

Wpływ frukto-oligosacharydów na przebieg zakażenia indyków wirusem krwotocznego zapalenia jelit i pałeczkami *Salmonella Typhimurium**)

ANDRZEJ KONCICKI, JAN JANKOWSKI*, ZENON ZDUŃCZYK**,
BEATA MAZUR-GONKOWSKA, ANNA KRASNODĘBSKA-DEPTA, TOMASZ STENZEL

Zespół Chorób Ptaków Katedry Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13, 10-957 Olsztyn

*Katedra Drobiarstwa Wydziału Bioinżynierii UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-717 Olsztyn

**Instytut Rozrodu Zwierząt i Badania Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

Koncicki A., Jankowski J., Zduńczyk Z., Mazur-Gonkowska B., Krasnodębska-Depta A., Stenzel T.

Influence of fructo-oligosaccharides on the course of turkey HEV and *Salmonella Typhimurium* infections

Summary

The aim of the study was to determine the influence of administering compound feed containing various fructo-oligosaccharides (FOS) on the health of turkeys infected with Hemorrhagic enteritis virus (HEV) and with *Salmonella Typhimurium* (ST). Investigations were performed on 270 young male BUT-9 turkeys which were divided into three groups (I-III) consisting of 90 birds in each group. Group I received a compound feed without FOS, while group II and III received feed with a 2% addition of chicory fine flour and standard fructo-oligosaccharide from chicory, respectively.

At the age of eight weeks 13 birds from every group were injected per os with HE virus at a dose of $10^{4.6} \text{EID}_{50} / \text{ml}$. After five days three birds from each group were slaughtered with the aim of defining their susceptibility to HEV and the 10 remaining turkeys were infected with ST: 1 ml of a bacterial suspension PBS with a concentration of 9×10^9 jtk/ml into the croup. The birds were clinically observed for 12 days. Blood samples were controlled from five birds from each group on days 5 and 12 following infection, after which three of the turkeys were slaughtered, anatomopathologically examined and cuttings of the liver and caecum were collected for bacteriological examination.

The results of the study indicate that the turkeys which received feed containing FOS did not succumb to ST infection because, five days following infection, bacteria was isolated only from the caecum, whereas it was additionally isolated from the liver in the case of turkeys who had received feed not containing FOS. The biochemical results from the groups of turkeys fitting within physiological norms and receiving feed containing FOS proves that there was no general ST infection and that FOS do not negatively influence turkeys' organisms. Five days after infection there was an increase of LDH activity in the three groups of turkeys receiving feed without FOS. The results of the study do not unanimously prove that FOS slow down ST infections but they do encourage further research on the issue.

Keywords: turkeys, fructo-oligosaccharides, HEV, *Salmonella Typhimurium*

Wprowadzony w krajach Unii Europejskiej zakaz stosowania antybiotykowych stymulatorów wzrostu zmusza do poszukiwania alternatywnych dodatków paszowych, które mogłyby zapewnić podobne efekty produkcyjne bez biologicznych konsekwencji, jakie niesło powszechne stosowanie antybiotyków paszowych (3). We wcześniejszych badaniach wykazano, że mieszanki paszowe z udziałem mannano-oligosacharydów (MOS), które ograniczając adhezję patogennych szczepów pałeczek *E. coli* do komórek błony śluzowej przewodu pokarmowego, łagodzą przebieg kolibakteriozy u indyków (18). Czynnikiem wspomagają-

cym wzrost i stan zdrowia ptaków wydają się również prebiotyczne oligosacharydy nowej generacji, jakimi są frukto-oligosacharydy (FOS) (13). Są to polimery D-fruktozy połączone między sobą wiązaniami β (2 \rightarrow 1) i α (1 \rightarrow 2) z D-glukozą na końcu molekuly. Stopień polimeryzacji może wynosić od 2 do 60. Oligosacharydem o wysokim stopniu polimeryzacji (> 30) jest inulina. Naturalnym źródłem oligosacharydów są także rośliny jadalne, jak: cykorja, cebula, czosnek, pomidor, banan. Krótkołańcuchowe FOS, ze stopniem polimeryzacji 3-4, są produkowane komercyjnie z sacharozy przy użyciu β -fruktofuranozydazy z *Aspergillus Niger* (24).

*) Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 3PO6 ZO2124.

