اثر فرمالدئید بر کاهش آلودگی باکتریهای گرم منفی غیرکلی فرمی در تخم مرغهای قابل جوجه کشی

غلامعلی کلیدری[۱].حمید مویدیان[۲].علی اسلامیان[۳] و محمد محسن زاده[۴]
۱- بخش علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۲- رزیدنت تخصصی بهداشت و بیماریهای طیور دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳- فارغ التحصیل دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران
۴- بخش پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران

خلاصه:

در مطالعه حاضر ما اثر فرمالدئید را بر روی کاهش آلودگی پوسته ، زرده و کیسه زرده ارزیابی نمودیم. ۲۴۰ عدد تخم مرغ قابل جوجه کشی از یک مزرعه مرغ مادر و کارخانه جوجه کشی آن مزرعه بعلاوه ۶۰ قطعه جوجه تازه هچ شده همان کارخانه جوجه کشی (طی ۵ مرحله) جهت انجام آزمایشات باکتریولوژی انتخاب گردید. ابتدا پوسته تخم مرغها با محلول آب پپتونه شستشو گردید و سپس به محیط سلنیت سیستئین انتقال یافته و انکوبه شد. همچنین محلول حاصله بطور مجزا انکوبه گردید. سپس ما پوسته ها را استریل کرده و تخم مرغها را شکسته ، زرده ها را هموژن کرده و به محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین منتقل نمودیم و انکوبه کردیم. بعلاوه ما پوست ناحیه شکم هر یک از جوجه های تازه هچ شده را استریل کرده ، سپس کالبدگشائی نمودیم ، محتویات کیسه زرده ها را هموژن کرده و به محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین منتقل نمودیم و انکوبه کردیم. پس از آن ما از کلنی های بدست آمده بر روی محیطهای مک کانکی آگار ، بلاد آگار و XLD کشت دادیم و انکوبه نمودیم. نهایتا ما از محیطهای کشت تفریقی استفاده کردیم. در مرحله ۱ از ۱۸/۳۳ ٪ پوسته های تخم مرغها ، در مرحله ۲ از ۱۱/۶۶ ٪ پوسته های تخم مرغها ، در مرحله ۳ از ۸/۳۳ ٪ پوسته های تخم مرغها و در مرحله ۴ از ۱۰ ٪ پوسته های تخم مرغها آلکالیژنز فکالیس جدا شد. همچنین در مرحله ۵ از ۱۱/۶۶ ٪ کیسه های زرده جوجه های تازه هچ شده آلکالیژنز فکالیس جدا شد. در هیچیک از مراحل از زرده تخم مرغها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا نگردید. بر اساس این تحقیق حضور باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی بر روی پوسته تخم مرغهای قابل جوجه کشی عادی و طبیعی است.

جمع آوری تخم مرغ هرچه سریعتر پس از تخمگذاری و ضدعفونی صحیح با فرمالدئید بایستی کاهش آلودگی باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی معنی داری را ایجاد کند که خطر نفوذ باکتری به داخل زرده بطور چشمگیری کاهش بیابد اما فرمالدئید نتوانست بر روی این آلودگیها بطور معنی داری ($p = ۰/۳۲۳$) مؤثر باشد. فقط کاهش آلودگی بین مراحل ۱و۳ معنی دار ($p = ۰/۰۴۹$) بود که می توان نتیجه گرفت دلیل آن ضدعفونی دوم در هچری می باشد.

