



تأثیر نوعی پروبیوتیک بر کلونیزه شدن روده‌ای و تهاجم بافتی سالمونلا انتریتیدیس در

جوجه‌های گوشتی

رضانعلی جعفری^{۱*}، احمدرضا راجی^۲، غلامعلی کلیدری^۳، منصور میاحی^۴، هادی ابراهیمی^۵

۱- دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی- دانشیار.

۲- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم پایه- دانشیار.

۳- دانشگاه فردوسی مشهد- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی- دانشیار.

۴- دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی- استاد.

۵- دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی- دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت و بیماری‌های طیور.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۹/۵، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۱۰/۲۶

چکیده

مقدمه: سالمونلا انتریتیدیس یکی از مهم‌ترین عوامل بیماری‌های با منشأ غذایی در انسان است که اغلب از طریق مصرف فرآورده‌های آلوده پرندگان منتقل می‌شود. پروبیوتیک‌ها مکمل‌های غذایی حاوی میکروارگانیسم‌های زنده هستند که از طریق پدیده حذف رقابتی می‌توانند باعث کاهش آلودگی سالمونلایی شوند. این مطالعه با هدف بررسی اثر نوعی پروبیوتیک بر پایه باکتری‌های لاکتوباسیلوس، بیفیدوباکتریوم و انتروکوکوس بر کلونیزه شدن روده‌ای و تهاجم بافتی سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: تعداد ۱۲۸ جوجه یک روزه در یک طرح کاملاً تصادفی به چهار تیمار هر کدام با ۴ تکرار ۸ قطعه‌ای تقسیم شدند. تیمارهای ۱ و ۲ در طول آزمایش آب آشامیدنی حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر پروبیوتیک را دریافت کردند، اما تیمارهای ۳ و ۴ آب معمولی استفاده کردند. در سن ۲ روزگی، تیمارهای ۱ و ۳ با ورود جوجه‌هایی که یک روز قبل با $10^5 \times 1/5$ سالمونلا تلقیح شده بودند (سیدر) مورد چالش قرار گرفتند. در سنین ۳، ۵، ۷ و ۲۱ روزگی، نمونه‌هایی از سکوم و کبد تهیه و از نظر آلودگی سالمونلایی بررسی شدند.

نتایج: جوجه‌های تحت آزمایش هیچ‌گونه نشانه بالینی و تلفاتی نداشتند. سیدرها در طول آزمایش به سالمونلا آلوده بودند. کلونیزه شدن سالمونلا در سکوم به‌طور محسوس تحت تأثیر پروبیوتیک قرار نگرفت، ولی جداسازی سالمونلا از نمونه‌های کبدی به‌طور نسبی ۳۷ درصد کاهش یافت.

نتیجه‌گیری: افزودن پروبیوتیک به آب جوجه‌های تازه به دنیا آمده از نظر درمانگاهی می‌تواند سودمند باشد، اما توجه به رعایت نکات بهداشتی در گله‌های مادر و نتایج آنها اهمیت بیشتری دارد.

واژه‌های کلیدی: ماکیان، پروبیوتیک، سالمونلا.

*نویسنده مسئول: دانشگاه شهید چمران اهواز- دانشکده دامپزشکی- گروه علوم درمانگاهی، تلفن: ۰۶۱-۳۳۳۳۰۰۷۳، نمابر: ۰۶۱-۳۳۳۶۰۸۰۷
 Email: jafari.ramezanali@scu.ac.ir

ارجاع: جعفری رضانعلی، راجی احمدرضا، کلیدری غلامعلی، میاحی منصور، ابراهیمی هادی. تأثیر نوعی پروبیوتیک بر کلونیزه شدن روده‌ای و تهاجم بافتی سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی. مجله دانش و تندرستی ۱۳۹۶؛ ۱۲(۱): ۲۸-۳۵.

