DOI: 10.22092/vj.2020.128115.1634
شماره ۱۳۰ بهار ۱۴۰۰
تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک

تاثیر تغذیه‌ی لاکتوفرین و پروبیوتیک بر وضعیت سلامت و کاهش آلودگی به باکتری اشرشیاکلای در بره‌های شیرخوار نژاد قزل

•مختار ملاکی
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
• علی حسینخانی (نویسنده مسئول)
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
• اکبر تقی زاده
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
• حمید پایا
گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
• غلامرضا حمیدیان
گروه بافت شناسی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تبریز، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸-۰۷-۲۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸-۱۰-۱۵
Emali: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

چکیده

مواد غذایی حاصل از فرآورده‌های حیوانی به دلیل امکان انتقال عوامل بیماری‌زای میکروبی و باقیمانده داروهای آنتی‌بیوتیکی به بدن انسان می‌توانند علاوه بر اختلال در سیستم ایمنی و گوارش، باعث ایجاد مقاومت میکروبی نیز شوند. به‌منظور مطالعه اثر تغذیه‌ی سطوح مختلف پروبیوتیک و لاکتوفرین بر وضعیت سلامت و میزان آلودگی به باکتری اشرشیاکلای در بره‌های شیرخوار نژاد قزل، تعداد ۳۶ بره نر در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل دو در سه ، به شش گروه تیماری اختصاص یافتند. طی دوره ۵۶ روزه‌ی آزمایش، بره‌ها با تیمارهای آزمایشی که شامل دو سطح پروبیوتیک (صفر و یک گرم به ازای هر رأس در روز) و سه سطح لاکتوفرین (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ گرم به ازای هر رأس در روز) بود، به‌صورت انفرادی تغذیه شدند. نتایج نشان داد که با وجود عدم تفاوت معنی‌دار بین نمره قوام مدفوع و دمای بدن، استفاده همزمان پروبیوتیک و لاکتوفرین، تعداد روزهای تحت درمان را در گروه‌های آزمایشی نسبت به گروه شاهد کاهش داد (P<۰/۰۵). افزون بر این، برهمکنش بین سطوح مختلف پروبیوتیک و لاکتوفرین باعث کاهش دفع باکتری اشرشیاکلای از مدفوع شد (P<۰/۰۵). تغذیه‌ی لاکتوفرین باعث افزایش خطی غلظت پلاسمایی آهن نسبت به گروه شاهد شد، به‌طوری که بالاترین سطح لاکتوفرین، بیشترین افزایش غلظت آهن را به‌دنبال داشت (P<۰/۰۵). به‌طور کلی، یافته‌های این پژوهش نشان داد که تغذیه‌ی پروبیوتیک و لاکتوفرین، وضعیت سلامت را در بره‌های شیرخوار بهبود بخشیدند، با این‌حال تغذیه‌ی همزمان این دو ترکیب، اثر مثبت بیشتری را در کاهش تعداد روزهای تحت درمان به‌دنبال داشت.

کلمات کلیدی: لاکتوفرین، پروبیوتیک، نوزاد نشخوارکنندگان، باکتری‌های بیماری‌زا، سیستم ایمنی

● Veterinary Researches & Biological Products No 130 pp: 55-62

Effect of Lactoferrin and Probiotic on Health Status and Reduction of Escherichia Coli Infection in Ghezel Lambs in Pre-weaning Phase

By: Mallaki, M., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Hosseinkhani, A., (Corresponding Author) Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Taghizadeh, A., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Paya, H., Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. and Hamidian, Gh., Department of Basic Science, Faculty of Veterinary, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received: 2019-10-15 **Accepted: 2020-01-05**

Emali: a.hosseinkhani@tabrizu.ac.ir

Foodstuffs that derived from animal products could transfer microbial pathogens and antibiotic drug residuesin, consequently it caused to disrupting in immune and gastrointestinal system and microbial resistance in the human body. This study was to investigate the effect of different levels of probiotic and lactoferrin (bLF) on the health status and infection rate of Escherichia coli in suckling Ghezel lambs. Thirty six suckling male lambs in a completely randomized design employing a 2×3 factorial arrangement were assigned to six exprimental groups. Experimental treatments were includes of two levels of probiotic (0 and 1 g/day/head) and three levels of bLF (0, 0.25 and 0.50 g/day/head) that used individually for 56 days of experiment. The results showed that despite no significant difference between fecal score and body temperature between the experimental groups, the simultaneous use of probiotics and bLF reduced days medicated in the experimental groups compared to the control group ($P<0.05$). In addition, interaction between different levels of probiotic and bLF reduced the excretion of Escherichia coli in the feces ($P<0.05$). Bovine lactoferrin led to a linear increase in plasma iron concentration compared to the control group, therewith the highest level of bLF having the highest increase in iron concentration ($P<0.05$). According to results of present experiment, it seems that bLF plus probiotic can have synergisc effect on performance and heath status of Ghezel lamb breed in preweaning phase.

