

## تأثیر آنتی بادی استخراج شده از تخم مرغ و پروبیوتیک در پیشگیری از عفونت سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی

زهرا مقدم شیراز<sup>۱</sup> شعبان رحیمی<sup>۱\*</sup> تقی زهرایی صالحی<sup>۲</sup>

۲) گروه پرورش و تولید طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس، تهران - ایران.

۳) گروه میکرو بیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، تهران - ایران.

(دریافت مقاله: ۱۷ فروردین ماه ۱۳۸۵، پذیرش نهایی: ۳۰ دی ماه ۱۳۸۶)

### چکیده

به منظور ارزیابی تأثیر مصرف پروبیوتیک و ایمونوگلوبولین (IgY) اختصاصی سالمونلا انتریتیدیس در پیشگیری از عفونت سالمونلوز در جوجه‌های گوشتی ابتدای تعداد چهار قطعه مرغ لگهون سفید (۳۳ هفتگی) با پادگن کامل سالمونلا انتریتیدیس (SE) به روش عضلانی و زیر جلدی ایمین شدند. غلظت پروتئینی پادگن پس از سونیکه کردن  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  بود. در تزریق نخست، از ۲۵۰ میکروگرم پادگن همراه با ۲۵۰ میکروگرم ماده آدجوانت کامل فروند (نسبت ۱:۱) استفاده شد. دوز یاد آور، دومرتبه و در فواصل ۱۴ روز با ماده آدجوانت ناقص فروند تزریق شد. خونگیری و جمع آوری تخم مرغ ها ۲۰ روز پس از نخستین تزریق انجام گرفت. در طول دوره ایمونیزاسیون، فعالیت پادتن ضد سالمونلا انتریتیدیس (IgY و IgG) در زرده و سرم با تست الایزا تعیین شد. سپس تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه نر یک روزه گوشتی (سویه راس ۳۰۸) در ۸ گروه، هر گروه شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه پرنده به مدت ۵۶ روز پرورش داده شدند. هشت گروه آزمایشی به صورت C, SPA, PA, SA, SP, A, P, S مشخص شدند. در چهار گروه به عنوان گروه‌های چالشی (S)، در سن ۷ روزگی، ۴ پرنده به طور تصادفی انتخاب و با ۵/۰ میلی لیتر از محلول سوسپانسیون SE حاوی  $1 \times 10^8$  CFU باکتری به روش دهانی چالش داده شدند. پرندهگان در گروه‌های (A)، از یک روزگی تا پایان دوره آزمایش، روزانه مقدار ۱۵ میلی لیتر زرده حاوی پادتن، را دریافت داشتند. گروه‌های حاوی پروبیوتیک (P) تا سن ۲۱ روزگی مقدار ۰/۱ درصد جیره و از ۲۱ تا ۵۶ روزگی مقدار ۰/۵ درصد جیره، پروبیوتیک دریافت نمودند. گروه شاهد (C) بدون چالش باکتری و فاقد تیمارهای پادتن و پروبیوتیک بود. به منظور بررسی عملکرد پرندهگان وزن بدن و مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی به طور هفتگی محاسبه شد. طرح به شکل کاملاً تصادفی اجرا شد. در این طرح از برنامه آماری SAS برای داده‌های پارامتری و از مربع کای برای داده‌های ناپارامتری استفاده شد. بالاترین تیترا پادتن پلی کلونال در زرده و سرم به ترتیب ۲۰ و ۵۵ روز پس از نخستین تزریق بدست آمد. میزان دفع باکتری در مدفوع پرندهگان، در گروه‌های حاوی A, P و A-P، به طور معنی داری کاهش یافت ( $p < 0/01$ ). در گروه‌های حاوی A و A-P، تعداد شمارش باکتری در سکوم به طور معنی داری پایین بود ( $p < 0/01$ ). همچنین در گروه‌های چالشی حاوی A, P و A-P، جداسازی باکتری از اندام‌های کبد، طحال و ایلتوم، کمتر بود. در هیچ دوره‌ای از آزمایش در بین گروه‌های مختلف از نظر میانگین وزن بدن، میانگین مصرف خوراک روزانه، ضریب تبدیل غذایی و میزان مرگ و میر اختلاف معنی داری وجود نداشت ( $p > 0/05$ ). در سن ۴۹ روزگی و در دوره پایانی در گروه‌های حاوی A, P و A-P میانگین افزایش وزن بدن به طور معنی داری بالاتر بود ( $p < 0/05$ ). میانگین ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های حاوی A, P و A-P در سن ۵۶ روزگی بهبود یافت.

واژه‌های کلیدی: ایمونوگلوبولین Y، ایمونوگلوبولین G، سالمونلا انتریتیدیس، الایزا، پروبیوتیک.

به منظور ایجاد ایمنی پاسیو و افزایش مقاومت در مقابل عوامل بیماری زا محسوب می‌شود (۶،۱۳) ایمونوگلوبولین Y (IgY) مهم ترین آنتی بادی موجود در زرده تخم مرغ طیور می باشد. IgY به عنوان جانشین برای آنتی بادی‌های پستانداران که به طور معمول در تحقیقات مورد استفاده قرار می‌گیرند، مطرح می‌شود. روش ساده خالص سازی و نشاندار کردن این ملکول از زرده تخم مرغ، عدم نیاز به خونگیری از حیوان، کاهش استرس، اجرای بهتر آزمایش‌های ایمونولوژیکی، پتانسیل بالای IgY در پیشگیری و درمان بیماری‌ها از جمله مزایای استفاده از آن در مقایسه با آنتی‌بادی‌های پستانداران می باشند (۲۱، ۱۵). در تجویز خوراکی IgY، ممکن است آنتی‌بادی تحت pH اسیدی معده دنا توره و با پروتئازهایی مثل پپسین و تریپسین، کیموتریپسین، کربوکسی پپتیداز و الاستاز تجزیه شود اما قطعات حاصل هنوز قابلیت اتصال و خنثی سازی آنتی‌ژن را داشته و بخش‌هایی از

