مقایسه‌ی اثر پروبیوتیک پریمالاک، پری‌بیوتیک فرماکتو و آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین بر کاهش کلنیزه شدن باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* در یک مدل آزمایشی از بیماری تورم نکروتیک روده در جوجه‌های گوشتی

حسن حسینیان‌بیلندی[۱*]، شعبان رحیمی[۲]، جواد دباغ کاخکی[۳]، احمدرضا جباری[۴] و علی حق‌روستا[۴]

تاریخ دریافت: ۹۲/۸/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۳/۳/۲۰

چکیده

این آزمایش به منظور مقایسه‌ی اثر پروبیوتیک، پری‌بیوتیک و آنتی‌بیوتیک محرک رشد و ویرجینیامایسین بر کاهش کلنیزه شدن باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* در ارتباط با بیماری تورم نکروتیک روده در جوجه‌های گوشتی، طراحی گردید. تعداد ۲۲۵ قطعه جوجه‌ی گوشتی نر یک روزه، از سویه‌ی کاب ۵۰۰، در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار، ۳ تکرار و ۱۵ قطعه جوجه‌ی گوشتی در هر واحد آزمایشی، مورد مطالعه قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل: شاهد منفی، شاهد مثبت، پروبیوتیک با نام تجاری پریمالاک، پری‌بیوتیک با نام تجاری فرماکتو و آنتی‌بیوتیک با نام تجاری ویرجینیامایسین بودند. جهت ایجاد مدل آزمایشی از بیماری، در سن ۱۴ روزگی به همه‌ی گروه‌ها به جز شاهد منفی، ۱۰ برابر دوز استاندارد واکسن کوکسیدیوز خورانده شد و در سنین ۱۸، ۱۹ و ۲۰ روزگی، با سویه‌ی بیماری‌زای باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* تیپ A، چالش یافتند. بر اساس نتایج به دست آمده، پری‌بیوتیک فرماکتو به صورت معنی‌داری جمعیت باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* را در روده‌ی جوجه‌های گوشتی کاهش داد. در بین تیمارهای آلوده، بیش‌ترین میزان دفع اُاُسیست در تیمار شاهد مثبت و کم‌ترین آن در تیمار پری‌بیوتیک مشاهده شد. تیمار آنتی‌بیوتیک به صورت معنی‌داری جمعیت باکتری‌های اسید لاکتیک را کاهش داد.

کلمات کلیدی: *کلستریدیوم پرفرنژنس*، پروبیوتیک، پری‌بیوتیک، آنتی‌بیوتیک

مقدمه

بیماری تورم نکروتیک روده (NE) یکی از شایع‌ترین ناهنجاری‌های گوارشی در ماکیان و بوقلمون است که خسارت اقتصادی ناشی از آن با توجه به انتشار جهانی و حضور تقریباً دائمی آن در مزارع پرورش طیور بسیار قابل توجه می‌باشد. بیش‌ترین شیوع این بیماری در طیور گوشتی، در سن ۲۰ تا ۲۵ روزگی که شرایط بی‌هوازی مناسبی جهت تکثیر کلستریدیوم‌ها در روده فراهم است، مشاهده می‌گردد (Watkins et al. 1997). بیماری NE در اثر کلنیزه شدن تیپ A و C *کلستریدیوم پرفرنژنس* (CP) و مهاجرت آن از روده‌ی بزرگ و سکوم به روده‌ی باریک صورت می‌گیرد (Timbermont et al. 2009). این باکتری در دستگاه گوارش پرندگان، حیوانات و انسان، بخشی از فلور طبیعی روده محسوب می‌گردد (Zhou et al. 2009). CP باسیلی گرم مثبت، بسیار مقاوم، اسپورزا، بی‌هوازی اجباری، زهراگین و کاتالاز منفی می‌باشد (Dahiya et al. 2005). تیپ A *کلستریدیوم پرفرنژنس* آلفا توکسینی به نام فسفولیپاز C تولید می‌کند که طیور در مقابل آن ۱۰ برابر بیش‌تر از پستانداران حساسیت نشان می‌دهند

[۱*] دانشجوی دکترا، گروه علوم دامی، دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه بیرجند E-mail: Hasanhosenyan@gmail.com (نویسنده‌ی مسئول)

[۲] استاد گروه پرورش و تولید طیور، دانشکده‌ی کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

[۳] مربی گروه دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی گناباد

[۴] استادیار گروه میکروبیولوژی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج

