جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله تحقیقات دامپزشکی، ۱۳۸۷، دوره ۶۳، شماره ۳، ۱۳۲-۱۲۷

ایجاد تجربی بیماری آنتریت نکروتیک در جوجه‌های گوشتی با استفاده از جدایه‌های *Clostridium perfringens* از موارد حاد بیماری در ایران

حسین نیک پیران بهرام شجاعدوست* سید مصطفی پیغمبری
گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱ خرداد ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۱۳ اردیبهشت ماه ۱۳۸۶)

چکیده

با بهره‌گیری از عوامل وشرایط مستعد کننده مختلف، تعداد ۵۲۵ قطعه جوجه‌گوشتی در ۶ آزمایش تجربی متفاوت، مورد استفاده قرارگرفتند تا سیستم چالش پایداری برای ایجاد تجربی بیماری آنتریت نکروتیک ایجادگردد. در ۴ آزمایش اول علی رغم تامین نسبی شرایط مستعد کننده و چالش جوجه‌ها با مخلوط کشت ۴ جدایه کلستریدیوم پرفرینژنس از موارد حاد بیماری، نتیجه موفقیت‌آمیز نبود. در آزمایش‌های ۵ و ۶ پس از گسترش شرایط مستعد کننده مناسب، با تجویز ۳ میلی لیتر از محلول حاوی 3×10^{8} cfu/ml از باکتری به روش داخل دهانی ومخلوط با دان مصرفی درسن ۱۷ روزگی به مدت ۵ روز و هر روز ۲ نوبت، تلفات ونشانه‌های بالینی بیماری در پرندگان چالش شده مشاهده شد. این مطالعه مشخص نمود که با ایجاد شرایط استرس‌زای مدیریتی و تغذیه‌ای (مانند افزایش تراکم ومقادیر بالای گندم و پودر ماهی)، تضعیف نسبی سیستم ایمنی، روش تکثیر مناسب و غلظت کافی باکتری و استفاده ازسوش‌های جداشده از موارد حاد بیماری، می‌توان بیماری را به صورت تجربی ایجاد نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتریت نکروتیک، کلستریدیوم پرفرینجنس، بیماری تجربی، جوجه گوشتی.

مقدمه

آنتریت نکروتیک یکی از بیماری‌های کشنده و خطرناک طیور در سراسر جهان به حساب می‌آید. این بیماری اساسا یک آنتروتوکسمی است که بوسیله باکتری (CP) *Clostridium perfringens* ایجاد می‌شود(۲۲). باکتری کلستریدیوم پرفرینجنس در طیور می‌تواند هم شکل بالینی و هم شکل تحت بالینی بیماری را ایجاد نماید(۷). شکل بالینی و شکل تحت بالینی بیماری در طیور بوسیله تیپ A کلستریدیوم پرفرینجنس (تولیدکننده آلفا- توکسین) و به میزان کمتر توسط تیپ C (تولیدکننده آلفا-توکسین وبتا- توکسین) ایجاد می‌شود(۱۹). علایم روده‌ای خاص انتریت نکروتیک توسط آلفا-توکسین ایجاد می‌شود(۲). از نظر اقتصادی این بیماری بسیار اهمیت دارد، زیرا سبب افزایش ضریب تبدیل در طیور گوشتی می‌شود (۱۶). به‌رغم حضور طبیعی این باکتری در روده بروز بیماری آنتریت نکروتیک منوط به فراهم شدن شرایط مستعد کننده برای این بیماری است(۳). بیماری‌های روده‌ای دیگر به‌ویژه بیماری کوکسیدیوز با از بین بردن لایه مخاطی روده زمینه را برای بروز این بیماری فراهم می‌کنند (۲۱). مقادیر بالای پودر ماهی، گندم، جو و یا چاودار در جیره از عوامل مستعد کننده یا شدت دهنده آنتریت نکروتیک به حساب می‌آیند(۲۰). اطلاعات کمی در مورد مکانیسم مسئول افزایش بروز انتریت نکروتیک در طیور گوشتی که از جیره‌ای بر پایه گندم یا جو تغذیه می‌شوند وجود دارد(۲). سایر پژوهشگران گزارش کرده‌اند که فاکتورهای استرس‌زای جیره می‌توانند دفع مدفوعی کلستریدیوم پرفرینجنس را افزایش دهند(۲۰).

