

Utjecaj komercijalnog i pokusnog probiotika na humoralni imunosni odgovor pilića u tovu cijepljenih protiv virusa zarazne bolesti burze



A. Kavazović*, E. Rešidbegović, A. Gagić, F. Alibegović-Zečić, T. Goletić, Č. Crnkić, A. Softić, A. Kustura i A. Koro

Sažetak

Istraživanje je provedeno da bi se ispitalo utjecaj dodatka probiotika u vodi za piće na imunosni odgovor protiv virusa zarazne bolesti burze pilića u tovu. Ukupno 240 jednodnevnih pilića Cobb 500 provenijence nasumice su podijeljeni u tri skupine i to dvije ogledne (P_1 i P_2) i jednu kontrolnu (K) svaka u 8 ponavljanja s po 10 pilića. Skupina P_1 dobivala je komercijalni probiotik *Probios*®, topivi prašak za perad firme Chr. HANSEN A/S, Danska, a skupina P_2 pokusni probiotik pripremljen prema vlastitoj recepturi. Kontrolnu skupinu predstavljali su pilići bez probiotičkog tretmana. Probiotički tretman se provodio u oglednih skupina pilića u prva tri dana života i trodnevno pri cijepljenju pilića. Tijekom ogleda svi pilići su cijepljeni u dobi od 14 dana protiv virusa zarazne bolesti burze cjepivom TAD GUMBORO®, sukladno

titru kongenitalnih protutijela. Kontrolom seruma pilića u dobi od 21 dan srednja vrijednost titra protutijela u sve tri skupine pilića bila je ujednačena. Međutim, u dobi od 33 dana ustvrđene su značajno ($P < 0,05$) veće srednje vrijednosti titra protutijela u pilića oglednih skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Statistička značajnost razlika srednje vrijednosti titra protutijela potvrđena je i između oglednih skupina u korist skupine P_1 u kojoj su pilići dobivali komercijalni probiotik *Probios*®. Pri kontroli seruma na kraju tova, 42. dana, značajno ($P < 0,05$) veću srednju vrijednost titra protutijela imali su pilići kojima je davan komercijalni probiotik *Probios*®. U pilića iz skupine tretirane pokusnim probiotikom ustvrđena je veća vrijednost protutijela bez statističke značajnosti razlika, u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Ključne riječi: pilići; tov; probiotik; protutijela; imunosni odgovor

Dr. sc. Aida KAVAZOVIĆ*, dr. med. vet., izvanredna profesorica (dopisni autor, e-mail; aida.kavazovic@vfs.unsa.ba), dr. sc. Emina REŠIDBEGOVIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Abdulah GAGIĆ, dr. med. vet., redoviti profesor, dr. sc. Fahira ALIBEGOVIĆ-ZEČIĆ, dr. med. vet., redovita profesorica, dr. sc. Teufik GOLETIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Čazim CRNKIĆ, dr. med. vet., izvanredni profesor, dr. sc. Almira SOFTIĆ, dr. med. vet., izvanredna profesorica, dr. sc. Aida KUSTURA, dr. med. vet., izvanredna profesorica, Amira KORO, dr. med. vet., asistentica, Univerzitet u Sarajevu Veterinarski fakultet, Sarajevo, Bosna i Hercegovina

Uvod

Ekonomičnost proizvodnje mesa brojlera ovisi o odabiru najboljih komercijalnih hibrida, provođenju potrebnih uvjeta smještaja i hranidbe te primjeni specifičnih i nespecifičnih mjera zdravstvene zaštite proizvodnih jedinki. Međutim, uvjeti u intenzivnom držanju komercijalnih brojlerskih pilića su izrazito stresni, naročito u prvim danima života, kada imunosni sustav i crijevna mikrobiota još uvijek nisu potpuno razvijeni.