Keywords: Lactoferrin, Probiotic, Ruminant's Neonate, Pathogenic Bacteria و Immune System

مقدمه

مصرف مواد غذایی به‌ویژه فرآورده‌های حیوانی یکی از اصلی‌ترین عوامل انتقال عوامل بیماری‌زای میکروبی به بدن انسان است. از طرفی، باقیمانده داروهای آنتی‌بیوتیکی در فرآورده‌های دامی و مصرف آن توسط انسان، می‌تواند بروز واکنش‌های آلرژیک، تب، اسهال و اختلال در هضم و جذب مواد غذایی در دستگاه گوارش ایجاد کند (۱۷). باکتری انتروهموراژیک اشرشیاکلای (E. Coli) که دارای سروتیپ‌های فراوانی است، از جمله عواملی است که باعث ایجاد اسهال خونی در کودکان و بزرگسالان، عفونت‌های ادراری و اختلال در انعقاد خون در انسان می‌شود در میان سروتیپ‌های اشرشیاکلای، سروتیپ HV:E. coli O۱۵۷ به دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند هدف قرار دادن افراد در همه سنین، تاثیرگذاری در مقادیر اندک، مقاومت به محیط اسیدی و فراوانی آن در نشخوارکنندگان، به‌عنوان یکی از مهم‌ترین تأمین‌کنندگان غذای انسان، دارای اهمیت بیشتری است (۱).

در مطالعه‌ای که به بررسی آلودگی با باکتری اشرشیاکلای در مزارع پرورش گوسفند انجام شده بود، مشخص شد که ۲ الی ۱۲ ٪ نمونه‌های مدفوع گرفته شده به این باکتری آلوده بودند (۸). با این حال هانلون و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که میزان حضور باکتری اشرشیاکلای بصورت پنهان با مقادیر آشکار آن برابری می‌کند (۸). با توجه به اهمیت این موضوع، یکی از مهم‌ترین اهداف پرورش‌دهندگان، کاهش میزان این باکتری در مزارع پرورش نشخوارکنندگان است. اگرچه استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها می‌تواند کارآیی مناسبی در کنترل و از بین بردن آلودگی به این باکتری باشد، اما نگرانی‌ها در رابطه با ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی، تمایل به استفاده از ترکیبات و روش‌های جایگزین، استفاده از ترکیبات پروبیوتیکی (۱۱)، دستکاری جیره غذایی (۳) و استفاده از ترکیبات ایمنی‌زای زیستی (۱۲) را افزایش داده است.

لاکتوفرین یک ترکیب گلایکوپروتئینی جاذب آهن (۸۰ kDa) از خانواده ترانسفرین‌های سرم است، که در آغوز، شیر، ترشحات موکوسی مانند اشک و بزاق، مایعات پانکراسی و جنسی و همچنین نوتروفیل‌های خون یافت می‌شود (۱۲). شرمن و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که استفاده از لاکتوفرین می‌تواند آلودگی به باکتری‌های کلی‌فرم را در گوساله‌های هلشتاین در سن دو هفتگی کاهش دهد و از ایجاد مقاومت آنتی‌بیوتیکی

در این گونه از باکتری‌ها جلوگیری کند (۲۰). افزون بر این، گزارش شده است که مکمل‌سازی جیره با لاکتوفرین می‌تواند به بهبود نمره مدفوع و کاهش شیوع برخی از بیماری‌های میکروبی و اسهال در دوره قبل از شیرگیری گوساله کمک کند (۱۹). پروبیوتیک‌ها که از میکروارگانیسم‌های زنده تشکیل شده‌اند، به‌عنوان یک مکمل غذایی دارای عملکرد چندوجهی در تغذیه و پرورش حیوانات می‌باشند. برای نمونه، پروبیوتیک‌ها می‌توانند به استقرار جمعیت میکروبی روده کمک کنند و به‌عنوان یک عامل بازدارنده، از رشد جمعیت میکروب‌های زیان‌آور جلوگیری کنند. همچنین پروبیوتیک‌ها به‌عنوان عامل محرک رشد، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و محافظت‌کننده در برابر برخی از بیماری‌ها شناخته می‌شوند (۲۴). سازوکارهای متعددی در ارتباط با تاثیر پروبیوتیک‌ها بر عوامل میکروبی زیان‌آور پیشنهاد شده است. از جمله این که، باکتری‌های پروبیوتیک از راه افزایش تولید سیتوکینین‌ها، فعالیت دستگاه ایمنی را تقویت کرده و یا در رقابت با دیگر باکتری‌های بیماری‌زا برای دستیابی به فاکتورهای رشد و دیگر مواد مغذی باعث کندی رشد آنها می‌شوند (۷). از نگاه پرویز و همکاران (۲۰۰۶)، سازوکار اثر پروبیوتیک‌ها بر جمعیت میکروارگانیسم‌های دستگاه گوارش شامل تنظیم اسیدیته‌ی روده، خاصیت آنتاگونیسم آن‌ها با باکتری‌های پاتوژن از راه تولید ترکیبات ضدمیکروبی و یا رقابت با باکتری‌های بیماری‌زا برای پیوند به موقعیت‌های موجود در روده، محدود کردن مواد مغذی و عوامل رشد موردنیاز آنها می‌باشد (۱۸). از آنجایی که لاکتوفرین و پروبیوتیک هر کدام بطور جداگانه دارای اثرات مثبتی بر سیستم ایمنی و کاهش عوامل بیماری‌زای میکروبی در حیوانات اهلی هستند، گمان می‌رود استفاده‌ی همزمان آن‌ها بتواند با ایجاد برهمکنش مثبت اثرات مفیدتری بر رشد، سلامت و میزان آلودگی به باکتری‌ها داشته باشد. بر این اساس، این پژوهش با هدف مطالعه اثر تغذیه‌ی لاکتوفرین و پروبیوتیک بر وضعیت سلامت و کاهش آلودگی به باکتری اشرشیاکلای در بره‌های شیرخوار نژاد قزل بود.

