

اثر اسپری سطوح مختلف باکتری کشته شده تسوکامورلا اینکوننسیس به جیره غذایی بر عملکرد رشد، خصوصیات مورفومتریک روده باریک و پاسخ ایمنی جوجه بلدرچین‌های ژاپنی واکسینه شده علیه بیماری نیوکاسل

کتایون نفوزی^{۱*}، علی حسن زاده تروجنی^۲، منیره خردامهر^۱، محمدصادق مددی^۲، وحیدرضا رنجبر^۳ و گراهام مک اینتایر^۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۸ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۳۱

^۱ به ترتیب دانشیار و استادیار گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز

^۲ دانش آموخته‌ی دکتری حرفه‌ای دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار گروه علوم درمانگاهی دانشکده دامپزشکی دانشگاه تبریز

^۴ دانش آموخته‌ی دکتری تخصص طيور کلینیک طیور یزد استان یزد

^۵ مرکز بیماری‌های عفونی و سلامت بین المللی موسسه علوم پزشکی ویندیر دانشگاه کالج لندن

*مسئول مکاتبه: E-mail: nofouzi@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: افزودن اکتینومیسیت‌ها به جیره غذایی باعث ارتقاء سطح ایمنی حیوانات مختلف می‌شود. هدف: این مطالعه به منظور ارزیابی اثرات تقویت سیستم ایمنی با استفاده از باکتری کشته شده تسوکامورلا اینکوننسیس افزوده شده بر جیره به عنوان جایگزینی بر عملکرد رشد، تغییرات عیار آنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل، عیار ایمنوگلوبولین A، میزان برخی سایتوکاین‌ها و مورفولوژی روده در بلدرچین ژاپنی می‌باشد. روش کار: در این تحقیق ۱۵۳ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی به طور تصادفی در سه تیمار و سه تکرار و در هر تکرار ۱۷ قطعه جوجه قرار داده شدند. گروه‌های باکتریایی شامل (۱) گروه کنترل یا بدون باکتری، (۲) گروه با دوز پایین، و (۳) گروه با دوز بالا بود. نتایج: گروه‌های دریافت کننده باکتری، از نظر عملکرد رشد با گروه کنترل، تفاوت معنی‌داری در سه دوره زمانی ۱-۱۴، ۱-۲۸ و ۱-۴۲ روز نداشتند هرچند در کل در مقایسه با گروه کنترل افزایش وزن به ویژه در گروه دریافت کننده دوز بالا دیده می‌شد. در ارزیابی IL-4 و INF- α در سرم گروه‌های مختلف آزمایشی، در روزهای ۷ و ۴۲، تفاوت معنادار دیده شد ($P < 0.05$). در اندازه گیری IgA گروه دریافت کننده دوز بالا، در روز ۴۲ تفاوت معنی‌داری نسبت به دو گروه دیگر داشت. باکتری تسوکامورلا اینکوننسیس باعث به وجود آمدن اختلاف آماری معنی‌داری در عیار آنتی‌بادی علیه نیوکاسل در سن ۴۲ روزگی بین گروه کنترل با گروه‌های دریافت کننده دوز پایین شده است. همچنین گروه‌های دریافت کننده باکتری کشته شده در نمونه‌های بافتی گرفته شده از قسمت‌های مختلف روده با یکدیگر و با گروه کنترل در شاخص‌های طول پرز، ضخامت پرز، عمق کریپت، تعداد کریپت و تعداد سلول‌های جامی تفاوت معنی‌داری نداشتند ($P < 0.05$). نتیجه‌گیری نهایی: با توجه به یافته‌های ماکروسکوپی و ایمنولوژیک، می‌توان نتیجه گرفت که باکتری کشته شده تسوکامورلا اینکوننسیس، بدون به وجود آوردن ضایعات پاتولوژیک خاص، باعث ارتقا سطح ایمنی و مورفولوژی روده در بلدرچین ژاپنی شده است.

واژگان کلیدی: بلدرچین ژاپنی، پاسخ ایمنی، تسوکامورلا اینکوننسیس، مورفولوژی روده، نیوکاسل

مقدمه

در سال‌های اخیر به دلیل رشد روز افزون صنعت مرغداری اهمیت بیماری نیوکاسل بیشتر مورد توجه قرار گرفته است و همواره به عنوان مهمترین عامل تهدید کننده طیور صنعتی و سنتی مطرح بوده است. بیماری نیوکاسل توسط سروتیپ ۱ (پارامیکسو ویروس‌های^۱ PMV-1) پرندگان ایجاد می‌گردد (الکساندر ۲۰۰۰). تولید تجاری بلدرچین، در کشورهای زیادی معمول شده است و مطالعات زیادی نشان می‌دهد که این گونه از پرندگان به آسانی می‌توانند به شرایط تجاری سازگار شوند و تولید گوشت و تخم مرغ بالایی داشته باشند (لیما و همکاران ۲۰۰۴). هر چند در خصوص برنامه‌های کنترل سلامتی این گونه، اطلاعات محدودی وجود دارد. به علاوه، همان گونه که در خصوص طیور گوشتی و بوقلمون شاهد هستیم، در آینده بلدرچین هم به صورت گسترده تولید خواهد شد و تراکم بالای پرند در بعضی مناطق منجر به گسترش بیماری‌های عفونی خواهد شد. امروزه، مزارع و غذاهای ارگانیک برای انسان اهمیت زیادی دارند، چرا که مصرف بی رویه آنتی بیوتیک‌ها، جهت درمان بیماری‌ها و بهداشت دام منجر به ایجاد مقاومت دارویی نسبت به عوامل عفونی شده و به همین دلیل مقبولیت محصولاتی که از مواد طبیعی حاصل می‌شوند، چه برای مصرف انسان و چه برای دام افزایش یافته است. در میان باکتری‌های هوازی راسته *اکتینومیستال*^۲ تعدادی باکتری شناخته شده‌اند که ترکیبات آنتی‌ژنی موجود در فرم کشته شده آنها قادر به ایجاد اثرات مفید در انسان، حیوانات و آبزیان می‌باشند (هانسرانی و همکاران ۲۰۱۰ ک مارو و همکاران ۲۰۱۱ و ترس و همکاران ۲۰۱۲)، از آن جمله می‌توان به باکتری *تسوکامورلا اینکونسیسی* اشاره نمود. مطالعات محدودی در خصوص اثرات این باکتری در فرم کشته شده وجود دارد. در موش آزمایشگاهی، تیپ ۲ دیابت

ملیتوس و چاقی با استفاده از باکتری کشته شده *تسوکامورلا اینکونسیسی* بهبود می‌یابد (ترس و همکاران ۲۰۱۲). در مطالعه دیگر متعاقب جراحات تجربی در شریان کاروتید موش با استفاده از باکتری کشته شده *تسوکامورلا اینکونسیسی* و تقویت سیستم ایمنی ایجاد شده با این باکتری، از بروز هایپرپلازی *myointimal* ممانعت گردید (هانسرانی و همکاران ۲۰۱۰). در سگ‌ها، استفاده از *تسوکامورلا اینکونسیسی* علیه آلرژی ناشی از نیش کک موثر نبوده است (مارو و همکاران ۲۰۱۱). در پرورش آبزیان در ماهی کوئی^۲، *تسوکامورلا اینکونسیسی* باعث افزایش غلبه بر تنش در ماهی شده است (استنفورد و استنفورد ۲۰۱۲). باکتری *گوردینیا برونشیا لیس* که جز اکتینومیست‌ها می‌باشد، در ماهی قزل آلا منجر به افزایش رشد و بهبود فراسنجه‌های بیوشیمیایی شامل آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و آنزیم‌های کبدی شده است (شعبانزاده و همکاران ۲۰۱۶). همچنین نفوذی و همکاران (۲۰۱۹) اثر *تسوکامورلا اینکونسیسی* را بر روی قزل آلا رنگین کمان بررسی کردند و اثرات خوبی روی رشد، شاخص‌های ایمنی و ساختار روده مشاهده شد. با توجه به فقدان مطالعات در خصوص اثرات مفید باکتری کشته شده *تسوکامورلا اینکونسیسی* در طیور و با توجه به توسعه روزافزون پرورش تجاری و صنعتی بلدرچین، مطالعه حاضر به عنوان اولین پژوهش جهت بررسی اثرات باکتری بر روی سایتوکاین‌های بلدرچین و کنترل بیماری نیوکاسل در بلدرچین مدنظر قرار گرفته است. بنابراین، هدف این تحقیق بررسی اثرات باکتری *تسوکامورلا اینکونسیسی* بر روی رشد و پارامترهای ایمنولوژیک سرم در جوجه بلدرچین های ژاپنی تحت شرایط محیطی نرمال می‌باشد.

¹Paramyxovirus²Actinomycetale

مواد و روش‌ها

انتخاب دوز باکتری بر اساس کارهای قبلی بر روی موش، موش صحرائی، سگ، انسان و ماهی قزل آلا و با مقیاسه وزن بلدرچین با این موجودات صورت پذیرفت (فونتانلا و همکاران، ۲۰۰ فونتانلا و همکاران ۲۰۰۶، ۶، هانسرانی و همکاران ۲۰۱۰، مارو و همکاران، ۲۰۱۱، ترس و همکاران ۲۰۱۲، اسمادینی و همکاران ۲۰۱۴، شعبانزاده و همکاران ۲۰۱۶، نفوذی و همکاران ۲۰۱۹). قبل از تنظیم جیره‌ها، ترکیب شیمیایی مواد خوراکی استفاده شده، اندازه گیری شد (AOAC, 2005) جیره های آزمایشی بر اساس ذرت-کنجاله سویا تنظیم شدند (جدول ۱). نیاز مواد مغذی جیره بر اساس احتیاجات مواد مغذی بلدرچین ژاپنی، در نظر گرفته شد (دیل، ۱۹۹۴).