Frukto-oligosacharydy nie są trawione przez endogenne enzymy gospodarza, natomiast w jelitach grubych stanowią pożywkę dla pożądanej mikroflory, głównie szczepów z rodzaju *Bifidobacterium* i *Lactobacillus*. Końcowymi produktami fermentacji FOS w jelitach grubych są bowiem krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe (LKT). Zwiększenie koncentracji kwasu mlekowego w treści jelit selektywnie stymuluje namnażanie wymienionych bakterii (6). FOS hamują rozwój drobnoustrojów patogennych, stymulują układ odpornościowy, obniżają syntezę trójgliceroli i kwasów tłuszczowych w wątrobie oraz wzmagają absorpcję wapnia w jelitach (5, 7). Choi i wsp. (6) wykazali również, że korzystne oddziaływanie FOS na stan funkcjonalny jelit przejawia się zwiększoną długością mikrokosmków jelitowych.

Wyniki badań przeprowadzonych na kurczątach brojlerach żywionych mieszankami z udziałem FOS nie potwierdzają jednoznacznie ich pozytywnego wpływu na wyniki produkcyjne i ograniczenie nosicielstwa pałeczek *Salmonella* (2, 6, 8, 20, 25), chociaż Fukata i wsp. (9) wykazali, że FOS hamują proces kolonizacji jelit tymi bakteriami u kurcząt brojlerów. W dostępnym piśmiennictwie brak jest wyników badań dotyczących zdrowotności indyków żywionych mieszankami z dodatkiem FOS. Jedynie Juśkiewicz i wsp. (14) wykazali, że stosowana w skarmianej paszy inulina w ilości 0,1% i 0,4% przez okres 16 tygodni nie wpływa na końcową masę ciała indyków. Natomiast w przypadku skarmiania mieszanki z 1% udziałem tego frukto-oligosacharydu stwierdzono istotnie niższą masę ciała indyków w porównaniu do ptaków żywionych mieszanką bez wymienionego FOS. Zastosowane dawki FOS nie miały także istotnego wpływu na pH, zawartość suchej masy oraz ilość LKT w treści jelit ślepych. Dodatek inuliny wyraźnie zmniejszył miano *E. coli*, natomiast nie obniżał liczebności *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* w treści tych jelit.

Celem badań było określenie wpływu skarmiania mieszanek paszowych z różnym udziałem frukto-oligosacharydów na zdrowotność indyków zakażonych wirusem krwotocznego zapalenia jelit (Haemorrhagic enteritis virus – HEV) i pałeczkami *Salmonella* Typhimurium (ST).

Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 270 indorkach typu BUT-9 odchowywanych od pierwszego dnia życia w standardowych warunkach w fermie doświadczalnej Katedry Drobniarstwa UWM w Olsztynie. Ptaki utrzymywano w oddzielnych kojcach, dzieląc je na trzy grupy (I-III). W żywieniu indyków stosowano mieszanki bazowe o składzie podanym w tab. 1 i wartości pokarmowej zgodnej z zaleceniami firmy BUT (1). Mieszanki bazowe uzupełniano premiksem zawierającym mikroelementy i witaminy (grupa I) oraz ponadto mączką z cykorii (grupa II), zawierającą różne frakcje inuliny o stopniu polimeryzacji 2-20, nazywane oligofruktozą, a także standardowym frukto-oligosacharydem

Tab. 1. Skład i wartość pokarmowa mieszanki bazowej

Składnik	Okres żywienia, tygodnie	
	0-4	5-8
Pszenvica, %	23,87	29,71
Kukurydza, %	20,00	20,00
Poekstrakcyjna śruta sojowa, %	40,41	37,28
Poekstrakcyjna śruta rzepakowa, %	3,00	3,00
Białko ziemniaczane, %	5,00	2,00
Olej sojowy, %	3,28	1,62
Smalec, %	–	2,00
Składniki mineralne, %	3,98*	3,73***
Aminokwasy, %	0,46**	0,66****
EM, Kcal	2800,00	2850,00
Białko ogólne, %	28,00	24,97
Włókno surowe, %	3,53	3,50
Lys, %	1,75	1,58
Met+Cys, %	1,08	1,02
Ca, %	1,20	1,10
P dostępny, %	0,60	0,55

Objaśnienia: * – NaCl – 0,22%; kreda – 1,27%; fosforan jednowapniowy – 2,29%; fosforan sodu – 0,20%; ** – DL-metionina 99 – 0,19%; L-lizyna HCl – 0,27%; *** – kwaśny węglan sodu – 0,10%; NaCl – 0,20%; kreda – 1,20%; fosforan jednowapniowy – 2,12%; fosforan sodu – 0,10%; **** – DL-metionina 99 – 0,23%; L-lizyna HCl – 0,35%; L-treonina – 0,08%