### مقدمه

اپیدمیولوژی پیچیده عفونت سالمونلایی به علت منابع عفونت متعدد، گستردگی میزان‌ها و سروتیپ‌ها، وجود حاملین طبیعی، پخش باکتری از طریق مدفوع و آلودگی گسترده آن می باشد. از بیش از ۲۵۵۰ سروتیپ سالمونلای شناخته شده (۲۰) حدود ۵۰ درصد از طیور جدا شده اند که در این بین سالمونلا تیفی موریوم و سالمونلا انتریتیدیس متداولترین آنها می باشند و بسیاری از عفونت‌های ناشی از این سروتیپ‌ها منشاء غذایی دارند (۲۲). سالمونلا انتریتیدیس (SE) Salmonella enteritidis عامل انتروکولیت (گاستروانتریت، مسمومیت غذایی) به عنوان شایع ترین عفونت سالمونلایی در انسان می باشد. مصرف آنتی‌بادی‌های اختصاصی علیه پاتوژن‌های میزبان هم در انسان و هم در حیوانات، به عنوان روش جالبی



برادفورد  $500 \mu\text{g ml}^{-1}$  تعیین شد.

استخراج آنتی بادی از زرده تخم مرغ: برای مصارف خوراکی آنتی بادی در جوجه های گوشتی IgY تخلیص نشد، بلکه مطابق روش Fulton و همکاران در سال ۲۰۰۲ زرده تخم مرغ به طور کامل از سفیده جدا شد و غشاء محافظ زرده نیز خارج شد. هم حجم زرده به دست آمده محلول  $\text{HPo}_4$ ]PBS (0.02 M)  $\text{NaCl}$ ، (0.15 M)  $\text{Na}_2$  [pH=7.2 اضافه کرده و مخلوط حاصل به مدت ۳ دقیقه با سرعت بالا در دستگاه مخلوط کن همگن شد و سپس در  $1800 \times \text{g}$  در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از سانتریفیوژ سه لایه تشکیل شد. لایه چربی بسیار نازک سطحی خارج شد و محلول شناوری که بین لایه سطحی و رسوب تشکیل شده و حاوی IgY بود، جمع آوری و رسوب حاصل دور ریخته شد (۱۰).

تخلیص ایمونوگلوبولین Y: به منظور اطمینان از حفظ تیترا بالای IgY در داخل زرده تخم مرغ ها، آزمایش الیزا انجام گرفت و جهت تعیین تیترا آنتی بادی، تخلیص IgY از زرده تخم مرغ بر اساس روش پولسون و با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۶۰۰۰ انجام شد (۱۸).

آزمایش الیزا: به طور مختصر، آنتی ژن کامل SE در داخل چاهک های پلیت الیزا کوت (Coating) شد و پس از گرمخانه گذاری پلیت (به مدت یک شب)، نمونه های زرده بر روی چاهک ها ریخته شد، همچنین به منظور بررسی واکنش غیر اختصاصی (NSB)، IgY (از قبل خریداری شده)، در چند چاهک ریخته شد. پس از گرمخانه گذاری، پروتئین های اتصال نیافته توسط شست و شو با بافر الیزا برداشته شدند. در آنکو باسیون مرحله بعدی دومین آنتی بادی کونژوگه شده با آنزیم Chicken-IgY-HRP - (Anti) به چاهک ها اضافه شد. بعد از گرمخانه گذاری و شست و شو با بافر الیزا، محلول رنگزا Tetra-Methyl Benzidine (TMB) به داخل چاهک ها افزوده شد. ادامه رنگ پذیری با اضافه کردن HCl متوقف شد. شدت رنگی شدن که مستقیماً با غلظت آنتی بادی IgY در نمونه ها متناسب بود، توسط دستگاه الیزا ریدر قرائت شد.

آزمایش بر روی جوجه های گوشتی: تعداد ۲۴۰ قطعه جوجه نر گوشتی یک روزه (سویه راس ۳۰۸) در ۸ گروه، هر گروه شامل ۳ تکرار و هر تکرار شامل ۱۰ قطعه پرنده به مدت ۵۶ روز پرورش داده شدند. هشت گروه آزمایشی به صورت Control (C)، Salmonella probiotic Antinbody (SPA)، Control (C)، Salmonella probiotic (SP)، Salmonella Antinbody (SA)، Probiotic Antibody (A)، Salmonella (S) و Probiotic (P) مشخص شدند. در چهار گروه به عنوان گروه های چالشی (S)، در سن ۷ روزگی، ۴ پرنده به طور تصادفی انتخاب و با  $1 \times 10^6$  CFU میلی لیتر از محلول سوسپانسیون SE حاوی (A)، از یک روزگی تا پایان دوره آزمایش، هر روز مقدار ۱۵ میلی لیتر زرده حاوی آنتی بادی را دریافت داشتند ( $1/5 \text{ ml/bird/day}$ ) و این مقدار زرده توسط سمپلر و با سرنگی که به جای سوزن آن لوله لاستیکی باریکی وصل شده بود،

آنتی بادی همچنان دست نخورده باقی می ماند (۶). مولکول IgY محیط آنکو باسیون  $\text{pH}=2$  و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد را تحمل می کند، همچنین فعالیت ایمونولوژیکی IgY با عملیات پاستوریزاسیون در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت سه و نیم دقیقه تحت تأثیر قرار نمی گیرد، همچنین پس از جداسازی IgY از زرده می توان آن را در دمای ۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ سال بدون هیچ کاهش معنی داری در تیترا آنتی بادی، ذخیره و نگهداری نمود (۱۳). اما بررسی استفاده از مواد حفاظتی مختلف از جمله سوکروز و کپسولدار کردن ژلاتینی IgY بر کارایی آن در مصارف خوراکی پیشنهاد می شود. از سوی دیگر نقش پروبیوتیک ها در زمینه سلامتی روده جوجه های گوشتی، به ایجاد تعادل میکروبیولوژیکی آن مربوط می شود که با تکثیر خود و با رقابت با پاتوژن ها در جسیبیدن به مکان های اتصال موجود بر روی سلول های اپی تلیال روده ای ایفای نقش می نماید (۱۹، ۱۲).