جدول ۱- ترکیب مواد تشکیل دهنده و محتوای مواد مغذی

جیره غذایی بر پایه ذرت و کنجاله سویا

Table 1- Composition and nutrient contents of corn-soybean based diets

Feed ingredients	1-14 d	15-42 d
Ingredient (%)		
Corn	46.45	52.45
Soybean meal	48	42
Poultry fat	1.50	1.5
Dicalcium phosphate	1.2	1.2
Calcium carbonate	1.3	1.3
Salt	0.20	0.20
DL-Methionine	0.20	0.20
Vitamin premix ¹	0.50	0.50
L-Lysine HCL	0.15	0.15
Mineral premix	0.5	0.5
Total	100	100
Calculated		
ME (kcal/kg)	2912	2910
CP (%)	23.1	20.2
Lys (%)	1.44	1.22
Met + Cys (%)	0.92	0.85
Calcium (%)	0.97	0.93
Nonphytate phosphorus (%)	0.49	0.47

واکسیناسیون بلدرچین ها در روز ۱۰ پرورش با واکسن B1 و در روز ۲۰ پرورش با واکسن لاسوتا از طریق قطره چشمی انجام شد و همه جوجه‌ها واکسینه شدند. وزن پرندگان و غذای مصرفی هر هفته اندازه گیری، و ضریب تبدیل غذا محاسبه شد (منافی و همکاران ۲۰۱۸). در پایان دوره پرورش (۴۲ روزگی)، به منظور تعیین

در این مطالعه ۱۵۳ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی *Coturnix Japonica* به طور تصادفی در سه تیمار و سه تکرار و در هر تکرار ۱۷ قطعه جوجه قرار داده شدند و گروه کنترل بدون افزودن باکتری به جیره، گروه دریافت کننده ی دوز پایین باکتری 10^6 CFU و گروه دریافت کننده دوز بالای باکتری 10^6 CFU به ازای هر پرند در هر روز دریافت کردند. تمام گروه های مورد آزمایش با جیره آغازین (۱-۱۴ روزگی) و جیره رشد (۱۵-۴۲ روزگی) تغذیه شدند. دمای ۲۳ درجه سانتی گراد و دوره نوری ۱۲ ساعت نور و ۱۲ ساعت تاریکی در طی مطالعه فراهم شد و جوجه ها به آب و غذا دسترسی آزاد داشتند. دوره پرورشی ۴۲ روزه بود و در داخل قفس انجام گرفت. نظر به این که جوجه ها از هر دو جنس انتخاب شده بودند و تعیین جنسیت بلدرچین در یک روزگی دشوار می باشد، لذا برای حذف فاکتور جنسیت، در هفته های آتی در حین نمونه گیری سعی شد از هر دو جنس به یک نسبت نمونه گیری شود. جوجه ها از شرکت های مولد بلدرچین منطقه در یک روزگی و با وزن تقریبی $1 \pm 7/8$ گرم تهیه شدند. از قفس های با ابعاد قفس $81 \times 56 \times 61$ سانتی متر جهت پرورش بلدرچین استفاده شد. برای هر قفس یک آبخوری کله قندی و یک دان خوری ناودانی مخصوص بلدرچین قرار داده شد. باکتری تسوکامورلا اینکونسیس کشت شده و کشته شده با حرارت اتوکلاو از شرکت BioEos (Kent, UK) تهیه شد. باکتری، با دوزهای 10^6 CFU و 10^6 CFU به ازای هر پرند به صورت روزانه با تهیه سوسپانسیون در آب مقطر استریل، بر روی کل دان گروه‌های مربوطه اسپری شد، بدین صورت که ابتدا به صورت اسپری ریزبا بخشی از دان مخلوط شده و سپس دان مزبور با کل دان مصرفی به خوبی مخلوط شد. دان مصرفی در پنج نوبت در طول روز مورد استفاده قرار گرفت. با دو برار شدن وزن پرند، میزان باکتری استفاده شده نیز، دو برابر می شد.

کریپت روده، تعداد کریپت روده و تعداد سلول‌های جامی)، نمونه برداری انجام شد. از بافت‌های مورد نظر ابتدا بازرسی دقیق خارجی به عمل آمد و سپس جهت مطالعات هیستوپاتولوژی از آنها نمونه برداری انجام شد. بافت‌ها در فرمالین بافر ۱۰٪ فیکس شدند و بعد از پاساژ بافت‌ها به روش روتین، از بلوک‌های پارافینی، مقاطع ۵-۶ میکرونی از آنها تهیه شد. مقاطع مذکور با رنگ آمیزی روتین هماتوکسیلین و ائوزین رنگ آمیزی شدند و به وسیله میکروسکوپ نوری مورد مطالعه قرار گرفتند. اندازه‌گیری فاکتورهای هیستومورفومتری در بافت روده بر اساس مطالعه پیشین انجام شد (آپتکمن و همکاران ۲۰۱۱) که موارد ذکر شده، در ۵ فیلد و در هر فیلد در ۵ پرز مورد ارزیابی قرار گرفت.

در پایان داده‌های به دست آمده در گروه‌های مورد بررسی، با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه‌ی ۲۲ و با استفاده از روش تجزیه و تحلیل واریانس یک طرفه مورد ارزیابی آماری قرار گرفتند.

آنالیز آماری داده‌های به دست آمده از فاکتورهای هیستومورفومتری با استفاده از تست انوای یک طرفه (SPSS version 22, IL, USA) با در نظر گرفتن $P < 0.05$ انجام شد.

نتایج و بحث

نتایج مربوط به عملکرد رشد در جدول ۲ نشان داده شده است. در کل افزایش وزن بدن جوجه‌ها تحت تأثیر تیمارهای آزمایشی قرار نگرفت. نتایج این آزمایش نشان داد تغذیه با مقادیر مختلف باکتری، افزایش وزن بدن بلدرچین‌ها را در مقایسه با گروه کنترل تحت تأثیر قرار نمی‌دهد ($P \leq 0.05$) که با نتایج گوکلو و همکاران (۲۰۱۱) و نیز صداقت و کریمی (۲۰۱۷) هم‌خوانی داشت. این یافته‌ها با نتایج به دست آمده در موش سوری نیز هم‌خوانی داشت (نفوذی و همکاران ۲۰۱۶) ولی با نتایج پژوهش لوکاپیرناساری و همکاران (۲۰۱۷) و گوپتا و همکاران (۲۰۱۶) مغایر بود. همچنین با نتایج نفوذی و

غلظت سرمی آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل، سطح ایمونوگلوبولین A (IgA)، عیار سرمی سایتوکاین‌های IL-4، IFN- α و IFN- γ ، از ورید بال چهار پرنده در هر تیمار خون‌گیری شد. خون‌ها به لوله‌ها منتقل شدند و پس از سانتریفیوژ به مدت ۵ دقیقه در ۳۰۰ دور، سرم آن‌ها جدا شد. سرم‌ها به میکروتیوب منتقل و داخل فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان آنالیز قرار داده شد. غلظت سرمی آنتی‌بادی ضد ویروس نیوکاسل به روش مهار هم‌گلوتیناسیون و روش الیزا و سطح ایمونوگلوبولین A، عیار سرمی سایتوکاین‌های IL-4، IFN- α و IFN- γ با روش الیزا و با استفاده از کیت‌های تجاری مربوط به شرکت (cusabio) ارزیابی شدند. نظر به این که اینترفرون آلفا و گاما به صورت سینرژیک در افزایش فعالیت ماکروفاژها دخیل هستند و از این طریق اثر ضدویروسی دارند، این سایتوکاین‌ها برای ارزیابی انتخاب شدند. جهت ارزیابی عیار آنتی‌بادی ضد نیوکاسل از روش مهار هم‌گلوتیناسیون طبق روش الکساندر و همکاران (۱۹۹۳) در روزهای ۱، ۷، ۱۴، ۲۸، ۳۵ و ۴۲ استفاده شد. جهت ارزیابی عیار سرمی آنتی‌بادی ضد نیوکاسل به روش الیزا نیز کیت الیزای شرکت IDEXX مورد استفاده قرار گرفت. قرائت نتایج با دستگاه الیزا ریدر مدل Hipervion (MPR 4+) صورت پذیرفت. عیار آنتی‌بادی طبق دستورالعمل شرکت سازنده محاسبه شد. به منظور بررسی ضایعات هیستوپاتولوژیک احتمالی در اثر استفاده از باکتری ایمونژن، در روزهای ۱۴، ۲۸ و ۴۲ مطالعه، از هر تکرار، دو پرنده ذبح شده و از اندام‌های داخلی شامل کبد، کلیه، قلب و مغز، به منظور مطالعه اثرات احتمالی هیپاتوتوکسیک، نفروتوکسیک، کاردیوتوکسیک و نوروتوکسیک باکتری، نمونه برداری بافتی انجام شد. همچنین، به دلیل تجویز خوراکی باکتری در دان جوجه‌ها، از قسمت‌های مختلف روده کوچک (دودنوم، ژژنوم و ایلیوم) به منظور مطالعه و مقایسه هیستومورفومتری (شامل طول پرز، ضخامت پرز، عمق

شرایط تجاری باشد. سیستم ایمنی، بدن را در برابر عوامل بیگانه حمایت می‌کند و از حمله ارگانیزم‌های بیماریزا مصون نگه می‌دارد. پاسخ عیار آنتی بادی، شاخصی برای بررسی وضعیت ایمنی پرندگان می‌باشد (جنو و همکاران ۲۰۰۸). بنابراین درک بهتر سیستم ایمنی بلدرچین، ممکن است برای بهره‌گیری از بلدرچین به عنوان حیوان آزمایشگاهی و بهبود کیفیت آن در مزارع پرورش بلدرچین مفید باشد.