مقدمه

سالمونلا باکتری گرم منفی، میله‌ای شکل و متعلق به خانواده انتروباکتریاسه است. تاکنون بیش از ۲۶۰۰ سروتیپ از سالمونلا شناسایی شده‌اند که سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم از مهم‌ترین و متداول‌ترین آنها هستند. سالمونلاها در پرندگان به صورت عمودی از گله مادر به نتاج و به صورت افقی از طریق آب، غذا، بستر و هوا از جوجه‌های آلوده به جوجه‌های حساس منتقل می‌شوند. سالمونلوز در جوجه‌های جوان اسهال‌های شدید و کشنده ایجاد می‌کند که گاهی اوقات تلفات آن به بیش از ۸۰ درصد هم می‌رسد (۱). مطالعات انجام شده نشان‌دهنده انتشار وسیع آلودگی سالمونلا انتریتیدیس در مزارع طیور کشور می‌باشد. اکبریان و همکاران (۲) با بررسی ۳۲۰۲ نمونه جمع‌آوری شده از ۱۵۰ گله مادر، تخم‌گذار و گوشتی، جوجه کشی و کشتارگاه، موفق به جداسازی ۱۲۳ (۳/۸۴ درصد) جدایه سالمونلا شدند که سالمونلا انتریتیدیس با ۶۹ مورد جداسازی دارای بالاترین فراوانی بود. براساس مطالعه‌ای که در سال‌های ۱۳۹۱-۱۳۸۹ روی تخم‌مرغ‌های تفریح نشده ۲۸ گله و جوجه‌های یک روزه ۱۳۲ گله مادر گوشتی از شش استان کشور (آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، زنجان، کرمانشاه، گیلان و مازندران) صورت گرفت، تعداد ۵۴ گله (۳۳/۷۵ درصد) به سالمونلا انتریتیدیس آلوده بودند (۳). در مطالعه‌ای روی ۱۴ گله گوشتی در اطراف تهران نیز، ۹ گله به سالمونلا انتریتیدیس (۶۴/۲ درصد) آلوده بودند (۴). ارم و همکاران (۵) در مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۲ تعداد ۳۰ جدایه سالمونلا انتریتیدیس از مرغداری‌های اطراف قائم شهر به دست آوردند که در میان آنها مقاومت چندگانه آنتی‌بیوتیکی بسیار شایع بود و بیشترین مقاومت نسبت به تتراسایکلین، نالیدیسیک اسید، فورازولیدون، استرپتومایسین و لینکوسایکسین مشاهده شد. در مطالعه‌ای دیگر، میزان آلودگی سالمونلا انتریتیدیس در ماکیان خانگی و تخم‌مرغ‌های بومی شهرستان اهواز به ترتیب ۵/۸ درصد و ۱/۶۶ درصد گزارش گردید (۶ و ۷). در سایر کشورها هم آلودگی سالمونلایی در پرندگان به کرات گزارش شده است. پوپ و همکاران (۸) با بررسی آلودگی سالمونلایی در نمونه‌های جمع‌آوری شده از بستر و آب گله‌های گوشتی تجارتی گزارش کردند که ۷۶/۹ درصد از کل نمونه‌ها به سروتیپ‌های مختلف سالمونلا از جمله سالمونلا انتریتیدیس آلوده بودند. در مطالعه‌ای دیگر که در مناطق مختلف برزیل صورت گرفت ۵۷/۵ درصد از گله‌های مادر و ۸۴ درصد از گله‌های گوشتی به سالمونلا انتریتیدیس آلوده بودند (۹).

سالمونلوز یکی از مهم‌ترین بیماری‌های با منشاء غذایی در انسان است که در اثر سالمونلاهای غیرتیفوئیدی ایجاد می‌شود. سالمونلاها ممکن است از طریق مصرف غذاهای آلوده به ویژه گوشت پرندگان صنعتی و تخم آنها، گوشت خوک، گوشت گاو و گوسفند به انسان

منتقل شوند (۱). به‌طور جهانی تخمین زده می‌شود که حدود ۹۳ میلیون مورد عفونت روده‌ای در اثر سالمونلوز غیرتیفوئیدی در انسان رخ می‌دهد که ۱۵۵ هزار مورد آن به علت گاستروانتریت شدید و اسهال منجر به مرگ می‌شود. در مقابل تعداد مبتلایان به حصبه (تیفوئید) ۱۶ میلیون نفر است (۱۰). علاوه بر آن، حدود ۳/۴ میلیون نفر در دنیا که اکثر آنها را اشخاص مبتلابه عفونت با ویروس HIV، مالاریا و کودکان دارای سوء تغذیه تشکیل می‌دهند به شکل تهاجمی یا سیستمیک سالمونلوز غیرتیفوئیدی مبتلا می‌گردند که ۲۰ درصد آنها دچار مرگ می‌شوند. سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم شایع‌ترین عوامل هر دو نوع عفونت روده‌ای و خونی شناخته شده‌اند (۱۱). بررسی‌های صورت گرفته در کشور ما نیز نشان‌دهنده آلودگی انسان به سالمونلاهای غیرتیفوئیدی است. اشراقی و همکاران (۱۲) تعداد ۱۹۵۰ نمونه مدفوع از کودکان مبتلا به اسهال در بیمارستان مرکز طبی کودکان در تهران را مورد بررسی میکروبی قرار دادند که از ۲۶ جدایه سالمونلا، سالمونلا انتریتیدیس با ۱۴ مورد (۵۴ درصد) دارای بیشترین فراوانی بود. شیرودی و همکاران (۱۳) ۶۴ جدایه سالمونلا انتریتیدیس جمع‌آوری شده از مرغان گوشتی، گاوداری‌های سطح تهران و بیماران ارجاعی به بیمارستان طبی کودکان امام خمینی تهران را از نظر میزان قرابت به روش انگشت‌نگاری مولکولی مورد بررسی قرار داده و دریافتند که جدایه‌های با منشاء طیور شباهت بیشتری (۷۲ تا ۸۱ درصد) به جدایه‌های انسانی دارند که از نظر اپیدمیولوژیکی احتمال آلودگی انسان به سالمونلا انتریتیدیس با منشاء طیور را بیشتر می‌کند.