1- Necrotic enteritis

(McDonel 1980). آلفاتوکسین یک متالوآنزیم حاوی روی، فسفولیپاز C و اسفنگومیلین می‌باشد که باعث هیدرولیز فسفولیپیدها و تخریب غشای سلول‌ها می‌گردد (Watkins et al. 1997). این زهرابه بیش‌ترین تأثیر را روی فسفولیپیدهای اسفنگومیلین و فسفاتیدیل کولین دارد (Olkowski et al. 2008). آلفاتوکسین به عنوان یک عامل زهراگین، عامل اصلی پیدایش عوارض و جراحات ناشی از بیماری NE در پرندگان محسوب می‌گردد (Olkowski et al. 2008). بروز جراحت در بافت پوششی روده و مزاحمت‌های انگلی دستگاه گوارش، دلیل اصلی بروز و توسعه‌ی بیماری در گله‌های طیور گوشتی به شمار می‌روند. تداخل این بیماری با کوکسیدیوز با تلفات بالایی همراه است و ممکن است در مجموع ۳۰ درصد گله در اثر تلفات حذف شوند (Zhou et al. 2009). به طور کلی کنترل بیماری‌های گوارشی متکی بر مصرف آنتی‌بیوتیک‌ها و داروهای ضدکوکسیدیایی است که از سال ۱۹۴۰ به صنعت پرورش طیور وارد شده‌اند، اما به دلیل بروز مقاومت آنتی‌بیوتیکی و میکروبی، استفاده از این ترکیبات در سراسر جهان با محدودیت‌هایی مواجه است. تشکیل شدن یک میکروفلور طبیعی در ابتدای خروج جوجه‌ها از تخم، می‌تواند به صورت مؤثری از تکثیر برخی پاتوژن‌های روده از قبیل *سالمونلاها*، *کلستریدیوم-ها*، *کمپیلوباکترها* و سویه‌های بیماری‌زای *ای‌کولای* جلوگیری نماید (Mead 2000). بین میکروفلور دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی و جمعیت باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* رقابت وجود دارد و استقرار یک میکروفلور مفید در دستگاه گوارش، جمعیت باکتری CP را محدود نموده و مقاومت پرندگان در برابر بیماری NE را افزایش می‌دهد (La Ragione and Woodward 2003). پری بیوتیک‌ها اجزاء غذایی غیر قابل هضم هستند که با تحریک انتخابی رشد یا فعالیت باکتری‌های مفید در میکروفلور روده، روی میزبان تأثیر مثبت می‌گذارند (Gibson and Roberfroid 1995). پری‌بیوتیک‌ها از طریق گیرنده‌های سطحی خود به عوامل بیماری‌زا متصل می‌شوند و از کلنیزه شدن و اتصال باکتری‌ها به دیواره‌ی روده جلوگیری می‌کنند (Spring et al. 2000). هم‌چنین می‌توانند منجر به تولید روده‌ای اسید لاکتیک، افزایش در تولید اسیدهای چرب کوتاه زنجیر و کاهش pH روده‌ی بزرگ گشته که به تغییر و بهبود میکروفلور روده‌ی طیور کمک می‌کند (Chung and Day 2004). در این تحقیق، تأثیر پروبیوتیک پریمالاک، پری‌بیوتیک فرماکتو و آنتی-بیوتیک ویرجینیامایسین بر کاهش میزان کلنیزه شدن باکتری CP در ارتباط با بیماری NE در جوجه‌های گوشتی بررسی گردید.

مواد و روش کار

گروه‌های آزمایشی

تعداد ۲۲۵ قطعه جوجه‌ی گوشتی نر سویه‌ی کاب-۵۰۰، در قالب طرح کاملاً تصادفی، در ۵ گروه آزمایشی با ۳ تکرار و ۱۵ قطعه جوجه در هر واحد آزمایشی مورد مطالعه قرار گرفتند. جوجه‌ها روی بستری از کاه و پوشال، داخل پن‌های استاندارد به ابعاد ۲m×۱ تا سن ۴۲ روزگی پرورش یافتند و در تمام طول دوره‌ی آزمایش از رژیم نوری ۲۴ ساعته استفاده نمودند. گروه‌های اول و دوم به ترتیب، به عنوان شاهد منفی (غیرآلوده) و شاهد مثبت (آلوده)، از جیره‌ای بر پایه‌ی ذرت و سویا، فرموله شده برای جوجه‌های گوشتی، بدون هیچ افزودنی غذایی تغذیه شدند (جدول ۱). گروه‌های سوم، چهارم و پنجم به ترتیب با جیره‌ی پایه حاوی ۰/۱ درصد پروبیوتیک پریمالاک (Primalac® محصول شرکت Star Labs امریکا، حاوی $۲/۵\times۱۰^{۷}$ Cfu/g از انواع باکتری‌های لاکتوباسیل، استرپتوکوکوس و بیفیدوباکتریوم)، ۰/۱ درصد پری‌بیوتیک فرماکتو (Fermacto® محصول شرکت Pet Ag آمریکا، حاوی ۱۲ درصد پروتئین خام، ۱/۱ درصد چربی، ۴۵ درصد فیبر و ۲ درصد خاکستر) و ۰/۰۲ درصد آنتی-بیوتیک ویرجینیامایسین (Virginiamycin® محصول شرکت تولید داروهای دامی ایران، یک پپتید مرکب از خانواده‌ی Sterptogramin، که توسط سویه‌ی *Sterptomyces virginia* تولید می‌شود) تغذیه شدند.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی محاسبه شده جیره‌ی پایه