Korištenje probiotika tijekom tog kritičnog razdoblja može poboljšati opće zdravstveno stanje pilića i proizvodne rezultate tijekom razdoblja tova. Dosadašnja istraživanja primjene ukazuju da probiotici povoljno utječu na proizvodne rezultate i humoralni imunosni odgovor bez štetnih posljedica na konzumente proizvoda mesa peradi, u vidu pojave rezistencije mikroorganizama i zadržavanja rezidua u mesu peradi, što je slučaj kod korištenja antibiotika kao promotora rasta (Rešidbegović i sur., 2001., Kavazović i sur., 2011., Salim i sur., 2013., Manafi i sur., 2018.).

Probiotički preparati koji se koriste u životinja u intenzivnoj proizvodnji mogu sadržavati jednu ili više vrsta mikroorganizama. Kao mikrobnii probiotici koriste se bakterije iz rodova *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, a zajedno s *Bacillus* sp., kvascima (*Saccharomyces cerevisiae*) i filamentoznim gljivicama (*Aspergillus oryzae*, *Candida pintolopesii*) glavni su sastojak probiotičkih preparata koji se najčešće koriste u ishrani farmaskih životinja. Mliječne bakterije se ubrajaju u glavne probiotičke mikroorganizme, a obuhvaćaju više rodova, od kojih su najviše istraženi *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Enterococcus* i *Pediococcus* (Fuller, 1999., Mahfuz i sur., 2017.). Probiotici, posebno laktobacili mogu modulirati odgovor sistemskih protutijela na brojne antigene u peradi.

Uloga probiotika očituje se u povećanju opće, nespecifične otpornosti organizma, odnosno jačanju prirodne obrane organizma.

Veći titar protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze u brojlera tretiranih probiotikom Protexin zabilježili su Kabir i sur. (2004.), a rezultati Nikpirana i sur. (2013.) pokazuju da dodatak istog probiotika značajno ($P < 0,05$) povećava imunosni odgovor u brojlerskih pilića na cjepivo protiv virusa Newcastleške bolesti u usporedbi s pilićima kontrolne skupine i skupine tretirane probiotikom. Dodavanjem probiotika *Bacillus subtilis* (50 mg/kg), Khaksefidi i Ghoorchi (2006.) su ustvrdili značajan pozitivan utjecaj ($P < 0,05$) na rast titra protutijela u pilića 10 dana nakon cijepjenja protiv Newcastleške bolesti. Nayeopor i sur. (2007.) su ispitivanjem dodatka 0,1% i 0,15% probiotika Primalac u hrani ustvrdili značajno veći titar protutijela u serumu tovnih pilića protiv virusa zarazne bolesti burze u odnosu na kontrolnu skupinu. Rezultati Landy i Kavyani (2013.) ukazuju da bi dodavanje 0,9 g Primalac probiotika/kg hrane, u uvjetima povećane ambijentalne temperature, moglo imati pozitivan utjecaj na imunosni odgovor nakon cijepjenja protiv virusa zarazne bolesti burze i virusa Newcastleške bolesti te infektivnog bronhitisa.

Kontinuirana, programska uporaba probiotičkog sredstva pripremljenog od inaktiviranog pekarskog kvasca, vitamina C i laktoze pozitivno djeluje na prosječnu vrijednost visine titra protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze (Rešidbegović i sur., 2001.).

Korištenjem ELISA testa Amakye-Anim i sur. (2000.) ustvrdili su značajno ($P < 0,05$) povećanje titra protutijela 14 dana nakon cijepjenja protiv uzročnika virusa zarazne bolesti burze kao i značajno ($P < 0,05$) povećanje tjelesne

mase pilića koji su hranjeni obrokom s dodatkom 1000 ppm askorbinske kiseline. Dodavanje 200 ppm vitamina C u obrok brojlarskih pilića tijekom tova rezultiralo je značajnim povećanjem titra protutijela protiv uzročnika virusa zarazne bolesti burze ELISA testom pri kontroli seruma 28 dana nakon cijepjenja (Lohakare i sur., 2005.). Rezultati drugih autora pokazuju da dodatak probiotika koji sadrži četiri *Bacillus species* i *Saccharomyces boulardii* (Microguard®) ima pozitivne učinke na stvaranje protutijela protiv virusa Newcastleške bolesti i virusa avijarne influence (Manafi i sur., 2018.).