مواد و روش‌ها

حیوانات و تیمارهای آزمایشی

این آزمایش در ایستگاه تحقیقاتی خلعت‌پوشان دانشگاه تبریز انجام شد. تعداد ۳۶ بره نر نژاد قزل در سن ۱ ± ۴ روزگی (وزن بدن ۰/۶۵ ± ۳/۹ kg) در قالب طرح کاملاً تصادفی با آرایش فاکتوریل دو در سه به شش گروه تیماری (شش رأس در هر تیمار) اختصاص داده شدند. بره‌ها پس از جداسازی از مادر به قفس‌های انفرادی منتقل و به مدت ۵۶ روز تحت آزمایش قرار گرفتند. تیمارهای آزمایشی شامل دو سطح پروبیوتیک (صفر و یک gr به ازای هر رأس در روز) و سه سطح لاکتوفرین گاوی (Bovine Lactoferrin) (bLF) (صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵ gr به ازای هر رأس در روز) بود. مقادیر مشخص شده لاکتوفرین و پروبیوتیک ابتدا در سرم فیزیولوژیک حل شده و سپس با استفاده از سرنگ روزانه (ساعت ۰۹:۰۰) به حیوانات خورانده شد. گروه شاهد معادل مقدار محلولی که روزانه به تیمارهای آزمایشی داده می‌شد، سرم فیزیولوژیک دریافت کردند.

اندازه‌گیری نمره‌ی مدفوع و روزهای تحت درمان

جهت بررسی وضعیت قوام مدفوع، مدفوع بره‌های آزمایشی سه روز متوالی در هر هفته بررسی و بر اساس جدول لما و همکاران (۲۰۰۱) امتیازدهی صورت گرفت (۱۵). در این روش، نمره یک: دانه‌ای و سفت و تا حدودی سخت، نمره دو: دانه‌ای و دارای حالت طبیعی، نمره سه: دانه‌ای و نرم، نمره چهار: کاملاً نرم بدون دانه و بدون حرکت روی سطح و نمره پنج: شل و آبکی دارای حرکت روی سطح می‌باشد. نمره‌های چهار و پنج اسهال در نظر گرفته شدند. روزهای تحت درمان برای بره‌های آزمایشی بر اساس دو شاخص نمره مدفوع بالاتر از سه و روزهایی که هر حیوان دارو (آنتی‌بیوتیک یا الکترولیت) دریافت می‌کرد، اندازه‌گیری و ثبت شد (۱۹). دمای رکتوم با استفاده از یک دماسنج و سه روز متوالی در هر هفته اندازه‌گیری و ثبت شد.

فراسنجه‌های خونی

به منظور بررسی فراسنجه‌های خون، در روزهای اول، ۲۸ و ۵۶ آزمایش، نمونه‌های خون در میکروتیوب‌های سه میلی‌لیتر حاوی ماده ضدانعقاد (EDTA) از سیاهرگ وداج گرفته شد. همچنین، فراسنجه‌های خونی شامل غلظت آهن و فعالیت آنزیم‌های آلانین آمینوترانسفراز (ALT)، آسپارتات آمینو ترانسفراز (AST) و گاما گلوتامین ترانسفراز (GGT) با استفاده از کیت‌های تشخیصی تجاری (Pars Azmoon Company, Tehran, Iran) و دستگاه اتوآنالایزر (Biotecnica, Targa ,۳۰۰۰ Rome, Italy) سنجش شدند.

تعیین میزان آلودگی میکروبی

برای اندازه‌گیری میزان دفع باکتری اشرشیاکلای، نمونه‌های مدفوع جهت کشت میکروبی در روزهای صفر، ۲۸ و ۵۶ آزمایش گرفته شد. برای این منظور، نمونه‌های مدفوع در لوله‌های فالکن استریل ۱۵ ml حاوی ۱۰ ml بافر (گلیسرول ۸۵٪ و سدیم کلراید ۰/۹٪) با نسبت ۱:۱۰ (حجمی/حجمی) ریخته شد و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند. در پایان آزمایش، نمونه‌ها پس از یخ‌گشایی با استفاده از لوله‌های آزمایش هانگیت ۱۰ ml استریل شده، حاوی نه ml بافر رقیق‌سازی شدند. جهت بررسی تعداد باکتری از رقت‌های 10^{4}، 10^{5} و 10^{6} جهت کشت استفاده شد. برای این منظور، محیط کشت (MacConkey Agar (MAC) طبق دستورالعمل شرکت سازنده آماده شد و پس از تلقیح، نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت رشد باکتری انکوبه شدند. پس از اتمام زمان انکوباسیون، پلیت‌هایی که تعداد کلنی‌های آن بین ۳۰ تا ۳۰۰ عدد بودند، شمارش شد. در نهایت تعداد باکتری‌ها با استفاده از فرمول زیر شمارش شدند. از ضریب ۱۰ به خاطر رقیق کردن اولیه نمونه‌ها استفاده شده است.