## مواد و روش کار

واکسیناسیون پرندگان تخم گذار: چهار قطعه مرغ لگهورن سفید (۳۳ هفتگی) به عنوان گروه اول انتخاب شدند. به هر مرغ ۵۰۰ میکروگرم از مخلوط آنتی ژن و ماده آدجوانت کامل فروند (به نسبت ۱:۱) در چند ناحیه زیر جلدی از عضله سینه (۲۵۰ میکروگرم) و نیز داخل عضله ران مرغ (۲۵۰ میکروگرم) تزریق شد. تزریق یاد آور در دو نوبت در فواصل ۲ هفته ای پس از نخستین ایمونیزاسیون انجام گرفت. ایمونژن به همراه آدجوانت ناقص فروند برای تزریق های یاد آور استفاده شد. در کل دوره آزمایشی به طور همزمان به چهار قطعه مرغ لگهورن سفید (۳۳ هفتگی) به عنوان گروه دوم (شاهد)، محلول سرم فیزیولوژی استریل تزریق شد.

زمان و نحوه خونگیری: بیست روز پس از نخستین تزریق، از ناحیه ورید بال پرندگان در هر دو گروه اول و دوم خونگیری به عمل آمد (۲ ml) و نمونه های سرمی جهت انجام تست ELISA تهیه شدند. بیست و پنج روز پس از نخستین تزریق، تخم مرغ ها جمع آوری شدند و به منظور تعیین تیترا IgY، عمل استخراج و تخلیص IgY از زرده ها انجام شد.

تهیه پادگن O سالمونلا انتریتیدیس: سرو تیپ SE که به صورت لیوفیلیزه از بانک میکروبی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج تهیه شده بود مورد استفاده قرار گرفت. از این باکتری در محیط مایع برین هارت کشت داده شد و جهت اطمینان از خلوص آن رنگ آمیزی گرام انجام گرفت. از محیط مایع فوق بر روی مک کانکی کشت داده شد و سپس پرگنه های مشکوک به سالمونلا بر روی TSI (محیط سه قندی آهن دار) و اوره کشت داده شدند (۲۲). پس از تأیید باکتری در این محیط کشت ها، یک لوپ کامل از کشت ۲۴ ساعته و خالص باکتری بر روی TSI، تحت شرایط استریل بر روی آگار برین هارت کشت خطی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، با سرم فیزیولوژی استریل شیرابه ای از کشت ها تهیه شد. شیرابه حاصل درون بشر و در داخل ظرف حاوی قطعات یخ در دستگاه Sonicator قرار گرفت. غلظت پروتئینی محلول آنتی ژن با روش





جدول ۳- تأثیر آنتی بادی و پروبیوتیک بر میزان تهاجم سالمونلا انتریتیدیس به اندام‌های داخلی. حروف S، A و P به ترتیب نماد سالمونلا، آنتی بادی و پروبیوتیک هستند. \* تعداد موارد مثبت سالمونلا انتریتیدیس و \*\* تعداد پرندگان ذبح شده

| تیما | ۲۱ روزگی |      |        | ۲۸ روزگی |      |        | ۳۵ روزگی |      |        |
|------|----------|------|--------|----------|------|--------|----------|------|--------|
|      | کید      | طحال | ایلئوم | کید      | طحال | ایلئوم | کید      | طحال | ایلئوم |
| S    | ۳*       | ۳*   | ۳*     | ۲        | ۱    | ۳      | ۳        | ۳    | ۳      |
| SP   | ۳        | ۳    | ۳      | ۲        | ۱    | ۳      | ۳        | ۳    | ۳      |
| SA   | ۳        | ۳    | ۳      | ۱        | ۳    | ۳      | ۳        | ۳    | ۳      |
| SPA  | ۳        | ۳    | ۳      | ۱        | ۳    | ۳      | ۳        | ۳    | ۳      |

جدول ۲- تأثیر پروبیوتیک و آنتی بادی بر تعداد باکتری سالمونلا در محتویات سکوم جوجه‌های گوشتی در گروه‌های چالش شده با باکتری ( $1 \times 10^6$  CFU). حروف S، A و P به ترتیب نماد سالمونلا، آنتی بادی و پروبیوتیک هستند. \* نماد معنی دار ( $p < 0.01$ ) میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک از نظر آماری اختلاف معنی داری دارند.

| تیما          | تعداد باکتری بر حسب لگاریتم واحد تشکیل دهنده کلنی به ازای هر گرم مدفوع |                   | فاکتور محافظتی (PF) |
|---------------|--|-------------------|---------------------|
|               | ۲۱ روزگی   | ۲۸ روزگی          |                     |
| S             | ۵/۲۶ <sup>c</sup>  | ۳/۹۸ <sup>c</sup> | -                   |
| SA            | ۱/۲۳ <sup>a</sup>  | ۰/۳۷ <sup>a</sup> | ۴/۲۷                |
| SP            | ۲/۹۲ <sup>b</sup>  | ۱/۹۸ <sup>b</sup> | ۱/۸                 |
| SPA           | ۱/۱۳ <sup>a</sup>  | ۰/۳۸ <sup>a</sup> | ۴/۶۹                |
| منابع تغییرات |  |                   |                     |
| تیما          | **   | **                | احتمال              |

جدول ۴- اثر استفاده از پروبیوتیک و آنتی بادی بر میانگین افزایش وزن روزانه جوجه‌های گوشتی در دوره‌های مختلف بر حسب گرم. حروف S، A و P به ترتیب نماد سالمونلا، آنتی بادی و پروبیوتیک هستند. \* نماد معنی دار ( $p < 0.01$ ) و ns نماد غیر معنی دار است. abc میانگین‌های با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار از نظر آماری می‌باشند.