همکاران بر روی ماهی قزل‌آلا مغایرت داشت (نفوذی و همکاران ۲۰۱۹). بی‌اثر بودن باکتری بر روی عملکرد رشد بلدرچین در مطالعه حاضر، به دلایل مختلفی مانند میزان باکتری مورد استفاده، می‌تواند باشد. به دلیل فقدان علائم بالینی، بلدرچین‌ها در سراسر دوره پرورشی سالم و بدون داشتن علامت مشخصی از یک بیماری محسوب شدند. البته شرایط موجود احتمال دارد به دلیل تراکم کم پرند و بالا بودن شرایط بهداشتی قفس‌های استفاده شده در این مطالعه در مقایسه با

جدول ۲- اثر *Tsukamurella inchonensis* بر فراسنجه‌های عملکرد در دوره‌های مختلف در گروه‌های مختلف آزمایش

بلدرچین ژاپنی

Table 2- Effect of *Tsukamurella inchonensis* administration on performance parameters on different days in various experimental groups of Japanese quail

Days	parameters	Experimental groups			P Value
		Control	Low dose (10 ⁵)	High dose (10 ⁶)	
1-14	BWG	68±1.30	69.5±3.42	69.3±2.41	0.903
	FI	161.54	161.19	144.05	
	FCR	2.37	2.31	2.07	
1-28	BWG	156.9±5.05	156.4±4.67	162.8±5.45	0.532
	FI	418.34	437.19	350.79	
	FCR	2.66	2.79	2.15	
1-42	BWG	223.2±13.38	224.9±3.92	236.8±15.40	0.691
	FI	692.54	756.79	581.64	
	FCR	3.10	3.36	2.45	

BWG: body weight gain (mean ±SD, g/bird); FI: feed intake (g/bird); FCR: feed conversion ratio.

زمان کاهش می‌یابد، و در جریان واکنش‌های واکنس B1 که واکنس ضعیفی است استفاده شده و معمولاً واکنس‌های کشته تزریقی هم عیار بالایی نمی‌دهند، لذا ۳۵ روز طول می‌کشد تا به عیار ۴ برسد و این کاهش تیتراژ در روزهای پیشین منطقی می‌باشد. بررسی نتایج جدول ۲ و ۴ بیانگر این است که تفاوت بین گروه‌ها تا روز ۴۲ معنی‌دار نمی‌باشد ولی در روز ۴۲ گروه دریافت‌کننده باکتری با دوز پایین، عیار آنتی‌بادی بالایی علیه نیوکاسل داشت. نتایج این پژوهش با نتایج منافی و همکاران (۲۰۱۶) هم خوانی داشت که با استفاده از باکتری *باسیلوس سوبتالیس* در جیره غذایی بلدرچین

بلدرچین نسبت به بیماری نیوکاسل حساس می‌باشد و از طرفی در انتشار این بیماری به طيور نقش دارد، لذا واکنس‌های بلدرچین‌ها را در برابر بیماری محافظت کرده و از انتقال بیماری به طيور جلوگیری می‌کند. اندازه‌گیری سطح آنتی بادی سرم جهت ارزیابی کیفیت واکنس‌های نیوکاسل کاربرد زیادی دارد (مس و همکاران ۱۹۹۸). به دنبال اولین واکنس‌های بلدرچین (زنده) عیار آنتی‌بادی ضد نیوکاسل افزایش یافته است و در روز ۴۲ در بالاترین حد خود بوده است. نظر به این که در روز اول عیار آنتی‌بادی در ارتباط با عیار آنتی بادی مادری می‌باشد، که به مرور

ژاپنی، عیار آنتی بادی ضد ویروس نیوکاسل افزایش یافته بود. این یافته‌ها نشان می‌دهد که امکان دارد ایمنی بلدرچین موثر باشد.

جدول ۳- اثر باکتری *تسوکامورلا اینکوننسیس* بر تولید آنتی بادی علیه نیوکاسل در بلدرچین‌های ژاپنی (روش مهار هم‌گلوتیناسیون)

Table 3- Effects of dietary heat-killed *Tsukamurella inchonensis* on antibody titers to Newcastle disease virus (NDV) in Japanese quail (Haemagglutination Inhibition test)

Item	Heat-killed <i>Tsukamurella inchonensis</i> supplementation Bacilli/bird/day		
	Control	Low dose (10^5)	High dose (10^6)
Antibody titers to NDV(log₂)			
d 1	3.77 ± 1.56	3.77 ± 1.56	3.77 ± 1.56
d 7	1.55 ± 1.42	2.11 ± 1.26	0.88 ± 0.33
d 14	2.88 ± 1.69	1.77 ± 0.83	2 ± 0
d 21	2.22 ± 2.10	2.66 ± 1.11	2.55 ± 0.72
d 28	2.88 ± 2.26	3.66 ± 0.86	3.55 ± 0.52
d 35	4.33 ± 1.8	4.66 ± 0.86	4.22 ± 1.2
d 42	5 ± 1.11	5.66 ± 0.5	5.33 ± 0.7

a- cMeans within a row with no common superscripts differ significantly ($P \leq 0.05$)

1Japanese quails were vaccinated with NDV vaccine at 10 and 20 d of age.

جدول ۴- ارزیابی پاسخ ایمنی به ویروس بیماری نیوکاسل با روش الیزا در روزهای مختلف در بلدرچین ژاپنی که 10^5 و 10^6 باسیل از باکتری کشته شده با حرارت *تسوکومورلا اینکوننسیس* را هر پرنده به صورت روزانه دریافت کرده بودند (میانگین \pm انحراف معیار)

Table 4- Evaluation of immune response to Newcastle disease virus by ELISA method at different days in Japanese quail receiving 10^5 or 10^6 bacilli of heat-killed *Tsukamurella inchonensis* per day per bird (mean \pm SEM)

Group	Age (days)						
	D 1	D 7	D 14	D 21	D 28	D 35	D 42
Control	3152 ± 284	2027 ± 347 ^a	444 ± 415	2157 ± 828	2163 ± 645	1651 ± 285	2382 ± 612 ^a
Low dose (10^5)	3152 ± 284	2667 ± 238 ^b	472 ± 437	2474 ± 1754	2253 ± 668	1764 ± 384	4897 ± 2853 ^b
High dose (10^6)	3152 ± 284	2701 ± 594 ^b	526 ± 323	2147 ± 319	2914 ± 1379	1856 ± 361	3988 ± 960 ^{ab}

^{ab}: Different superscripts within columns indicate significant difference among doses of bacteria ($P < 0.05$).

تولید شده توسط سلول‌های B را به عنوان اولین دفاع اکتسابی جهت خنثی کردن سموم، ویروس‌ها و باکتری‌های بیماری‌زا استفاده می‌کنند (مرینو-گوزمن ۲۰۱۷). در مطالعه حاضر، در طی هفته اول مصرف باکتری، سطح IgA افزایش چندانی در مقایسه با گروه کنترل نداشته است (جدول ۵). دلیل این عدم افزایش این است که در سه تا هفت روز بعد از تولد جوجه، تعداد سلول‌های B تولید شده در بورس فابرسیوس در حدی

ایمنوگلوبولین A، یکی از کلاس‌های عمده آنتی بادی است که در ترشحات مخاطی بیشتر حیوانات وجود دارد و به عنوان اولین سد دفاعی در برابر مهاجمینی که از طریق تنفسی یا بلع وارد می‌شوند، به حساب می‌آید. همچنین IgA در غلظت‌های بالایی در سرم بیشتر گونه‌ها یافت می‌شود، که در آنجا به عنوان دومین سد دفاعی جهت محدود کردن عوامل بیماری‌زایی که سد مخاطی را شکسته‌اند، عمل می‌کند. گونه‌های مهره داران، IgA

هم خوانی دارد ولی با نتایج بیلی و همکاران (۲۰۰۷) مغایرت دارد.