ماده‌ی مغذی	جیره‌ی آغازی (۱۴- ۱ روزگی)	جیره‌ی رشد (۲۸-۱۴ روزگی)	جیره‌ی پایانی (۴۲-۲۸ روزگی)
انرژی (kcal/kg)	۲۹۰۰	۲۹۵۰	۳۰۰۰
پروتئین (٪)	۲۱	۱۸/۵	۱۷/۵
متیونین (٪)	۰/۵۴	۰/۵۲	۰/۵۱
متیونین + سیستئین (٪)	۰/۹۱	۰/۸۷	۰/۸۳
لایزین (٪)	۱/۲۱	۱/۱۰	۱
فسفر قابل دسترس (٪)	۰/۴۷	۰/۴۴	۰/۴۳
کلسیم (٪)	۱	۰/۹	۰/۹
سدیم (٪)	۰/۱۶	۰/۱۶	۰/۱۶

چالش گروه‌های آزمایشی

به منظور ایجاد جراحت در روده و فراهم شدن وضعیت مساعد برای بروز بیماری NE، در ۱۴ روزگی تمام جوجه‌ها به استثنا گروه شاهد منفی، ۱۰ برابر دوز استاندارد واکسن کوکسیدیوز (Livacox T®، حاوی ۳۰۰۰۰ تا ۵۰۰۰۰ اُاُسیست از هر یک از گونه‌های *E. tenella*، *E. maxima* و *E. acervulina*) دریافت کردند (Gholamiandehkordi et al. 2007). جهت ایجاد بیماری NE، در سنین ۱۸، ۱۹ و ۲۰ روزگی، جوجه‌های مزبور با ۱ میلی‌لیتر کشت مایع CP با رقت 10^{8} cfu/mL (که از گروه بیماری‌های طیور دانشگاه تهران تهیه گردید و رقت مورد نظر از باکتری، از طریق مقایسه با کدورت لوله‌های استاندارد مک‌فارلند در مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انجام شد) به روش تلقیح داخل چینه‌دان، چالش شدند. جوجه‌های گروه کنترل منفی نیز با ۱میلی‌لیتر از محیط کشت باکتری (BHI استریل) تلقیح شدند تا شرایط محیطی برای تمام تیمارها یکسان باشد. پن‌های مربوط به گروه کنترل منفی برای پیش‌گیری از آلودگی میکروبی در سالن مجزا و در وضعیت پرورشی کاملاً مشابه نگهداری گردیدند.

نمونه‌برداری

در ۲۱ و ۴۲ روزگی نمونه‌گیری از محتویات سکوم و در روزهای ۲۸ و ۳۵ نمونه‌های مدفوع پرنده جمع‌آوری و جهت شمارش جمعیت باکتری CP به آزمایشگاه منتقل شد. در سنین ۲۲، ۲۴ و ۲۶ روزگی، از مدفوع پرندگان جهت تعیین تعداد اُاُسیست نمونه‌گیری شد. هم‌چنین در سن ۴۲ روزگی جهت بررسی جمعت کل باکتری‌های هوازی، اسیدلاکتیک و *کلی‌باسیل*، سه پرنده از هر گروه آزمایشی کشتار و از محتویات سکوم پرنده‌ها نمونه‌گیری انجام شد.