$$\text{تعداد باکتری‌ها} = \frac{10 \times \text{ضریب رقت} \times \text{تعداد کلنی شمارش شده}}{\text{مقدار تلقیح شده به محیط کشت}}$$

آنالیز آماری

داده‌های حاصل از آزمایش با استفاده از رویه Mixed و به روش داده‌های تکرار شونده در زمان نرم‌افزار آماری SAS نسخه (۹/۱) و بر اساس مدل زیر تجزیه و تحلیل شدند:

$$Yijkl = \mu + Ai + Bj + A\times Bij + Tk + eijkl$$

که در این مدل Yijk، مربوط به تکرار i از هر تیمار، μ میانگین کل مشاهدات، Ai اثر سطوح لاکتوفرین، Bj اثر سطوح پروبیوتیک، A×Bij اثر متقابل لاکتوفرین و پروبیوتیک، Tk اثر زمان و eijkl اثر اشتباه آزمایشی بود. مقایسه میانگین تیمارهای آزمایشی با استفاده از آزمون توکی و سطح احتمال ۵ درصد انجام شد.

نتایج

وضعیت سلامت

نتایج مربوط به وضعیت سلامت شامل نمره‌دهی قوام مدفوع، دمای رکتوم، روزهای تحت درمان و میزان دفع باکتری اشرشیاکلای از مدفوع در جدول سه نشان داده شده است. اگر چه نتایج نشان می‌دهد که

جدول ۱- تاثیر تغذیه پروبیوتیک و لاکتوفرین بر شاخص‌های سلامت بره‌های شیرخوار نژاد قزل.

پروبیوتیک۱	لاکتوفرین۲	نمره مدفوع	دمای رکتوم درجه سانتی‌گراد	روزهای تحت درمان	تعداد باکتری اشرشیاکلای ۱۰ CFU/g feces (log)
۰	-	۲/۴۸	۳۹/۰۳	۱/۸ a	۵/۹۲ a
۱	-	۲/۳۸	۳۸/۸۶	۱/۵۴ b	۵/۸۰ b
خطای استاندارد میانگین		۰/۱۷	۰/۱۴	۰/۰۹	۰/۰۳
-	۰	۲/۵۸	۳۹/۲۰	۲/۰۸ a	۶/۰۹ a
-	۱	۲/۳۷	۳۸/۹۶	۱/۷۸ b	۵/۹۰ b
-	۲	۲/۳۴	۳۸/۶۸	۱/۱۴ c	۵/۵۸ c
خطای استاندارد میانگین		۰/۲۲	۰/۱۷	۰/۱۱	۰/۰۳
برهمکنش پروبیوتیک × لاکتوفرین					
۰	۰	۲/۶۲	۳۹/۳۰	۲/۴۰ a	۶/۱۶ a
۰	۱	۲/۴۷	۳۹/۱۱	۱/۷۶ b	۶/۰۰ b
۰	۲	۲/۳۳	۳۸/۶۷	۱/۲۴ c	۵/۶۰ d
۱	۰	۲/۵۴	۳۹/۱۰	۱/۸۵ a	۶/۰۳ b
۱	۱	۲/۲۶	۳۸/۸۱	۱/۶۵ b	۵/۸۲ c
۱	۲	۲/۳۴	۳۸/۶۸	۱/۰۵ c	۵/۵۷ d
خطای استاندارد میانگین		۰/۳۱	۰/۲۵	۰/۱۵	۰/۰۴
سطح احتمال					
پروبیوتیک		۰/۶۹	۰/۴۰	۰/۰۴	۰/۰۱
لاکتوفرین		۰/۷۰	۰/۱۱	۰/۰۱	۰/۰۱
پروبیوتیک × لاکتوفرین		۰/۹۴	۰/۸۱	۰/۰۷	۰/۲۳

۱) سطوح ۰ و یک پروبیوتیک بترتیب حاوی صفر و یک gr پروبیوتیک به ازای هر رأس در روز بود.

۲) سطوح ۰، یک و دو لاکتوفرین بترتیب حاوی صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ gr لاکتوفرین به ازای هر رأس در روز بود.

a-c) میانگین‌های با حروف معنی‌دار متفاوت، با یکدیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

درجه قوام مدفوع در گروه‌های مصرف کننده لاکتوفرین و پروبیوتیک بهبود یافته است، اما تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد نداشتند. همچنین، پروبیوتیک، لاکتوفرین و برهمکنش بین آن‌ها، دمای رکتوم را تحت تاثیر قرار نداد (P>۰/۰۵). خوراندن پروبیوتیک و لاکتوفرین سبب کاهش روزهای تحت درمان شد (P<۰/۰۵)، اما برهمکنش بین پروبیوتیک و لاکتوفرین اثر معنی‌داری بر شمار روزهای تحت درمان نداشت. افزون بر این، عفونت باکتریایی اشرشیاکلای مدفوع حیوانات تغذیه شده با پربیوتیک و لاکتوفرین به طور خطی کاهش یافت (P<۰/۰۵)، به طوری که با افزایش سطح لاکتوفرین و پروبیوتیک شمار باکتری‌های اشرشیاکلای در مدفوع کاهش یافت (جدول ۱).

