسبی میکروارگانیزم های پروبیوتیکی افشانه بر سطح بدن جوجه در بلدرچین بیش از مرغ می باشد. همچنین

به نظر می رسد پوشش پرهای نخستین در جوجه بلدرچین انبوه تر از جوجه مرغ است و این موضوع در صورت اثبات می تواند اندوخته بالاتری از میکروارگانیزم های پروبیوتیکی را برای پرنده فراهم نماید. در محاسبات فوق مواردی به ناچار به صورت غیر دقیق ساده انگاشته شده اند تا محاسبات با استفاده از روابط ریاضی مقدور گردد، نظیر عدم لحاظ ناهمواری سطح بدن جوجه ها، تبعیت کامل شکل بدن جوجه از شکل تخم و پرپوش های سطح بدن جوجه. در عین حال تفاوت سطح نسبی در این دو گونه مشهود است. بدیهی است که فرضیات بالا در شرایط برابری دوز تجویز پروبیوتیک افشانه شده صادق می باشد.

برخلاف نتایج سایرین که تزریق تعلیق پروبیوتیک را بر جوجه درآوری تخم مرغ بی اثر گزارش نمودند (Edens و همکاران ۱۹۹۷)، استفاده از این روش در مورد تخم بلدرچین هنگامی که ۵۰ میکرولیتر تعلیق پروبیوتیک تزریق شد، منجر به جوجه درآوری حدود ۲۳ درصد در مقابل ۷۲ درصد برای سایر گروه ها گردید. به نظر می رسد علت جوجه درآوری پایین تخم های تزریق شده، انسداد منافذ غشای پوسته توسط تعلیق پروبیوتیک و خفگی جنین پیش از تفریخ باشد.

عدم تفاوت معنی دار در وزن بدن پرندگان گروه های شاهد مثبت و منفی بیانگر عدم تاثیر چالش سالمونلا بر وزن بدن در سن 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 نقشی اساسی در متابولیسم مواد مغذی بویژه چربی و پروتئین ایفای می نماید. علاوه بر این سم زدایی نیز از کنش های اصلی این عضو می باشد. رابطه افزایش فعالیت اندام ها با اندازه آنها تحت مکانیزم های هایپرتروفی و هایپرپلازی شناخته شده می باشد (Gore و Qureshi، ۱۹۹۷؛ Awad و همکاران ۲۰۰۹). رشد بالاتر در پرندگان دریافت کننده پروبیوتیک در مقایسه با گروه شاهد مثبت (وزن بدن) نیازمند تامین مواد مغذی بیشتر در مقایسه با پرندگان این گروه می باشد. فعالیت جگر در تامین سوسترای بیشتر به منظور تکافوی نیازهای افزوده غذایی می تواند یکی از علل احتمالی افزایش وزن این عضو در در گروه های دریافت کننده پروبیوتیک در آزمایش حاضر باشد. البته Grimes و همکاران (۲۰۰۸) در آزمایش خود به عدم تاثیرپذیری وزن نسبی جگر بوقلمون از دریافت پروبیوتیک رسیدند، اما در تحقیق Awad و همکاران (۲۰۰۹) افزایش معنی داری در وزن نسبی جگر گروه دریافت کننده پروبیوتیک با گروه شاهد مشاهده گشت. از سوی دیگر، پدیده مزدوج زدایی^۶ رخداد شناخته شده ای در برخی باکتری های خانواده اسید لاکتیک می باشد (De smet و همکاران ۱۹۹۵؛ Sanford، ۱۹۹۲). از آنجا که عمده میکروارگانیزم های تشکیل دهنده پروبیوتیک مورد استفاده در این تحقیق به این خانواده تعلق دارد، جایگزینی این باکتری ها در دستگاه گوارش پرنده می تواند سبب تجزیه نمک های صفرآوی و افزایش دفع مدفوعی آنها گردد. بنابراین نیاز به جایگزینی نمک های صفرآوی سبب ساخت بیشتر این نمک ها توسط 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

- 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 administration 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 immunity 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

هیپاتوسیت ها در پاسخ به سم داخلی^۷ (لیپوپولی 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 (میکروارگانیزم ها و آنتی ژن ها) قرار گیرد (Klasing, ۱۹۹۸). تحریک این اندام می تواند توسط هر دوی میکروارگانیزم های بیماریزا (سالمونلا) چالش داده شده و میکروارگانیزم 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 کارآمدترین روش های تجویز در مورد بلدرچین به ترتیب روش تجویز دهانی، تلفیق روش های دهانی-کلواکی و کلواکی بودند.

پاورقی ها

- 1- Altrial
- 2- Cloacal drinking
- 3- Razi institute 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.

- 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- Revollo, 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) Prevention 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., Suias, Y., Kankaanpaa, P. and Salmiinen, S. (2001) Probiotics: Effects on immunity. *American Journal of Clinical Nutrition*. 73:444S-450S.
- 22- Karimi Torshizi, M. A., Moghadam, A. R., Rahimi, Sh., Mojangani, 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.