کلمات کلیدی: فرمالدئید ، تخم مرغ قابل جوجه کشی ، جداسازی ، باکتری غیر کلی فرمی

مقدمه:

عفونت کیسه زرده بیماری شایع در هفته اول زندگی جوجه ها می باشد. این عفونت اغلب در نتیجه آلودگی پوسته تخم مرغ (۱و۲) ایجاد می گردد. عفونت ممکن است ناشی از آلودگی با باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی به تنهائی بصورت عفونت اولیه یا همراه با عوامل عفونی دیگر بصورت عفونت ثانویه یا عفونت مخلوط (۳و۴) باشد. عفونت کیسه زرده در پرندگان جوان ممکن است به دلیل ورود میکروارگانیسم از طریق ناف التیام نیافته یا نفوذ از پوسته تخم مرغ پیش از یا در طی انکوباسیون رخ دهد(۵و۶). مدیریت صحیح تخم مرغ همراه با مدیریت مناسب کارخانه جوجه کشی و برنامه صحیح بهداشتی جهت پیشگیری از آلودگی زودرس از ضروریات هستند. ابتلاء به عفونت کیسه زرده در جوجه های گوشتی در استرالیا حدود ۵-۱ ٪ می باشد (۷). ابتلاء در ایران حدود ۱۰ ٪ و تلفات نیز ۱۰-۵ ٪ می باشد (۸). در بریتانیا تلفات ناشی از عفونت کیسه زرده به دلیل سالمونلا ۲ ٪ می باشد. سودوموناس آئروژینوزا و پروتئوس ولگاریس برای جنین و جوجه

بیماریزائی دارند که توسط آنزیم پروتئاز این بیماریزائی را ایجاد می کنند (۹). در مطالعه حاضر اثر فرمالدئید بر کاهش آلودگی باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی تخم مرغهای قابل جوجه کشی ارزیابی گردید.

مواد و روش کار:

۲۴۰ عدد تخم مرغ قابل جوجه کشی از یک مزرعه مرغ مادر گوشتی و کارخانه جوجه کشی آن مزرعه و همچنین ۶۰ قطعه جوجه تازه هچ شده آن کارخانه جوجه کشی بر اساس طرح تصادفی از مراحل مختلف انتخاب شدند. مراحل شامل: ۱- پیش از تمیز کردن و ضدعفونی اول تخم مرغها ۲- پس از ضدعفونی اول ۳- پیش از قرار دادن تخم مرغها در داخل دستگاه ستر ۴- زمان انتقال تخم مرغها از ستر به هچر ۵- جوجه های تازه هچ شده. پوسته و زرده هر یک از تخم مرغها و کیسه زرده جوجه های تازه هچ شده جهت حضور باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی مورد آزمایش قرار گرفتند. ابتدا پوسته های تخم مرغ با محلول آب پپتونه شستشو گردید و سپس این محلول ها به محیط سلنیت سیستئین انتقال داده شده و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردیدند ، همچنین این محلول ها جداگانه انکوبه گردیدند. سپس ما پوسته تخم مرغها را توسط الکل ^{o}۷۰ استریل نمودیم و پوسته ها را شکسته ، سفیده ها را خارج کرده ، زرده ها را هموژن کرده و به محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین منتقل کرده و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه نمودیم. علاوه بر آن ما پوست شکم هر یک از جوجه های تازه هچ شده را توسط الکل ^{o}۷۰ استریل نمودیم ، سپس آنها را کالبدگشائی کرده ، کیسه زرده را بیرون کشیدیم ، هموژن کرده و به محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین منتقل کرده و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۲۴ ساعت انکوبه نمودیم. پس از آن ما از کلنی های رشد کرده بر روی محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین بر روی محیطهای مک کانکی آگار و بلاد آگار کشت داده و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه نمودیم. همچنین ما از کلنی های رشد کرده بر روی محیطهای آب پپتونه و سلنیت سیستئین بر روی محیط XLD کشت داده و در دمای ^{o}C ۳۷ به مدت ۴۸-۲۴ ساعت انکوبه نمودیم. پس از آن اگر کلنی ها بر روی این محیطها رشد نکرده بودند ما محیطها را به مدت ۲۴ ساعت دیگر انکوبه می کردیم و اگر رشد کرده بودند ما از محیطهای تفریقی TSI ، سیمون سیترات ، MR ، VP ، حرکت ، ایندول ، اوره آز جهت تفریق سالمونلا و اشریشیا کلی استفاده می کردیم. ما از گاز فرمالدئید جهت گازدهی تخم مرغها بصورت ۴۰cc فرمالین و ۲۰gr پرمنگنات پتاسیم به ازاء هر متر مکعب فضا بهره بردیم. در نهایت نتایج بدست آمده بوسیله آزمون کای مربع با نرم افزار SPSS نسخه شماره ۱۳ آنالیز گردید.