جدول ۲- تاثیر تغذیه پروبیوتیک و لاکتوفرین بر فراسنجه‌های خونی بره‌های شیرخوار نژاد قزل.

پروبیوتیک۱	لاکتوفرین۲	آهن (mg/dl)	آلانین آمینوترانسفراز (U/L)	آسپارتات آمینو ترانسفراز (U/L)	گاما گلوتامین ترانسفراز (U/L)
۰	-	۱۵۸/۳۹ b	۱۰/۶۳	۳۶/۳۵	۱۹/۴۸
۱	-	۱۶۲/۸۰ a	۱۰/۲۰	۳۵/۸۷	۱۹/۱۳
خطای استاندارد میانگین		۱/۸۸	۰/۱۹	۰/۴۶	۰/۲۷
-	۰	۱۵۵/۶۴ b	۱۰/۴۳	۳۶/۴۴	۱۹/۷۵
-	۱	۱۶۱/۰۶ a	۱۰/۳۷	۳۵/۹۴	۱۹/۰۸
-	۲	۱۶۵/۰۸ a	۱۰/۴۴	۳۵/۹۴	۱۹/۰۹
خطای استاندارد میانگین		۲/۳۰	۰/۲۳	۰/۵۷	۰/۳۳
برهمکنش پروبیوتیک × لاکتوفرین					
۰	۰	۱۵۴/۵۶ c	۱۰/۸۴	۳۷/۰۰	۲۰/۱۱
۰	۱	۱۵۸/۰۶ bc	۱۰/۵۴	۳۶/۰۶	۱۹/۲۷
۰	۲	۱۶۲/۵۶ ab	۱۰/۵۰	۳۶/۰۰	۱۹/۰۵
۱	۰	۱۵۶/۷۲ c	۱۰/۰۱	۳۵/۸۹	۱۹/۳۹
۱	۱	۱۶۴/۰۶ ab	۱۰/۲۰	۳۵/۸۳	۱۸/۸۹
۱	۲	۱۶۷/۶۱ a	۱۰/۳۸	۳۵/۸۹	۱۹/۱۴
خطای استاندارد میانگین		۳/۲۵	۰/۳۳	۰/۸۰	۰/۴۷
سطح احتمال					
پروبیوتیک		۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۴۶	۰/۳۸
لاکتوفرین		۰/۰۲	۰/۹۷	۰/۷۷	۰/۲۸
پروبیوتیک × لاکتوفرین		۰/۸۲	۰/۵۶	۰/۷۹	۰/۶۹

۱) سطوح ۰ و یک پروبیوتیک بترتیب حاوی صفر و یک gr پروبیوتیک به ازای هر رأس در روز بود.

۲) سطوح ۰، یک و دو لاکتوفرین بترتیب حاوی صفر، ۰/۲۵ و ۰/۵۰ gr لاکتوفرین به ازای هر رأس در روز بود.

a-c) میانگین‌های با حروف معنی‌دار متفاوت، با یکدیگر در سطح ۵٪ اختلاف معنی‌دار دارند.

فراسنجه‌های خونی

نتایج مربوط به تاثیر خوراندن پروبیوتیک و لاکتوفرین بر فراسنجه‌های خونی در جدول ۲ نشان داده شده است. غلظت آهن پلاسما به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار گرفت (P<۰/۰۵) به‌طوری که غلظت آهن خون بره‌های تغذیه شده با پروبیوتیک و لاکتوفرین به طور معنی‌داری نسبت به گروه شاهد بالاتر بود. با این حال، آنزیم‌های کبدی آلانین آمینوترانسفراز، آسپارتات آمینو ترانسفراز و گاما گلوتامین ترانسفراز تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفتند.

بحث

پروبیوتیک‌ها ترکیباتی هستند که با کاهش سطح میکروب‌های مضر در دستگاه گوارش به بهبود وضعیت سلامت جانداران مختلف از جمله نشخوارکنندگان کمک می‌نمایند. همچنین، شواهد نشان می‌دهد لاکتوفرین با بهبود سیستم ایمنی، می‌تواند میزان ابتلا به عفونت‌های مختلف را کاهش دهد. در این آزمایش با فرض اینکه تغذیه پروبیوتیک و لاکتوفرین می‌تواند منجر به بهبود وضعیت سلامت و کاهش آلودگی میکروبی بره‌های شیرخوار شود، ترکیبات یاد شده را به صورت مجزا و هم‌زمان برای بررسی احتمال برهمکنش مثبت بین آن‌ها به بره‌های شیرخوار نژاد قزل خورانده شد. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که تغذیه پروبیوتیک و لاکتوفرین می‌تواند منجر به افزایش غلظت آهن خون و کاهش آلودگی به باکتری اشرشیاکلای و همچنین کاهش روزهای تحت درمان بره‌های شیرخوار شود. با این حال، بجز تعداد رزوهای تحت درمان که برهمکنش بین سطوح مختلف لاکتوفرین و پروبیوتیک، تمایل به کاهش آن داشت، سایر فراسنجه‌های اندازه‌گیری شده تحت تاثیر برهمکنش بین تیمارها قرار نگرفت. بر اساس نتایج، شمار روزهای تحت درمان در زمانی که بالاترین سطح لاکتوفرین همراه با پروبیوتیک تغذیه شدند، بیشترین کاهش را داشت.