| تیما         | افزایش وزن روزانه (گرم) |                     |       |        | مصرف خوراک روزانه (گرم) |        |        |        | ضریب تبدیل غذایی |        |      |        | درصد تلفات |        |      |        |
|--------------|-------------------------|---------------------|-------|--------|-------------------------|--------|--------|--------|------------------|--------|------|--------|------------|--------|------|--------|
|              | کل                      | پایانی              | رشد   | آغازین | کل                      | پایانی | رشد    | آغازین | کل               | پایانی | رشد  | آغازین | کل         | پایانی | رشد  | آغازین |
| S            | ۳۰/۳۷                   | ۶۵/۷۷ <sup>ab</sup> | ۷۴/۹۵ | ۳۰/۳۹  | ۱۳۴/۷۵                  | ۲۰۹/۴۴ | ۱۵۳/۶۶ | ۵۴/۶۱  | ۲/۳۵             | ۳/۱۸   | ۲/۰۵ | ۱/۸۱   | ۰          | ۰      | ۳    | ۰      |
| SP           | ۳۰/۴۵                   | ۶۳/۱۹ <sup>b</sup>  | ۷۱/۰۳ | ۵۵/۱۷  | ۱۲۹/۶۷                  | ۱۹۲/۱۰ | ۱۵۵/۷۴ | ۵۰/۷۱  | ۲/۳۵             | ۳/۰۴   | ۲/۱۹ | ۱/۶۷   | ۰          | ۰      | ۶    | ۰      |
| SA           | ۳۲/۱۶                   | ۶۴/۱۶ <sup>b</sup>  | ۷۵/۹۷ | ۵۹/۰۳  | ۱۳۳/۲۵                  | ۲۰۳/۴۴ | ۱۵۵/۹۸ | ۵۲/۱۲  | ۲/۲۶             | ۲/۹۹   | ۲/۰۷ | ۱/۶۲   | ۰          | ۰      | ۶    | ۳      |
| SPA          | ۳۲/۸۹                   | ۷۴/۷۸ <sup>a</sup>  | ۷۸/۳۹ | ۶۱/۹۸  | ۱۳۷/۴۰                  | ۲۰۹/۱۴ | ۱۶۲/۲۶ | ۵۲/۶۱  | ۲/۲۲             | ۲/۷۹   | ۲/۰۶ | ۱/۶۰   | ۳          | ۳      | ۱۲   | ۶      |
| C            | ۳۱/۴۶                   | ۶۷/۶۷ <sup>ab</sup> | ۷۰/۸۰ | ۵۶/۶۱  | ۱۳۱/۱۷                  | ۲۰۶/۸۵ | ۱۴۸/۸۹ | ۵۱/۶۵  | ۲/۳۱             | ۳/۰۶   | ۲/۱۰ | ۱/۶۴   | ۰          | ۰      | ۴    | ۱      |
| P            | ۳۲/۸۵                   | ۷۳/۷۱               | ۸۰/۰۴ | ۶۲/۳۵  | ۱۳۷/۶۹                  | ۲۰۸/۷۲ | ۱۶۱/۷۴ | ۵۴/۳۹  | ۲/۲۱             | ۲/۸۲   | ۲/۰۲ | ۱/۶۵   | ۳          | ۳      | ۹    | ۳      |
| A            | ۳۱/۵۹                   | ۷۱/۹۹ <sup>ab</sup> | ۷۶/۱۹ | ۵۹/۹۴  | ۱۳۵/۶۲                  | ۲۱۰/۴۵ | ۱۵۶/۳۸ | ۵۳/۲۱  | ۲/۲۶             | ۲/۹۲   | ۲/۰۵ | ۱/۶۸   | ۳          | ۳      | ۶    | ۰      |
| PA           | ۳۱/۴۱                   | ۷۳/۳۵ <sup>a</sup>  | ۷۷/۴۰ | ۶۰/۷۱  | ۱۳۳/۸۴                  | ۲۰۸/۹۹ | ۱۵۵/۰۲ | ۵۰/۶۶  | ۲/۲۰             | ۲/۸۵   | ۲/۰۱ | ۱/۶۱   | ۰          | ۰      | ۶    | ۳      |
| SEM          | ۰/۴۰                    | ۱/۱۸                | ۱/۰۴  | ۰/۷۷   | ۱/۱۴                    | ۳/۰۵   | ۱/۳۸   | ۰/۶۵   | ۰/۱۳             | ۰/۱۰   | ۰/۰۷ | ۰/۰۸   | ۰/۰۲       | ۰/۰۳   | ۰/۰۲ | ۰/۰۳   |
| منبع تغییرات |                         |                     |       |        |                         |        |        |        |                  |        |      |        |            |        |      |        |
| تیما         | ns                      | *                   | ns    | ns     | ns                      | ns     | ns     | ns     | ns               | ns     | ns   | ns     | ns         | ns     | ns   | ns     |

شمارش باکتری در محتویات سکوم پرندگان در گروه‌های چالشی: در سن ۲۱ و ۲۸ روزگی بین گروه‌های چالشی از نظر تعداد باکتری اختلاف معنی دار ( $p < 0.01$ ) مشاهده شد. مطابق جدول (۲) گروه S همواره بیشترین و گروه SA و SPA کمترین تعداد باکتری را در محتویات سکوم داشتند. مقادیر شمارش باکتری در گروه SP در هر دو دوره نمونه برداری بیشتر از گروه‌های SA و SPA بود، لذا از نظر آماری تأثیر معنی دار آنتی بادی ضد سالمونلا انتریتیدیس در کاهش تکثیر باکتری در گروه‌های چالشی وجود دارد ( $p < 0.01$ ).