نتایج:

مرحله ا : از ۶۰ پوسته تخم مرغ ، ۱۱ پوسته (۱۸/۳۳ ٪) ، آلودگی با آلکالیژنز فکالیس داشتند. مرحله ۲ : از ۶۰ پوسته تخم مرغ ، ۷ پوسته (۱۱/۶۶ ٪) ، آلودگی با آلکالیژنز فکالیس داشتند. مرحله ۳ : از ۶۰ پوسته تخم مرغ ، ۵ پوسته (۸/۳۳ ٪) ، آلودگی با آلکالیژنز فکالیس داشتند. مرحله ۴ : از ۶۰ پوسته تخم مرغ ، ۶ پوسته (۱۰ ٪) ، آلودگی با آلکالیژنز فکالیس داشتند. مرحله ۵ : از ۶۰ کیسه زرده ، ۷ کیسه زرده (۱۰ ٪) ، آلودگی با آلکالیژنز فکالیس داشتند. در هیچیک از مراحل باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی از زرده ها جدا نگردید.

بحث:

بررسی گله های گوشتی در هلند آلودگی ۹۴ ٪ نمونه های مدفوعی را با سالمونلا تایید کرد و نیز ۴۰ ٪ گله های مادر در آمریکا آلوده به سالمونلا بودند (۱۰). کوکس و همکاران در سال ۱۹۹۷ کاهش در بروز و سطح سالمونلا را در کارخانجات گوشتی تجارتی در آمریکا از ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۵ گزارش کردند. مرحله ۱ : در این مرحله میزان آلودگی ۱۸/۳۳ ٪ بود. آلکالیژنز فکالیس تنها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا شده از پوسته ها بود. منبع اصلی آلودگی تخم مرغ مدفوع می باشد. منابع دیگر آلودگی شامل : سیستم تناسلی مرغ ، گرد و غبار ، بستر و دستهای کارگران جمع آور تخم مرغ می باشد. بورد در سال ۱۹۶۶ هیچ باکتری از سفیده و زرده تخم مرغها نتوانست جدا کند (۱۱). بزرگمهری فرد در سال ۱۳۷۱ نیز هیچ باکتری از زرده تخم مرغها نتوانست جدا کند. محققین دیگر نیز نتایج مشابه در مورد جداسازی باکتری از محتویات تخم مرغها گرفتند (۱۲). پلت کردن غذا بعنوان روشی مفید جهت کاهش آلودگی سالمونلائی مرغهای مادر گوشتی پیشنهاد