ایجاد تجربی بیماری آنتریت نکروتیک مشکل بوده و نیازمند کار و تجربه فراوان می‌باشد. تاکنون مدل‌های گوناگونی برای ایجاد تجربی این بیماری توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است(۱،۴،۸،۹،۱۸،۲۰). پژوهشگران توانسته‌اند جراحات آنتریت نکروتیک را بوسیله خوراندن دان آلوده به کلستریدیوم پرفرینجنس؛ تجویز کشت زایای کلستریدیوم پرفرینجنس به‌طور داخل وریدی، دهانی و یا داخل چینه‌دانی؛ تجویز داخل دئودنومی کشت براث کلستریدیوم پرفرینجنس؛ تجویز توکسین خالص عاری از CP و یا ترکیبی از CP و توکسین آن؛ و نیز استفاده از اووسیست اسپورولهٔ گونه‌های ایمریا و سپس خوراندن کشت زایای CP یا دان آلوده به CP ایجاد نمایند(۲۰). با این حال عفونت و آلودگی با کلستریدیوم پرفرینجنس به تنهایی برای ایجاد شکل بالینی بیماری کافی نمی‌باشد و فاکتورهای مستعد کننده بی‌شماری وجود دارد. اما بسیاری از این عوامل نامعلوم بوده و باعث نتایج متفاوت در ایجاد تجربی بیماری می‌شوند(۹). در تحقیق حاضر که برای اولین بار در ایران انجام می‌شود تلاش شد که با استفاده از جدایه‌های باکتری CP از موارد حاد بیماری در گله‌های گوشتی ایران، یک مدل تجربی قابل تکرار برای بیماری آنتریت نکروتیک تثبیت گردد تا در مطالعات آتی بر روی جنبه‌های مختلف این بیماری قابل استفاده باشد.

مواد و روش کار

برنامه آزمایش‌ها: در این مطالعه، ۵ آزمایش ابتدایی قبل از انجام آزمایش نهایی به منظور تعیین تعداد باکتری مورد نیاز، شرایط تغذیه‌ای، نحوه مناسب تلقیح و سایر فاکتورهای موثر در ایجاد بیماری صورت پذیرفت. در جدول ۱ مشخصات مربوط به تمام آزمایش‌ها که در نهایت منجر به ایجاد بیماری بالینی گردید درج گردیده است. شایان ذکر است که پس از موفقیت‌آمیز بودن آزمایش پنجم، آزمایش ۶ به عنوان تکرار آزمایش پنجم به

*) نویسنده مسؤول: تلفن: ۶۶۹۲۳۷۴۸-۰۲۱ نمابر: ۶۶۹۳۳۲۲۲-۰۲۱ Email:bshojae@ut.ac.ir

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

انجام رسید.

پرندگان: در ۵ آزمایش اول، در هر آزمایش ۸۰ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه از نژاد کاب تهیه شدند که با انتخاب تصادفی به ۴ گروه ۲۰ قطعه‌ای و در آزمایش ۶، تعداد ۱۲۵ قطعه جوجه گوشتی یک‌روزه تهیه و با انتخاب تصادفی به ۵ گروه ۲۵ قطعه‌ای تقسیم شدند و بر روی بستر پوشال قرار گرفتند. در ۴ آزمایش اول، میزان مساحت هر پن ۱/۵ متر مربع و در آزمایش ۵ و ۶ میزان فضای هر پن به ۰/۸ متر مربع کاهش داده شد که پرندگان تا سن ۲۵ روزگی در آن پن‌ها پرورش یافتند. برای جلوگیری از آلودگی‌های میکربی، پن‌ها، دان و تجهیزات با گاز فرمالدئید ضد عفونی شدند و درجه حرارت اپتیمال برای راحتی پرندگان مهیا گردید.

باکتریها: چهار جدایه CP از گنجینه میکروبی دانشکده انتخاب و برای چالش جوجه‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. این جدایه‌ها از جراحات تیپیک آنتریت نکروتیک جوجه‌ها در رخدادهای حاد بیماری در گله‌های گوشتی براساس روش‌های استاندارد (۱۲،۱۷) جداسازی شده و در گلیسرول ۲۵ درصد در فریزر ۷۰- درجه سانتیگراد نگهداری می‌شدند.