شمارش باکتری

جهت شمارش باکتری CP، با استفاده از محلول بافر فسفات (PBS) از یک گرم نمونه رقت‌های متوالی 10^{-1}، 10^{-2} تا 10^{-6} تهیه شد. از رقت‌های 10^{-4}، 10^{-5} و 10^{-6} هر کدام مقدار ۱۰۰ میکرولیتر به محیط کشت اختصاصی باکتری CP، Tryptose Sulfite Cycloserine (TSC) Agar منتقل گردید (Hauschild and Hilsheimer 1974). نمونه‌ها ۲۴ ساعت داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط بی‌هوازی قرار گرفتند. جهت بررسی جمعیت کل باکتری‌های هوازی، اسیدلاکتیک و

کلی‌باسیل به ترتیب از محیط‌های کشت Brain Heart Infusion (BHI) Agar، Man, Rogosa and Sharpe (MRS) Agar و Mac Conkey (MAC) استفاده شد.

شمارش اُاُسیست

جداسازی اُاُسیست‌ها از نمونه‌ی مدفوع با توجه به اختلاف چگالی آن نسبت به آب مقطر و محلول آب نمک اشباع، به روش شناورسازی انجام شد (Ryley et al. 1976).

آنالیز آماری

کلیه‌ی اطلاعات به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۵ تیمار و ۳ تکرار، با استفاده از نرم‌افزار SAS و به روش GLM آنالیز شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه گردیدند.

نتایج

جمعیت باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس*

نتایج مربوط به لگاریتم تعداد باکتری دفع شده که در جدول ۲ ارائه شده است، نشان می‌دهد که تلقیح باکتری CP در ایجاد آلودگی تجربی، موفقیت‌آمیز بوده است و دفع باکتری CP در گروه‌های چالش شده افزایش معنی‌داری نسبت به گروه شاهد منفی نشان می‌دهد. تغذیه‌ی جوجه‌های گوشتی با پری‌بیوتیک فرماکتو به صورت معنی‌داری جمعیت باکتری CP دفعی را کاهش داد اما تأثیر پروبیوتیک پریمالاک در کاهش کلنیزه شدن باکتری CP فقط در ۴۲ روزگی معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در ۴۲ روزگی تیمارهای آنتی‌بیوتیک، پروبیوتیک و پری‌بیوتیک نسبت به تیمار شاهد مثبت، به ترتیب ۲۱، ۳۱ و ۳۴ درصد جمعیت باکتری CP را در محتویات سکوم کاهش دادند.

جدول ۲: تأثیر پری‌بیوتیک، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس* بر جمعیت این باکتری در نمونه‌ی مدفوع و سکوم (Log_{10} CFU/g)

	گروه‌های آزمایشی					
دوره	آنتی‌بیوتیک	پروبیوتیک	پری‌بیوتیک	شاهد مثبت	شاهد منفی	SEM
روز ۲۱	^{b}۶/۷۱	^{a}۷/۳۱	^{a}۷/۲۴	^{a}۷/۲۸	^{c}۳/۵۶	۰/۲۶
روز ۲۸	^{ab}۶/۶۹	^{ab}۶/۵۴	^{b}۶/۱۸	^{a}۷/۰۹	^{c}۳/۸۲	۰/۳۸
روز ۳۵	^{ab}۶/۱۵	^{ab}۶/۱۲	^{b}۵/۳۸	^{a}۷/۶۹	^{c}۳/۰۵	۰/۶۳
روز ۴۲	^{b}۵/۹۶	^{bc}۵/۱۵	^{c}۴/۹۳	^{a}۷/۵۵	^{d}۳/۴۲	۰/۵۱

^{abcd} میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر سطر برای اثر تیمار اختلاف معنی‌دار دارند ($p<۰/۰۵$).

آنتی‌بیوتیک: گروه تغذیه شده با جیره‌ی پایه حاوی ۰/۰۲ درصد آنتی‌بیوتیک ویرجینیامایسین و چالش یافته با باکتری CP

پروبیوتیک: گروه تغذیه شده با جیره‌ی پایه حاوی ۰/۱ درصد پروبیوتیک پریمالاک و چالش یافته با باکتری CP

پری‌بیوتیک: گروه تغذیه شده با جیره‌ی پایه حاوی ۰/۱ درصد پری‌بیوتیک فرماکتو و چالش یافته با باکتری CP

شاهد مثبت: گروه تغذیه شده با جیره‌ی پایه فاقد افزودنی و چالش یافته با باکتری CP

شاهد منفی: گروه تغذیه شده با جیره‌ی پایه فاقد افزودنی و غیرآلوده

میزان دفع اُاُسیست (OPG)

با توجه به جدول ۳ در تمام طول مدت نمونه‌برداری از مدفوع، بیش‌ترین تعداد اُاُسیست دفع شده مربوط به گروه شاهد آلوده بود و در مدفوع گروه شاهد منفی هیچ‌گونه اُاُسیستی مشاهده نشد. تیمار ویرجینیامایسین

کم‌ترین میزان دفع اُاُسیست را در بین تیمارهای آلوده داشت. تیمار پروبیوتیک در مجموع تأثیر معنی‌داری بر کاهش OPG نداشت، اما پری‌بیوتیک فرماکتو ۱۰ روز پس از چالش در مقایسه با گروه شاهد مثبت، باعث کاهش OPG مدفوع گردید (p<۰/۰۵).