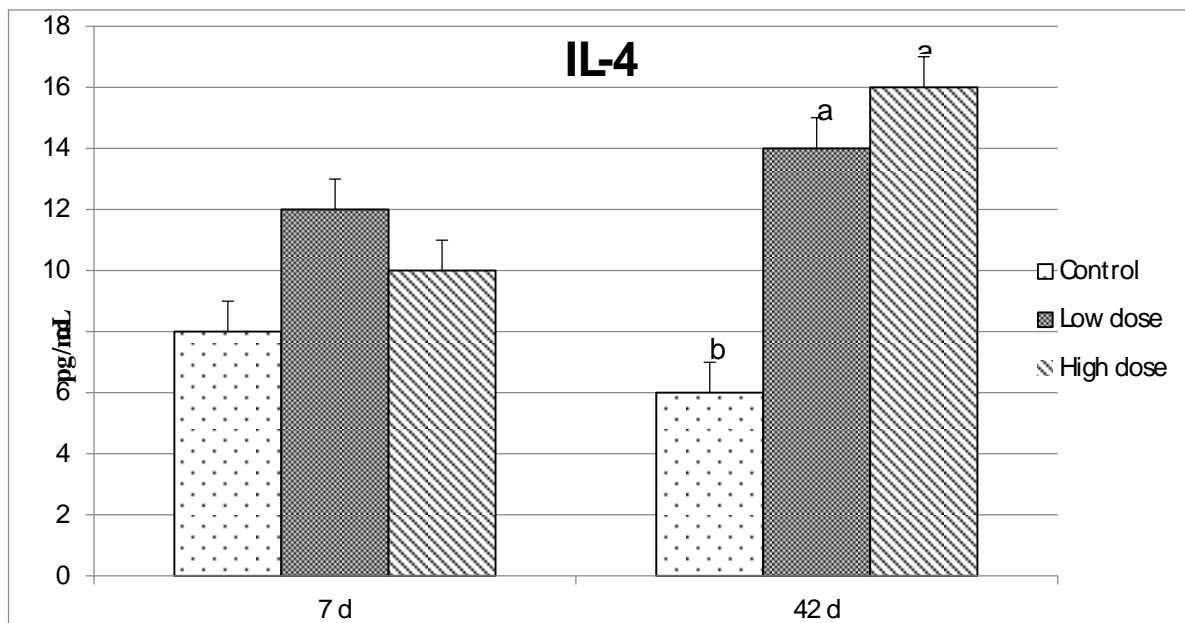
جدول ۵- مجموع میزان IgA در روزهای مختلف در بلدرچین های ژاپنی که به میزان 10^5 یا 10^6 CFU از باکتری تسوکامورلا اینکوننسیس را هر پرنده در هر روز دریافت کرده اند

Table 5- Total IgA levels in different days from Japanese quail receiving 10^5 or 10^6 bacilli of heat-killed *Tsukamurella inchonensis* per bird per day (ng/mL)

Group	Age (days)	
	D 7	D 42
Control	222 ± 57	198 ± 70 ^a
Low dose (10^5)	339 ± 86	249 ± 24 ^a
High dose (10^6)	472 ± 164	10163 ± 3978 ^b

^{ab}: Different superscripts within columns indicate significant difference among doses of bacteria ($P < 0.05$).

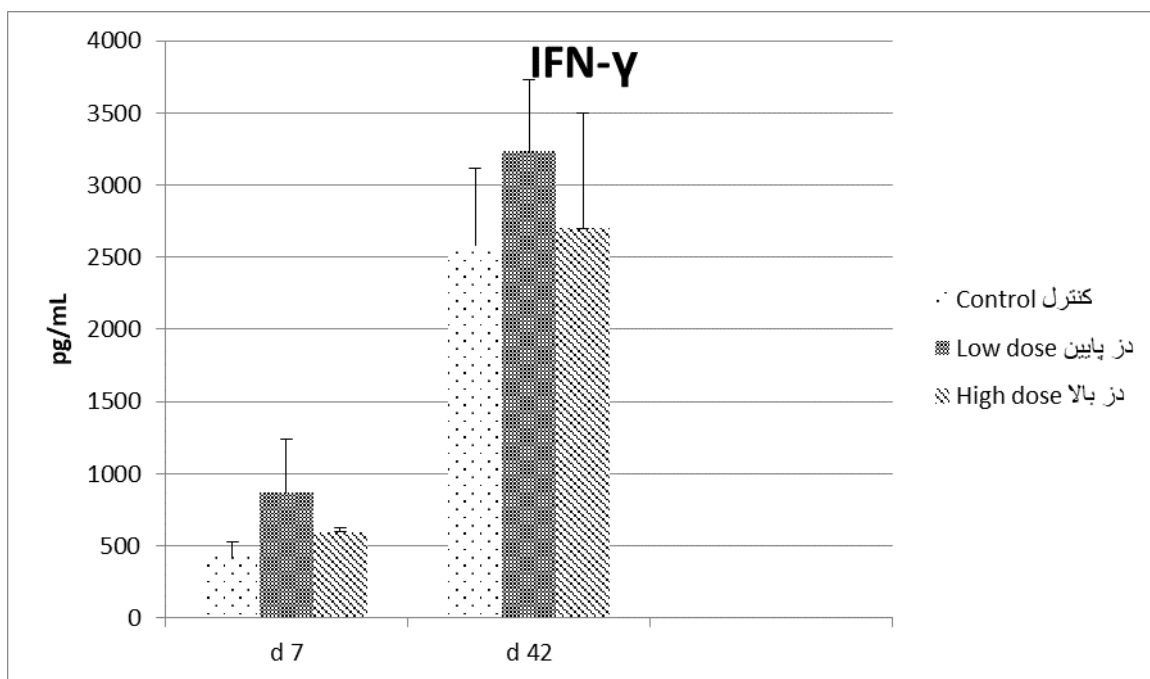
نیست که در بافت های دیگر مستقر شوند (ژنگ و همکاران ۲۰۱۵). به همین دلیل در طی هفته اول، IgA به میزان کمی تولید می شود. از روز هفت بعد از تولد، سطح IgA افزایش می یابد. در روز ۴۲ میزان IgA در گروه با دوز بالا به طور معنی داری بیشتر از دو گروه دیگر می باشد. نظر به این که سایتوکاین ها، تولید IgA را افزایش می دهند (فولر ۱۹۸۹)، احتمال دارد بالا بودن سطح سایتوکاین در گروه با دوز بالا در مقایسه با سایر گروه ها منجر به افزایش سطح ایمنوگلوبین A شده است که در افزایش سطح ایمنی مخاطی، به ویژه به عنوان سدی علیه میکروارگانیزم های بیماری زا اهمیت دارد. بالا بودن عیار IgA شش هفته پس از واکسیناسیون، در گروه با دوز بالا، بیانگر اثرات طولانی مدت این باکتری در دوز بالا می باشد که با نتایج لیو و همکاران (۲۰۰۱)



شکل ۱- IL-4 اندازه گیری شده در سرم در گروه های مختلف آزمایش دریافت کننده باکتری تسوکامورلا اینکوننسیس در روزهای ۷ و ۴۲

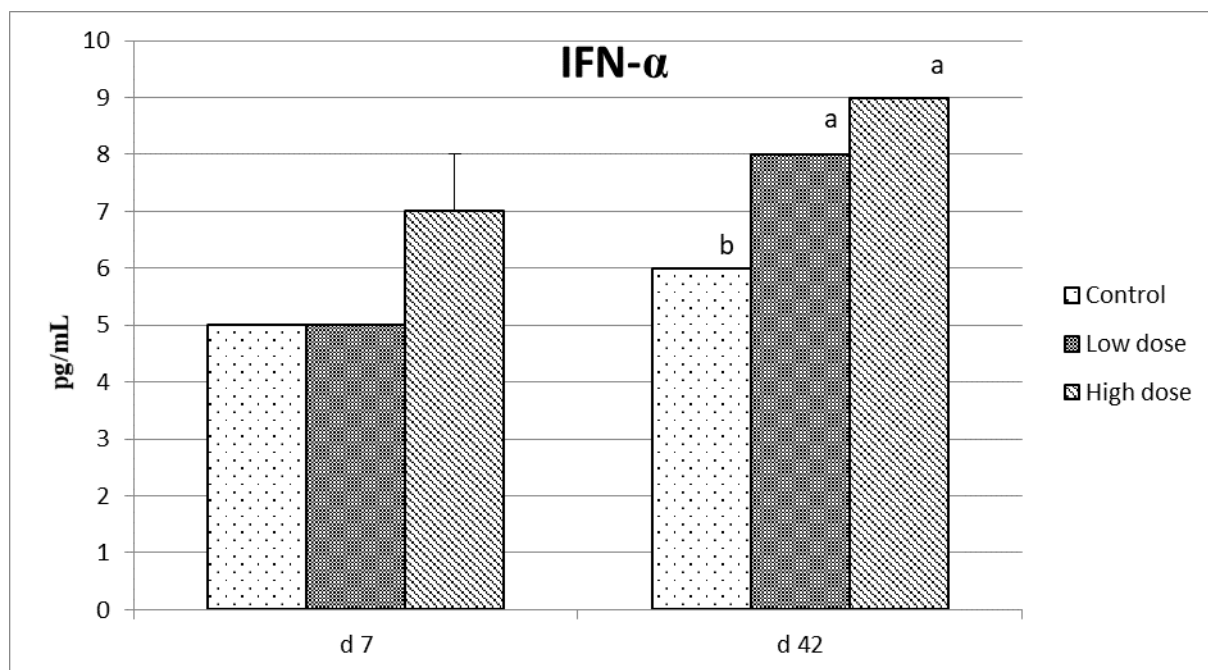
Figure 1- IL-4 production was measured in blood in days 7 and 42. The cytokine response to heat killed *Tsukamurella inchonensis* was compared with control group

^{ab}: Different superscripts within columns indicate significant difference among doses of bacteria ($P < 0.05$).



شکل ۲ - اندازه‌گیری شده در سرم در گروه‌های مختلف آزمایش در روزهای ۷ و ۴۲.