مقادیر فاکتور محافظتی (PF) در گروه‌های چالشی: مطابق جدول (۲) مقادیر PF در ۲۱ روزگی (۱۴ روز پس از چالش) در گروه‌های SA، SPA بیشتر از ۴ بوده در حالی که در گروه SP پایین تر ( $PF = 1/8$ ) بوده است. همچنین در ۲۸ روزگی (۲۱ روز پس از چالش) مقادیر PF در گروه‌های SA، SP، SPA به ترتیب ۱۰/۴۷، ۲، ۱۴/۷۴ بوده است که گروه SP پایین ترین و گروه SA بالاترین

( $p < 0.01$ ). مطابق جدول (۱) در سن ۱۴ روزگی یعنی ۷ روز پس از چالش

۱- S سالمونلا، آنتی بادی، P پروبیوتیک، C کنترل

۲- SEM - اشتباه معیار میانگین ها

۳- ns غیر معنی دار ( $p > 0.05$ )

۴- \* معنی دار ( $p < 0.05$ )

abc میانگین‌های با حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی دار از نظر آماری می‌باشند.

خوراکی باکتری گروه S و SAP به ترتیب با ۴۶ و ۲۷/۵ درصد بالاترین و پایین ترین درصد پرندگان ناقل باکتری را داشته‌اند. در ۲۱ روزگی یعنی ۲ هفته پس از چالش، درصد موارد مثبت در گروه‌های S، SP، SA، SPA به ترتیب ۲۰، ۱۳، ۱۰/۳ و ۶ درصد بوده است. در ۲۸ روزگی در گروه‌های SA و SPA هیچ یک از پرندگان باکتری را دفع ننموده، در حالی که ۱۴ درصد گروه S و ۱۱ درصد گروه SP همچنان ناقل باکتری بوده‌اند. در ۳۵ روزگی هیچ کدام از گروه‌های چالشی، موارد مثبت سالمونلا از نمونه سواب کلوک را نداشتند (جدول ۱).



انسان و دام می باشد و افزایش شیوع آن بین انسان و حیوان مخصوصاً در دهه های اخیر و ظاهراً عدم توانایی در کنترل بیماری از نظر انتشار آن، اهمیت بیماری را دو چندان می نماید (۷، ۱۴) با توجه به اثر مهم دفع سالمونلا از مدفوع در انتشار جانبی آلودگی سالمونلایی در طیور، چنین به نظر می رسد که روش پیشگیری از عفونت با مصرف آنتی بادی و پروبیوتیک مؤثر واقع شده است زیرا در کل دوره آزمایشی گروه S به عنوان گروه کنترل منفی (فاقد آنتی بادی - پروبیوتیک) بالاترین درصد آلودگی را در کلواک داشته است. در گروه های SA و SPA در مقایسه با S و SP، پرندهگان در مدت زمان کوتاه تری ناقل باکتری بوده اند و تا قبل از سن ۲۸ روزگی دفع سالمونلا از مدفوع متوقف شده است، در حالی که گروه های S و SP همچنان در سن ۲۸ روزگی حامل باکتری در مدفوع بوده اند. در ۱۴ و ۲۱ روزگی درصد موارد مثبت آلودگی در کلواک پرندهگان گروه SPA نسبت به S و SA کمتر بوده و این اختلاف از نظر آماری معنی دار بوده است که بیانگر فعالیت سینرژیسمی بین پروبیوتیک و آنتی بادی در کاهش استقرار باکتری در دستگاه گوارش پرنده می باشد که با نتایج بسیاری از آزمایش ها (۸، ۹، ۷) مطابقت دارد. در کل در هر چهار گروه چالشی در سن ۳۵ روزگی تمام نمونه های سواب کلواک از نظر سالمونلا منفی بودند و این بیانگر روند پاک شدن خود به خودی باکتری در دستگاه گوارش پرنده می باشد که با آزمایش Heres و همکاران در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد (۱۲).

مطابق نتایج حاصل از این تحقیق، در روزهای ۱۴ و ۲۱ پس از چالش سالمونلا، مقدار عددی شمارش باکتری در سکوم گروه SA و SPA مشابه بوده، لذا پروبیوتیک و آنتی بادی در ارتباط با کاهش تکثیر سالمونلا در لومن سکوم از نظر آماری فعالیت سینرژیسمی معنی داری نداشته اند که با نتایج حاصل از بررسی های Fulton و همکاران در سال ۲۰۰۲ و Tellez و همکاران در سال ۲۰۰۱ مغایرت دارد (۲۱، ۱۰). اما Balevi و همکاران در سال ۲۰۰۱ اظهار داشت که عدم تأثیر معنی دار پروبیوتیک ها در کاهش تکثیر پاتوژن ها در دستگاه گوارش جوجه های گوشتی را می توان به انتخاب نامناسب میکروارگانیسم های موجود در آن و غیر اختصاصی بودن سویه، گونه و جنس میکروارگانیسم ها ربط داد (۳). Morishita و همکاران در سال ۱۹۹۲ اظهار داشتند که در شرایط بهینه پرورشی و مدیریتی، قابلیت استقرار میکروارگانیسم های پروبیوتیک ها در دستگاه گوارش مهم ترین عامل در توانایی آنها در رقابت با پاتوژن ها محسوب می شود (۱۶). Fuller در سال ۱۹۸۹ نشان داد که عدم توانایی یک میکروارگانیسم در استقرار در محل (دستگاه گوارش) ممکن است یک ناتوانایی ذاتی بوده و یا به نحوی با حضور فلور طبیعی مرتبط باشد. تحمل در برابر pH پایین روده کوچک پس از حفظ بقا در محیط سنگدان، نیز مؤثر می باشد (۹). ممکن است عوامل دیگری مانند دمای مطلوب برای رشد و مقاومت در برابر اسیدهای چرب غیر اشباع نیز در بروز پدیده استقرار در محل نقش داشته باشد (۱).

بر اساس نتایج Corrier و همکاران در سال ۱۹۹۵ گروه های حاوی آنتی بادی و پروبیوتیک یا آنتی بادی به تنهایی، در مقایسه با گروه های حاوی

مقدار فاکتور محافظتی را داراست.