جدول ۳: تأثیر پری‌بیوتیک، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس*، بر میزان دفع اُاُسیست در نمونه مدفوع (Log_{10} CFU/g)

	گروه‌های آزمایشی					
دوره	آنتی‌بیوتیک	پروبیوتیک	پری‌بیوتیک	شاهد مثبت	شاهد منفی	SEM
۲۲ روزگی	^{b}۲/۱۷	^{ab}۲/۵۵	^{ab}۲/۵۷	^{a}۲/۹۱	^{c}۰	۰/۳۵
۲۴روزگی	^{ab}۲/۶۱	^{ab}۲/۷۴	^{b}۲/۴۸	^{a}۳/۱۱	^{c}۰	۰/۳۹
۲۶روزگی	^{ab}۲/۵۷	^{a}۳/۰۶	^{b}۲/۴۱	^{a}۳/۱۴	^{c}۰	۰/۴۳

^{abc} میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر سطر برای اثر تیمار اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

گروه‌های آزمایشی: مطابق با جدول ۲

جمعیت باکتری‌های هوازی، اسید لاکتیک و *کلی‌باسیل*

با توجه به لگاریتم تعداد باکتری‌های دفع شده که در جدول ۴ ارائه شده است، تیمارهای آزمایشی تأثیر معنی‌داری بر جمعیت باکتری‌های هوازی سکوم نداشتند (p>۰/۰۵). تیمار پروبیوتیک بیش‌ترین جمعیت باکتری اسید لاکتیک را در محتویات سکوم نشان داد و این تفاوت در مقایسه با تیمار آنتی‌بیوتیک معنی‌دار بود (p<۰/۰۵). از نظر جمعیت *کلی‌باسیل‌ها* در سکوم، بین تیمار شاهد منفی با تمام تیمارهای آلوده تفاوت معنی‌داری مشاهده شد (p<۰/۰۵)، اما این تفاوت بین تیمارهای آلوده معنی‌دار نبود.

جدول ۴: تأثیر پری‌بیوتیک، پروبیوتیک و آنتی‌بیوتیک در جیره‌ی جوجه‌های گوشتی چالش یافته با باکتری *کلستریدیوم پرفرنژنس*، بر جمعیت میکروبی سکوم (Log_{10} CFU/g)

	گروه‌های آزمایشی					
جمعیت میکروبی	آنتی‌بیوتیک	پروبیوتیک	پری‌بیوتیک	شاهد مثبت	شاهد منفی	SEM
اسید لاکتیک	^{b}۶/۲۳	^{a}۷/۸۵	^{ab}۶/۵۹	^{ab}۶/۶۱	^{ab}۶/۸۲	۰/۵۲
هوازی	۷/۵۸	۸/۱۴	۸/۲۱	۸/۱۷	۸/۲۸	۰/۶۳
کلی‌باسیل	^{b}۶/۲۸	^{b}۶/۴۱	^{b}۶/۷۶	^{b}۶/۴۳	^{a}۷/۸۶	۰/۴۶

^{ab} میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک در هر سطر برای اثر تیمار اختلاف معنی‌دار دارند (p<۰/۰۵).

گروه‌های آزمایشی: مطابق با جدول ۲

بحث

در این آزمایش، پری‌بیوتیک فرماکتو بیش‌ترین تأثیر را بر کاهش جمعیت باکتری CP دفعی داشت و پروبیوتیک پریمالاک در ۴۲ روزگی تأثیر معنی‌داری در کاهش جمعیت این باکتری در مقایسه با تیمار شاهد مثبت، نشان داد. Hofacre و همکاران در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند، مانان‌الیگوساکاریدها و فروکتوالیگوساکاریدها در کاهش جمعیت باکتری CP در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی مؤثر هستند. Bello و همکاران در سال ۲۰۰۱ با