نحوه آماده سازی باکتری‌ها برای چالش: در آزمایش‌های اول تا چهارم، جدایه‌های CP روی پلیت‌های آگار خوندار کشت و در جار بی هوازی حاوی بسته‌های مخصوص ایجاد کننده محیط بی هوازی (A, Merck, Germany Anaerocult) و استریپ‌های تایید کننده محیط بی‌هوازی (Anaerotest, Merck, Germany) به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شدند. پس از سپری شدن ۷۲ ساعت، سرم فیزیولوژی استریل به میزان ۴ میلی لیتر به هر یک از پلیت‌ها اضافه گردید و کشت موجود در سطح پلیت‌ها با کمک سواب استریل شستشو و سپس با همدیگر مخلوط شدند. سوسپانسیون حاصله توسط سرم فیزیولوژی به حجم مورد نظر رسانده شد و میزان جذب نوری (OD) سوسپانسیون حاصله در طول موج ۶۰۰ لاندا با استفاده از اسپکتروفتومتر نوری (Janeway, UK) تعیین گردید. این میزان در آزمایش‌های پایلوت بین ۱/۰۶۴ الی ۱/۱۵ بود. در آزمایش‌های ۵ و ۶، جدایه‌های CP ابتدا به مدت ۲۴ ساعت بر روی پلیت آگار خوندار به شیوه فوق‌الذکر کشت و سطح پلیت‌ها با سرم فیزیولوژی شستشو و سپس با همدیگر مخلوط شدند. از آنجا که بر اساس تحقیق‌های اخیر انجام شده محیط‌های مایع در مقایسه با محیط‌های جامد در ایجاد تجربی بیماری عملکرد بهتری داشته‌اند (۲۳)، ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون حاصله به لوله‌های آزمایش یونیورسال ۲۰ میلی لیتری استریل که قبلاً به هر کدام ۱۰ میلی لیتر از محیط محلول استریل BHI (Merck) ریخته شده بود اضافه گردید. لوله‌های آزمایش یونیورسال حاوی محیط BHI که باکتری‌های CP در آنها کشت شده بودند به مدت ۱۶ ساعت در محیط بی‌هوازی ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند (۲۳). سپس کشت باکتریایی حاصله که مخلوطی از هر ۴ جدایه بود در سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ گردید، مایع رویی دور ریخته شد و رسوب حاصله با استفاده از سرم فیزیولوژی به حجم مورد نیاز رسانیده شد. میزان جذب نوری (OD) سوسپانسیون باکتریایی آماده شده برای تلقیح در طول موج ۶۰۰ با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. جهت انجام شمارش میکروبی، یک میلی لیتر از سوسپانسیون تلقیح برداشته شد و پس از رقت‌سازی بر روی پلیت‌های محیط آگار مغذی (Merck) کشت شدند. پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در شرایط بی‌هوازی در ۳۷ درجه انکوبه شدند تا شمارش میکروبی سوسپانسیون باکتریایی آماده شده برای تلقیح به صورت روزانه تعیین گردد.

دوز و روش چالش: سوسپانسیون میکروبی در آزمایش‌های اولیه هم از راه داخل دهانی و هم از راه رکتال، ولی در آزمایش‌های بعدی فقط از طریق دهانی به جوجه‌ها تلقیح شد. در آزمایش اول، دوز چالش برای هر پرنده یک میلی لیتر از غلظت $۲/۶\times۱۰^{۸}$، و در آزمایش‌های ۲، ۳ و ۴ به میزان ۲ میلی لیتر از غلظت $۲/۸۴\times۱۰^{۸}$ از طریق دهانی در هر نوبت تلقیح بود. هر پرنده روزانه در دو نوبت و به مدت ۳ روز تلقیح شد. در آزمایش‌های ۵ و ۶، هر پرنده به میزان ۳ میلی لیتر از سوسپانسیون میکروبی با غلظت $۳/۰۷\times۱۰^{۸}$ به‌صورت خوراکی در ۲ نوبت صبح و بعدازظهر با فاصله حداقل ۴ ساعت از هم دریافت نمود. سپس این گروه از پرندگان دان آلوده به سوسپانسیون میکروبی را به نسبت (V:W) ۳۶ :۱ بعد از نوبت دوم تجویز خوراکی را دریافت داشتند (۹). لازم به یادآوری است که در ۴ آزمایش اول از دان آلوده به CP استفاده نگردید. برای تجویز سوسپانسیون میکروبی به پرندگان از یک کاتتر ادراری که به یک سرنگ ۵ میلی لیتری وصل شده بود استفاده گردید. در ۴ آزمایش اول، قبل از چالش به پرندگان تمامی گروه‌ها به مدت ۸-۶ ساعت پرهیز غذایی داده شد، اما در آزمایش ۵ و ۶، مدت پرهیز غذایی برای گروه‌های مختلف به ۲۴ ساعت افزایش یافت.

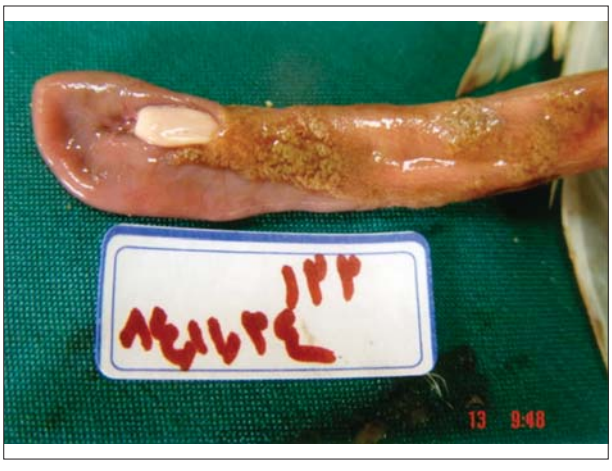
رژیم غذایی مورد استفاده: در آزمایش‌های ۱، ۲، ۳ برای تمام گروه‌های چالش و کنترل از روز اول تا ۷ روزگی از دان آغازین بر پایه ذرت + سویا و در آزمایش ۴ از جیره بر پایه ۴۰ درصد گندم استفاده شد. در آزمایش‌های ۵ و ۶، ترکیب دان از روز اول تا ۱۱ روزگی برای گروه‌های چالش جیره‌ای بر پایه ۵۵ درصد گندم بود (۱۱). در آزمایش‌های ۱ تا ۴، در سنین ۸ الی ۱۳ روزگی از جیره ویژه حاوی ۴۰ درصد و ۵۰ درصد پودر ماهی برای گروه‌های چالش و از دان آغازین (ذرت + سویا) برای گروه کنترل استفاده گردید. پودر ماهی به‌عنوان یک فاکتور خطر شناخته شده است و برای ایجاد شرایط مستعد کننده برای بیماری استفاده می‌شود (۶).