اسهال یکی از شایع‌ترین علل مرگ و میر در بره‌های نوزاد است که در پی آلودگی به باکتری اشرشیاکلای، روتا ویروس و سایر میکروارگانیسم‌های بیماری‌زای روده بروز می‌کند. در توافق با یافته‌های این پژوهش، سوپرتی و همکاران (۱۹۹۷) با تغذیه گوساله‌های شیرخوار با لاکتوفرین، کاهش بروز اسهال ناشی از کاهش جمعیت باکتری اشرشیاکلای را تایید کردند (۲۱). در گزارش دیگری روبلی و همکاران (۲۰۰۳) نیز الگوی یکسانی در کاهش میزان بروز اسهال و روزهای تحت درمان در گوساله‌های نوزاد که لاکتوفرین دریافت نموده بودند، ارائه دادند (۱۹). در همین راستا، دی بروتی و همکاران (۲۰۰۷) و عاطف یکتا و همکاران (۲۰۱۱) به‌ترتیب با اعمال پروبیوتیک و لاکتوفرین در بره‌های شیرخوار و گوسفندان بالغ توانستند با کمک اثرات ضد باکتریایی این دو ترکیب، افزون بر تعدیل جمعیت باکتریایی روده، نمره مدفوع را کاهش و بروز اسهال را متوقف کنند (۶, ۲۳). نتایج مربوط به این پژوهش نیز نشان داد که استفاده از پروبیوتیک و سطوح مختلف لاکتوفرین مانع از بروز اسهال شدید در حیوانات گروه‌های تیماری شد. از طرفی دیگر، کاهش معنی‌دار روزهای تحت درمان در مطالعه کنونی نیز می‌تواند نشانگر کاهش جمعیت باکتریایی مضر دستگاه گوارش باشد، که در سایر مطالعات ذکر شده است. مطالعه عاطف یکتا و همکاران (۲۰۱۱) که به‌طور اختصاصی جهت بررسی اثر تیمارهای آزمایشی بر اسهال و دفع باکتریایی اشرشیاکلای در گوسفندان بالغ انجام شده بود، نیز نشان داد که تغذیه روزانه ۱۰ و یک گرم لاکتوفرین به مدت ۱۸ روز، دفع باکتری را به‌طور کامل متوقف کرد؛ با این حال، در مطالعه حاضر با وجود اینکه دفع باکتری در انتهای آزمایش نسبت به ابتدای آزمایش کاهش معنی‌داری داشت، ولی به طور کامل متوقف نشد، که می‌تواند ناشی تفاوت‌های سنی و یا مرتبط با سطح پایین‌تر لاکتوفرین مورد استفاده در این مطالعه باشد (۲۳).

کاهش روزهای تحت درمان در گروه‌های تیماری دریافت کننده لاکتوفرین بخصوص هنگامی که با پروبیوتیک همراه شده است، با نتایج حاصل از مطالعات گذشته همخوانی داشت. در این راستا، گزارش شده است که لاکتوفرین با داشتن ویژگی‌های ضدمیکروبی می‌تواند باعث سرکوب باکتری‌های بیماری‌زای دستگاه گوارش از جمله اشرشیاکلای شود، و میزان بروز اسهال و آسیب‌های درون دستگاه گوارش را کاهش دهد (۱۰).

لاکتوفرین یک پروتئین عامل خط دفاع طبیعی حاوی آهن در پستانداران می‌باشد، که در ترشحات برون ریز حاضر است و باعث مقابله با فلورهای میکروبی مضر در شیر، اشک، مایعات خارج شده از پرده گوش و بینی، بزاق، موکوس‌های برونشیتی، مایعات گوارشی، موکوس‌های درون سرویکس و مایع منی می‌شود. افزون بر این، لاکتوفرین از ترکیبات اصلی گرانول‌های ثانویه نوتروفیل‌های چند هسته‌ای (PMNs) می‌باشد. این آپوپروتئین (دارای < ۱۵ ٪ آهن) در محل‌های حمله میکروب‌ها و نئوپلاست‌ها از نوتروفیل‌های چند هسته‌ای آزاد می‌شوند. در پستانداران دو سیستم دفاعی اولیه حاوی مولکول‌های گیرنده (حمله کننده و جمع‌آوری کننده) آهن شامل ترانسفرین (TF) و لاکتوفرین (LF) می‌باشد (۲۲). هر کدام از این دو پروتئین می‌توانند به طور مؤثری دو اتم آهن را در هر مولکول خود به دام اندازند. این دو گیرنده آهن در یک مسیر پیچیده‌ای و بطور مداوم باعث پالایش مایعات بدن از اتم‌های آزاد آهن می‌شوند. ترانسفرین مسئول بوجود آوردن محیط‌های عاری از آهن آزاد در سرم، لنف و مایعات سروبرواسپینال (CSF) می‌باشد. برخلاف ترانسفرین که آهن جذب کرده را در محیط‌های که pH به زیر ۷/۴ می‌رسد، آزاد می‌کند، لاکتوفرین می‌تواند آهن را حتی تا pH زیر ۳/۵ هم به طور مؤثری در خود حفظ نماید. بنابراین، لاکتوفرین به‌عنوان یک عامل گیرنده (کیلات‌کننده) آهن و آنتی‌میکروبی، در محدود گسترده‌ای از مایعات بدن، حتی زمانی که pH محیط به واسطه‌ی تولید اسیدهای کاتابولیکی ناشی از فعالیت‌های مقابله‌کننده با مهاجمان بسیار پایین بیاید، نیز عمل کند. لاکتوفرین افزون بر اینکه دارای پتانسیل گیرندگی آهن است، دارای قدرت باند شوندگی بالایی برای ساختارهای سلولی آنیونیک و ترکیبات مولکولی نیز می‌باشد که برای بروز فعالیت ضد باکتری‌های گرم منفی و مثبت لازم است (۱۴).