می گردد (۱۲). استرسها می توانند سبب شوند که سالمونلا از طریق مدفوع دفع شود (۱۳). سالمونلا از موش Rat جدا شد و نقش آن در انتقال سالمونلا موکدا ذکر گردیده است (۱۴). همچنین بستر ۴ ٪ آلودگی سالمونلائی نشان داد (۱۵). میزان آلودگی پوسته تخم مرغ به سالمونلا در تحقیقی ۶ ٪ بود (۱۶). در تحقیقی دیگر ۷۱ ٪ باکتریهای جدا شده از پوسته ۲۲۵ تخم مرغ باکتریهای گرم منفی بودند که شامل : سالمونلا و پروتئوس می شدند (۱۷). در تحقیقی ۱۴/۳ ٪ سالمونلا از ۲۳۴۵ سکوم مرغهای مادر جدا گردید (۱۸). سالمونلا از پوسته تخم مرغهای دو مزرعه مادر در عربستان جدا گردید به این شکل که در یک مزرعه آلودگی ۱/۲۴ ٪ و در دیگری ۲/۰۶ ٪ بود (۱۹). هامپفری و همکاران در سال ۱۹۹۱ نشان دادند که ۰/۶ ٪ از ۵۷۰۰ تخم مرغ مربوط به ۱۵ مزرعه آلودگی سالمونلائی داشتند. مرحله ۲ : در این مرحله میزان آلودگی ۱۱/۶۶ ٪ بود که در مقایسه با مرحله قبل ۶/۶۷ ٪ کاهش یافته بود اما این کاهش معنی دار نبود ($p = ۰/۲۷۳$). مجددا آلکالیژنز فکالیس تنها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا شده از پوسته ها بود. در این مرحله تخم مرغها با کاغذ سنباده تمیز و سپس درجه بندی می شدند. این اقدامات سبب کاهش میزان آلودگی بر روی پوسته می گردد. دلیل عدم حضور باکتریها در زرده این است که جمع آوری و درجه بندی تخم مرغها بلافاصله پس از تخمگذاری صورت گرفته است. مواتس در سال ۱۹۷۹ ثابت کرد که برخی مواد ضدعفونی کننده مانند ترکیبات چهارتائی آمونیوم یا هیپوکلریت سدیم می توانند میزان آلودگی باکتریائی را کاهش دهند اما این کاهش ها خیلی بارز نبود. ماریس در سال ۱۹۸۶ اظهار نمود که فرمالدئید بیشترین اثر را بر روی کاهش آلودگی باکتریهای پوسته تخم مرغ دارد و پس از آن ترکیبات فنله و یده مؤثرترین می باشند.کناپ و همکاران در سال ۲۰۰۲ نقش تمیز کردن و ضدعفونی پوسته تخم مرغها را در کاهش آلودگی پوسته به اثبات رساندند. اسمیت و همکاران در سال ۲۰۰۰ بر نقش رطوبت سطحی تخم مرغها در نفوذ میکروارگانیسم ها تاکید نمودند. بنابراین ما نتیجه می گیریم که اگر جمع آوری صحیح و سریع تخم مرغها ، بکارگیری ماده ضدعفونی کننده مناسب و سطح مناسب رطوبت به دقت رعایت گردد و همراه با کیفیت بالای پوسته تخم مرغها باشد ، آلکالیژنز فکالیس نمی تواند به داخل نفوذ کند. مرحله ۳ : در این مرحله میزان آلودگی ۸/۳۳ ٪ بود که در مقایسه با مرحله قبل ۳/۳۳ ٪ و در مقایسه با مرحله اول ۱۰ ٪ کاهش نشان داد. میزان کاهش آلودگی این مرحله نسبت به مرحله قبل اختلاف معنی داری نداشت ($p = ۰/۳۷۱$) اما نسبت به مرحله اول اختلاف معنی دار بود ($p = ۰/۰۴۹$). همانند مراحل قبلی ، آلکالیژنز فکالیس تنها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا شده از پوسته ها بود. پس از انتقال تخم مرغها از مزرعه به کارخانه جوجه کشی ، تخم مرغها پس از ۲۴ ساعت از ضدعفونی اول مجددا در کارخانه جوجه کشی با فرمالدئید ضدعفونی می شوند. سپس در سردخانه تا هنگام چیدن در دستگاه ستر نگهداری می شوند. اگرچه نتایج نشان می دهد که ضدعفونی دوم میزان آلودگی را بطور معنی داری کاهش نمی دهد اما در مقایسه با مرحله ۱ کاهش ۱۰ ٪ در میزان آلودگی بیانگر آن است که این عمل سبب پیشگیری از تکثیر باکتریهای گرم منفی غیر کلی فرمی شده است. مرحله ۴ : در این مرحله میزان آلودگی ۱۰ ٪ بود که در مقایسه با مرحله قبل ۱/۶۷ ٪ افزایش نشان داد. میزان افزایش آلودگی این مرحله نسبت به مرحله قبل اختلاف معنی داری نداشت ($p = ۰/۶۳۷$). همانند مراحل قبلی ، آلکالیژنز فکالیس تنها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا شده از پوسته ها بود. مطالعات گذشته نشان داد که بین روزهای ۱۹-۰ انکوباسیون در میزان آلودگی باکتریهای روی پوسته تخم مرغ اختلاف معنی داری رخ نمی دهد اما بین روزهای ۲۱-۱۹ انکوباسیون میزان آلودگی باکتریهای پوسته افزایش می یابد. مرحله ۵ : در این مرحله میزان آلودگی کیسه های زرده ۱۱/۶ ٪ بود. میزان آلودگی نسبت به مرحله قبل ۱/۶ ٪ افزایش داشت. میزان افزایش آلودگی معنی دار نبود ($p = ۰/۶۷۰$). همانند مراحل قبلی ، آلکالیژنز فکالیس تنها باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی جدا شده بود. در این مرحله کرک پرها اصلی ترین دلیل آلودگی جوجه های تازه هچ شده بودند. بهاتا و مکنب در سال ۱۹۸۰ و چن در سال ۲۰۰۰ به نقش کرک پرها در انتقال آلودگی اشاره نمودند. دلیل دیگر آلودگی کیسه های زرده جوجه های تازه هچ شده مکونیوم می تواند باشد (۲۰). ورود میکروارگانیسم ها به جوجه های تازه هچ شده ناف التیام نیافته ، بلع و یا آسپیراسیون می باشد. باربور و نابوت در سال ۱۹۸۲ از جوجه های تازه هچ شده ، ۱۹/۲۳ ٪ سالمونلا جدا نمودند. بر اساس نتایج بدست آمده زرده ها در هر یک از مراحل ۴-۱ عاری از