نحوه تضعیف ایمنی: در آزمایش‌های ۱ تا ۳، از عوامل تضعیف ایمنی استفاده به‌عمل نیامد. ولی در آزمایش‌های ۴ تا ۶، از واکسن گامبورو به‌عنوان عامل تضعیف کننده ایمنی استفاده گردید (۱۱،۲۲). در آزمایش ۴، دو برابر دوز توصیه شده و در آزمایش‌های ۵ و ۶، ده برابر دوز توصیه شده واکسن گامبورو از راه قطره چشمی و در سن ۱۴ روزگی مورد استفاده قرار گرفت.

نحوه ارزیابی چالش: کلیه پرندگان تلف شده در طول آزمایش و همچنین کلیه پرندگان زنده مانده در انتهای آزمایش، پس از کشتار کالبدگشایی گردیدند. گسترش از سطوح روده‌ای برای مشاهده باکتری CP و آیمریاها تهیه شد. تشخیص ماکروسکوپی آنتریت نکروتیک براساس حضور

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

تصویر ۱- وجود مناطق وسیع نکروز در ناحیه ژژنوم پرنده تلف شده.



تصویر ۲- وجود مناطق نکروز در ناحیه دئودنوم پرنده تلف شده.

جراحات تیپیک این بیماری بود. این جراحات شامل کانون‌های نکروزه تا مناطق وسیعی از نکروز مخاطات در روده کوچک است که اغلب تشکیل یک غشای کاذب، بدون وجود واکنش‌های التهابی یا خونریزی می‌باشد. برای امتیازبندی جراحات روده‌ای مشاهده شده در پرندگان مورد آزمایش از روش (Prescott) به شرح ذیل استفاده شد: امتیاز صفر= بدون جراحات ماکروسکپی، امتیاز ۱ = دیواره نازک و شکننده، امتیاز ۲ = زخم و کانون‌های نکروزه، امتیاز ۳ = مناطق نکروزه وسیع، امتیاز ۴ = نکروز بسیار شدید و وسیع (۱۵). ملاک ایجاد تجربی بیماری آنتریت نکروتیک بر اساس مشاهده ضایعات مشخص بیماری در ۳۰ درصد از موارد کالبدگشایی شده برای هر یک از گروه‌ها بود. در روزهای ۱۸، ۲۰، ۲۲ و ۲۴ از تمامی گروه‌های چالش شده و کنترل، ۴ قطعه از هر پن به‌طور تصادفی انتخاب شدند و پس از کالبدگشایی و مشاهدات لازم، نمونه‌برداری‌های مورد نیاز نیز صورت گرفت.

نتایج

آزمایش‌های ۱ الی ۴: در آزمایش‌های ۱ تا ۴ در گروه‌های چالش شده از راه دهانی و از راه کلواک تلفات ناشی از بیماری آنتریت نکروتیک مشاهده نگردید و هیچ‌یک از پرندگان در کالبدگشایی نیز ضایعات تیپیک آنتریت نکروتیک را نشان ندادند.

آزمایش‌های ۵ و ۶: در این آزمایش‌ها که گروه‌های چالش شده سوسپانسیون باکتریایی شستشو شده را روزانه در ۲ نوبت به میزان حداقل ۳×۱۰^{۸} CFU/ml به دو روش مستقیم دهانی و همراه با دان آلوده دریافت داشتند، علاوه بر بروز نشانه‌های بالینی آنتریت نکروتیک و تلفات در جوجه‌ها، ضایعات تیپیک نکروز مخاط روده در جوجه‌های کالبدگشایی شده نیز آشکار بود. شروع اولین تلفات ناشی از بیماری آنتریت نکروتیک ۷۲ ساعت بعد از شروع چالش بود که در کالبدگشایی علائم تیپیک آنتریت نکروتیک را نیز نشان داد. در روزهای بعد نیز تلفات با تعداد بیشتری مورد ملاحظه قرار گرفت. اولین تلفات در آزمایش‌های ۵ و ۶ در گروه چالشی که جیره حاوی ۵۰ درصد پودر ماهی را دریافت کرده بود مشاهده گردید، ولی در روزهای بعد تعداد تلفات در گروه چالش‌ای که جیره حاوی ۴۰ درصد پودر ماهی را دریافت کرده بود به مراتب بیشتر بود. این تفاوت در تعداد تلفات از لحاظ آماری نیز قابل توجه بود. در کالبدگشایی پرندگان تلف شده ناشی از آنتریت نکروتیک، ضایعات تیپیک بیماری بیشتر در ناحیه ژژنوم ملاحظه گردید، اگر چه در مواردی ضایعات بیماری در ناحیه دئودنوم روده نیز آشکار بود.