مطالعات متعددی در گونه‌های مختلفی از جمله انسان (۱۶) و گوساله (۱۳) اثبات کردند که لاکتوفرین می‌تواند با استفاده از چندین سازوکار مانند افزایش توانایی سلول‌های انتروسایت در دریافت آهن از لاکتوفرین، افزایش جذب پروتئین لاکتوفرین که خود دارای آهن است (۱۶) و همچنین افزایش انتقال لاکتوفرین و آهن از طریق سلول‌های لبه مسواکی و ذخیره‌سازی در این سلول‌ها جهت انتقال به داخل پلاسمای خون (۴)،

میزان جذب آهن در بدن را افزایش دهد. این یافته‌های با نتایج پژوهش حاضر که نشان می‌دهد با مصرف لاکتوفرین سطح آهن خون افزایش یافته است، همخوانی داشت. اطلاعات زیادی در رابطه با تاثیر مصرف پروبیوتیک بر غلظت آهن در بدن وجود ندارد. با این حال آنتونوویک و همکاران (۲۰۰۵) گزارش کردند که استفاده از پروبیوتیک در جیره بره‌های نوزاد باعث افزایش غلظت آهن پلاسما شده است (۲). برخلاف یافته این گزارش، نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهند که افزودن پروبیوتیک نتوانست به طور معنی‌داری غلظت آهن را افزایش دهد (جدول ۲).

به طور کلی فعالیت برخی از آنزیم‌های کبدی همچون گاما گلوتامین ترانسفراز (GGT)، آلانین آمینوترانسفراز (ALT) و آسپارتات آمینوترانسفراز (AST) به عنوان شاخصی از استرس، آسیب‌های بافتی و عفونت قلمداد می‌شود. این آنزیم‌ها به طور طبیعی درون سلولی هستند، ولی در صورت آسیب به سلول‌ها به درون خون آزاد می‌شوند و نشان دهنده آسیب بافتی هستند (۵). کاهش اندک و غیرمعنی‌دار بدست آمده در مقدار آنزیم‌های گاما گلوتامین ترانسفراز و آسپارتات آمینوترانسفراز در گروه‌های دریافت‌کننده پروبیوتیک و لاکتوفرین در مطالعه حاضر با نتایج هیلال و همکاران (۲۰۱۱) همخوانی داشت (۹). اگرچه نمی‌توان با قطعیت بیان کرد که این تغییرات به دلیل اثرات همزمان یا جداگانه ترکیبات پروبیوتیک و لاکتوفرین در این مطالعه است، با این حال می‌توان فرض نمود که اثرات این دو ترکیب در بهبود وضعیت سلامتی و شاخص‌هایی همچون روزهای تحت درمان و کاهش عوامل بیماری‌زای دستگاه گوارش در کاهش این آنزیم‌ها دخیل بوده‌اند.

نتیجه‌گیری کلی

به طور کلی نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که افزودن مکمل‌های پروبیوتیک و لاکتوفرین به جیره بره‌ها بخصوص تا قبل از سن از شیرگیری می‌تواند باعث بهبود وضعیت سلامت از جمله تقویت سیستم ایمنی و کاهش روزهای تحت درمان و بروز اسهال شود. بهترین مکمل در این آزمایش گروه حاوی ۰/۵۰ گرم لاکتوفرین و یک گرم پروبیوتیک در روز به ازای هر رأس بود که نسبت به سایر گروه‌ها عملکرد بهتری را کاهش روزهای تحت درمان داشت.

منابع مورد استفاده

1- Adugna, A., M. Kibret, B. Abera, E. Nibret and M. Adal. 2015. Antibiogram of E. coli serotypes isolated from children aged under five with acute diarrhea in Bahir Dar town. *African health sciences* 15: 656-664.

2- Antunović, Z., M. Šperanda, B. Liker, V. Šerić, Đ. Senčić, M. Domaćinović and T. Šperandat. 2005. Influence of feeding the probiotic Pioneer PDFM® to growing lambs on performances and blood composition. *Acta veterinaria* 55: 287-300.