آنتی‌بیوتیک‌ها ترکیبات طبیعی یا سنتزی هستند که به‌طور گسترده برای افزایش بهره‌وری، پیشگیری و درمان بیماری‌ها از جمله سالمونلوز در دام و طیور مورد استفاده قرار می‌گیرند. سرطان‌زایی، ایجاد آلرژی، به هم زدن تعادل فلورمیکروبی روده و ظهور سویه‌های مقاوم در انسان از پیامدهای سوء مصرف آنها هستند (۱۴). به همین دلیل، در سال‌های اخیر استفاده از عوامل محرک ایمنی (ایمونومولولاتورها)، عصاره‌های گیاهی، باکتریوفازها، پروبیوتیک، پریبیوتیک، سینبیوتیک و دیگر ترکیبات جایگزین به‌منظور کاهش مصرف داروهای ضد میکروبی مورد توجه محققین قرار گرفته است (۱۵). جوجه‌هایی که تازه از تخم خارج می‌شوند بدون میکروفلور طبیعی در دستگاه گوارش خود و یا دارای میکروفلور اندکی هستند. بنابراین به عوامل بیماری‌زای روده‌ای از قبیل سالمونلاها بسیار حساس می‌باشند. به‌طور طبیعی جایگیری فلور مفید در دستگاه گوارش به یک دوره زمانی طولانی نیاز دارد، در حالی که میکروارگانسیم‌های بیماری‌زا تنها چند ساعت بعد از تولد در روده جوجه‌ها کلونیزه می‌شوند. استفاده از پروبیوتیک‌ها در روزهای اولیه زندگی می‌تواند با اثرات مفید بر میزبان در کاهش عفونت‌های

پریمالاک را دریافت کردند، اما جوجه‌ها در تیمارهای ۳ و ۴ آب معمولی بدون پروبیوتیک استفاده کردند. همچنین در روز دوم بعد از تولد، به هر واحد آزمایشی از تیمارهای ۱ و ۳ تعداد سه قطعه جوجه که از روز قبل با سالمونلا آلوده شده بودند (جوجه‌های سیدر) اضافه گردید تا تأثیر پروبیوتیک بر روند انتشار افقی سالمونلا ارزیابی شود.

نخست باکتری سالمونلا انتریتیدیس (تهیه شده از موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی) به مدت ۱۶ ساعت در محیط تریپتوز سوی براس در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد. سپس ۰/۵ میلی‌لیتر آن که دارای $1/5 \times 10^8$ cfu باکتری بود به ۲۴ قطعه جوجه یکروزه به روش گاوآژ دهانی تلقیح شد. این جوجه‌ها در روز بعد به‌عنوان سیدر در گروه‌های چالش مورد استفاده قرار گرفتند. در سنین ۳، ۵، ۷ و ۲۱ روزگی، یک جوجه غیر سیدر و یک جوجه سیدر (به جز ۲۱ روزگی) از هر واحد آزمایشی به‌صورت تصادفی انتخاب و به روش جابه‌جایی مهره گردنی کشته شدند. سپس و برای جداسازی سالمونلا کشت داده شدند. هم‌زمان، محتویات سکومی در جوجه‌های چالش شده از نظر شمارش سالمونلا نیز بررسی گردیدند. در ضمن به‌دلیل تفاوت حدت بین سویه‌های مختلف از یک سروتیپ سالمونلا، میزان دوز تلقیح در این مطالعه براساس نتایج حاصل از آزمایشات مقدماتی (پایلوت) به گونه‌ای انتخاب شد که ضمن کلونیزاسیون در سکوم باعث مرگ جوجه‌های سیدر نشود تا احتمال انتقال افقی عفونت ممکن باشد.

نمونه‌های سکومی و کبدی به‌ترتیب به وسیله آنس استریل و سوآب استریل روی هر دو محیط انتخابی زایلوز لیزین دزوکسی کولات و سبز درخشان (حاوی ۲۰ میلی‌گرم نوویوسین در لیتر) به‌طور خطی کشت داده شده و سپس در شرایط هوازی در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. نمونه‌های سکومی قبل از انتقال به محیط‌های انتخابی به مدت ۲۴ ساعت در محیط راپاپورت در دمای ۴۱ درجه سانتی‌گراد غنی‌سازی شدند. حداقل سه پرگنه مشکوک به سالمونلا از هر دو محیط (پرگنه‌های صورتی در سبز درخشان و پرگنه‌های سیاه براق در زایلوز لیزین دزوکسی کولات) در ژلوز خون کشت داده شدند و در صورت خالص بودن، یکی از کلنی‌های گرد و موکوبیدی با کشت در محیط‌های لیزین آبرون، تریپل شوگر آبرون، اوره آز، حرکت و سیمون سترات از نظر آزمایشات بیوشیمیایی بررسی گردیدند (۲۱). به‌منظور شمارش سالمونلا در جوجه‌های چالش شده (سیدر و غیر سیدر)، محتویات سکومی هر جوجه به‌طور جداگانه در پلیت استریل کاملاً مخلوط و با ترازوی دقیق وزن‌کشی شد. سپس رقت‌های متوالی ده‌گانه از 10^{-1} تا 10^{-6} تهیه گردید. از هر رقت، ۱۰۰ میکرولیتر روی ژلوز سبز درخشان (حاوی ۲۰ میلی‌گرم نوویوسین در لیتر) به‌صورت یکنواخت

