

## UČINAK PROBIOTIKA NA IMUNOSNI ODGOVOR KOD PILIĆA U TOVU EFFECT OF PROBIOTICS ON IMMUNE RESPONSE IN BROILER CHICKS

**Aida Kavazović, Emina Rešidbegović, A. Gagić, Fahira Alibegović - Zečić, Ć. Crnkić, T. Goletić, Aida Kustura, Almira Softić**

Izvorni znanstveni članak - Original scientific paper  
Primitljeno - Received: 20.06.2011.

### SAŽETAK

Cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka komercijalnog (*Probios*<sup>®</sup>) i pokusnog (kultura *Lactobacillus acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka, inaktivirani pekarski kvasac, vitamin C i laktoza) probiotskog preparata putem vode za piće na imunosni odgovor protiv gumborske bolesti kod tovnih pilića. Istraživanja su provedena na 105 jednodnevnih pilića provenijence Cobb 500 podijeljenih u tri skupine (dvije pokusne i jedna kontrolna skupina). Probiotski tretman obje pokusne skupine pilića bio je prva tri dana života i trodnevno pri vakciniranju pilića protiv njukaslske i gumborske bolesti te infektivnog brohitisa (dan prije, na dan i dan nakon vakciniranja). Tijekom pokusa pilići su vakcinirani prema programu imunoprofilakse koji je načinjen u skladu s titrom kongenitalnih protutijela. Kontrolom imunosnog odgovora protiv gumborske bolesti kod pilića u dobi od 28 i 42 dana utvrđene su veće, odnosno značajno ( $p < 0,05$ ) veće srednje vrijednosti titra protutijela kod pilića pokusne P<sub>2</sub> odnosno P<sub>1</sub> skupine u usporedbi s vrijednostima kontrolne K skupine. Istovremeno, statistička značajnost razlika srednjih vrijednosti titra protutijela između pokusnih skupina nije utvrđena.

Ključne riječi: probiotici, brojlerski pilići, protutijela, imunosni odgovor

### UVOD

Stimulacija staničnog i humoralnog imuniteta važna je za zaštitu peradi od patogena u gastrointestinalnom traktu. Komenzalne bakterije u crijevima imaju značajnu ulogu u razvoju imunosnog odgovora i djeluju sa stanicama GALT-a od kojih su B-1 najvažnije. Ove su stanice uključene u proizvodnju prirodnih protutijela. Stoga se manipulacijom s crijevnom mikroflorom može utjecati na razvoj imunog odgovora.

Probiotski mikroorganizmi, uključujući mliječne bakterije, pozitivno utječu na sastav crijevne mikroflora. Stimuliraju proizvodnju sekretornih IgA, podržavaju ciljani prijenos luminalnih antigena do Pejerovih ploča i povećavaju proizvodnju gama interferona. Osim navedenog, mliječne bakterije sti-

muliraju aktivnost nespecifičnih i specifičnih imunoloških stanica, što ovisi od vrsta ili sojeva bakterija koje su najvjerojatnije određene razlikama u sastavu stanične stijenke.

Proizvodi stanične stijenke mogu imati kostimulirajuću ulogu u indukciji sustavnog imunosnog odgovora (Herich i Levkut, 2002).

Rezultati ispitivanja učinaka dodavanja *Lactobacillus* kulture i oksitetraciklina u hrani pilića izlaganih od 21. do 42. dana tova tri sata na 36 °C pokazuju da su pilići obje testirane provenijence i Hubard i Shaver koji su u obroku dobivali *Lactobacillus* kulture, uz ostvarenje boljih proizvodnih rezultata, imali značajno veći titar protutijela protiv njukaslske bolesti u odnosu na skupine tretirane oksitetraciklinom, odnosno kontrolne netretirane skupine (Zulkipli i sur., 2000). Haghghi i sur. (2005) su ustanovili

dr. sc. Aida Kavazović, dipl. vet., docent; dr. sc. Fahira Alibegović - Zečić, vanredni profesor; dr.sc. Ćazim Crnkić, docent; Katedra za hranu i ishranu životinja; dr. sc. Emina Rešidbegović, redovni profesor; dr.sc. Abdulah Gagić, redovni profesor, dr. sc. Teufik Goletić, dr.sc Aida Kustura, docent; dr.sc. Almira Softić, docent; Zavod za zootehniku i peradarstvo, Veterinarski fakultet Univerziteta u Sarajevu, Zmaja od Bosne 90, 71 000 Sarajevo, Bosna i Hercegovina. tel./faks 00387 33 65 04 35; e-mail: aida.kavazovic@vfs.unsa.ba