3- Callaway, T. R., M. Carr, T. Edrington, R. C. Anderson and D. J. Nisbet. 2009. Diet, Escherichia coli O157: H7, and cattle: a review after 10 years. *Current issues in molecular biology* 11: 67.

4- Davidson, L. A., & Lonnerdal, B.,. 1989. Fe-saturation and proteolysis of human lactoferrin: effect on brush-border receptor-mediated uptake of Fe and Mn. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, 257: G930-G934.

5- Davis, P., L. McDowell, N. Wilkinson, C. Buergelt, R. Van Alstyne, R. Weldon, T. Marshall and E. Matsuda-Fugisaki. 2008. Comparative effects of various dietary levels of Se as sodium selenite or Se yeast on blood, wool, and tissue Se concentrations of wether sheep. *Small ruminant research* 74: 149-158.

6- De Bortoli, N., G. Leonardi, E. Ciancia, A. Merlo, M. Bellini, F. Costa, M. G. Mumolo, A. Ricchiuti, F. Cristiani and S. Santi. 2007. Helicobacter pylori eradication: a randomized prospective study of triple therapy versus triple therapy plus lactoferrin and probiotics. *The American journal of gastroenterology* 102: 951-956.

7- Dongarrà, M. L., V. Rizzello, L. Muccio, W. Fries, A. Cascio, I. Bonaccorsi and G. Ferlazzo. 2013. Mucosal immunology and probiotics. *Current allergy and asthma reports* 13: 19-26.

8- Hanlon, K. E., M. F. Miller, L. M. Guillen, A. Echeverry, E. Dormedy, B. Cemo, L. A. Branham, S. Sanders and M. M. Brashears. 2018. Presence of Salmonella and Escherichia coli O157 on the hide, and presence of Salmonella, Escherichia coli O157 and Campylobacter in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. *Meat science* 135: 1-5.

9- Hillal, H., G. El-Sayaad and M. Abdella. 2011. Effect of growth promoters (probiotics) supplementation on performance, rumen activity and some blood constituents in growing lambs. *Archives Animal Breeding* 54: 607-617.

10- Jang, Y., H. Oh, L. Piao, H. Choi, J. Yun and Y. Kim. 2009. Evaluation of probiotics as an alternative to antibiotic on growth performance, nutrient digestibility, occurrence of diarrhea and immune response in weaned pigs. *Journal of Animal Science and Technology* 51: 25-32.

11- Jatkauskas, J. and V. Vrotniakiene. 2010. Effects of probiotic dietary supplementation on diarrhoea patterns, faecal microbiota and performance of early weaned calves. *Veterinarni Medicina* 55: 494-503.

12- Kieckens, E., Rybarczyk, J., Cox, E., & Vanrompay, D. 2018. Antibacterial and immunomodulatory activities of bovine lactoferrin against Escherichia coli O157: H7 infections in cattle. *BioMetals* 31: 321-330.

13- Kume, S.-I. and S. Tanabe. 1996. Effect of supplemental lactoferrin with ferrous iron on iron status of newborn calves. *Journal of dairy science* 79: 459-464.

14- Leitch, E. and M. Willcox. 1998. Synergic antistaphylococcal

properties of lactoferrin and lysozyme. *Journal of medical microbiology* 47: 837-842.

15- Lema, M., L. Williams and D. Rao. 2001. Reduction of fecal shedding of enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7 in lambs by feeding microbial feed supplement. *Small ruminant research* 39: 31-39.

16- Levay, P. F., & Viljoen, M.,. 1995. Lactoferrin: a general review. *Haematologica*, 80: 252-267.

17- Newell, D. G., M. Koopmans, L. Verhoef, E. Duizer, A. Aidara-Kane, H. Sprong, M. Opsteegh, M. Langelaar, J. Threfall and F. Scheutz. 2010. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International journal of food microbiology* 139: S3-S15.

18- Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang and H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of applied microbiology* 100: 1171-1185.

19- Robblee, E., P. S. Erickson, N. L. Whitehouse, A. McLaughlin, C. G. Schwab, J. Rejman and R. Rompala. 2003. Supplemental Lactoferrin Improves Health and Growth of Holstein Calves during the Preweaning Phase1, 2. *Journal of dairy science* 86: 1458-1464.

20- Sherman, M. P., M. M. Miller, J. Sherman and V. Niklas. 2014. Lactoferrin and necrotizing enterocolitis. *Current opinion in pediatrics* 26: 146-150.

21- Superti, F., M. Ammendolia, P. Valenti and L. Seganti. 1997. Antirotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Medical Microbiology and Immunology* 186: 83-91.

22- Weinberg, E. D. 2005. Iron withholding as a defense strategy. Anemia of Chronic Disease Taylor and Francis Group, Boca Raton: 255-280.

23- Yekta, M. A., E. Cox, B. Goddeeris and D. Vanrompay. 2011. Reduction of Escherichia coli O157: H7 excretion in sheep by oral lactoferrin administration. *Veterinary microbiology* 150: 373-378.

24- Yeoman, C. J. and B. A. White. 2014. Gastrointestinal tract microbiota and probiotics in production animals. *Annu Rev Anim Biosci* 2: 469-486.