Materijali i metode

Za istraživanje je ukupno korišteno 240 jednodnevnih pilića. Pilići su podijeljeni u tri skupine (dvije ogledne - P₁ i P₂ i jedna kontrolna - K). Svaka od tri skupine je imala po 80 pilića i to 8 ponavljanja s po 10 pilića. Za hranidbu pilića tijekom tova od 42 dana korištene su kompletne krmne smjese: starter, gover i finišer. Pilići su tijekom tova hranu i vodu dobivali *ad libitum*.

Komercijalni probiotik *Probios*®, topivi prašak za perad firme Chr. HANSEN A/S, Danska, sadržavao je 1,1 x 10⁸ CFU/g mliječnokiselinskih bakterija vrsta *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus casei*; 25% natrijevog tiosulfata; 55% sirutke u prahu i 20% natrijeva silicijeva aluminata. Prema preporuci proizvođača pilići skupine P₁ dobivali su preparat u vodi za piće u količini od 1 mg po piletu pri svakom tretmanu.

Pilići skupine P₂ su tretirani pokusnim probiotikom koji se sastojao od dvije odvojene komponente pripremljene prema vlastitoj recepturi. Komponenta koja je sadržavala 5% inaktiviranog pekarskog kvasca, 20% vitamina C, 4% laktoze i 71% glukoze kao najprisutnijeg nosača davana je u količini od 0,3 g po

piletu, a kultura *L. acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka aplicirana je u količini od 1 mL pripremljene suspenzije (10⁶ CFU/mL) po piletu u vodi za piće pri svakom tretmanu.

Probiotički tretman se provodio prva tri dana života i trodnevno pri cijepjenju pilića (dan prije, na dan i dan nakon cijepjenja). Pilići iz sve tri skupine su u dobi od 14 dana cijepljeni protiv virusa zarazne bolesti burze cjepivom TAD GUMBORO®, sukladno titru kongenitalnih protutijela. Kontrolnu skupinu predstavljali su pilići bez probiotičkog tretmana.

Uzorci krvi za serološka ispitivanja uzeti su od jednodnevnih pilića za određivanje titra kongenitalnih protutijela. Tijekom kontrole krv je uzorkovana od pilića iz svake skupine (po dva pilića po ponavljanju) u dobi od 21, 33 i 42 dana, odnosno ukupno 16 uzoraka krvi po skupini. Za utvrđivanje ELISA titra protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze korišten je komercijalni imunoenzimski test FlockChek® IBD Antibody Test Kit, sukladno uputstvu proizvođača (IDEXX Laboratories Inc., SAD).

Statistička analiza

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 varijanse 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). Statistička značajnost razlika utvrđena je na razini od *P*<0,05.

Rezultati i rasprava

U Tabeli 1 prikazane su srednje vrijednosti titra protutijela u pilića nakon cijepljenja protiv virusa zarazne bolesti burze tijekom razdoblja tova. Kontrolom seruma pilića u dobi od 21 dan srednja vrijednost titra protutijela bila je ujednačena u sve tri skupine pilića, a analizom varijance između srednjih vrijednosti nisu utvrđene statistički značajne razlike ($P < 0,05$), što je sukladno rezultatima Cardoso Bitterncourt i sur. (2014.) koji su ustvrdili veći titar protutijela protiv virusa Newcastleške bolesti bez statističke značajnosti, u usporedbi s kontrolnom i skupinom tretiranom antibiotikom kao promotorom rasta. U našim istraživanjima, pri kontroli humoralnog imunskog odgovora u pilića u dobi od 33 dana utvrđene su značajno ($P < 0,05$) veće srednje vrijednosti titra protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze u pilića oglednih P_1 i P_2 skupina u odnosu na kontrolnu skupinu. Pored toga, potvrđena je i statistička značajnost razlika srednje vrijednosti titra protutijela između ogledne P_1 i P_2 skupine.