Figure 2- IFN-γ production was measured in blood. The cytokine response to heat killed *Tsukamurella inchonensis* was compared with control group



شکل ۳ - اندازه‌گیری شده در سرم در گروه‌های مختلف آزمایش در روزهای ۷ و ۴۲

Figure 3- IFN-α production was measured in blood. The cytokine response to heat killed *Tsukamurella inchonensis* was compared with control group

a: significant statistical difference with the control group; b: significant statistical difference between low dose and high dose groups

التهاب دارند و وقتی میزان آنها به هم می‌خورد، عوارض پاتولوژیک رخ می‌دهد (سان و همکاران ۲۰۱۸). میزان

اینترلوکین‌ها جزئی ترکیبات مهم ایمنی به حساب می‌آیند. آنها عملکردهای مهمی در التهاب و وضعیت عمومی

۷ در کنترل عفونت و محدود کردن عوامل بیماریزا، نقش عمده‌ای دارد (دیمیر-پوئیسون و همکاران ۲۰۰۴). نتایج ارائه شده در این تحقیق بیانگر این است که باکتری تسوکومورلا اینکونسیس نقش زیادی در تغییر سطح IFN- γ ندارد. این نتایج با پژوهش فوجیوارا و همکاران (۲۰۰۹) هم خوانی دارد که با مصرف باسیلوس سوبتالیس در جیره طیور گوشتی، تغییر معنی داری را در سطح اینترفرون گاما مشاهده نکردند. مطالعات قبلی نشان داده است که IFN- α ای که به صورت خوراکی یا داخل رگی به طیور تجویز شده است، باعث مهار ویروس‌هایی چون آنفلوآنزای پرندگان^۶، ویروس بیماری نیوکاسل، ویروس برونشیت عفونی طیور^۷ و ویروس سارکوم رز^۸ و ویروس بیماری مارک^۹ می شود (جیانگ و همکاران ۲۰۱۱). در مطالعه حاضر، در روز ۴۲ پرورش هر دو گروه تیمار اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل داشتند. IFN- α باعث کاهش پاسخ‌های پیش التهابی می‌گردد که دلیل آن به کاهش تکثیر ویروس برمی‌گردد. عوامل ویروسی باعث تخریب بورس فابرسیوس^{۱۰} می‌شوند که در نهایت منجر به کاهش ایمنی همورال طیور می‌شود. بیشتر باکتری‌ها با تنظیم کنترل سایتوکاین‌های پیش التهابی و ضدالتهابی، به ایمنی میزبان سود می‌رسانند (فولیگنه و همکاران ۲۰۱۰).

سایتوکاین‌های Th1 شامل IFN- γ و IFN- α (به عنوان سایتوکاین‌های پیش التهابی شناخته می‌شوند) و سایتوکاین Th2، IL-4 (به عنوان سایتوکاین ضدالتهابی شناخته می‌شود) در این مطالعه اندازه گیری شد. اینترفرون‌ها به دلیل ویژگی ضد ویروسی که دارند، به این نام، اسم گذاری شده اند. دو کلاس اینترفرون‌ها وجود دارند: اینترفرون‌های تیپ ۱ (IFN- α و IFN- β) که به دلیل فعالیت ضدویروسی شناخته شده هستند و اینترفرون‌های تیپ ۲ یا IFN- γ که علاوه بر فعالیت ضدویروسی، در فعال شدن ماکروفاژها و تنظیم سیستم ایمنی، نقش حیاتی دارند (ویگلی و کیسر ۲۰۰۳). در طی هفت روز اول، افزایش معنی داری در سطح سایتوکاین‌ها مشاهده نشد. در طول دوره پرورشی، افزودن باکتری تسوکومورلا اینکونسیس به جیره پایه، در روز ۴۲ باعث افزایش معنی‌دار سطح اینترلوکین-۴ در هر دو گروه دریافت کننده باکتری شده است. اینترلوکین-۴ در جریان تحریک لنفوسیت‌های B و تکثیر لنفوسیت‌های T، و همچنین در تشکیل سلول‌های T کمکی^{۱۱} نقش به سزایی دارد (سان و همکاران ۲۰۱۸). در جریان آسیب‌های بافتی و بیماری‌های مرتبط با TH2 که توسط عوامل بیماری‌زای انگلی و خارج سلولی ایجاد می‌شود، سطح اینترلوکین-۴ افزایش می‌یابد. IFN- γ سایتوکاینی چندشکلی است که در فعال کردن ماکروفاژها و نوتروفیل‌ها در مراحل اولیه عفونت با میکروارگانیزم‌ها نقش دارد (کوگات و همکاران ۲۰۰۵). همچنین IFN- γ در فعال کردن ماکروفاژها جهت تولید نیتریک اکساید نقش دارد (هی و همکاران ۲۰۱۱). IFN- γ تمایز سلول‌های T به Th1 را نیز بر عهده دارد (سان و همکاران ۲۰۱۸). بیان IFN- γ طیور، مانند آنچه در پستانداران دیده می‌شود، با عفونت‌های باکتریایی، ویروسی و انگلی همراه است و ثابت شده است که IFN-

^۶Avian Influenza

^۷Infectious bronchitis

^۸Rous sarcoma virus

^۹Marek disease

^{۱۰}bursa of Fabricius

^{۱۱}Interferon

^{۱۲}T helper2

^{۱۳}Macrophage

جدول ۶- بررسی اثر افزودن سطوح مختلف باکتری *تسوکامورلا اینکوننسیس* بر شاخص‌های هیستومورفومتریک بخش‌های مختلف روده بلدچین زاپنی در روز ۱۴ میانگین \pm انحراف از میانگین (SEM)، ($P \leq 0.05$)

Table 6- The histomorphometrical measurement of different parts of small intestine in different groups on 14 days after exposure with different doses of *Tsukamurella inchonensis*

Intestinal sections	Treatments	Height (μm) ($\times 100$)	Width (μm) ($\times 100$)	Crypt number ($\times 400$)	Crypt depth (μm) $\times 100$	Goblet number ($\times 400$)
Duodenum	Low dose	5.16 \pm 0.98	0.94 \pm 0.03	7.77 \pm 0.40	0.80 \pm 0.57 ^a	16.55 \pm 1.59
	High dose	7.12 \pm 0.65 ^a	0.96 \pm 0.08	7.80 \pm 0.37	0.88 \pm 0.07 ^a	17.00 \pm 0.88
	control	2.6 \pm 0.33	0.91 \pm 0.05	6.55 \pm 0.52	0.42 \pm 0.37	13.60 \pm 1.32
Jejunum	Low dose	3.59 \pm 0.10	0.94 \pm 0.04	7.40 \pm 0.33	0.72 \pm 0.05 ^a	19.50 \pm 1.32
	High dose	4.17 \pm 1.03 ^{ab}	0.94 \pm 0.04	7.00 \pm 0.50	0.83 \pm 0.06 ^a	20.37 \pm 1.30
	Control	2.65 \pm 0.18	0.93 \pm 0.04	6.60 \pm 0.50	0.42 \pm 0.03	17.25 \pm 1.23
Ileum	Low dose	1.92 \pm 0.14	0.58 \pm 0.03	5.10 \pm 0.31	0.60 \pm 0.03	16.50 \pm 0.56
	High dose	2.80 \pm 0.26 ^{ab}	0.74 \pm 0.05 ^a	5.55 \pm 0.44 ^{ab}	0.63 \pm 0.04 ^{ab}	24.60 \pm 2.72 ^{ab}
	Control	1.56 \pm 0.04	0.48 \pm 0.01	4.60 \pm 0.24	0.43 \pm 0.02	16.60 \pm 1.07

a-b: significant statistical difference with the control group; b: significant statistical difference between low dose and high dose groups.

جدول ۷- بررسی اثر افزودن سطوح مختلف باکتری *تسوکامورلا اینکوننسیس* بر شاخص‌های هیستومورفومتریک بخش‌های مختلف روده بلدچین زاپنی در روز ۲۸ میانگین \pm انحراف از میانگین (SEM)، ($P \leq 0.05$)

Table 7- The histomorphometrical measurement of different parts of small intestine in different groups on 28 days after exposure with different doses of *Tsukamurella inchonensis*

Intestinal section	Group	Height (μm) ($\times 100$)	Width (μm) ($\times 100$)	Crypt number ($\times 400$)	Crypt depth (μm) $\times 100$	Goblet number ($\times 400$)
Duodenum	Low dose	7.74 \pm 0.33	1.02 \pm 0.05 ^a	6.70 \pm 0.036	0.87 \pm 0.09	19.55 \pm 1.11
	High dose	8.60 \pm 0.30 ^{ab}	1.13 \pm 0.08 ^a	7.00 \pm 0.70	1.16 \pm 0.12 ^a	23.87 \pm 1.24 ^a
	control	6.63 \pm 0.24	0.70 \pm 0.06	5.70 \pm 0.30	0.66 \pm 0.02	15.00 \pm 0.44
Jejunum	Low dose	5.70 \pm 0.20	0.96 \pm 0.02 ^a	6.88 \pm 0.38	0.78 \pm 0.06 ^a	22.00 \pm 1.30
	High dose	5.82 \pm 0.22 ^{ab}	0.99 \pm 0.04 ^a	7.60 \pm 0.50	0.83 \pm 0.07 ^a	22.25 \pm 1.30
	Control	3.98 \pm 0.11	0.56 \pm 0.04	6.40 \pm 0.42	0.52 \pm 0.03	18.00 \pm 1.22
Ileum	Low dose	2.98 \pm 0.09	0.79 \pm 0.01 ^a	6.88 \pm 0.38	0.87 \pm 0.07 ^a	22.00 \pm 1.30
	High dose	3.28 \pm 0.12 ^{ab}	0.87 \pm 0.03 ^a	7.60 \pm 0.50	0.89 \pm 0.06 ^a	22.25 \pm 1.30
	Control	1.80 \pm 0.11	0.63 \pm 0.05	6.40 \pm 0.42	0.61 \pm 0.04	18.00 \pm 1.22