بحث

جهت انجام تحقیق بر روی بیماری آنتریت نکروتیک طیور در اکثر موارد ایجاد تجربی بیماری ضروری است. علیرغم آنکه این بیماری در شرایط فارم براحتی ایجاد می‌شود، اما ایجاد بیماری در شرایط تجربی آسان نبوده و نیازمند بوجود آوردن شرایط خاص می‌باشد(۹). در این مطالعه با تامین شرایط لازم برای ایجاد بیماری از جهات مختلف (آماده‌سازی و تنظیم میزان باکتری و نحوه تلقیح آن، شرایط تغذیه‌ای، پرورشی و تضعیف ایمنی)، با انجام ۵ آزمایش تجربی اولیه و تکرار آزمایش آخر، شرایط ایجاد تجربی این بیماری بررسی و تثبیت گردیدند.

نقش عوامل مستعد کننده در بروز بیماری آنتریت نکروتیک طیور به خوبی شناخته شده و در سطح وسیعی مورد بحث قرار گرفته است(۲۲). عامل ایجاد کننده این بیماری *C. perfringens* در روده طیور سالم به طور طبیعی زندگی می‌کند، اما حضور باکتری به تنهایی موجب بروز بیماری نمی‌شود، بلکه همواره عوامل دیگری نیز باید وجود داشته باشند که موجب افزایش رشد و تولید توکسین توسط این باکتری شوند(۹،۱۸).

از طرف دیگر عوامل تغذیه‌ای از جمله افزایش میزان گندم(۵،۲۰) و پودر ماهی(۲،۲۰) جیره موجب بروز این بیماری شده است. افزایش گندم جیره با کاهش سرعت عبور مواد غذایی از روده همراه است و موجب می‌شود که باکتری چالش فرصت بیشتری برای رشد، ایجاد توکسین و القاء ضایعات نکروتیک بر روی مخاط روده داشته باشد. پودر ماهی به میزان بالا در جیره‌های غذایی با افزایش میزان PH در روده، محیط را برای رشد بهتر باکتری فراهم می‌کند(۲۲). در این مطالعه با استفاده از جیره‌ای بر پایه درصد

جدول۱- مشخصات آزمایش‌ها و گروه‌های آزمایشی. [1] جیره اولیه از یک روزگی به مدت ۷ الی ۱۱ روز داده شد. [2] جیره پیش چالش پس از جیره اولیه و قبل از چالش به مدت ۵ روز داده شد.

مشخصات	آزمایش ۱	آزمایش ۲	آزمایش ۳	آزمایش ۴	آزمایش ۵	آزمایش ۶
تعداد گروه x تعداد جوجه	۴×۲۰	۴×۲۰	۴×۲۰	۴×۲۰	۴×۲۰	۵×۲۵
مساحت پن‌ها (مترمربع)	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۱/۵	۰/۸	۰/۸
جیره اولیه[1]	پیش دان (۲۱٪ پروتئین)	پیش دان (۲۱٪ پروتئین)	پیش دان (۲۱٪ پروتئین)	بر پایه ۴۰٪ گندم	بر پایه ۵۵٪ گندم	بر پایه ۵۵٪ گندم
درصد پودر ماهی در جیره پیش از چالش[2]	گروه۱= ۴۰٪ گروه۲ = ۵۰٪ گروه۳=بدون پودر ماهی گروه۴=بدون پودر ماهی	گروه۱= ۴۰٪ گروه۲ = ۵۰٪ گروه۳=بدون پودر ماهی گروه۴=بدون پودر ماهی	گروه۱= ۴۰٪ گروه۲ = ۵۰٪ گروه۳=بدون پودر ماهی گروه۴=بدون پودر ماهی	گروه۱= ۴۰٪ گروه۲ = ۵۰٪ گروه۳=بدون پودر ماهی گروه۴=بدون پودر ماهی	گروه۱= ۳۰٪ گروه۲ = ۴۰٪ گروه۳ = ۵۰٪ گروه ۴ =بدون پودر ماهی	گروه۱= ۳۰٪ گروه۲ = ۴۰٪ گروه۳ = ۵۰٪ گروه۴=بدون پودر ماهی
دوز چالش دهانی	۱ml	۲ml	۲ml	۲ml	۳ml	۳ml
مخلوط کردن میکرب با دان	-	-	-	-	به نسبت ۱:۳۶	به نسبت ۱:۳۶
مشاهده بیماری بالینی	-	-	-	-	+	+
مدت پرهیز غذایی (ساعت)	۶	۶	۸	۸	۲۴	۲۴
سن چالش (روز)	۱۴	۱۴	۱۴	۱۶	۱۷	۱۷
تعداد نوبت چالش در روز	۲	۲	۲	۲	۲	۲
تعداد روز چالش	۱	۱	۳	۳	۵	۵
تجویز واکسن گامبورو	-	-	-	۲ دوز	۱۰ دوز	۱۰ دوز