Na kraju tova, 42. dana, ustvrđena je značajno veća ($P < 0,05$), odnosno veća srednja vrijednost titra protutijela u pilića P_1 i P_2 skupine, respektivno, u usporedbi s kontrolnom skupinom.

Utvrđene, značajne razlike u produkciji protutijela oglednih u odnosu na kontrolne jedinice mogu se pripisati probiotskim mikroorganizmima koji sigurno pomažu u iskorištavanju hranjivih tvari nužnih za produkciju protutijela. Fuller-ovi (1989.) pokusi *in vitro* pokazali su da limfociti periferne krvi ljudi stimulirani malim količinama jogurta koji je sadržavao žive laktobacile proizvode 3-4 puta više interferona nego kontrolne stanice, što je i klinički dokazano. Pored povećane produkcije interferona, autor je ustanovio i povećanje broja B limfocita, stanica ubojica i IgG. Složen mehanizam djelovanja objašnjava činjenicom da se laktobacili adheriraju za limfocite koji produciraju interferon, što bi mogao biti bitan dio procesa stimulacije.

Rezultati naših istraživanja ukazuju na moguću pozitivan učinak komercijalnog i pokusnog probiotika na stvaranje protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze i suglasni su s rezultatima drugih autora koji su ispitali utjecaj različitih probiotika na humoralni imunski odgovor u brojerskih pilića (Amakye-Anim i sur., 2000., Rešidbegović i sur., 2001., Lohakare i sur., 2005., Kavazović i sur., 2011.). Veći titar protutijela protiv virusa zarazne bolesti burze u brojlera tretiranih s probiotikom Protexin zabilježili su Kabir i sur. (2004.), a rezultati Nikpiran-a

Tabela 1. Srednje vrijednosti ELISA titra protutijela protiv zarazne bolesti burze u pilića tijekom ogleda

Dob pilića (dana)	P_1	P_2	K	SD	P vrijednost
21	11243	11388	11054	793	0,702
33	2947 ^{bc}	2675 ^b	2171 ^a	356	0,001
42	2014 ^b	1853 ^{ab}	1451 ^a	374	0,019

K - Kontrolna skupina

P_1 - Ogledna skupina tretirana komercijalnim probiotikom

P_2 - Ogledna skupina tretirana pokusnim probiotikom

SD - Zajednička (dijeljena) standardna devijacija za sve srednje vrijednosti u istom redu udružena s One-way ANOVA procedurom u programu Minitab 14 (Minitab, 2003.).

^{abc} - vrijednosti u istom redu koje ne sadrže istu slovnu oznaku značajno se razlikuju na razini od $P < 0,05$.

i sur. (2013.) ukazuju da i dodatak istog probiotika značajno ($P < 0,05$) povećava humoralni imunosni odgovor u brojerskih pilića na cjepivo protiv virusa Newcastleste bolesti u usporedbi s pilićima kontrolne skupine i skupine tretirane probiotikom.

Ispitujući učinke dodavanja probiotika Protexin®, rezultati Hajati i sur. (2014.) upućuju na zaključak da se dodatkom spomenutog suplementa postiže bolji humoralni imunosni odgovor u roditeljskih jedinki Cobb 500 protiv virusa zarazne bolesti burze, avijarne influence i Newcastleste bolesti, ali da bi trebalo provesti istraživanja u cilju procjene kako različiti faktori: starost, genetika, ishrana, zdravstveni status i uvjeti držanja mogu utjecati na primjenu probiotika.