باکتری گرم منفی غیر کلی فرمی بود ، و بین آلودگی جوجه های تازه هچ شده و پوسته های تخم مرغ شباهت وجود داشت. بنابراین ما می توانیم به این باور برسیم که منبع آلودگی کیسه زرده نیز پوسته تخم مرغ می باشد.

منابع:

1. Abdel-galil, Y; El-gmiey, S.R. and Abdel-latif, M.M; Bacterial chicken death in Balady hatcheries in dak ahlia governorate.Assiut Veterinary Medical Journal; 1995; 3(66): 199-206.
2. Al-sadi, H.I; Basher, H.A. and Ismail, H.K; Bacteriological and pathologic studies on dead in shell chicken embryos. Iraqi Journal of Veterinary Sciences; 2000; 13(2): 297-307.
3. Barbour, E.K. and Nabbut, N.H; Isolation of salmonella and some other potential pathogens from two chicken breeding farms in Saudi Arabia. Avian Diseases; 1982; 26(2): 234-244.
4. Bhatia, T.R. and McNobb, G.D; Dissemination of salmonella in broiler chicken operation. Avian Diseases; 1980; 24(3): 616-624.
5.Bastarows, A.F; Khalil, N.G; Seddek, S.R. and Aly, S.M; Bacteriological studies on entrobacteriaceae isolated from table eggs. Assiut Veterinary Medical Journal; 1997; 36(2): 203-214.
6. Board, RG. and Fuller, R. Microbiology of the avian egg.1st Ed, 1994; pp: 1-22, 25-40, 139-143.
7. Board, RG. The course of microbial infection of the hen's egg. Journal of Applied Bacteriology; 1966; 29: 319-341.
8. Board; RG.The microbiology of eggs.Egg science and technology. AVI publishing co. INC, Westport, Connecticut .pp: 49-64.
9. Board, RG. The Microbiology of hen's egg. Avian Applied Microbial; 1969; 11: 245-281.
10. Byrd, J. A; DeLoach, J.R; Corrier, D.E; Nisbet, D.J. and Stanker, L.H; Evaluation of Salmonella serotype distributions from commercial broiler hatcheries and grower houses. Avian. Dis; 1999. 43:39-47.
11. Chen, S.J *et al.*; Monitoring the hygiene of chicken hatcheries in Taiwan during 1999-2001. Microbial immunological infection; 2000; 35(4)236-242.
12. Chdoudhary, B; Studies on yolk sac infection in poultry, antibiogram of isolates and correlation between in-vitro and in-vivo drug action. Indian Journal of Animal Health; 1993; 32(1): 21-23.
13. Cox, N.A; Bailey, J.S; Berrang, M.E. and Buhr, R.J; Automated spray sanitizing of broiler hatching eggs.3.total bacteria and coliform recovery after using an egg spraying machine. Journal of Applied Poultry Research; 1994; 3: 234-237.
14. Cox, N.A; Bailey, J.S; Berrang, M.E. and Mauldin, J.M; Diminishing incidence and level of Salmonellae in commercial broiler hatcheries. J. Appl. Poult. Res;1997; 6:90-93.
15. Higgins, R; Malo-Rene-Roberge, E; Gauthier, R; Studies on the dissemination of salmonella in nine broiler chicken flocks. Avian Diseases; 1982; 26(1): 29-33.
16. Humphrey, T.J; Whitehead, A; Gawler, A.H; Henley, A; Rowe, B; Numbers of salmonella entritidis in the contents of naturally contaminated hen eggs. Epidemiologic Infection; 1991; 106(3):489-496.
17. Knape, K.D. *et al;* Comparison of egg shell surface microbial population for in-line and off-line commercial egg processing facilities. Poultry Science; 2002; 81(5): 695-698.
18. Lifshitz, A; Baker, R.C; Naulor, H.B; The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. Journal of Food Science; 1964; 24: 44-99.
19. Maris, P; Experiments on disinfection of egg shell. Lab. Nat. Med .Vet; 1986; 17(2): 123-128.
20. Moats, W.A; The effect of washing eggs under commercial conditions on bacterial loads on egg shells. Poultry Science; 1979; 58,No 5: 1228-1233.
21. Smith, A; Rose, S.P; Wells, R.G; Pirogozliev, V; The effect of changing the extra moisture of caged laying hens on extra and microbial contamination of their egg shells. British Poultry Science; 2000; 41(2): 168-173.