da dodatak probiotika povećava odgovor sustavnih protutijela, pretežno IgM protiv ovčjih ritrocita, ali ne i serumski IgM i IgG protutijela protiv govedih serum albumina. Dodavanjem probiotika *Bacillus subtilis* (50 mg/kg), Khaksefidi i Ghoorchi (2006) su, pored pozitivnog učinka na proizvodne rezultate, utvrdili i značajan pozitivan učinak ( $p < 0,05$ ) na rast titra protutijela kod pilića 10 nakon vakciniranja protiv njukaslske bolesti.

Upotreba aktivnog pekarskog kvasca, vitamina C i laktoze u tretmanima peradi odražava se uglavnom pozitivno, kako na proizvodne rezultate i povećanje imuniteta, tako i na preveniranje infekcija patogenim mikroorganizmima. Pilenke koje su prethodno osam dana tretirane probiotskom kombinacijom od 0,2 g aktivnog pekarskog kvasca i 0,1 g laktoze po jedinki dnevno, preživjele su u 100 % slučajeva o/n infekciju veoma patogenim virusom njukaslske bolesti Hertz 33 (Gagić i sur., 1991). Korištenje probiotskog sredstva pripremljenog od inaktiviranog pekarskog kvasca, vitamina C i laktoze kod pilića provenijence Cobb 500 tijekom tova od 42 dana u eksperimentalnim uvjetima, rezultiralo je pozitivnim djelovanjem na prosječnu vrijednost visine titra protutijela protiv gumborske bolesti (Rešidbegović i sur., 2001). Veću tjelesnu masu kao i značajno povećanje probavljivosti hranjivih tvari (energija, sirove bjelančevine i sirova mast) ostvarili su tovni pilići kojima je dodavano 200 ppm vitamina C u obroku. Osim toga, korištenjem ELISA testa 28 dana nakon vakciniranja utvrđeno je i značajno povećanje titra protutijela protiv uzročnika gumborske bolesti (Lohakare i sur., 2005).

Razmatrajući rezultate dosadašnjih istraživanja upotrebe probiotika, ali i na osnovi vlastitih saznanja, odlučili smo pripremiti pokusno probiotsko sredstvo (kultura *L. acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka, inaktivirani pekarski kvasac, vitamin C i laktoza), te utvrditi učinke njegove primjene.

Osnovni cilj istraživanja bio je ispitati utjecaj dodatka komercijalnog i pokusnog probiotskog preparata putem vode za piće na imunski odgovor protiv gumborske bolesti kod tovnih pilića.

## MATERIJAL I METODE RADA

Istraživanje je provedeno na ukupno 105 pilića raspodijeljenih u tri skupine: dvije pokusne ( $P_1$  i  $P_2$ ) i jedna kontrolna skupina (K). Svaka skupina je brojala po 35 pilića koji su pri useljenju bili ujednačeni u odnosu na tjelesnu masu.

Pokusna skupina 1 ( $P_1$ ) dobivala je komercijalni probiotik *Probios*® topivi prašak za perad firme Chr. HANSEN A/S, Danska u vodi za piće prema preporuci proizvođača (1 mg po piletu pri svakom tretmanu), a pokusna skupina 2 ( $P_2$ ) eksperimentalni probiotik pripremljen od dvije odvojeno pripremljene komponente. Komercijalni probiotik *Probios*® je sadržavao  $1,1 \times 10^8$  CFU/g mliječnokiselinskih bakterija vrsta *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*; 25% natrijevog tiosulfata; 55% surutke u prahu i 20% natrijeva silicijeva aluminata.