بالای گندم (۵۵درصد) که به عنوان خوراک اولیه از ۱ الی ۱۱ روزگی مورد استفاده قرار گرفت و نیز درصد بالای پودر ماهی (۳۰ الی ۵۰ درصد) که در فاصله ۱۲ الی ۱۶ روزگی در جیره‌های گروه‌های چالش مصرف شد، تلاش گردید تا شرایط مساعدی در روده برای رشد، تکثیر و ماندگاری باکتری چالش شده فراهم شود. از طرف دیگر به دلیل آن که کاهش ایمنی از دیگر شرایط مستعد کننده برای بروز بیماری می‌باشد، با کاهش فضای پرورشی جوجه‌ها و بالا بردن میزان تراکم با هدف ایجاد استرس و همچنین استفاده از دوز بالای واکسن زنده گامبورو، تلاش گردید تا شرایط نسبی تضعیف ایمنی در جوجه‌های تحت آزمایش فراهم گردد، تا بدین ترتیب باکتری چالش شده بهتر بتواند توان بیماری‌زایی خود را اعمال نماید.

در مطالعه حاضر در ۴ آزمایش اول که سوسپانسیون میکروبی از راه دهانی و رکتال داده شد در گروه‌های تحت چالش علایمی از بیماری و تلفات و ضایعات ماکروسکوپیک دیده نشد. Olkowski و همکاران در سال ۲۰۰۵ طی بررسی خود بیان کردند که چالش پرندگان با استفاده از جدایه‌های C.p. از موارد حاد بیماری چه به صورت چالش دراز مدت با ۲×۱۰^{۸} CFU /ml از ۱۴ تا ۲۱ روزگی و چه به صورت چالش کوتاه مدت (تک دوز ۳×۱۰^{۱۰} CFU /ml به صورت داخل دهانی) هیچ علایمی از بیماری یا تلفات ناشی از آن را ایجاد نکرد و در کالبدگشایی نیز علایم ماکروسکوپیک مشاهده نشد و صرفا ضایعات هیستوپاتولوژیک دیده شد(۱۳). Kaldhusdal و همکاران در سال ۱۹۹۲ در بررسی خود تغییرات تحت بالینی مشاهده کردند که مشابه با نتایج توصیف شده بوسیله Olkowski و همکاران در سال ۲۰۰۵ بود(۱۰). این یافته‌ها مطابق با یافته‌های ما در چهار چالش اول می‌باشد. اگرچه محققین اولیه Truscott و Al-sheikhly در سال ۱۹۷۷(۱۸) و Prescott و همکاران در سال ۱۹۷۸(۱۵) موفق به ایجاد تجربی بیماری انتریت نکروتیک شدند ولی تلاش‌های اخیر برای القاء بیماری با موفقیت کمی همراه بوده است. Olkowski و همکاران مشکل بودن ایجاد تجربی بیماری در حال حاضر در مقایسه با چند دهه گذشته را احتمالاً به دلیل مقاومت ژنوتیپی پرندگان امروزی نسبت به انتریت نکروتیک می‌دانند(۱۳).