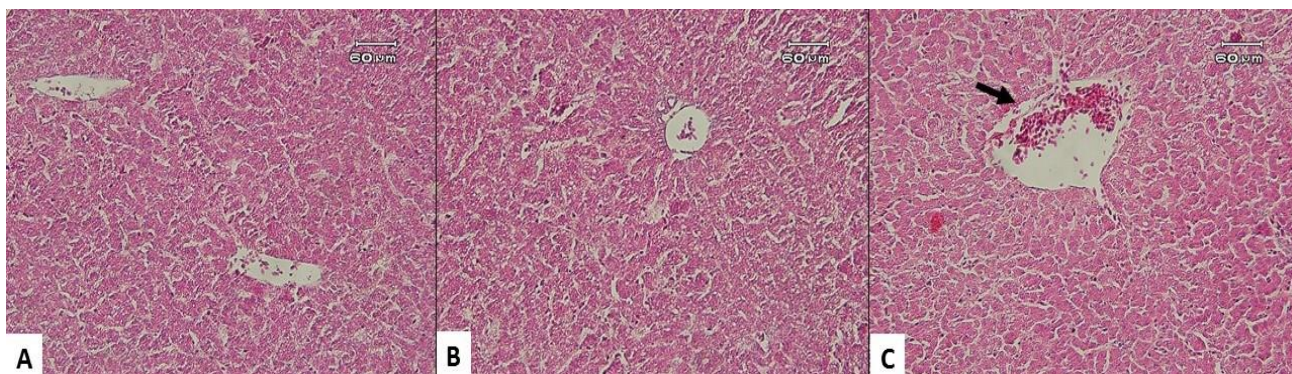
a: significant statistical difference with the control group; b: significant statistical difference between low dose and high dose groups.

جدول ۸- بررسی اثر افزودن سطوح مختلف باکتری *تسوکامورلا اینکوننسیس* بر شاخص‌های هیستومورفومتریک بخش‌های مختلف روده بلدچین زاپنی در روز ۴۲ میانگین \pm انحراف از میانگین (SEM)، ($P \leq 0.05$)

Table 8- The histomorphometrical measurement of different parts of small intestine in different groups on 42 days after exposure with different doses of *Tsukamurella inchonensis*

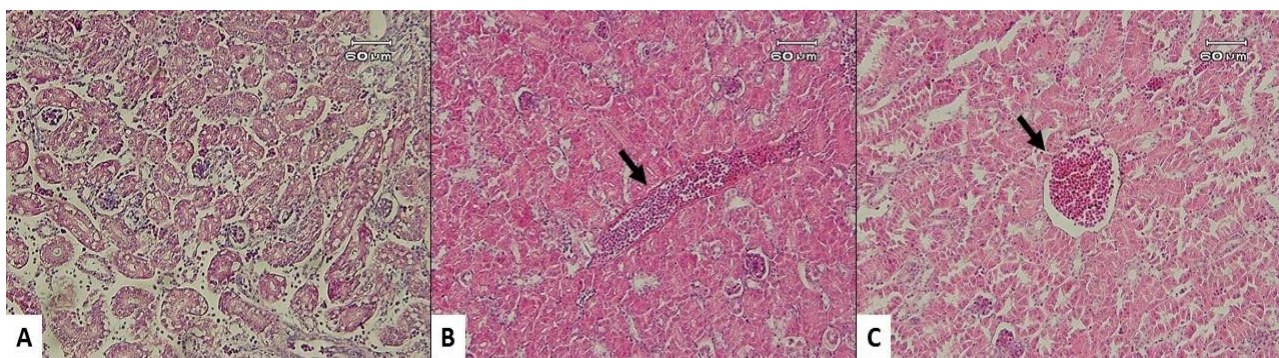
Intestinal section	Treatment	Height (μm) ($\times 100$)	Width (μm) ($\times 100$)	Crypt number ($\times 400$)	Crypt depth (μm) $\times 100$	Goblet number ($\times 400$)
Duodenum	Low dose	3.59 \pm 0.10	0.93 \pm 0.04	7.00 \pm 0.50	0.72 \pm 0.59 ^a	19.50 \pm 1.32
	High dose	4.17 \pm 1.03 ^{ab}	0.95 \pm 0.04	7.40 \pm 0.33	0.83 \pm 0.06 ^a	20.37 \pm 1.30
	control	3.65 \pm 0.18	0.91 \pm 0.04	6.60 \pm 0.50	0.42 \pm 0.37	17.25 \pm 1.23
Jejunum	Low dose	6.32 \pm 0.18 ^a	0.97 \pm 0.04	7.11 \pm 0.35	0.85 \pm 0.03 ^a	22.55 \pm 1.53
	High dose	7.12 \pm 0.50 ^a	1.04 \pm 0.03 ^{ab}	7.40 \pm 0.50	0.86 \pm 0.04 ^a	22.87 \pm 1.47
	Control	5.11 \pm 0.17	0.73 \pm 0.02	6.87 \pm 0.35	0.62 \pm 0.03	21.30 \pm 1.65
Ileum	Low dose	3.74 \pm 0.11 ^a	0.89 \pm 0.05	7.40 \pm 0.47	0.85 \pm 0.05	31.37 \pm 1.95 ^a
	High dose	5.52 \pm 0.36 ^a	0.98 \pm 0.25	8.60 \pm 0.67	0.95 \pm 0.04	33.87 \pm 1.55 ^a
	Control	2.97 \pm 0.13	0.87 \pm 0.03	6.75 \pm 0.52	0.80 \pm 0.03	22.60 \pm 0.81

a: significant statistical difference with the control group; b: significant statistical difference between low dose and high dose groups.



شکل ۴- بافت کبد، بلدرچین ژاپنی، روز ۱۴ نمونه برداری. A: کبد نرمال در گروه کنترل، B: بافت کبد طبیعی در گروه دوز پایین، C: بافت کبد با پرخونی خفیف در گروه دوز بالا. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

Figure 4- liver, Japanese quail, 14 days-old. A: control group with normal liver, B: normal structure of the liver in low dose group, C: liver with mild vascular congestion in high dose group. H&E



شکل ۵- بافت کلیه، بلدرچین ژاپنی، روز ۲۸ نمونه برداری. A: کلیه نرمال در گروه کنترل، B: بافت کلیه با پرخونی خفیف در گروه دوز پایین، C: بافت کلیه با پرخونی خفیف در گروه دوز بالا. رنگ آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین

Figure 5- kidney, Japanese quail, 28 days-old. A: control group with normal kidney, B: kidney with mild vascular congestion in low dose group, C: liver with mild vascular congestion in high dose group. H&E



شکل ۶- روده کوچک (ایلئوم)، بلدرچین ژاپنی، روز ۴۲ نمونه برداری. A: بافت ایلئوم در گروه کنترل، B: بافت ایلئوم در گروه دوز پایین، C: بافت ایلئوم در گروه دوز بالا

Figure 6- small intestine (ileum), Japanese quail, 42 days-old. A: control group, B: low dose group, C: high dose group

Significant difference was observed in the villous length and width on days 14, 28 and 42 in different groups of experiments in the ileum tissue. H&E.

کریپت می‌تواند موجب ضعف جذب گردد، در نتیجه باعث افزایش ترشحات دستگاه گوارش و کاهش عملکرد خواهد شد (او و همکاران ۲۰۰۳). نتایج مطالعه حاضر تغییر معنی داری را در تعداد سلول‌های گابلت نشان نداد. ولی، افزایش معنی دار در تعداد گابلت سل‌ها و ترشح موسین در سطح پرزهای ژزنوم به دنبال استفاده از ترکیب کارواکرول، سینامالدئید، و النورسین کاسپیکوم گزارش شده است (جامروز و همکاران ۲۰۰۶). همچنین به نظر می‌رسد استفاده از روغن‌های ضروری پونه کوهی، رازیانه و پوست مرکبات در طیور گوشتی باعث افزایش طول پرزهای ایلئوم و افزایش تعداد گابلت سل‌ها می‌شود (ریسینگر و همکاران ۲۰۱۱).

نتیجه‌گیری کلی

با توجه به یافته‌های ماکروسکوپی و سرم‌شناسی، می‌توان نتیجه گرفت که باکتری کشته شده تسوکامورلا اینکونینسیس باعث تغییر عیارآنتی‌بادی علیه واکسن نیوکاسل در بلدرچین ژاپنی، بدون به وجود آوردن ضایعات پاتولوژیک خاص می‌شود. باکتری کشته شده تسوکامورلا اینکونینسیس می‌تواند بدون ایجاد عوارض جانبی در بافت‌های حیاتی، موجب بهبود ساختار هیستومورفولوژیک روده کوچک، به ویژه در فاکتورهای طول پرزها، ضخامت پرزها و عمق کریپت‌ها و بیشتر در قسمت ایلئوم و در دوز بالا در بلدرچین ژاپنی شود. آلودگی محیطی، شیوع بیماری‌های عفونی و بحث امنیت غذایی سه مشکل اساسی است که صنعت طیور ایران را درگیر کرده است. مطالعه حاضر نشان داد که باکتری تسوکامورلا اینکونینسیس علی‌رغم این که روی رشد بلدرچین تأثیری ندارد، ولی باعث بهبود مورفولوژی روده، افزایش تولید سایتوکاین‌های موثر بر ویروس‌ها و ارتقا پاسخ ایمنی به واکسیناسیون می‌شود.