تحقیق روی محیط کشت باکتری CP، هم‌چنین McBain و MacFarl در سال ۲۰۰۱ با کشت باکتری از نمونه‌ی روده‌ی انسانی نتیجه گرفتند که پری‌بیوتیک فروکتوالیگوساکارید، رشد باکتری CP را محدود می‌کند. Kaldhusdal و همکاران در سال ۲۰۰۱ دریافتند که فراهم نمودن یک میکروفلور مطلوب در نخستین روزهای پرورش جوجه‌های گوشتی از کلنیزه شدن CP و شیوع بیماری NE جلوگیری نموده و بازده گله را افزایش می‌دهد. تحقیقات آزمایشگاهی روی انسان و موش نشان داده‌اند که *لاکتوباسیلوس‌ها* باعث کاهش جمعیت باکتری CP در دستگاه گوارش می‌گردند (Mahony et al. 2001). La Ragione و Woodward در سال ۲۰۰۳ گزارش دادند، در جوجه‌های گوشتی که در سن ۱ و ۲۰ روزگی با $۱۰^{۹}$ اسپور از *باسیلوس سابتیلیس* تلقیح شده و یک روز بعد با $۱۰^{۵}$cfu/mL *کلستریدیوم پرفرنژنس* چالش می‌شوند، کلنیزه شدن باکتری CP کاملاً متوقف می‌شود. در مقابل Craven و همکاران در سال ۱۹۹۹ تأثیر پروبیوتیک‌ها را در کنترل و پیش‌گیری از بیماری NE، غیر معنی‌دار گزارش کردند. Taheri و همکاران در سال ۲۰۱۰ گزارش دادند در نتیجه عمل پروبیوتیک‌ها جمعیت باکتری‌های مفید مانند *لاکتوباسیلوس‌ها*، *کلی‌فرم‌ها* و *بیفیدوباکترها* افزایش می‌یابد و pH دستگاه گوارش به دلیل افزایش تولید اسیدهای چرب فرار پایین می‌آید. کاهش pH، رشد پاتوژن‌ها را در روده محدود می‌کند. Hofacre و همکاران در سال ۲۰۰۳ مشاهده نمودند، میزان تلفات در یک مدل آزمایشی از بیماری تورم نکروتیک روده به میزان ۳۰ تا ۶۰ درصد در جوجه‌هایی که از سن یک روزگی باکتری اسید لاکتیک دریافت می‌نمایند، پایین‌تر است. آن‌ها هم‌چنین مشاهده نمودند میزان تولید آلفاتوکسین توسط باکتری CP به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. Falaki و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر پری‌بیوتیک فرماکتو و پروبیوتیک پریمالاک را بر فلور میکروبی دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی بررسی و مشاهده نمودند، پریمالاک به صورت معنی‌داری جمعیت *لاکتوباسیلوس‌ها* را در ایلئوم و سکوم افزایش می‌دهد. آن‌ها هم‌چنین گزارش دادند، تیمار فرماکتو (۲۰۰۰ گرم بر تن) و پریمالاک (۹۰۰ گرم بر تن) باعث کاهش معنی‌دار *کلی‌باسیل‌ها* در ایلئوم می‌گردد. هم‌چنین Taheri و همکاران در سال ۲۰۱۰ تأثیر پروبیوتیک‌ها بر کاهش جمعیت *کلی‌باسیل‌ها* در دستگاه گوارش جوجه‌های گوشتی را مثبت گزارش نمودند. در تحقیق حاضر تیمار با عامل بیماری NE در مقایسه با تیمار شاهد منفی، به صورت معنی‌داری باعث کاهش جمعیت *کلی‌باسیل‌ها* در سکوم گردید. به نظر می‌رسد باکتری CP، اثر ممانعت‌کننده بر جمعیت *کلی‌باسیل‌ها* داشته است.