Tablica 1. Program imunoprofilakse

Table 1. Programme of immunoprophylaxis

iVakcinacija protiv bolesti Vaccination against disease	Dob pilića Chicken age	Vrsta vakcine Vaccine type
Njukaslska bolest Newcastle disease	12.dan 12 <sup>th</sup> day	PESTIKAL® LA SOTA <sup>1</sup>
Gumborska bolest Gumboro disease	19.dan 19 <sup>th</sup> day	TAD GUMBORO® <sup>2</sup>
Infektivni bronhitis Infectious bronchitis	26.dan 26 <sup>th</sup> day	TAD IB® <sup>2</sup>

<sup>1</sup> VETERINA, Zagreb

<sup>2</sup> LAH, Njemačka

Komponenta koja je sadržavala 5% inaktiviranog pekarskog kvasca, 20% vitamina C, 4% laktoze i 71% glukoze kao nosača davana je u količini od 0,3g po piletu, a kultura *L. acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka aplicirana je u količini od 1 ml pripremljene suspenzije ( $10^6$  CFU/ml) po piletu u vodi za piće pri svakom tretmanu. Probiotski tretman obje pokusne skupine pilića bio je prva tri dana života i trodnevno pri vakciniranju pilića (dan prije, na dan vakciniranja i dan nakon vakciniranja). Kontrolnu skupinu predstavljali su pilići bez probiotskog tretmana.

Tijekom pokusa pilići su vakcinirani prema programu imunopofilakse koji je načinjenim u skladu s titrom kongenitalnih protutijela (Tablica 1).

Uzorci krvi za serološka ispitivanja uzeti su od 15 jednodnevnih pilića za određivanje titra kongenitalnih protutijela. Tijekom pokusa krv je uzeta od pilića iz svake skupine u dobi od 28 i 42 dana.

Titar protutijela protiv gumborske bolesti određen je imunoenzimskim testom - ELISA (Marquardt i sur. 1980). Za izvođenje testa korišten je komercijalni kit (FlockChek®: IBD Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories Inc., USA). Test je izvođen prema uputi proizvođača.

Za obradu dobivenih podataka korišten je statistički program Minitab Release 14 for Windows

(Minitab, 2003). Rezultati su obrađeni jednostrukom analizom varijance (One-way ANOVA), a za testiranje razlika srednjih vrijednosti korišten je Tukey test (Tukey 95% Simultaneous Confidence Intervals). Za provođenje analize varijance svi rezultati su prethodno transformirani u logaritamske ( $\log_{10}$ ) vrijednosti nakon čega je Ryan-Joiner test normaliteta (Minitab, 2003) pokazao približno normalnu raspodjelu frekvencija transformiranih vrijednosti ( $P > 0,05$ ).

## REZULTATI I RASPRAVA

U Tablici 2 prikazane su srednje vrijednosti titra protutijela kod pilića nakon vakciniranja protiv Gumborske bolesti tijekom perioda tova.

Kontrolom seruma pilića u dobi od 28 i 42 dana utvrđene su značajno ( $p < 0,05$ ) veće srednje vrijednosti titra protutijela (8958 i 2694) kod pilića pokusne  $P_1$  skupine u usporedbi s vrijednostima kontrolne K skupine (7891 i 1809). Mada su i kod pilića pokusne  $P_2$  skupine utvrđene veće srednje vrijednosti titra antitijela (8812 i 2472) nije bilo statističke opravdanosti razlika u odnosu na titar protutijela kod pilića kontrolne K skupine. Osim toga, nije potvrđena statistička značajnost razlika srednjih vrijednosti titra protutijela između pokusne  $P_1$  i  $P_2$  skupine.

Dobiveni rezultati pokazuju da je probiotski tretman obje skupine pokusnih pilića imao pozitivan

**Tablica 2. Srednje vrijednosti titra protutijela protiv gumborske bolesti kod pilića tijekom pokusa**

**Table 2. Average antibody titre values against Gumboro disease in chickens during fattening period**

Dob pilića (dana) Chicken age (days)	$P_1$	$P_2$	K	SD	P (Fisher) =
28	8958 <sup>b</sup>	8812 <sup>ab</sup>	7891 <sup>a</sup>	1037	0,031
42	2694 <sup>b</sup>	2472 <sup>ab</sup>	1809 <sup>a</sup>	833	0,028

K – Kontrolna skupina / Control group

$P_1$  – Pokusna skupina tretirana komercijalnim probiotikom

Experimental group treated with commercial probiotic

$P_2$  – Pokusna skupina tretirana eksperimentalnim probiotikom

Experimental group treated with experimental probiotic

SD – Zajednička (dijeljena) standardna devijacija za sve srednje vrijednosti u istom redu udružena s

One-way ANOVA procedurom u programu Minitab 14 (Minitab, 2003).