**نمونه برداری از اندام های داخلی:** بر اساس نتایج حاصل در جدول (۳) موارد مثبت باکتری در گروه های SA و SPA در هر دو دوره نمونه گیری در سن ۲۱ و ۲۸ روزگی همواره کمتر از گروه های S و SP بود. طحال و کبد در اکثر پرندهگان تا ۲ هفته پس از چالش (تا ۲۱ روزگی) از نظر سالمونلا مثبت بوده و به مرور زمان موارد مثبت باکتری در این دو ارگان کمتر شد. در ۲۵ روزگی از هیچ یک از اندام ها در هیچ گروه آزمایشی، باکتری جدا سازی نشد. در هر چهار گروه چالش شده، در مورد ایلئوم اکثر نمونه ها از نظر سالمونلا منفی بوده اند، به استثنای ۲۱ روزگی که موارد مثبت ایلئوم فقط در گروه های S و SP مشاهده شد.

#### عملکرد جوجه های گوشتی

**افزایش وزن روزانه:** مطابق جدول (۴) با وجود برخی نوسانات و ناهماهنگی هادر میانگین افزایش وزن روزانه در گروه های مختلف آزمایشی، در دوره پایانی، میانگین افزایش وزن روزانه گروه SPA به طور معنی داری بیشتر از SA و SP بوده است ( $p < 0.05$ ). در گروه های چالشی و غیر چالشی فقط با حضور توأم آنتی بادی و پروبیوتیک بیشترین مقدار افزایش وزن روزانه مشاهده شد، لذا آنتی بادی و پروبیوتیک دارای فعالیت سینرژیسمی بوده اند.

**روزانه:** مطابق جدول (۴) در هیچ یک از دوره های پرورشی میانگین مصرف خوراک روزانه گروه های آزمایشی از نظر آماری اختلاف معنی داری نداشته است ( $P < 0.05$ ). اما، در دوره رشد، پایانی و کل دوره آزمایشی، از نظر عددی گروه های دریافت کننده پروبیوتیک (چالشی و غیر چالشی) نسبت به گروه C مصرف خوراک روزانه بالاتری داشتند.

**ضریب تبدیل غذایی:** مطابق جدول (۴) در هیچ دوره ای از نظر آماری اختلاف معنی داری بین مقادیر ضریب تبدیل غذایی در بین گروه های مختلف آزمایشی مشاهده نشد و در گروه های مختلف آزمایشی، در دوره آغازین تغییرات میانگین ضریب تبدیل غذایی روزانه مشابه میانگین افزایش وزن و مصرف خوراک روزانه روند مشخصی نداشته است اما در دوره رشد، پایانی و کل دوره آزمایشی، گروه های SPA, PA, P از نظر عددی ضریب تبدیل غذایی مشابه و بهتر از گروه S داشتند، لذا در گروه های چالشی و غیر چالشی، حضور توأم آنتی بادی و پروبیوتیک موجب بهبود عملکرد حیوان و کاهش ضریب تبدیل غذایی گشته است.

**میزان مرگ و میر:** در هیچ یک از مراحل انجام آزمایش، نشانه بالینی عفونت سالمونلایی در هیچ پرنده ای مشاهده نشد و مطابق جدول (۴) در بین گروه های مختلف از نظر درصد مرگ و میر اختلاف معنی داری مشاهده نشد ( $p > 0.05$ ).

#### بحث

در بین بیماری های طیور، سالمونلوز از بیماری هایی است که علاوه بر ضررهای اقتصادی در زمینه پرورش طیور، از بیماری های عفونی مشترک بین



مختلفی در این ارتباط نقش داشته‌اند (۸، ۲۱).

در کل شاید بتوان گفت که در گروه‌های چالشی و غیرچالشی فقط با حضور توأم آنتی بادی و پروبیوتیک، بیشترین مقدار افزایش وزن روزانه مشاهده شد، لذا آنتی بادی و پروبیوتیک در ارتباط با افزایش وزن بدن دارای فعالیت سینرژیسمی بوده‌اند که با نتایج بررسی‌های Tellez و همکاران در سال ۲۰۰۱ مطابقت دارد (۲۱).

بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های Balevi و همکاران در سال ۲۰۰۱ پروبیوتیک اختصاصی طیور با تثبیت نمودن جمعیت میکروبی مفید دستگاه گوارش و مشارکت دادن این میکروارگانیسم‌ها در هضم اجزای مواد خوراکی اثر مثبتی بر روی بهبود میانگین مصرف خوراک و افزایش وزن روزانه خواهد داشت (۳). بررسی‌های Burkholder و Patterson در سال ۲۰۰۳ نقش مثبت پروبیوتیک‌ها را در بهبود مصرف خوراک و ضریب تبدیل غذایی جوجه‌های گوشتی بیان نمود (۱۷).

مطابق نتایج حاصل از این تحقیق ضریب تبدیل غذایی در گروه‌های حاوی آنتی بادی و پروبیوتیک به تنهایی یا توأم با هم بهبود یافت که با نتایج بررسی‌های Clancy در سال ۲۰۰۳ مطابقت دارد (۷). از طرف دیگر میزان رشد و تکثیر سالمونلا در این گروه‌ها کاهش یافت که بر اساس بررسی‌های Bolder و همکاران در سال ۲۰۰۲ حرکت کند خوراک به طرف پایین دستگاه گوارش (بهبود بازدهی خوراک) موجب افزایش مدت زمان تماس میکروارگانیسم‌ها با اسیدهای چرب فرار روده شده و لذا احتمال از بین رفتن پاتوژن‌ها را افزایش می‌دهد (۵).

بر اساس نتایج بدست آمده از این تحقیق مصرف توأم پریمالاک و IgY اختصاصی ضد سالمونلا انتریتیدیس در جوجه‌های گوشتی چالش شده با باکتری موجب کاهش تکثیر سالمونلا در محتویات سکوم و در نتیجه کاهش دفع آن از مدفوع گردید. همچنین آلودگی لاشه در کشتارگاه و انتشار باکتری در محیط کاهش یافت. لذا برای پیشگیری و کنترل بهتر سالمونلوز علاوه بر توجه به روش‌های مدیریتی و واکسیناسیون، از روش مصرف خوراکی پادتن IgY اختصاصی (ایمنی اکتسابی پاسیو) نیز می‌توان استفاده نمود.