ایمریا انگلی داخل سلولی است و به منظور تکثیر باید به سلول‌های میزبان حمله کند، لذا برای این کار ابتدا باید به سطوح اپیتلیال بچسبد. باکتری‌های پروبیوتیک سازگار یافته با روده ممکن است جهت چسبیدن به مخاط روده با ایمریاها رقابت کنند و گیرنده‌های موجود در سلول‌های اپیتلیال روده را اشغال کنند که این کار باعث تعویق در نفوذ و ترشح اسپوروزوئیت‌های *ایمریا* به مخاط روده می‌شود، در نتیجه تکثیر و انتشار اُاُسیست‌ها کاهش می‌یابد (Dalloul et al. 2003). Dalloul و همکاران در سال ۲۰۰۵ در مطالعه‌ای مشاهده نمودند که افزودن پریمالاک به مقدار یک کیلو در تن به جیره‌ی جوجه‌های گوشتی، باعث کاهش دفع اُاُسیست در مدفوع به میزان ۱۴ درصد در آلودگی با ایمریا *آسرولینا* می‌گردد. Elmusharaf و همکاران در سال ۲۰۰۶ مشاهده کردند که مانان‌الیگوساکارید سبب کاهش تعداد مراحل غیرجنسی شیزونت‌ها در لامینا پروپریا در سکوم جوجه‌های گوشتی آلوده به *ایمریا تنلا* می‌شود. اثر محافظتی مانان الیگوساکارید ممکن است به علت افزایش در طول ویلی و بهبود یکنواختی پرزهای دستگاه گوارش باشد. در مجموع نتیجه‌گیری می‌شود اگرچه پروبیوتیک پریمالاک و پری‌بیوتیک فرماکتو، باعث کاهش OPG مدفوع می‌گردد ولی این تفاوت در تیمار پری‌بیوتیک، از نظر آماری معنی‌دار است.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس به جهت تأمین اعتبار طرح تشکر می‌گردد. هم‌چنین از همکاری جناب آقای دکتر بهرام شجاع‌دوست، ریاست محترم مؤسسه‌ی تحقیقات واکسن و سرم‌سازی، رازی جناب آقای دکتر دلیمی، مدیرعامل محترم شرکت هزار طب تهران، جناب آقای دکتر جلالی و مدیریت محترم شرکت سبزدشت، سرکار خانم کاظمی تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Bello, F.D.; Walter, J.; Hertel, C. and Hammes, W.P. (2001). In vitro study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from *Lactobacilli* and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. Systematic and Applied Microbiology, 24: 232–237.

Chung, C.H. and Day, D.F. (2004). Efficacy of *Leuconostoc mesenteroides* (ATCC 13146) isomaltooligosaccharides as a poultry prebiotic. Poultry Science, 83: 1302–1306.

Craven, S.E.; Stern, N.J.; Cox, N.A.; Bailey, J.S. and Berrang, M. (1999). Cecal carriage of *Clostridium perfringens* in broiler chickens given mucosal starter culture. Avian Diseases, 43: 484-490.

Dahiya, J.P.; Wilkie, D.C.; Van Kessel, A.G. and Drew, M.D. (2005). Potential strategies for controlling necrotic enteritis in broiler chickens in post-antibiotic era. Animal Feed Science and Technology, 129: 60-88.

Dalloul, R.A.; Lillehoj, H.S.; Shellem, T.A. and Doerr, J.A. (2003). Enhanced mucosal immunity against *Eimeria acervulina* in broilers fed a *Lactobacillus* based probiotic. Poultry Science, 82: 62-66.

Dalloul, R.A.; Lillehoj, H.S.; Tamim, N.M.; Shellem, T.A. and Doerr, J.A. (2005). Induction of local protective immunity to *Eimeria acervulina* by a *Lactobacillus*-based probiotic. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, 28: 351-361.

Elmusharaf, M.A.; Bautista, V.; Nollet, L. and Beynen, A.C. (2006). Effect of a mannanoligosaccharide preparation on *Eimeria tenella* infection in broiler chickens. International Journal of Poultry Sciences, 5: 583-588.

Falaki, M.; Shams Shargh, B.; Dastar, S.; Zerehdaran, M. and Khomairi, M. (2010). The investigation of intestinal microflora and growth response of young broilers given feed supplemented with different levels of peobiotic and prebiotic. Journal of Animal and Veterinary Advances, 10: 2685-2690.

Gholamiandehkordi, A.R.; Timbermont, L.; Lanckriet, A.; Van Den Broeck, W.; Pedersen, K.; Dewulf, J. et al. (2007). Quantification of gut lesions in a subclinical necrotic enteritis model. Avian Pathology, 36: 375-382.

Gibson, G.R. and Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. Journal of Nutrition, 125: 1401–1412.

Hauschild, A.H.W. and Hilsheimer, R. (1974). Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. Applied Microbiology, 27: 78-82.

Hofacre, C.L.; Beacorn, T.; Collett, S. and Mathis, G. (2003). Using competitive exclusion, mannan-oligosaccharide and other intestinal products to control necrotic enteritis. Applied of Poultry Research, 12: 60–64.

Kaldhusdal, M.; Schneitz, C.; Hofshagen, M. and Skjerve, E. (2001). Reduced incidence of *Clostridium perfringens* associated lesions and improved performance in broiler chickens treated with normal intestinal bacteria from adult fowl. Avian Diseases, 45: 149-156.

La Ragione, R.M. and Woodward, M.J. (2003). Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. Veterinary Microbiology, 94: 245-256.

Mahony, O.L.; Feeney, M.; OHalloran, S.; Murphy, L.; Kiely, B.; Fitzgibbon, J. et al. (2001). Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumor development in IL-10 knockout mice. Alimentary Pharmacology and Therapeutics, 15: 1219-1225.