روده‌ای مؤثر باشد. بر اساس تعریف فولر، پروبیوتیک نوعی افزودنی غذایی حاوی ارگانیزم‌های زنده است که با بهبود تعادل میکروبی بدن اثرات مفیدی برای میزبان دارد (۱۶). پروبیوتیک‌ها با تولید مواد ضد میکروبی و اسیدهای آلی، رقابت برای جایگاه‌های اتصال به گیرنده‌های سطحی سلول میزبان، رقابت برای مصرف مواد غذایی و تقویت ایمنی از بافت پوششی روده در برابر عوامل بیماری‌زا محافظت می‌کنند (۱۷). در صورتی که استفاده از یک پروبیوتیک خاص قادر به کاهش آلودگی سالمونلایی در طیور پرورشی باشد، می‌توان کاهش تلفات و پرهیز از مصرف بی‌رویه آنتی‌بیوتیک‌ها در صنعت طیور، کاهش خطر انتقال سالمونلا به انسان و نیز مخاطرات مرتبط با باقیمانده‌های دارویی در جامعه انسانی را انتظار داشت. بدین منظور تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر نوعی پروبیوتیک تجارتي (پریمالاک) بر انتشار افقی سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی جوان از طریق ارزیابی کلونیزه شدن روده‌ای و تهاجم بافتی آن به کبد انجام گرفت. پریمالاک شامل لاکتوباسیلوس اسیدوفیلوس، لاکتوباسیلوس کازئی، بیفیدوباکتریوم ترموفیلوم و انتروکوکوس فاسیوم هر کدام به میزان $2/5 \times 10^8$ cfu در هر گرم به‌صورت دهیدراته همراه با پوسته برنج و کربنات کلسیم می‌باشد (۱۸).

مواد و روش‌ها

یکصد و شصت و دو قطعه جوجه گوشتی یک روزه سویه راس ۳۰۸ از گله مادر گوشتی بدون آلودگی سالمونلایی خریداری شدند. جهت اطمینان از عدم آلودگی سالمونلایی، از سکوم و کیسه زرده ۱۰ قطعه جوجه کشت میکروبی صورت گرفت. جوجه‌های باقیمانده در شرایط کاملاً بهداشتی و بدون مصرف هیچگونه آنتی‌بیوتیک در شرایط قفس در سالن تحقیقاتی دانشکده دامپزشکی دانشگاه فردوسی مشهد براساس راهنمای مراقبت و استفاده از حیوانات آزمایشگاهی مصوب کمیته ملی تحقیقات ایالات متحده (۱۹) پرورش داده شدند. نوردهی در ۳ روز اول به‌طور مداوم و پس از آن ۲۳ ساعت روشنایی و یک ساعت تاریکی بود. تمامی جوجه‌ها در طول آزمایش با دسترسی آزاد به آب و دان با جیره آردی آغازین که براساس نیاز جوجه‌های گوشتی تنظیم شده بود، تغذیه گردیدند (۲۰). برای حذف هر گونه آلودگی احتمالی سالمونلایی، آب و دان جوجه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد تحت فشار ۱۵ پوند اتوکلاو می‌شد.

یکصد و بیست و هشت قطعه جوجه یکروزه در یک طرح کاملاً تصادفی در قالب فاکتوریل 2×2 (با یا بدون پریمالاک، چالش شده یا چالش نشده) به ۴ تیمار هر کدام دارای ۴ تکرار ۸ قطعه‌ای تقسیم شدند که هر تکرار یک واحد آزمایشی است. از زمان تولد تا ۲۱ روزگی، جوجه‌های تیمارهای ۱ و ۲ آب آشامیدنی حاوی ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر

۴	غیر سیدر	-	-
۱	غیر سیدر	۲	۲
۲	غیر سیدر	-	-
۳	غیر سیدر	۴	۴
۴	غیر سیدر	-	-

^۱ اعداد نشان‌دهنده موارد مثبت از ۴ جوجه نمونه‌گیری شده در هر تیمار هستند.

^۲ تیمارهای ۱ و ۲ پریمالاک را به میزان ۱۲۰ میلی‌گرم در لیتر آب دریافت کردند ولی فقط تیمارهای ۱ و ۳ از طریق سیدر در معرض آلودگی با سالمونلا قرار گرفتند.

جدول ۲- شمارش^۱ سالمونلا در محتویات سکومی جوجه‌های چالش شده در نمونه‌گیری‌های مختلف

تیمار ۳ (پروبیوتیک منفی)	تیمار ۱ (پروبیوتیک مثبت)	نوع جوجه	سن جوجه (روز)
۵/۶±۰/۵۱	۴/۴±۰/۴۴	سیدر	۳
-	-	غیر سیدر	۳
۷/۵±۰/۶۲	۸/۴±۰/۵۲	سیدر	۵
۶/۶±۰/۴۲	۵/۵±۰/۴۷	غیر سیدر	۵
۸/۴±۰/۷۳	۷/۶±۰/۶۱	سیدر	۷
۷/۶±۰/۳۹	۷/۲±۰/۴۴	غیر سیدر	۷
۷/۹±۰/۴۵	۷/۹±۰/۳۶	غیر سیدر	۲۱

^۱ مقادیر نماینده میانگین ± خطای استاندارد شمارش باکتری از حداقل ۳ جوجه در هر تیمار انجام گرفته و بر مبنای لگاریتم ۱۰ در هر گرم مدفوع هستند.