Dodavanje probiotika koji sadrži četiri *Bacillus* speciosa i *Saccharomyces boulardii* (Microguard®) pokazuje pozitivan učinak na tvorbu protutijela protiv virusa Newcastleste bolesti i virusa avijarne influence (Manafi i sur., 2018.). Iako je prema literaturi veći broj istraživanja u kojima se navode pozitivni učinci primjene probiotika na humoralni imunosni odgovor u brojerskih pilića, evidentni su i navodi nekih autora (Dibaji i sur., 2015.) da dodatak probiotika (Biomim i Protexin, respektivno) nema stimulirajući utjecaj na porast protutijela i imunosni odgovor u brojerskih pilića cijepljenih protiv virusa bolesti zarazne bolesti burze, virusa Newcastleste bolesti i virusa Infektivnog bronhitisa, a izostanak stimulacije humoralne imunosti autori vezuju za vrstu i sojeve bakterija prisutnih u probiotiku.

Zaključak

Primjena komercijalnog (*Probios*®) i pokusnog (kultura *Lactobacillus acidophilus* izolirana iz acidofilnog mlijeka, inaktivirani pekarski kvasac, vitamin C i laktoza) probiotika, temeljem rezultata

dobivenih ovim istraživanjem, ukazuje na njihov potencijalno pozitivan učinak na humoralni imunosni odgovor nakon cijepjenja protiv virusa zarazne bolesti burze pilića u tovu, moguće je unaprijediti mehanizam interakcije specifične i nespecifične imunomodulacije.

Literatura

1. AMAKYE-ANIM, J., T. L. LIN, P. Y. HESTER, D. THIAGARAJAN, B. A. WATKINS and C. C. WU (2000): Ascorbic Acid Supplementation Improved Antibody Response to Infectious Bursal Disease Vaccination in Chickens. *Poultry Sci.* 79, 680-688.
2. CARDOSO BITTERN COURT, L., C. CASSIMIRA da SILVA, P. D. S. RANGEL GARCIA, C. SOARES da SILVA ARAUJO, R. de ALBUQUERQUE, L. F. ARAUJO, A. L. S. PASCHOAL CORDOSO and E. N. CASTIGLIONI TESSARI (2014): Effects of the use of probiotics on the immune response and blood parameters of broilers. *Revista Electronica Nutritime* 11, 3450-3464.
3. DIBAJI, S. M., A. SEIDAVI, L. ASADPOUR, F. SANCHEZ CHOPA, V. LAUDADIO, E. CASALINO and V. TURAFELLI (2015): Effect of Biomim®IMBO on the humoral immune response of broiler chickens. *Europ. Poult. Sci.* 79. doi:10.1399/eps.2015.111
4. FULLER, R. (1989): Probiotics in man and animals. *A Review. J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.
5. FULLER, R. (1999): Probiotics for Farm Animals. In: *Probiotics A Critical Review.* Tannock, G. W. (Ed.), Horizon Scientific Press, Wymondham, England (15-22).
6. HAJATI, H., A. HASSANABADI and A. TEIMOURI YANSARI (2014): The Effect of Dietary Supplementation of Prebiotic and probiotic on Performance, Humoral Immunity responses and Egg hatchability in Broiler Breeders. *Poul. Sci. J.* 2, 1-13.
7. KABIR, S. M. L., M. M. RAHMAN, M. B. RAHMAN and S. U. AHMAD (2004): The Dynamics of Probiotics on Growth Performance and Immune Response in Broilers. *J. Poult. Sci.* 3, 61-64.
8. KHAKSEFIDI, A. and T. GHOORCHI (2006): Effect of Probiotic on Performance and Immunocompetence in Broiler Chicks. *J. Poult. Sci.* 43, 296-300.
9. KAVAZOVIĆ, A., E. REŠIDBEGOVIĆ, A. GAGIĆ, F. ALIBEGOVIĆ - ZEČIĆ, Č. CRNKIĆ, T. GOLETIĆ, A. KUSTURA i A. SOFTIĆ (2011): Učinak probiotika na imunosni odziv kod pilića u tovu. *Krmiva* 53, 117-121.
10. LANDY, N. and A. KAVYANI (2013): Effects of Using a Multi-Strain Probiotic on Performance, Immune Response and Cecal Microflora Composition in Broiler Chickens Under Cyclic Stress Condition. *Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 3, 703-708.