Tab. 2. Skład mieszanek doświadczalnych (%)

Składnik	Grupy żywieniowe		
	I	II	III
Premix*	0,25	0,25	0,25
Mączka z cykorii	–	2,00	–
FOS z cykorii	–	–	2,00
Śruta z kukurydzy	2,75	0,75	0,75
Mieszanka bazowa	97,00	97,00	97,00

Objaśnienia: * – w przeliczeniu na kg paszy: wit. A 15 000 IU; wit. D₃ 4500 IU; wit. E 50 mg; wit. K₃ 2,5 mg; wit. B₁ 3,5 mg; wit. B₂ 10 mg; wit. B₆ 6 mg; wit. B₁₂ 0,03 mg; kwas foliowy 2 mg; biotyna 0,36 mg; niacyna 75 mg; kwas pantotenowy 21 mg; cholina 600 mg; Mn 150 mg; Zn 90 mg; Fe 60 mg; Cu 15 mg; J 1 mg; Se 0,3 mg; Dielazuril 1 mg

(FOS) z cykorii (grupa III) – oligofruktoza uzyskiwana komercyjnie z inuliny cykorii (Raftilose firmy Orafit) (tab. 2).

Trzydzieści dziewięć wybranych losowo indyków (po 13 ptaków z każdej grupy) w wieku 8 tyg. przeniesiono do izolowanych wiwariów Zespołu Chorób Ptaków i zakażono *per os* (do wola) wirusem HE w dawce 10^{4,6}EID₅₀/ml. Pięć dni po zakażeniu uśmiercono po 3 indyki z każdej grupy celem określenia ich wrażliwości na zakażenie wirusem HE na podstawie indeksu śledzionowego (IS), zmian anatomopatologicznych i obecności wirusa w śledzionie (16).

Kontrolę stanowiły 3 uśmiercone w tym samym czasie indyki nie zakażone. Pozostałe indyki zakażono *per os* wyizolowanym od indyków patogennym serotypem pałeczek ST, wprowadzając do wola po 1 ml zawiesiny tych bakterii w PBS odpowiadającej liczbie 9×10^9 jtk/ml. Pałeczki ST użyte do zakażenia przednamnażano na płynnym podłożu selektywnym Rappaporta-Vassiliadis (RV), a następnie namnażano na agarze odżywczym. Kontrolę stanowiły indyki nie zakażone, przetrzymywane w pomieszczeniach Katedry Drobiarstwa.

Indyki wszystkich grup poddano obserwacji klinicznej. W piątym i dwunastym dniu po zakażeniu pobierano z żyły skrzydłowej krew od 5 indyków z każdej grupy celem przeprowadzenia badań biochemicznych. Po pobraniu krwi indyki uśmiercano i poddawano badaniom anatomopatologicznym, a wycinki wątroby i jelit ślepych badaniu bakteriologicznemu na obecność pałeczek ST. W tym celu pobrane jałowo wycinki narządów umieszczano w płynnym podłożu selektywnym RV, a następnie otrzymane hodowle przesiewano na stałe podłoże selektywne BGA (agar z zielenią brylantową i czerwienią fenolową (Oxoid)). Uzyskane kolonie bakteryjne o cechach makroskopowych charakterystycznych dla rodzaju *Salmonella* przesiewano na płytki z agarem odżywczym i inkubowano przez 24 godz. w temp. 37°C. W celu potwierdzenia obecności pałeczek ST, czyste kultury bakteryjne poddawano badaniu biochemicznemu, wykorzystując zestaw API 20 (bioMérieux) zgodnie z zaleceniami producenta.

W surowicy krwi oznaczano zawartość białka całkowitego, glukozy, trójglicerydów, kwasu moczowego, wapnia i fosforu. Ponadto w surowicy oznaczano metodą kinetyczną aktywność enzymów: aminotransferazy asparaginianowej (AST), fosfatazy zasadowej (AP), dehydrogenazy kwasu mlekowego (LDH) i kinazy kreatynowej (CK). Oznaczeń dokonano fotometrem typu Epoll 20, używając testów diagnostycznych firm Alpha Diagnosticks i Pointe Scientific. Poziom lizozymu oznaczano metodą opisaną przez Parry i wsp. (21).