The effect of formaldehyde on decreasing the contamination rate of non-coliform gram-negative bacteria in hatching eggs

Keleidari, Gh. Moayedian, H. Eslamian, A. Mohsenzadeh, M.

Abstarct:
In present study we evaluated the effect of formaldehyde on decreasing the contamination rate of egg shell, yolk and yolk sac. 240 hatching eggs from broiler breeder farm and hatchery as well as 60 newly-hatched chicks (5 stages) were taken for bacteriological examinations. Firstly egg shells were rinsed with peptone water solution and then these solutions were transferred to cysteine selenite media and were incubated, also these solutions were incubated separately. Then we sterilized egg shells and broke shells, yolks were homogenized and transferred to peptone water and cysteine selenite media and were incubated. Furthermore we sterilized abdominal skin of each newly-hatched chicks, thereafter necropsied,yolk sacs were homogenized and transferred to peptone water and cysteine selenite media and then were incubated. After that we cultivated on McConky agar, blood agar and XLD from colonies and incubated them. Finally we used differential diagnostic media. At first stage from 18.33 % of egg shells, at second stage from 11.66 % of egg shells, at third stage from 8.33 % of egg shells and at fourth stage from 10 % of egg shells was separated *Alcaligenes faecalis.* Also at fifth stage from 11.66 % of yolk sacs was separated *Alcaligenes faecalis.* In any stages did not separate non-coliform gram-negative bacteria from yolk. Based on this research the existence of non- coliform gram-negative bacteria on the hatching egg shells is ordinary and natural. Egg collection as soon as possible after laying and properly disinfection with formaldehyde must be lead to a significant contamination reduction of non-coliform gram-negative bacteria with which the risk of bacteria penetration in to the yolk will decrease dramatically, but formaldehyde could not effect significantly ($p = 0.323$) on these contaminations. Only contamination reduction between stages 1,3 was significant ($p = 0.049$) so we conclude it is related to secondary fumigation by formaldehyde.
Key words: formaldehyde, hatching eggs, isolation, non-coliform bacteria