11. LOHAKARE, J. D., M. H. RYU, T. W. HAHN, J. K. LEE and B. J. CHAE (2005): Effects of Supplemental Ascorbic Acid on the Performance and Immunity of Commercial Broilers. *J. Appl. Poult. Res.* 14, 10-19.
12. MANAFI, M., M. HADEYATI and S. MIRZAIE (2018): Probiotic *Bacillus* species and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broiler chickens. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 48, 379-389.
13. MINITAB Statistical Software (2003): Release 14 for Windows. State College, Pennsylvania. Copyright © 2000-2003 Minitab Inc.
14. NAYEBPOR, M., P. FARHOMAND and A. HASHEMI (2007): Effects of Different levels of Direct Fed Microbial (*Primalac*) on Growth Performance and Hummoral Response in Broiler Chickens. *J. Anim. Vet. Adv.* 61, 1308-1313.
15. NIKPIRAN, H., M. TAGHAVI, A. KHODADADI and S. S. ATHARI (2013): Influence of Probiotic and Prebiotic on broiler chickens performance and immune status. *J. Nov. Appl. Sci.* 2, 256-259.
16. REŠIDBEGOVIĆ, E., A. KAVAZOVIĆ i A. GAGIĆ (2001): Uticaj probiotskog tretmana na imuni odgovor brojerskih pilića vakcinisanih protiv Gumborske bolesti živom vakcinom Gumbokal IM*SPF. *Veterinaria* 50, 175-180.
17. SALIM, H. M., H. K. KANG, N. AKTER, D. W. KIM, J. H. KIM, M. J. KIM, J. C. NA, H. B. JONG, H. C. CHOI, O. S. SUH and W. K. KIM (2013): Supplementation of direct-fed microbials as an alternative to antibiotic on growth performance, immune response, cecal microbial population, and ileal morphology of broiler chickens. *Poultry Sci.* 92, 2084-2090.

Effect of commercial and experimental probiotics on immune response to Infectious Bursal Disease vaccination in broiler chickens

Aida KAVAZOVIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Emina REŠIDBEGOVIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Abdulah GAGIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Fahira ALIBEGOVIĆ-ZEČIĆ, DVM, PhD, Full Professor, Teufik GOLETIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Čazim CRNKIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Almira SOFTIĆ, DVM, PhD, Associate Professor, Aida KUSTURA, DVM, PhD, Associate Professor, Amira KORO, DVM, Asisstant, University of Sarajevo Veterinary Faculty, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina

The experiment was conducted to evaluate the effect of probiotics in drinking water on the immune response against Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) in broiler chickens. A total of 240 one day old broiler chicks (Cobb 500) were randomly divided into three groups. Two groups (P_1 and P_2) were experimental and one was control (K), each with eight replicate pens of ten chicks. Chicks of the P_1 group were given the commercial probiotic *Probios*[®], soluble poultry powder (Chr. HANSEN A/S, Denmark) and chicks of the P_2 group were given an experimental probiotic prepared according to an original recipe. Chicks of the control group received no treatment. Probiotic treatment was given to the experimental groups during the first three days of life and for three days during the vaccination of chicks. During the experiment, chicks were vaccinated at 14 days of age against IBDV with the TAD GUMBORO[®] vaccine in accordance with

congenital antibody titers. Controlling the immune response against IBDV at 21 days of age, the mean value of the antibody titer was uniform in all three groups of chicks. However, at 33 days of age, a significantly ($P < 0.05$) higher mean antibody titre was found in chicks of the experimental groups compared to the control. Statistically significant differences in mean values of the antibody titers were also confirmed among the experimental groups in favour of the P_1 group. At 42 days of age, at the end of the fattening period, chicks treated with the commercial probiotic *Probios*[®] (P_1) showed significantly ($P < 0.05$) higher antibody titres than the control. A higher antibody value was determined in chicks from the group treated with experimental probiotics, but without statistical significance compared to the control group.

Key words: broiler chickens; fattening; probiotics; antibodies; immune response