## References

1. Afshar Mazandaran, N., Rajab, A., Kiaei, M. (2002) Probiotic and their use in animal nutrition (PROBIOTICS the scientific basis, Edited by Roy Fuller). Norbakhsh Publications, p. 110-240.
2. Baba, E. S., Nagaishi, T. F., Arakawa, A. (1991) The role of intestinal microflora on the prevention of Salmonella colonization in gnotobiotic chickens. Poultry Sci. 70: 1902-1970.
3. Balevi, T., Coskun, B., Kurtoglu, V., etingul, Q. S. (2001) Effect of dietary probiotic on performance

پروبیوتیک به تنهایی، نقش محافظتی بهتری داشته‌اند، که تا حدودی با نتایج حاصل از شمارش باکتری در سکوم، در بررسی مامطابقت دارد. احتمال دارد که نقش آنتی بادی در ممانعت از تکثیر باکتری در سکوم بیشتر مطرح بوده باشد و پروبیوتیک در این ارتباط نقش ضعیف‌تری داشته است (۸).

مطابق بررسی Methner و همکاران در سال ۱۹۹۵ مصرف دوزهای بالاتر آنتی ژن در چالش خوراکی مشابه حالت طبیعی ایجاد عفونت در پرنده نخواهد بود، به ویژه اینکه عفونت زایی در بافت‌های مختلف هم در جوجه‌های جوان و هم در مرغ‌ها با چالش دوزهای خیلی پایین‌تر نیز گزارش شده است (۱۵). لذا بر این اساس، ما در این تحقیق دوز متوسط چالش را در نظر گرفتیم.

در گروه S، بالاترین سطح عفونت در ارگان‌ها تا ۱۴ روز پس از چالش باکتری بوده است. در مطالعه Methner در سال ۱۹۹۵ بیشترین سطح آلودگی در کبد و طحال ۷ روز پس از چالش (۱۵) و مطابق آزمایش Bjerrum و همکاران در سال ۲۰۰۳ حدود ۳-۲ روز پس از چالش بوده است (۴). به استناد نتایج بسیاری از محققان، پاک‌سازی اندام‌ها از سالمونلا بیشتر به سن پرنده به هنگام چالش بستگی دارد تا به زمان سپری شده از چالش و میزان عفونت ایجاد شده و تهاجم باکتری به اندام‌های داخلی علاوه بر دوز چالش شده و سن پرنده، تحت تأثیر بسیاری از فاکتورها از قبیل تیپ فاز سرو تیپ مورد نظر و سویه باکتری قرار دارد، اما در بررسی ما فقط یک سویه خاص از باکتری و یک سن معین (۷ روزگی) در جوجه‌های گوشتی جهت چالش با باکتری در نظر گرفته شد، لذا انجام آزمایشات تکمیلی، جهت بررسی فاکتورهای مذکور، از جمله سنین مختلف چالش در جوجه‌ها، دوزهای مختلف چالش باکتری، پیشنهاد می‌شود. همچنین، مطابق بررسی‌های Bjerrum و همکاران در سال ۲۰۰۳ ایجاد عفونت ناشی از سالمونلا و ظهور نشانی‌های بالینی و بروز ضایعات هیستوپاتولوژیک به عوامل مختلفی از جمله بیماری زایی جرم، مقاومت و ایمنی میزبان، بهداشت محیط، مصرف بی‌رویه آنتی بیوتیک‌ها و تغییر فلور طبیعی روده بستگی دارد (۴).

بررسی‌های Baba و همکاران در سال ۱۹۹۱ در ارتباط با چالش خوراکی جوجه‌های گوشتی با سالمونلا انتریتیدیس نشان داد که در مقایسه با سکوم که در آن باکتری در مدت زمان زیادی قابل جداسازی است، در ایلئوم زمان عبور باکتری خیلی سریع‌تر است و تنها با پیش‌غنی‌سازی محتویات ایلئوم موفق به جداسازی باکتری شدند (۲) و در آزمایش ما هم تقریباً عفونت بسیار کمی در ایلئوم مشاهده شد.

**عملکرد جوجه‌های گوشتی:** در مقاله‌های مختلف مورد مطالعه توسط نگارنده، در اکثر موارد تأثیر توأم پروبیوتیک و آنتی بادی اختصاصی سالمونلا، بر تکثیر و کلونیزه شدن باکتری در سکوم و تهاجم آن به اندام‌های داخلی بر اساس دوزهای مختلف چالشی و در سن‌های مختلف، مورد بررسی قرار گرفته و در این ارتباط میزان مرگ و میر و علائم کلینیکی عفونت نیز مد نظر بوده است، اما در کمتر مواردی بحث عملکرد پرنده مطرح شده است و در اکثر موارد هم نتایج ضد و نقیض بوده‌اند، زیرا فاکتورهای مدیریتی و محیطی