بحث

در میان باکتری‌های منتقل شونده از طریق غذا، سالمونلاها از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. گاستروانتریت شایع‌ترین و متداول‌ترین عفونت سالمونلایی در انسان است که عمدتاً به‌وسیله سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موربوم ایجاد می‌شود (۲۳). آلودگی انسان معمولاً از طریق مصرف غذاهای خام یا نیمه خام مانند گوشت و تخم‌مرغ حاصل می‌شود (۲۴). پروبیوتیک‌ها با تولید مواد ضد میکروبی و اسیدهای آلی، رقابت برای جایگاه‌های اتصال، رقابت برای مصرف مواد غذایی، از بین بردن سموم و تقویت ایمنی از اپی‌تلیوم روده در برابر سموم و عوامل پاتوژن محافظت می‌نمایند (۱۷). استفاده از پروبیوتیک‌ها و پریبیوتیک‌ها با بهبود کارایی ژنتیکی روده منجر به افزایش راندمان دستگاه گوارش می‌شوند (۲۵). همچنین پروبیوتیک‌ها اثرات مفید زیادی بر ساختار میکروسکوپی روده دارند (۲۶). آن‌ها ساخت و ترشح موکوس روده را تنظیم می‌نمایند (۲۷). موکوس به‌وسیله گابلت سل‌ها ترشح شده و لایه‌ای چسبنده روی مخاط ایجاد می‌کند. همچنین پروبیوتیک‌ها با افزایش استحکام پیوندهای بین سلولی در اپی‌تلیوم روده از مخاط روده در برابر عوامل عفونی محافظ می‌کنند (۲۸). رحیمی و همکاران (۱۸) در بررسی اثر پریمالاک بر ساختار بافتی روده کوچک جوجه بوقلمون‌های یک روزه ماده نشان دادند که استفاده از پریمالاک تعداد و اندازه گابلت سل‌ها و ضخامت

کشت داده شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری گردید. بعد از ۲۴ ساعت، رقتی که در آن تعداد کلنی‌های سالمونلا بین ۳۰۰-۳۰ عدد بود شمارش شد تا با احتساب ضریب رقت و وزن محتویات سکومی برداشت شده، تعداد باکتری سالمونلا در هر گرم از محتویات سکومی محاسبه گردد (۲۲).

کلیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آزمون تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه و تکمیلی توکی تجزیه و تحلیل شدند و تفاوت‌ها در سطح کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی گردیدند.

نتایج

براساس نتایج حاصله (جدول ۱)، باکتری سالمونلا از سکوم و کبد هیچ‌کدام از جوجه‌ها در تیمارهای ۲ و ۴ (بدون چالش) جداسازی نشد، اما جوجه‌های سیدر در تیمارهای ۱ و ۳ (چالش‌یافته) از سن سه روزگی و جوجه‌های غیرسیدر در این دو تیمار از پنج روزگی در بررسی باکتریولوژیک مثبت بودند. هیچ‌کدام از جوجه‌های آزمایش نشانه بالینی یا تلفات نداشتند. تمامی ۲۴ جوجه سیدر در بررسی آلودگی سکومی مثبت بودند ولی عفونت کبدی در ۲۰ جوجه شناسایی شد. از مجموع ۱۶ جوجه غیر سیدر نمونه‌گیری شده در تیمار ۱ (پروبیوتیک مثبت)، باکتری سالمونلا از سکوم ۹ جوجه و از کبد ۵ جوجه جدا گردید در حالی که از همان تعداد جوجه در تیمار ۳ (پروبیوتیک منفی)، ۱۱ جوجه در آلودگی سکومی و کبدی مثبت بودند. در بررسی شمارش سالمونلا در سکوم (جدول ۲)، افزودن پریمالاک تأثیری بر تراکم باکتری کلونیزه شده در جوجه‌های سیدر و غیر سیدر نداشت.

جدول ۱- جداسازی^۱ سالمونلا از سکوم و کبد جوجه‌ها در نمونه‌گیری‌های مختلف

سن جوجه (روز)	تیمار ^۲	نوع جوجه	سکوم	کبد
۳	۱	غیر سیدر	۴	۲
	۲	غیر سیدر	-	-
	۳	غیر سیدر	۴	۲
	۴	غیر سیدر	-	-
۵	۱	سیدر	۴	۴
	۲	غیر سیدر	۳	۱
	۳	سیدر	۴	۴
	۴	غیر سیدر	۳	۳
۷	۱	سیدر	۴	۴
	۲	غیر سیدر	۳	۲
	۳	سیدر	۴	۴
	۴	غیر سیدر	۴	۴

درصد کاهش یافت. تفاوت نتایج این پژوهش با مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل تنوع بیشتر باکتری‌ها در پروبیوتیک مصرفی نسبت به ارگانسیم‌های موجود در پریمالاک باشد. هیگینز و همکاران (۳۳) جوجه‌های گوشتی تازه متولد شده را با 10^4 cfu سالمونلا انتریتیدیس مورد چالش قرار داده و بعد از یک ساعت دزهای مختلفی از لاکتوباسیلوس (10^6 ، 10^4 و 10^8) را به هر جوجه خوراندند. دز 10^4 cfu اثر چشمگیری بر کلونیزه شدن سالمونلا نداشت، ولی دو دز بالاتر موجب کاهش کلونیزه شدن باکتری در سکوم گردیدند. در آزمایشی دیگر که از محلول رویی محیط کشت لاکتوباسیلوس بدون حضور باکتری زنده استفاده گردید، کاهش محسوسی در کلونیزه شدن سالمونلا در سکوم مشاهده نشد.