نتایج مطالعه حاضر (جداول ۶-۸ و شکل ۶-۸) تغییر معنی‌داری را در تعداد سلول‌های جامی نشان نداد. نتایج مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی باکتری *Tsukamurella inchonensis* می‌تواند بدون ایجاد عوارض جانبی در بافت‌های حیاتی، موجب بهبود ساختار هیستومورفولوژیک روده کوچک به ویژه در فاکتورهای طول پرزها، ضخامت پرزها و عمق کریپت‌ها و بیشتر در قسمت ایلئوم و در دوز بالاتر در جوجه بلدرچین ژاپنی شود که در این مطالعه در هر سه روز نمونه برداری بافتی، تغییرات معنی دار بین گروه‌های مختلف آزمایش مشاهده شد. پژوهشگران در سال ۱۹۹۲ گزارش نمودند که افزایش طول پرز نشان دهنده افزایش سطح و مقدار جذب مواد مغذی می‌باشد (کاسپری ۱۹۹۲). نتایج مطالعه دیگر نشان داد که کریپت روده بعنوان تولید کننده ویلی بوده و کریپت‌ها عمیق نشان دهنده تجدید سریع بافت بوده و در موارد تخریب طبیعی و یا التهاب ناشی از عوامل بیماری‌زا یا سموم حاصل از آنها و آسیب شدید به بافت موجب تسریع در روند تجدید بافت پرز خواهد شد (یاسون و همکاران ۱۹۸۷). اخیراً برخی محققین افزایش معنی داری را در طول پرز و عمق کریپت روده به دنبال استفاده از آلفامیون و بیومیون در جوجه‌های گوشتی گزارش نموده‌اند (عرفانی مجد و همکاران ۲۰۱۴). هرچند، برخی از پژوهشگران گزارش نموده‌اند که عمق کریپت تحت تأثیر درمان غذایی (آلفمیون و بیومیون) قرار نمی‌گیرد و افزودن سین بیوتیک و پروبیوتیک به جیره موجب افزایش طول پرز و نسبت عمق کریپت بصورت معنی داری در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد (اوارد و همکاران ۲۰۰۶). در سالهای اخیر، پژوهشگران به این نتیجه رسیده‌اند که طول بیشتر پرز به عنوان شاخص فعال بودن عملکرد پرز روده می‌باشد (شموتو و یاماچی ۲۰۰۰). علاوه بر این کوتاه شدن ویلی و عمق

منابع مورد استفاده

- Alexander DJ, Allan PM, Biggs CD, Bracewell J, Darbyshire PS, Dawson AH, Harris FT, Jordan I, MacPherson J, McFerran CJ, Randall JC, Stuart O, Swarbrick O and Wilding GP, 1983. A standard technique for haemagglutination inhibition tests for antibodies to avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Record* 113: 64-64.
- Alexander DJ, 2000 Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique eT Technique* 19 (2): 443-462.
- AOAC, 2005 Official methods of analysis of AOAC international. 18th ed. AOAC int., Gaithersburg, MD.
- Aptekmann KP, Baraldi Arton SM, Stefanini MA and Orsi MA, 2001. Morphometric analysis of the intestine of domestic quails (*Coturnix coturnix japonica*) treated with different levels of dietary calcium. *Anatomy, Histology and Embryology* 30: 277-280.
- Awad WA, Böhm J, Razzazi-Fazeli E, Ghareeb K and Zentek J, 2006. Effect of addition of a probiotic microorganism to broiler diets contaminated with deoxynivalenol on performance and histological alterations of intestinal villi of broiler chickens. *Poultry Science* 85: 974- 979.
- Bailey JS, Rolon A, Holt PS, Hofacre CL and Wilson JL, 2007. Humoral and mucosal-humoral immune response to a Salmonella vaccination program in broiler breeders. *International Journal of Poultry Science* 6: 172-181.
- Caspary WF, 1992. Physiology and pathophysiology of intestinal absorption. *American Journal of Clinical Nutrition* 55: 299-308.
- Dale N, 1994. National research council nutrient requirements of poultry. *The Journal of Applied Poultry Research* 3: 101.
- Dimier-Poisson IH, Bout DT and Quere P, 2004 Chicken primary enterocytes: inhibition of *Eimeria tenella* replication after activation with crude interferon- γ supernatants. *Avian Diseases* 48: 617-624.
- Erfani Majd N, Mayahi M and Sadeghi Moghadam A, 2014. The effect of alphamune and biomin on histomorphological structure of small intestine and caecal tonsil lymphoid tissue in broiler chicken. *Iranian Journal of Veterinary Research* 15 (1): 30-35.
- Foligne B, Dewulf J, Breton J, Claisse O, Lonvaud-Funel A and Pot B, 2010. Probiotic properties of non-conventional lactic acid bacteria: immunomodulation by *Oenococcus oeni*. *International Journal of Food Microbiology* 140: 136-145.
- Fontanella GH, Pascutti MF, Daurelio L, Perez AR, Nocito AL, Wojdyla D, Bottasso O, Revelli SS and Stanford JL, 2007. Improved outcome of *Trypanosoma cruzi* infection in rats following treatment in early life with suspensions of heat-killed environmental Actinomycetales. *Vaccine* 25: 3492-500.
- Fuller R, 1989. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology* 66: 365-378.
- Fujiwara K, Yamazaki M, Abe H, Nakashima K, Yakabe Y, Otsuka M, Ohbayashi Y, Kato Y, Namai K, Toyoda A, Miyaguchi Y and Nakamura Y, 2009. Effect of *Bacillus subtilis* var. *natto* fermented soybean on growth performance, microbial activity in the caeca and cytokine gene expression of domestic meat type chickens. *Japanese Poultry Science* 46: 116-122.
- Gao J, Zhang HJ, Yu SH, Wu SG, Yoon I, Quigley J, Gao YP and Qi GH, 2008. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poultry Science* 87: 1377-1384.
- Gupta NK, Shrivastava AK, Praveen PK and Ganguly S, 2016. Effect of feed supplement and probiotics on growth performance of Japanese quails. *Indian Journal of Animal Nutrition* 33): 486-489.
- Hansrani M, Stanford J, McIntyre G, Bottasso O and Stansby G, 2010. Immunotherapy for the prevention of myointimal hyperplasia after experimental balloon injury of the rat carotid artery. *Angiology* 61: 437-442.
- Hashemipour H, Khaksar V, Rubio LA, Veldkamp T and Van Krimpen MM, 2016. Effect of feed supplementation with a thymol plus carvacrol mixture, in combination or not with an NSP-degrading enzyme, on productive and physiological parameters of broilers fed on wheat-based diets. *Animal Feed Science and Technology* 211: 117-131.
- He H, Genovese KJ and Kogut MH, 2011. Modulation of chicken macrophage function by TH1/TH2 cytokines. *Cytokines* 53: 363-369.

- Jamroz D, Wertelecki T, Houszka M and Kamel C, 2006. Influence of diet type on the inclusion of plant origin active substances on morphological and histochemical characteristics of the stomach and jejunum walls in chicken. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* 90: 255-268.
- Jiang H, Yang H and Kapczynski DR, 2011. Chicken interferon alpha pretreatment reduces virus replication of pandemic H1N1 and H5N9 avian influenza viruses in lung cell cultures from different avian species. *Virology Journal* 8: 447- 459.
- Kogut MH, Rothwell L and Kaiser P, 2005. IFN- γ priming of chicken heterophils upregulates the expression of proinflammatory and Th1 cytokine mRNA following receptor-mediated phagocytosis of salmonella enterica serovar enteritidis. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 25: 73-81.
- Lima FS, Santin E, Paulillo AC, Junior LD, de Moraes VMB, Gama NMQ and Schocken- Iturrinor RP, 2004. Evaluation of different programs of Newcastle disease vaccination in Japanese quail. *International Journal of Poultry Science* 3: 354-356.
- Lokapirnasari WP, Dewi AR, Fathinah A, Hidanah S, Harijani N, Soeharsono B, Karimah B and Andriani D, 2017. Effects of probiotic supplementation on organic feed to alternative antibiotic growth promoter on production performance economics analysis and economics analysis of quail. *Veterinary World* 10: 1508-1514.
- Manafi M, Khalaji S and Hedayati M, 2016. Assessment of probiotic containing *Bacillus subtilis* on the performance and gut health of laying Japanese quails. *Brazilian Journal of Poultry Science* 18: 599-606.
- Manafi M, Hedayati M and Mizaie S, 2018. Probiotic *Bacillus* species and *Saccharomyces boulardii* improve performance, gut histology and immunity in broiler chickens. *South African Journal of Animal Science* 48: 379-389.
- Marro A, Pirles M, Schiaffino L, Bin L, Dávila H, Bottasso OA, McIntyre G, Ripley PR, Stanford CA and Stanford JL, 2011. Successful immunotherapy of canine flea allergy with injected Actinomycetales preparations. *Immunotherapy* 3: 971-978.
- Mass RA, Oei HL, Kemper S, Koch G and Viser L, 1998. The use of homologous virus in the haemagglutination-inhibition assay after vaccination with Newcastle disease virus strain La Sota or clone30 leads to an over estimation of protective serum antibody titers. *Avian Pathology* 27, 625-631.
- Merino-Guzman R, Latorre JD, Delgado R, Hernandez-Velasco X, Wolfenden AD, Teague KD, Mahaffey BD, Baxter MFA, Hargis BM and Tellez G, 2017. Comparison of total immunoglobulin A levels in different samples in Leghorn and broiler chickens. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 7: 116-120.
- Nofouzi K, Aghapour M, Hamidian GH, Katirae F, Stanford J and Ripley P, 2016. Oral administration of heat killed *Tsukamurella inchonensis* enhances immune responses and intestinal function of mice. *Veterinari Medicina* 61: 681-688.
- Nofouzi K, Sheikhzadeh N, Varshoie H, Sharabyani SK, Jafarnezhad M, Shabanzadeh S, Ahmadifar E, Stanford J and Shahbazfar AA, 2019. Beneficial effects of killed *Tsukamurella inchonensis* on rainbow trout growth, intestinal histology, immunological, and biochemical parameters. *Fish Physiology and Biochemistry* 45: 209-217.
- Paul AG, van Kooten PJ, van Eden W and van der Zee R, 2000. Highly autoproliiferative T cells specific for 60-kDa heat shock protein produce IL-4/IL-10 and IFN- γ and are protective in adjuvant arthritis. *The Journal of Immunology* 165: 7270-7277.
- Ramazani A, 2018. Effect of different Levels threonine on growth performance, efficiency of carcass and morphology of the small intestine of broilers. *Iranian Veterinary Journal* 14 (2): 26-34.
- Reisinger N, Steiner T, Nitsch S, Schatzmayr G and Applegate TJ, 2011. Effects of a blend of essential oils on broiler per-formance and intestinal morphology during coccidial vaccine exposure. *Journal of Applied Poultry Research* 20: 272-283.
- Sedaghat A, Karimi T and Orshizi MA, 2017. Immune responses, intestinal microbiota and blood characteristics of Japanese fed on diets containing camphor. *Animal* 11: 2139-214.
- Shabanzadeh S, Shapoori M, Sheikhzadeh N, Nofouzi K, Khani Oushani A, Najafi MH, Mardani K and Shahbazfar AA, 2016. Growth performance, intestinal histology, and biochemical parameters of rainbow