- and humoral immune response. *Brit Poultry Sci.* 42: 456-461.
4. Bjerrum, L., Engberg, R. M., pedersen, K. (2003) Infection models for *Salmonella typhimurium* DT110 in Day-old and 14-Day-old broiler chickens, kept in isolators. *Avian Dis.* 47: 1474-1480.
  5. Bolder, N. M., Janss, L. L. G., Putirulan, F. F., Wagenaar, J. A. (2002) Resistance of broiler outbred lines to infection with *Salmonella enteritidis*. *Avian Pathol.* 31: 581-591.
  6. Carlander, D. (2002) Avian IgY antibody, in vitro and in vivo. *Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine. Acata Universitatis Upsaliensis.* Uppsala Sweden.
  7. Clancy, R. (2003) Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol Med Mic.* 38: 9-12.
  8. Corrier, D. E., Nisbet, D. J., Scanlan, C. M., Deloach, J. R. (1995) Control of *salmonella typhimurium* colonization in broiler chicks with a continuous-flow characterized mined culture of cecal bacteria. *Poultry Sci.* 74:916-924.
  9. Fuller, R. (1989) Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 66:365-378.
  10. Fulton, R. M., Nersessian, B. N., Reed, W. M. (2002) Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken Egg-Derived Antibody alone or in combination with probiotics. *Poultry Sic.* 81: 34-40.
  11. Gurtler, M., Methner, U., Fehlhaber, K. (2004) Growth of *Salmonella enteritidis* in Yolk from eggs laid by immunized hens. *Int. J. Food Mic.* 90: 107-113
  12. Heres, L., Wagenaar, J. A., Knapen, F. V. , Bert, A. P. (2003) Passage of *Salmonella* through the crop and gizzard of broiler chickens fed with fermented liquid feed. *Avian Pathol.* 32: 173-181.
  13. Kruger, C. (2004) Passive immunization against oral pathogens. From the division of clinical immunology at the department of laboratory medicine and center for oral biology at NOVUM, Institute of odontology. Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden.
  14. Larsson, A. (2003) *Salmonella*. *Int Poultry Prod.* 10: 23-25.
  15. Methner, U., Koch, H., Meyer, H. (1995) Model for experimental efficacy testing of control measures against *Salmonella* infections in Poultry. *Avian Dis.* 35: 809-819.
  16. Morishita, T. Y., Lam, K. M., Mccapes, R. H. (1992) The microbiological ecology of the turkey jejunum. *Vet. Methods.* 14:233-240.
  17. Patterson, J. A., Burkholder, K. M. (2003) Application of prebiotics and probiotics in poultry production. *Poultry Sci.* 82: 627-631.
  18. Polson, A. (1990) Isolation of IgY from the Yolks of eggs by a chloroform polyethylene glycol procedure. *Immunol. Invest.* 19: 253-258.
  19. Rahimi, Sh., Khaksefidi, A., Mousavi, T. (2003) Effect of probiotic and antibiotic on immune system of broilers. *J. Fac. Vet. Med. Univ. Tehran.* 58: 1-4.
  20. Sim, J. S., Lee, E. N., Sunwoo H. H., Manninen, K. (2001) IgY Technology : Egg antibodies for food production. Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, and Animal Health Laboratory, Alberta Agriculture, Edmonton, AB, Canada.
  21. Tellez, G., petrone, V. M., Escorcía, M., Morishita, T. Y., Cobb, C. W. and Villasenor, L. (2001) Evaluation of avian - specific probiotic and *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium* and *Salmonella heidelberg*- specific antibodies on cecal colonization and organ invasion of *Salmonella enteritidis* in broiler. *J Food Protect.* 64: 287-291.
  22. Zahraei Salehi, T. (1999) *Salmonella*. Tehran University Publications. p.9-120.



# THE EFFECT OF EGG DERIVED SPECIFIC ANTIBODY AND PROBIOTIC ON PREVENTION OF *SALMONELLA ENTERITIDIS* INFECTION IN BROILER CHICKENS

Moghaddam Shiraz, Z.<sup>1</sup>, Rahimi, Sh.<sup>1\*</sup>, Zahraei Salehi, T.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Poultry Science, College of Agriculture, Tarbiat Modarres University, Tehran- Iran.

<sup>2</sup>Department of Microbiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran- Iran.

(Received 5 April 2006, Accepted 19 January 2008)

## Abstract:

To evaluate the effect of probiotic (Primalac) and *Salmonella enteritidis*-specific IgY on prevention of *Salmonella enteritidis* infection in broiler chickens, four 33 week-old Single Comb White Leghorn hens were hyperimmunized with *Salmonella enteritidis* (SE) whole cell antigens obtained by ultrasonication and administered at a protein concentration of 500 µg/ml after centrifugation. Primary immunization was performed with 250µg of the antigen prepared in equal volume of Freund's complete adjuvant and saline. Booster injections were done each 14 days for twice, using incomplete Freund's adjuvant. Bleedings were performed 20 days after first injection and eggs were collected. The presence of anti-Salmonella antibody IgY and IgG in egg yolk and serum respectively, was monitored by ELISA, during the immunization period. Body weight, feed intake and feed conversion were determined. Then two hundred forty male "Ross" day-old chicks were randomly assigned to 8 groups and 3 replications of 10 birds were grown for 56 days of experiment. Eight experimental groups identified with, S, P, A, SP, SA, AP, SPA, C. Four birds from four challenged groups (S), were orally inoculated with 0.5 ml of *S. enteritidis* that contained  $1 \times 10^6$  cfu / ml on day 7. The groups that supplemented with antibody (A), received 15 ml of yolk contained antibody (1.5 ml/bird/day), from day 1 to end of the experiment. The probiotic treated groups (P) were received probiotic, 0.1% of feed and 0.5% of feed, during 1-21 and 22-56 days of experimental period respectively. One group as control (C) did not receive any treatment of probiotic and antibody. The test was completely randomized designed. In this project the SAS statistical program for parameter data and  $\chi^2$  test for non-parameter data. The results indicated that high titer polyclonal antibody may be obtained 20 days and 55 days after first immunization, in serum and egg yolk respectively. A-treated, P-treated and A-P treated groups had significantly lower fecal shedding ( $P < 0.01$ ). The antibody alone and A-P treated groups had a significantly lower concentration of SE cecal colonization. Antibody alone and A-P treated groups had a lower isolation of SE from the liver, spleen and ileum. There were no significant differences ( $P > 0.05$ ) in the mean body weight, mean daily feed intake, feed conversion ratio and mortality rate among the experimental groups at any period of experiment, but in the A-, P-, and A-P treated groups, daily weight gain significantly increased during finisher period and at day 49 ( $p < 0.05$ ).

**Key words:** IgY, IgG, *Salmonella enteritidis*, ELISA, Probiotic.

\*Corresponding author's email: rahimi\_s@modares.ac.ir, Tel: 021-44194911-4, Fax: 021-44196524