هاشم‌زاده و همکاران (۳۴) با استفاده از تکنیک PCR تأثیر نوعی پروبیوتیک تجارتي (پروتکسین) بر کلونیزه شدن سالمونلا انتریتیدیس در روده جوجه‌های تازه متولد شده را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه، هر جوجه 6×10^7 cfu باکتری پروبیوتیک را به یکی از روش‌های تلقیح به کیسه هوایی تخم در روز ۱۸ انکوباسیون، افشانه روی جوجه یک روزه، گاوژ دهانی و تلقیح به کلواک دریافت کرد و ۴۸ ساعت بعد با $1/5 \times 10^4$ cfu سالمونلا انتریتیدیس به روش گاوژ دهانی مورد چالش قرار گرفت که تمامی شیوه‌های تجویز پروبیوتیک مانع از کلونیزه شدن سکومی سالمونلا شدند. تلقیح کلواکی پروبیوتیک نسبت به سایر روش‌ها میزان کلونیزه شدن سالمونلا را بیشتر کاهش داد ولی تفاوت چشمگیری بین سایر روش‌های کاربرد پروبیوتیک در میزان کلونیزه شدن سالمونلا در روزهای اول و هفتم بعد از چالش دیده نشد. لوندرو و همکاران (۳۵) نیز اثر جیره غذایی حاوی عصاره اسپرژیلوس اریزا (پروبیوتیک) را بر انتقال افقی سالمونلا انتریتیدیس در بوقلمون و ماکیان مورد بررسی قرار دادند که براساس نتایج حاصله، استفاده از پروبیوتیک توانست جداسازی سالمونلا از لوزه‌های سکومی را به‌طور معنی‌داری کاهش دهد. از آن جایی که میکروارگانسیم‌های زنده موجود در پروبیوتیک به شیوه رقابتی کلونیزه شدن سالمونلا در دستگاه گوارش را تحت تأثیر قرار می‌دهند نتایج گاهاً متناقض در پژوهش‌های علمی می‌تواند به دلیل تفاوت در تعداد و نوع ارگانسیم‌های موجود در پروبیوتیک و روش استفاده از آن، دز و شیوه چالش سالمونلا باشد. در مطالعه حاضر، پریمالاک کاهش محسوسی در انتقال افقی سالمونلا انتریتیدیس نداشت ولی میزان تهاجم کبدی را کاهش داد که از نظر درمانگاهی دارای اهمیت است، هرچند رعایت اصول بهداشتی در گله‌های مادر و نتایج آنها اهمیت بیشتری در پیش‌گیری از انتشار و بروز آلودگی سالمونلایی دارد.

مخاط روده را به‌طور معنی‌داری افزایش می‌دهد. پلیکانو و همکاران (۲۹) نیز با استفاده از میکروسکوپ الکترونی اثر پروبیوتیک (لاکتوباسیلوس اسیدفیلوس، باسیلوس سابتیلیس، استرپتوکوکوس لاکتیس، بیفیدوباکتریوم بیفیدوم و اسپرژیلوس اریزا) و پروبیوتیک (برپایه مانوزالینگوساکارید) را بر تکامل مخاط روده جوجه‌های گوشتی بررسی کردند. براساس یافته‌های میکروسکوپ الکترونی، اندازه پرزهای دژدونوم و ژژنوم و نیز عمق کریپ‌های به دنبال استفاده از پروبیوتیک و پروبیوتیک افزایش یافت.

در مطالعه حاضر، عدم جداسازی باکتری سالمونلا از تیمارهای شاهد نشان می‌دهد که در تیمارهای ۱ و ۳، فقط سیدرها منشاء انتقال افقی سالمونلا برای جوجه‌های غیر سیدر بودند. هرچند استفاده از پریمالاک نتوانست کاهش معنی‌داری در شدت کلونیزه شدن سالمونلا در سکوم ایجاد کند ولی میزان تهاجم بافتی سالمونلا به کبد را به میزان ۵۵ درصد کاهش داد. کارینا و همکاران (۳۰) اثرات پیش‌گیرانه و درمانی انتروکوکوس فاسیوم علیه آلودگی سالمونلایی را بررسی کردند. در آزمایش اول، جوجه‌های تازه متولد شده ابتدا به مدت ۳ روز متوالی هر روز دو بار با 10^6 cfu باکتری تغذیه گردیده و سپس با 10^5 cfu سالمونلا پلوروم چالش شدند. در آزمایش دوم ابتدا جوجه‌ها با همان تعداد سالمونلا چالش گردیده و پس از آن با همان برنامه پروبیوتیک را دریافت کردند. تغذیه با پروبیوتیک و چالش با سالمونلا در هر دو آزمایش به روش گاوژ دهانی انجام شد. نتایج نشان داد که سالمونلا پلوروم در هر دو گروه از کبد و طحال جوجه‌ها جدا گردید اما جوجه‌هایی که به‌صورت پیش‌گیرانه پروبیوتیک را دریافت کردند، آلودگی کمتری در کبد و طحال داشته و زندمانی بیشتری داشتند. در پژوهش حاضر نیز پریمالاک نتوانست به‌طور کامل مانع از تهاجم بافتی سالمونلا شود، اما میزان تهاجم در گروه‌های مصرف‌کننده پروبیوتیک کمتر بود. مارتینز و همکاران (۳۱) با بررسی تأثیر ساکارومایسس سرویسیه سویه ۹۰۵ بر آلودگی ناشی از سالمونلا تیفی موریوم و نیز تحریک سیستم ایمنی در موش‌های عاری از میکروارگانسیم و موش‌های معمولی دریافتند که استفاده از این مخمر می‌تواند موش‌ها را در برابر عفونت سالمونلایی محافظت کند و میزان انتقال باکتری از سکوم به عقده‌های لنفاوی مزانتر، پلاک‌های پایر و طحال را کاهش دهد.