McReynolds و همکاران در سال ۲۰۰۴(۱۱) با استفاده از جیره‌ای بر پایه ۵۵درصد گندم و باکتری C.p به میزان $۱۰^{۷}$ CFU /ml توانستند ایجاد بیماری نمایند. در بررسی حاضر با استفاده از جیره‌ای بر پایه ۵۵درصد گندم (۱ تا ۱۱ روزگی) و نیز استفاده از پودر ماهی به میزان ۴۰درصد به عنوان ریسک فاکتور (۱۲ تا ۱۶ روزگی) و استفاده از واکسن گامبورو به میزان ۱۰ برابر دوز (در ۱۴روزگی) در گروه‌های چالش شده میانگین ضایعات ایجاد شده شدیدتر از نتایج McReynolds و همکاران می‌باشد(اکثرا بین ۳ تا ۴ در مقایسه با ۰/۵-۲)(۱۱). شاید از دلایل شدت ضایعات در بررسی ما استفاده از پودر ماهی به میزان ۴۰درصد و یا به‌کارگیری سوسپانسیون باکتریای به غلظت ۳×۱۰^{۸}CFU/ml در مقایسه با $۱۰^{۷}$CFU /ml می‌توان اشاره کرد. ولی Olkowski و همکاران علیرغم به‌کارگیری از جیره‌ای حاوی ۴۰درصد پروتئین (با منشاء پودرماهی و پودرگوشت) وسطوح بالای گندم جیره و تغییرات ناگهانی جیره و پرهیز غذایی نتوانستند علائم بالینی و ضایعات ماکروسکوپی ایجاد نمایند(۱۳). Pedersen و همکاران در سال ۲۰۰۳ با استفاده از دوزهای خیلی بالای باکتری C.p قادر به ایجاد علائم بالینی تلفات نگردید(۱۴). که موید نقش واکسن گامبورو به عنوان تضعیف کننده سیستم ایمنی می‌باشد(۲۱). در این بررسی در آزمایش‌های ۵ و ۶ علاوه بر استفاده از راه دهانی، سوسپانسیون میکروبی به میزان ۳×۱۰^{۸}CFU/ml به نسبت ۱/۳۶(v/w) مخلوط در دان نیز استفاده شد و در گروه‌های چالش شده علایم بیماری و ضایعات ماکروسکوپیک مشاهده گردید. Brennan و همکاران در سال ۲۰۰۱ و Kaldhusdal در سال ۱۹۹۹ و Prescott و همکاران در سال ۱۹۷۸ با استفاده از مخلوط کردن سوسپانسیون میکروبی در دان توانستند بیماری

تجربی ایجاد نمایند(۶،۹،۱۵). این امر موید آن است که احتمالا تجویز C.p. به‌صورت مخلوط در دان فرصت لازم برای رشد باکتری و تولید توکسین را فراهم می‌نماید. این یافته‌ها مطابق با یافته‌های ما در چالش‌های ۵ و۶ می‌باشد.

در خاتمه باید گفت که نمی‌توان تنها یک عامل را در ایجاد بیماری تجربی دخیل دانست، بلکه برای ایجاد موفقیت‌آمیز بیماری آنتریت نکروتیک باید مجموعه‌ای از عوامل ذکر شده را در نظر گرفت و به طور مناسب و با دقت فراوان آنها را به‌کار گرفت. مدل تجربی ایجاد شده در این مطالعه قابل تکرار است و به راحتی می‌تواند در تحقیقاتی که نیاز به ایجاد تجربی بیماری آنتریت نکروتیک دارد مورد استفاده قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله از زحمات پرسنل بخش بیماری‌های طیور سرکار خانم اعظم یزدانی و آقای داوود سلیمانی و همچنین از معاونت محترم پژهشی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران و شرکت گلپاد به خاطر تامین هزینه‌های انجام طرح صمیمانه سپاسگذاری می‌نماید.

References

1. Al-sheikhly, F., Truscott, R.B. (1977a) The interaction of Clostridium perfringnes and its toxins in the production of necrotic enteritis of chickens. Avian Dis. 21: 256-263.
2. Annett, C.B., Viste, J.R., Chirino-Trejo, M., Classen, H.L. (2002) Necrotic enteritis: effect of barley, wheat and corn diets on proliferation of *clostridium perfringens* type A. Avian Pathol. 31: 599-602.
3. Anonymous (2000) Link between coccidiosis and necrotic enteritis still uncertain. Poult. Digest. 59: 32-34.
4. Bernier, G., Phaneuf, J.B., Filion, R. (1977) Enterite necrotique chez le poulet de gril. III. Etude des facteurs favorisant la multiplication de *clostridium perfringens* et la transmission experimentale de la maladie. Can. J. Comp. Med. 41: 112-116.
5. Branton, S.L., Reece, F.N., Hagler, W.M. (1987) Influence of a wheat diet on mortality of broiler chickens associated with necrotic enteritis. Poult. Sci. 66: 1326-1330.
6. Brennan, J., Bagg, R., Barnum, D., Wilson, J. and Dick P. (2001) Efficacy of naracin in the prevention of necrotic enteritis in broiler chickens. Avian Dis. 45: 210-214.
7. Engstrom, B.E., Fermer, C., Lindberg, A., Saarinen , E., Baverud, V., Gunnarsson, A. (2003) Vet. Microbiol. 94: 225-235.
8. Kaldhusdal, M.I. (2000) Necrotic enteritis as affected by dietary ingredients. World Poult. 16: 42-43.
9. Kaldhusdal, M, Hofshagen, M., Lovlan, A., Longstrand, H. and Redhead, K. (1999) Necrotic enteritis challenge models with broiler chickens raised on litter: evaluation of preconditions, *Clostridium perfringens* strains and outcome variables. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 24: 337-343.
10. Kaldhusdal, M., Hofshagen, M. (1992) Barley inclusion and avoparcin supplementation in broiler diets. 2. Clinical, pathological and bacteriological findings in a mild form of necrotic enteritis. Poultry Sci. 71: 1145-53.
11. McReynolds, J.L., Byrd, J.A., Anderson, R.C., Moore R.W., Edrington, T.S., Genovese K.J., Poole T.L. Kubena, L.F. and Nisbet, D.J. (2004) Evaluation of immunosuppressants and dietary mechanisms in an experimental disease model for necrotic enteritis. Poult. Sci. Dec. 83:1948-52.
12. Miller, D.A. (1998) Clostridial diseases. In A Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens. Edited by DE Swayne, JR Glisson, MM Jackwood, JE Pearson, WM Reed. 4th Ed. American Association of Avian Pathologists, Kendall/Hunt publishing company Pennsylvania, USA, p. 61-68.
13. Olkowski, A.A., Wojnarawicz, C., Chirino-trejo, M. and Drew, M.D. (2006) Responses of broiler chickens orally challenged with *Clostridium perfringens* isolated from field cases of necrotic enteritis. Res. Vet. Sci. 81:99-108.
14. Pedersen, K., Bjerrum, L., Nauerby, B., Madsen, M. (2003) experimental infections with rifampicin-resistant *Clostridium perfringens* strains in broiler chickens using isolator facilities.. Avian Pathol.