- trout in response to dietary inclusion of heat-killed *Gordonia bronchialis*. *Fish Physiology and Biochemistry* 42: 65-71.
- Shamoto K and Yamauchi K, 2000. Recovery responses of chick intestinal villus morphology to different refeeding procedures. *Poultry Science* 79: 718-723.
- Silva JR, Pinto AA and Carrasco AOT, 2010. The use of homologous antigens in hemagglutination-inhibition (HI) test for detection of antibodies against Newcastle disease virus in vaccinated and experimentally infected pigeons. *Virus Reviews and Research* 15 (1).
- Smaldini PL, Stanford J, Romanian DE, Fossati CA and Docena GH, 2014. Down-regulation of NF- κ B signaling by *Gordonia bronchialis* prevents the activation of gut epithelial cells. *Innate immunity* 20: 628-638.
- Stanford J and Stanford C, 2012. Mycobacteria and their world. *International Journal of Mycobacteriology* 1: 3-12. doi:10.1016/j.ijmyco.2012.01.001.
- Sun DS, Shi BL, Tong MM and Yan SM, 2018. Improver performance and immunological responses as a result of dietary *Yucca schidigera* extract supplementation in broilers. *Italian Journal of Animal Science* 17: 511-517.
- Tarres MC, Carmen MD, Carlos J, Alet N, Bottasso O, McIntyre G, Stanford C and Stanford J, 2012. Beneficial effects of immunotherapy with extracts derived from Actinomycetales on rats with spontaneous obesity and diabetes. *Future Medicine* 4: 1-11.
- Wigley P and Kaiser P, 2003. Avian cytokines in health and disease. *Brazilian Journal of Poultry Science* 5: 1-14.
- Xu ZR, Hu CH, Xia MS, Zhan XA and Wang MQ, 2003. Effects of dietary fructooligosaccharide on digestive enzyme activities, intestinal microflora and morphology of male broilers. *Poultry Science* 82: 1030-1036.
- Yason CV, Summers BA and Schat KA, 1987. Pathogenesis of rotavirus infection in various age groups of chickens and turkeys: pathology. *American Journal of Veterinary Research* 6: 927- 938.
- Zhang Q, Eicher SD and Applegate TJ, 2015. Development of intestinal mucin 2, IgA, and polymeric Ig receptor expressions in broiler chickens and Pekin ducks. *Poultry Science* 94: 172-180.

Effects of spraying different dietary killed- *Tsukamurella inchonensis* levels on growth performance, small intestine morphometry and immune responses in Newcastle disease vaccinated Japanese quails

K Nofouzi^{1*}, A Hassanzadeh Teroujeni², M Khordadmehr¹, MS Madadi³, VR Ranjbar⁴ and G McIntyre⁵

Received: January 28, 2019

Accepted: April 20, 2019

¹Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

² DVM Graduated, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Associate Professor, Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁴Clinic of poultry disease, Yazd, Yazd Province.

⁵Centre for Infectious Diseases and International Health, Windeyer Institute of Medical Sciences, University College London, England

*Corresponding author: E-mail: nofouzi@tabrizu.ac.ir

Introduction: Irrational use of antibiotics as growth promoter and as therapeutic agents in livestock and poultry is a major issue under discussion. Inappropriate use of antibiotics is not only responsible for an increase in microbial resistance to antibiotics but also the presence of antibiotic residues in animal products is a topic of public health importance. The International Study Group on Antimicrobial Strategies (ISGNAS) has also mentioned the increased microbial resistance to antibiotic as a serious problem. Newcastle Disease (ND) is one of the most devastating diseases of the domestic fowl, which can cause high level mortality of these animals. ND is caused by Newcastle Diseases Virus (NDV), an avian Paramyxovirus type 1 (APMV-1) that belongs to the genus *Avulavirus*, family *Paramyxoviridae* (Silva et al., 2010). Chickens are the natural host of the virus, but it can infect a variety of avian species causing severe disease (Carrasco et al., 2016). The commercial production of Japanese quails (*Coturnix coturnix japonica*) is extensively distributed in several countries around the world and many studies showed that this species can easily adapt to commercial management conditions, with good performance in terms of meat and egg production (Lima et al., 2004). The purpose of this study was to evaluate the effects of heat-killed *Tsukamurella inchonensis* (*T.inchonensis*) in diet as an alternative on growth performance, intestinal morphology and immune responses of Japanese quail.

Material and methods: Animal care and experimental design Unsexed Japanese quail (*C. coturnix japonica*) were obtained at one day of age acclimated to laboratory surroundings for one week before immunizations and measurements were begun. Quail were housed nine cages measuring 61 × 56 × 81 cm. Temperature in the animal room was maintained at 23°C. Food and water were available *ad libitum*. Quail were fed bird food containing approximately 20% crude protein that contained no coccidiostat or other medications. Fluorescent lights provided a photoperiod of 12 h light and 12 h dark. The University of Tabriz Animal care and Use Committee approved all protocols.

Seventeen Japanese quail were assigned randomly to each of nine groups in a 3 × 3 factorial design with three bacterial treatments. The quails were randomly assigned to each treatment, because sexing could not be done until later development. Quail were sometimes moved between cages if pecking started to occur. The bacterial treatments consisted of (1) a control or no bacteria group, (2) a low dose group, and (3) a high dose group. The low- and high dose groups received 10⁵ or 10⁶ CFU per bird per day in food, respectively from the first day of age.

Growth performance and sample collection Body weight gain (BWG) and feed consumption was recorded during grower period and finisher period. On d 14, 28 and 42, two birds closet to the

median weight from each pen (6 per treatment) were randomly selected, weighed, stunned and slaughtered by exsanguination. The parameters of investigation included hemagglutination inhibition and ELISA titer of antibodies against NDV, intestinal morphology development and IgA and cytokines titer. Feed intake were recorded daily on cage basis. Body weight was determined every week. At days 1, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 of the experiment (42 days), antibodies against Newcastle disease were measured. At the end of days 14, 28 and 42, two quails from each cage were randomly selected and killed by cervical dislocation for histopathological and histomorphometrical studies.

Results and discussion: In the present study, we determined whether an Actinomycetales species which had previously been shown to enhance treatment of asthma and sweet-itch (Stanford and Stanford, 2012), could affect the development of antibodies in sera of chickens. FI and FCR were not affected by different doses of *T.inchonensis* supplementation. The high dose in feed tended to give higher BWG than the control group (Table 2). Interferones were so named due to their anti-viral properties. They consist of two classes: Type I interferons (IFN- α and IFN- β) that have well-defined anti-viral activity, and type II interferon or IFN- γ which plays a vital role in macrophage activation and modulation of the immune system, in addition to its anti-viral activity (Wigley and Kaiser, 2003). There was a significant difference in the measurement of IL-4 and INF- α in the serum of different experimental groups on days 7 and 42. In the measurement of IgA, the high dose recipient group, had significant differences in day 42 concerning other two groups. *T.inchonensis* caused a statistically significant difference in antibody titer against Newcastle disease at 42 days of age in low dose group. At microscopically examination, there was no hepatotoxicity, nephrotoxicity, cardiac toxicity and neurotoxicity or other side effects in liver, kidney, heart and brain, respectively (Fig 4-5). The histomorphometrical measurement results of different parts of small intestine and lymphoid tissue of caecal tonsil are shown in Tables 6-8 and figure 6. *T.inchonensis* treatments, affected ($p < 0.05$) length and thickness of villi, crypt depth, crypt number and number of goblet cells.

Conclusion: According to macroscopic and immunological findings, it can be concluded that supplementation of *T.inchonensis* can improve intestinal morphology and immune responses in Japanese quail.

Keywords: Immune response, Intestinal morphology, Japanese quail, Newcastle disease, *Tsukamurella inchonensis*