Otrzymane wyniki opracowano statystycznie dwuczynnikową analizą wariancji w układzie ortogonalnym Stat 1.

Wyniki i omówienie

Zakażenie ptaków pałeczkami *Salmonella* najczęściej zachodzi drogą pokarmową, po czym wędrują one do jelit ślepych i tam następuje zjawisko adherencji i wnikania do komórek gospodarza, głównie komórek M, makrofagów i granulocytów obojętnochłonnych (10). Jeśli komórkowe mechanizmy obronne sprawnie funkcjonują, wówczas zakażenie ogranicza się do jelit i GALT (gut-associated lymphoid tissues) (22). Należy jednak podkreślić że zakażenia pałeczkami *Salmonella* u drobiu są trudne do zwalczania i stanowią istotny problem epidemiologiczny z uwagi na liczne źródła zakażenia oraz szerzenie drogą transowarialną (4, 12, 17, 23). Z drugiej strony, cho-

robotwórczość tych pałeczek zależy od właściwości samych zarazków, które są różne w zależności od serowaru, jak i wrażliwości makroorganizmu, także uwarunkowanej wieloma czynnikami (19).

Biorąc powyższe pod uwagę stworzono model doświadczalny, pozwalający jak najbardziej obiektywnie ocenić rolę FOS w przebiegu zakażenia pałeczkami ST i wpływ tych oligosacharydów na stan zdrowotny indyków. W tym celu indyki zakażano najpierw wirusem krwotocznego zapalenia jelit, który, wywołując immunosupresję, predysponuje je do wtórnych infekcji drobnoustrojami warunkowo chorobotwórczymi (11, 18), a następnie wyizolowanym od padłych z powodu salmonellozy indyków serotypem pałeczek ST.

Wyniki zakażenia wirusem HE i pałeczkami ST indyków żywionych mieszankami z różnymi FOS przedstawiono w tab. 3. Z danych tej tabeli wynika, że indyki były wrażliwe na zakażenie wirusem HE (powiększony IS, charakterystyczna marmurkowatość śledziony 5 dni po zakażeniu, reizolacja wirusa) (16).

Pomimo że indyki po zakażeniu pałeczkami ST nie wykazywały klinicznych objawów chorobowych, to jednak 5 dni po zakażeniu wyizolowano te bakterie z jelit ślepych i wątroby od 2 indyków z grupy I (kontrola) i z jelit ślepych od 5 indyków z grup II i III. Natomiast nie wyizolowano pałeczek ST od żadnego z indyków uśmierconych po 12 dniach od zakażenia (tab. 3).

Wyniki badań bakteriologicznych wskazują, że u indyków, które żywiono mieszanką z udziałem FOS nie doszło do przełamania bariery jelitowej i uogólnienia zakażenia pałeczkami ST. Uzyskane wyniki dowodzą, że FOS stanowiące pożywkę dla pożądanej mikroflory jelitowej stymulują mechanizmy obronne związane z przewodem pokarmowym i utrudniają adherencję i wnikanie pałeczek *Salmonella* do komórek gospodarza. Na pozytywny wpływ FOS na stan zdrowotny indyków wskazują również uzyskane wyniki badań biochemicznych (tab. 4 i 5). Wykazany wzrost aktywności LDH 5 dni po zakażeniu ST u indyków grupy I może wskazywać na uszkodzenie przez te bakterie komórek wątrobowych (15). Warto także dodać, że w surowicy indyków tej grupy, pomimo braku różnic statystycznych, wykazano również wyższą aktywność AP, CK i lizozymu.

Tab. 3. Wyniki zakażenia indyków wirusem HE i pałeczkami *S. Typhimurium* (n = 13; $\bar{x} \pm s$)

Grupy żywieniowe	Zakażenie	IS 5 dni po zakażeniu wirusem HE	Reizolacja wirusa/liczba ptaków badanych	Objawy kliniczne	Izolacja ST	
					5 dni po zakażeniu	12 dni po zakażeniu
I	Z	2,75 ± 0,48 ^a	3/3	brak	2 (jelito ślepe i wątroba)	0
	N	1,26 ± 0,20 ^b	0/3			
II	Z	2,68 ± 0,21 ^a	3/3	brak	4 (jelito ślepe)	0
III	Z	2,71 ± 0,17 ^a	3/3	brak	1 (jelito ślepe)	0

Objaśnienia: Z – indyki zakażone wirusem HE; N – indyki nie zakażone wirusem HE; a, b – istotność różnic przy $p \leq 0,01$