هیگینز و همکاران (۳۲) با بررسی تأثیر پروبیوتیک‌های جدا شده از روده طیور صنعتی بر عفونت سالمونلا در جوجه‌های گوشتی تازه متولد شده دریافتند که کلونیزه شدن سالمونلا انتریتیدیس و سالمونلا تیفی موریوم در لوزه‌های سکومی به‌ترتیب به میزان ۶۰-۷۰ درصد و ۹۵

16. Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989;66:365-78.
17. Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: Role of probiotics and prebiotics. *J Nut Biochem* 1998;9:668-75.
18. Rahimi S, Grimes JL, Fletcher O, Oviedo E, Sheldon BW. Effect of a direct-fed microbial (Primalac) on structure and ultrastructure of small intestine in turkey poults. *Poult Sci* 2009;88:491-503. doi: 10.3382/ps.2008-00272
19. National Research Council. Guide for the care and use of laboratory animals. 8th ed. Washington D.C: National Academic Press;2011.p.41-65. doi: 10.17226/12910
20. Leeson S, Summers JD, editors. Commercial poultry nutrition. 3rd ed. Guelph: Ontario, Canada; 2005.
21. Waltman WD, Gast RK. Salmonellosis. In: Dufour-Zavala L, Swayne DE, editors. A laboratory manual for the isolation, identification and characterization of avian pathogens. 5th ed. Athens, Georgia: American Association of Avian Pathologists, Inc;2008.p.3-9.
22. Dadras H. Egg-transmitted immunity to Salmonella typhimurium phage type 49 in the chicken [dissertation]. Glasgow Univ.: UK; 1989.
23. Gracias SK, McKillip LJ. A review of conventional detection and enumeration methods for pathogenic bacteria in food. *Can J Microbiol* 2004;50:883-90. doi: 10.1139/w04-080
24. Herikstad H, Hayes P, Mokhtar M, Fracaro ML, Threlfall EJ, Angulo FJ. Emergence quinolone resistant Salmonella in the United States. *Emerg Infect Dis* 1997;3:371-2. doi: 10.3201/eid0303.970316
25. Hofacre CL, Beacom T, Collett S, Mathis G. Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. *J Appl Poult Res* 2003;12:60-4.
26. Awad WA, Bohm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K, Zentek J. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poult Sci* 2006;85:974-9.
27. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* 2001;73:1131S-41S.
28. Montalto M, Maggiano N, Ricci R, Curigliano V, Santoro L, Di Nicuolo F, et al. Lactobacillus acidophilus protects tight junctions from aspirin damage in HT-29 cells. *Digestion* 2004;69:225-8. doi: 10.1159/000079152
29. Pelicano ERL, Souza PA, Souza HBA, Figueiredo DF, Boiogo, MM, Carvalho SR, et al. Intestinal mucosa development in broiler chickens fed natural growth promoters. *Braz J Poult Sci* 2005;7:221-9. doi: 10.1590/S1516-635X2005000400005
30. Carina AM, Oliver G, Apella MC. Protective effect of Enterococcus faecium J96, a potential probiotic strain, on chicks infected with Salmonella pullorum. *J Food Prot* 2000;63:1333-7.
31. Martins FS, Rodrigues AC, Tiago FC, Penna FJ, Rosa CA, Arantes RM, et al. Saccharomyces cerevisiae strain 905 reduces the translocation of Salmonella enterica serotype typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J Med Microbiol* 2007;56:352-9. doi: 10.1099/jmm.0.46525-0
32. Higgins JP, Higgins SE, Vicente JL, Wolfenden AD, Tellez G, Hargis BM. Temporal effects of lactic acid bacteria probiotic culture on Salmonella in neonatal broilers. *Poult Sci* 2007;86:1662-6.
33. Higgins SE, Higgins JP, Wolfenden AD, Henderson SN, Torres-Rodriguez A, Tellez G, et al. Evaluation of a lactobacillus-based probiotic culture for the reduction of Salmonella enteritidis in neonatal broiler chicks. *Poult Sci* 2008;87:27-31. doi: 10.3382/ps.2007-00210