SD – Pooled standard deviation for all mean values in the same row with One-way ANOVA procedure in Minitab 14 programme (Minitab, 2003).

<sup>abc</sup> – vrijednosti u istom redu koje ne sadrže istu slovnju oznaku razlikuju se značajno na razini  $p < 0,05$ .

<sup>abc</sup> – values in the same row without a common letter differ significantly  $p < 0,05$ .

učinak na kvalitetu vakcinalnog odgovora protiv uzročnika gumborske bolesti.

U ovom smislu naši se rezultati slažu s navodima Rešidbegović i sur. (2001) koji su potvrdili pozitivno djelovanje probiotskog sredstva pripremljenog od inaktiviranog pekarskog kvasca, vitamina C i laktoze na prosječnu vrijednost titra protutijela protiv uzročnika gumborske bolesti.

Utvrđene, pa čak i značajne razlike u produkciji protutijela kod pokusnih u odnosu na kontrolne jedinke u našim istraživanjima mogu se pripisati probiotskim mikroorganizmima koji sigurno pomažu (Fuller, 1999) u iskorištavanju hranjivih tvari neopodnoh za proizvodnju protutijela.

S našim rezultatima koji potvrđuju pozitivan utjecaj probiotika na imunosni odgovor kod tretiranih jedinki suglasni su navodi brojnih autora. Tako su Zulkifli i sur. (2000) utvrdili značajno veći titar HI protutijela kod Hubbard pilića tretiranih *Lactobacillus* kulturom u odnosu na piliće provenijence Shaver tretirane istom kulturom, što bi moglo ukazivati i na dodatni utjecaj genetskih čimbenika u imunom odgovoru kod različitih tovnih hibida. Ispitujući učinke pet sojeva probiotskih mikroorganizama, Siwicki i sur. (2005) su utvrdili da pojedini probiotici stimuliraju nespecifični celularni i humoralni imunitet, te utječu na smanjenje mortaliteta pilića nakon infekcije. Rezultati Khaksefidi i Ghoorchi (2006) upućuju na značajno veći HI titar protutijela 10 dana nakon vakciniranja protiv uzročnika njukaslske bolesti kod pilića koji su tretirani probiotikom.

Prema podacima iz literature upotreba probiotskih sredstava koja sadrže pekarski kvasac, laktozu i/ili vitamin C, pokazala se djelotvornom u prevenciji oboljenja uzrokovanih virusima. Upotreba kvasca i 0,2% laktoze kod pilića umjetno inficiranih virusom gumborske bolesti utjecala je na poboljšanje vakcinalnog imuniteta protiv uzročnika njukaslske bolesti (Rešidbegović i sur. 1998).

Korištenjem ELISA testa, Amakye-Anim i sur. (2000) utvrdili su značajno ( $p < 0,05$ ) veći titar protutijela 14 dana nakon vakcinacije protiv uzročnika gumborske bolesti kod brojlerskih pilića tretiranih sa 1000 ppm askorbinske kiseline u hrani. Veći, odnosno značajno veći titar protutijela kod pilića koji su dobivali 200 ppm vitamina C u tovnim smjesama utvrdili su Lohakare i sur. (2005) 14. i 28. dan nakon vakcinacije protiv uzročnika gumborske bolesti. Ti-

tar protutijela protiv uzročnika njukaslske bolesti bio je također veći, ali ne i statički značajan.

## ZAKLJUČAK

Na osnovi provedenih istraživanja može se zaključiti da primjena komercijalnog (Probios®) i pokusnog (kultura *Lactobacillus acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka, inaktivirani pekarski kvasac, vitamin C i laktoza) probiotika ima pozitivan učinak na srednje vrijednosti titra protutijela protiv gumborske bolesti kod pilića u tovu, uz jače zabilježen odgovor nakon primjene komercijalnog preparata, uz statističku značajnost prema kontrolnoj skupini od  $p < 0,05$ .