32:403-411.

15. Prescott, J. F., Sivendra, R., Barnum, D.A. (1978) The use of bacitracin in the prevention and treatment of experimentally induced necrotic enteritis in the chicken .Can.Vet.J.19:181-183.
16. Stutz, H. W., Lawton, G. C. (1984) Effects of diet and antimicrobials on growth, feed efficiency, intestinal *Clostridium perfringens*, and ideal weight of broiler chicks. Poult. Sci. 63: 2036-2042.
17. Summanen, P., Baron, E.j., Citron,D.M., Strong, H.M., Wexler, H.M., Finegold, S.M. (1993) Wadsworth anaerobic bacteriology manual 5thEd. Star Publishing Company. Belmont, California, USA, p.1-125.
18. Truscott, R.B., Al-Sheikhly, F. (1977) Reproduction and treatment of necrotic enteritis in broilers. Am. J. Vet. Res. 38: 857-861.
19. Van Immerseel, F., De Buck, J., Damans, F., Huyghebaert, G., Hesebrouck, F. and Ducatelle, R. (2004) *Clostidium perfringens* in poultry; an emerging threat for animal and public health. Avian Pathol. 33:537-549.
20. Wages, D. P., Opengart, K. (2003) Necrotic enteritis. In Disease of Poultry. Edited by YM Saif, HJ Barnes, JR Glisson, AM Fadly, LR McDougald, DE Swayne. 11thEd. Iowa State Press, Iowa, USA, p.781-783.
21. Williams, R.B. (1999) Anticoccidial vaccines, the story so far. World Poult. 3: 23-25.
22. Williams, R.B. (2005) Review intercurrent coccidiosis and necrotic enteritis of chickens, rational, integrated disease management by maintenance of gut integrity. Avian Pathol. 34: 159-160.
23. Williams, R. B., Marshall, R.N., La Ragions, R.M. (2003) A new method for the experimental production of necrotic enteritis and its use for studies on the relationships between necrotic enteritis, coccidiosis and anticoccidial vaccination of chickens. Parasitol. Res. 90: 19-26.

J.Vet.Res. 63,3:127-132,2008

EXPERIMENTAL INDUCTION OF NECROTIC ENTERITIS IN BROILER CHICKENS BY *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ISOLATES FROM THE OUTBREAKS IN IRAN

Nikpiran, H., Shojadoost, B.*, Peighambari, S. M.

Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran - Iran.

(Received 21 May 2006 , Accepted 2 May 2007)

Abstract:

To establish an stable challenge system for induction of necrotic enteritis (NE) in broiler chickens, different potential factors and predisposing conditions were imposed in 6 separate different experiments using 525 day-old chicks in total. Despite the presence of some predisposing factors and using 4 isolates of *Clostridium perfringens* (CP) from acute and severe NE outbreaks as challenge bacteria, the disease was not successfully reproduced in the first 4 experiments. In the 5th and 6th experiments, the predisposing conditions were changed and each bird was challenged with 3 ml (3×10^8 CFU/ml) of CP live culture via oral route and also the feed mixed with CP suspension 2 times per day and for 5 consecutive days. Clinical signs and mortalities, and lesions associated with NE were observed in the later two experiments. This study showed that by stressful nutritional and management procedures such as increased stocking density and high levels of wheat and fish meal; induction of relative immunosuppression; using sufficient CP concentration and appropriate ways of its multiplication; and applying challenge bacteria isolated from acute outbreaks, NE may be experimentally induced in broiler chickens.

Key words: necrotic enteritis, *Clostridium perfringens*, experimental study, broiler chicken.

***Corresponding author's email: bshojae@ut.ac.ir, Tel: 021-66923748, Fax: 021-66933222**