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه شهید چمران اهواز به خاطر حمایت مالی پژوهش حاضر سپاسگزاری می‌کنند. همچنین از دانشگاه فردوسی مشهد که در بخش عملی تحقیق و نیز مشارکت در تقبل هزینه‌ها همکاری نموده است صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Gast RK. Paratyphoid infections. In: Swayne DE, Glisson JR, editors. Diseases of Poultry. 13th ed. John Wiley and Sons, Inc, Pub;2013.p.693-706.
2. Akbarian R, Peighambari SM, Morshed R, Yazdani A. Survey of Salmonella contamination of poultry industry flocks in Iran. *Iran Vet J* 2011;8:5-10.
3. Taheri H, Peighambari SM, Morshed R, Barin A. The Salmonella and Escherichia coli isolates from broiler breeder flocks in various provinces of Iran. *J Vet Clin Sci* 2015;9:3-10.
4. Morshed R, Peighambari SM. Salmonella infections in poultry flocks in the vicinity of Tehran. *Int J Vet Res* 2010;4:273-6.
5. Eram N, Peighambari SM, Yazdani A. Survey of Salmonella contamination in broiler flocks around Ghaemshahr: determine the serotype and antimicrobial resistance. *J Vet Lab Res* 2013;5:85-94.
6. Jafari RA, Ghorbanpour M, Jaideri A. An investigation into Salmonella infection status in backyard chickens in Iran. *Int J Poult Sci* 2007;6:227-9.
7. Jafari RA, Fazlara A, Dalirnia A. Survey of Salmonella infection in eggs of backyard hens in Ahvaz. *Iran Vet J* 2006;2:58-63.
8. Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, Cardoso ALSP, Tessari ENC, Castro AGM. Serovars of Salmonella spp isolated from broiler chickens and commercial breeders in diverse regions in Brazil from July 1997 to December 2004. *Braz J Poult Sci* 2005;7:195-8. doi: 10.1590/S1516-635X2005000300010
9. Poppe C, Irwin RJ, Messier S, Finley GG, Oggel J. The prevalence of Salmonella enteritidis and other Salmonella spp. among Canadian registered commercial chicken broiler flocks. *Epidemiol Infect* 1991;107:201-11.
10. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Noor Hidayah MS, et al. Salmonella: a foodborne pathogen. *Int Food Res J* 2011;18:465-73.
11. Ao TT, Feasey NA, Gordon MA, Keddy KH, Angulo FJ, Crump JA. Global burden of invasive nontyphoidal Salmonella disease, 2010. *Emerg Infect Diseases* 2015;21:941-9.
12. Eshraghi S, Soltan Dalall MM, Fardsanei F, Zahraei Salehi T, Ranjbar R, Nikmanesh B, Aminharati F, Abdosamadi Z, Akbari A. Salmonella enteritidis and antibiotic resistance patterns: a study on 1950 children with diarrhea. *TUMJ* 2010;67:876-82.
13. Shiroodi AA, Jamshidian M, Zahraei Salehi T, Nikbakht Boroujeni GR, Amin K. Genotyping of Salmonella enterica serovar enteritidis isolated from human and animal by REP-PCR. *Research on Medicine* 2016;40:79-85.
14. Phillips I, Casewell M, Cox T, De Groot B, Friis C, Jones R, et al. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *J Antimicrob Chemother* 2004;53:28-52. doi: 10.1093/jac/dkg483
15. Cheng G, Hao H, Xie S, Wang X, Dai M, Huang L, et al. Antibiotic alternatives: the substitution of antibiotics in animal husbandry?. *Front Microbiol* 2014;5:1-15. doi: 10.3389/fmicb.2014.00217

34. Hashemzadeh Z, Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Razban V, Zahraei Salehi T. Prevention of Salmonella colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. *J Agri Sci Tech* 2010;12:425-32.
35. Londero A, Menconi A, Reginatto AR, Bacocina I, Wolfenden A, Shivaramaiah S, et al. Effect of an aspergillus meal prebiotic on Salmonella infection in turkeys and broiler chickens. *Int J Poultry Sci* 2011;10:946-51. doi: 10.3923/ijps.2011.946.951



Effect of a Probiotic on Gut Colonization and Tissue Invasion by Salmonella Enteritidis in Broiler Chickens

Ramezan Ali Jafari (Ph.D.)^{1*}, Ahmad Reza Raji (Ph.D.)², Gholam Ali Kalidari (Ph.D.)³, Mansoor Mayahi (Ph.D.)¹, Hadi Ebrahimi (D.V.M)¹

1- Dept. of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran.

2- Dept. of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

3- Dept. of Clinical Sciences, School of Veterinary Medicine, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Received: 25 November 2016, Accepted: 15 January 2017

Abstract:

Introduction: *Salmonella enteritidis* (SE) is reported to be among the leading agents of food-borne human illnesses which are often transferred via consumption of contaminated poultry products. Probiotics are live microbial feed supplements which could decrease the intestinal infection of *Salmonellae* by competitive-exclusion phenomenon. The objective of the present study was to evaluate the effect of a probiotic based on *Lactobacillus*, *Bifidiobacter* and *Enterococcus* spp. on gut colonization and tissue invasion of SE in broiler chickens.

Methods: One hundred and twenty-eight day-old chicks were divided by a completely randomization into four treatments (T1-T4) each with four replicates of eight birds. The chicks in T1 and T2 received water contained 120 mg/l probiotic during the experiment, but those in T3 and T4 were given pure water. At the second day, the chicks in T1 and T3 were challenged by introducing seeder chicks inoculated with 1.5×10^5 cfu SE one day before. At the 3rd, 5th, 7th and 21st days, samples were obtained from cecum and liver, and examined for SE isolation.

Results: The chicks did not experience any clinical signs or mortality. The seeder chicks were infected over the experiment. Cecal colonization of SE was not influenced by probiotic significantly, but SE isolation from liver samples showed nearly 37% decrease.

Conclusion: Addition of probiotic to the water of newly-hatched chicks could be useful from a clinical viewpoint, but sanitation considerations in parent flocks and their offspring is more important.

Keywords: Chickens, Probiotic, Salmonella.

Conflict of Interest: No

*Corresponding author: R.A. Jafari, Email: jafari.ramezanali@scu.ac.ir

Citation: Jafari R.A, Raji A.R, Kalidari Gh.A, Mayahi M, Ebrahimi H. Effect of a probiotic on gut colonization and tissue invasion by *Salmonella enteritidis* in broiler chickens. Journal of Knowledge & Health 2017;12(1):28-35.