## LITERATURA

1. Amakye-Anim, J., Lin, T.L., Hester, P.Y., Thiagarajan, D., Watkins, B.A. and Wu, C.C. (2000): Ascorbic Acid Supplementation Improved Antibody Response to Infectious Bursal Disease Vaccination in Chickens. *Poultry Sci.* 79: 680-688.
2. Fuller, R. (1999): Probiotics for Farm Animals. In *Probiotics: A Critical Review*. Ed. by Gerald W. Tannock.. Horizon Scientific Press, Wymondham, England, 15-22.
3. Gagić, A. Maslić–Strizak, D., Rešidbegović, E., Kavazović, A., Mulamekić, N., Muhović, A. (1991): Efekat probiotskog tretmana kod pilenki nakon infekcije patogenim virusom njukaslske bolesti. *Veterinaria*. 40, (Suplement 1): 88-92.
4. Haghighi, H. R., Gong, J., Gyles, C.L., Hayes, M.A., Sanei, B., Parvizi, P., Gisavi, H., Chambers, J.R. and Sharif, S. (2005): Modulation of Antibody-Mediated Immune Response by Probiotics in Chickens. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12 (12): 387-1392.
5. Herich, R. and Levkut, M. (2002): Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Vet. Med. – Czech*, 47 (6):169-180.
6. Khaksefidi, A. and Ghoorchi, T. (2006): Effect of Probiotic on Performance and Immunocompetence in Broiler Chicks. *The Journal of Poultry Science*, 43: 296-300.
7. Lohakare, J. D., Ryu, M. H., Hahn, T.-W., Lee, J. K., and Chae, B. J. (2005): Effects of Supplemental Ascorbic Acid on the Performance and Immunity of Commercial Broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 14:10–19.

8. Marquardt, W.W., Johnson, R.B., Odenwald, W.F. and Schlotthober, B.A. (1980): An Indirect Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) for Measuring Antibodies in Chickens Infected with Infectious Bursal Disease Virus. *Avian Dis.* 22 (2): 375-385.
9. MINITAB Statistical Software (2003): Release 14 for Windows. State College, Pennsylvania. Copyright © 2000-2003 Minitab Inc.
10. Rešidbegović, E., Kavazović, A., Gagić, A., Kustura, A., Mulamekić, N., Prašović, S. (1998): Vještačka infekcija pilića virusom gumborske bolesti i imunosupresivni na serološki odgovor prema vakcini protiv NC bolesti uz davanje laktoze i kvasca. *Veterinaria* 47 (3-4): 157-163.
11. Rešidbegović, E., Kavazović, A., Gagić, A. (2001): Uticaj probiotskog tretmana na imuni odgovor brojerskih pilića vakcinisanih protiv Gumborske bolesti živom vakcinom Gumbokal IM\*SPF. *Veterinaria* 50 (1-4): 175-180.
12. Siwicki, A.K., Bielecka, M., Wojcik, R., Biedrzycka, E., Smoragiewicz, W., Olowski, A., Malaczewska, J., Kask, S. (2005): Effect of selected probiotic on non-specific cellular and humoral defense mechanisms and protection against salmonellosis – experimental study in broiler chickens. *Roadshow 3, Guthealth Support*, Warsaw, Poland.
13. Zulkifli, I., Abdullah, N., Azrin, N.M., Y.W. Ho (2000): Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing *Lactobacillus* cultures and oxytetracycline under heat stress conditions. *Brit. Poult Sci.* 41: 593-597.

#### SUMMARY

The aim of the study was to examine the effect of commercial (*Probios*®) and experimental (the culture of *Lactobacillus acidophilus* isolated from acidophilus milk, inactivated bakers' yeast, vitamin C and lactose) probiotic preparations through drinking water on the immune response against Gumboro disease in broiler chickens. Research was conducted on 105/day old Cobb 500 chicks divided into three groups (two experimental and one control group). Probiotic treatments of experimental groups of chickens were the first three days of life and three days during the vaccination of chickens against Newcastle disease, Gumboro disease and Infectious bronchitis (the day before, on the day of and the day after vaccination). During the experiment chickens were vaccinated under the program of immunoprophylaxis, made in accordance with congenital antibody titres.

By controlling the immune response against Gumboro disease in chickens at the age of 28 and 42 days higher and significantly ( $p < 0.05$ ) higher mean antibody titres were found in experimental P<sub>2</sub> and P<sub>1</sub> groups compared with control K group, respectively. In the same time, statistically significant differences in mean values of antibody titres between the experimental groups were not determined.

Key words: probiotics, broiler chickens, antibodies, immune response