McBain, A.J. and MacFarlane, G.T. (2001). Modulation of genotoxic enzyme activities by non-digestible oligosaccharide metabolism in in-vitro human gut bacterial ecosystems. Medical Microbiology, 50: 833-842.

McDonel, J.L. (1980). *Clostridium perfringens* toxins (type A, B, C, D, E). Pharmacology and Therapeutics, 10: 617-655.

Mead, G.C. (2000). Prospects for competitive exclusion treatment to control salmonellas and other foodborne pathogens in poultry. Veterinary Journal, 159: 111-123.

Olkowski, A.A.; Wojnarowicz, C.; Chirino-Trejo, M.; Laarveld, B. and Sawicki, G. (2008). Sub-clinical necrotic enteritis in broiler chickens: Novel etiological consideration based on ultratructural and molecular changes in the intestinal tissue. Veterinary Science, 85: 543–553.

Ryley, J.F.; Meade, R.; Hazelhurst, J. and Robinson, T.E. (1976). Methods in Coccidiosis research, separation of oocyst from faeces. Parasitology, 73: 311- 326.

Spring, P.; Wenk, C.; Dawson, K.A. and Newman, K.E. (2000). The effects of dietary mannaoligosaccharides on cecal parameters and the concentrations of enteric bacteria in the ceca of *salmonella*-challenged broiler chicks. Poultry Science, 79: 205–211.

Taheri, H.R.; Moravej, H.; Malakzadegan1, A.; Tabandeh, F.; Zaghari, M.; Shivazad, M. and Adibmoradi, M. (2010). Efficacy of *Pediococcus acidlactici*-based probiotic on intestinal *Coliforms* and villus height, serum cholesterol level and performance of broiler chickens. African Journal of Biotechnology, 9: 7564-7567.

Timbermont, L.; Lanckriet, A.; Pasmans, F.; Haesebrouck, F.; Ducatelle, R. and Van Immerseel, F. (2009). Intra-species growth-inhibition by *Clostridium perfringens* is a possible virulence trait in necrotic enteritis in broilers. Veterinary Microbiology, 137: 388–391.

Watkins, K.L.; Shryock, T.R.; Dearth, R.N. and Saif, Y.M. (1997). In vitro antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* from commercial turkey and broiler chicken origin. Veterinary Microbiology, 54: 195-200.

Zhou, H.; Gong, J.; Brisbin, J.; Yu, H.; Sarson, A.J.; Si, W. et al. (2009). Transcriptional profiling analysis of host response to *Clostridium perfringens* infection in broilers. Poultry Science, 88: 1023–1032.

The effect of probiotic primalac, prebiotic fermact and antibiotic virginiamycin on reduction colonization *Clostridium perfringens* in necrotic enteritis challenge model of broilers

Hoseinyan Bilondi, S.H.[1]; Rahimi, S.[2]; Dabagh Kakhki, J.[3]; Jabari, A.[4] and Haghrusta, A.[4]

Received: 17.11.2013 Accepted: 10.06.2014

Abstract

This work was conducted to study the effect of probiotic, prebiotic and antibiotic on reducing colonization of *C. perfringens*, associated necrotic enteritis in broilers. In this experiment, 225 day-old male chicks (Cobb-500) were randomly distributed in 5 dietary groups of 3 replicates with 15 chicks/pen as follow: (i) negative control group; (ii) positive control group; (iii) probiotic primalac®; (iv) prebiotic fermacto®; (v) antibiotic virginiamycin®. On day 14, all birds were inoculated by 10 times the standard dose of coccidiosis vaccines except the negative control group. On 18, 19 and 20 days of age, the challenged birds were also gavaged by *C. perfringens* type A. The results of this study indicated significant reduction population of *C. perfringens* in the intestine of chickens due to the influence of dietary supplementation of prebiotic. Among the infected treatments, the highest OPG was observed in positive control group and prebiotic treatment had the lowest. Antibiotic treatment significantly reduced the population of *lactic acid* bacteria.

Key words: *Clostridium perfringens*, Antibiotic**,** Probiotic, Prebiotic

1- PhD Student, Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Birjand University, Birjand, Iran
2- Professor, Department of Poultry Science, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
3- Academic Staff, Department of Veterinary, Islamic Azad University, Gonabad-Iran
4- Assistant Professor, Department of Microbiology, Razi Vaccin and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Corresponding Author: Hoseinyan Bilondi, S.H., E-mail: Hasanhosenyan@gmail.com