Original Article

Iranian Journal of Medical Microbiology

Iran J Med Microbiol: Volume 9, Number 3 (08-2015)

Journal homepage: www.ijmm.ir

Isolation of Lytic Bacteriophage from Poultry's Feces and Evaluation of It's Efficiency to Reduce *Salmonella enteritidis* In Vitro and In Vivo

Mosab Ahmadi, Mohammad Amir Karimi Torshizi, Shaban Rahimi

Poultry Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Article Information

Article history:
Received: 2014/07/22
Accepted: 2015/01/26
Available online:2015/11/29

Article Subject:
Zoonoses Research

IJMM 1394; 9(3): 37-47

Corresponding author at:

Dr. Mohammad Amir Karimi Torshizi

Poultry Science Department, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Email:
Karimitm@modares.ac.ir

Abstract

Background and Aim: The role of poultry in production of protein for growing population is undeniable. In other hand, these products are known as a resource of zoonotic pathogens specially *Salmonella enteritidis*. In past, antibiotics were used as a controlling agent for these pathogens, nowadays according to the banning of antibiotic growth promoters application and spread of resistant pathogens, administration of antibiotic alternatives is necessary. This study was conducted to isolate the bacteriophage and evaluation of it's safety and efficiency on *S. enteritidis* in *in vitro* and *in vivo* conditions.

Materials and Methods: Bacteriophage was isolated in Poultry Microbiology Research Center of Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University of Tehran and it's efficiency on *S. enteritidis* was evaluated by measuring optical density (OD) of nutrient broth containing *S. enteritidis* in presence of phage and lack of it, also experiment on Japanese quail was conducted. In order to evaluate phage safety, the effect of it on immune organ weights and humoral immune response of Japanese quail was determined.

Results: Isolated bacteriophage showed a potential ability in reducing *S. enteritidis*. Antibody titer against sheep erythrocytes and immune organ weights were not affected by treatments, while, the count of ileal lactic acid bacteria and antibody titer against influenza killed vaccine virus (H9N2) in groups that received bacteriophage had a significant difference in comparison to positive control ($P<0.05$).

Conclusions: Our results demonstrate that administration of this phage via oral gavage and cloacal drinking route can eliminate and decrease *S. enteritidis* colonization respectively, moreover it can improve immune response of challenged animals.

Key Words: Lytic bacteriophage, *Salmonella enteritidis*, Administration method, Immune

Copyright © 2015 Iranian Journal of Medical Microbiology. All rights reserved.

How to cite this article:

Ahmadi M, Karimi Torshizi M, Rahimi S. Isolation of Lytic Bacteriophage from Poultry's Feces and Evaluation of It's Efficiency to Reduce Salmonella enteritidis In Vitro and In Vivo. Iran J Med Microbiol. 2015; 9 (3) :37-47

مقاله پژوهشی

مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران

سال ۹ – شماره ۳ – پاییز ۱۳۹۴

Journal homepage: www.ijmm.ir

جداسازی باکتریوفاژ لیتیک از مدفوع طیور و ارزیابی کارایی آن در کاهش *سالمونلا انتریتیدیس* در شرایط *In vitro* و *In vivo*

مصعب احمدی، محمد امیر کریمی ترشیزی، شعبان رحیمی

گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله

دریافت:۱۳۹۳/۰۴/۳۱

پذیرش:۱۳۹۳/۱۱/۰۶

انتشار آنلاین:۱۳۹۴/۰۹/۰۹

موضوع:

بیماری‌های مشترک انسان - دام

IJMM 1394; 9(3): 37-47

نویسنده مسئول:

دکتر محمد امیر کریمی ترشیزی

گروه پرورش و مدیریت طیور، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تلفن: ۰۹۱۲۵۹۹۴۴۶۱

پست الکترونیک:

Karimitm@modares.ac.ir

چکیده

زمینه و اهداف: اهمیت گوشت و تخم طیور در تأمین پروتئین موردنیاز جمعیت رو به افزایش متقاضی غذا غیرقابل انکار است. از طرف دیگر این محصولات به عنوان مخازن پاتوژن‌های مشترک بین انسان و طیور مانند *سالمونلا انتریتیدیس* شناخته شده‌اند. در گذشته از آنتی‌بیوتیک‌ها به عنوان عوامل کنترل کننده این پاتوژن‌ها استفاده شده است، امروزه با توجه به ممنوعیت استفاده از آنتی‌بیوتیک‌های محرک رشد و گسترش پاتوژن‌های مقاوم، استفاده از جایگزین‌های آنتی‌بیوتیک ضروری می‌باشد. این مطالعه به منظور جداسازی باکتریوفاژ علیه *سالمونلا انتریتیدیس*، ارزیابی کارایی و بررسی ایمن بودن آن در شرایط In vitro و In vivo انجام شد.

مواد و روش‌کار: باکتریوفاژ در آزمایشگاه تحقیقات میکروبیولوژی گروه پرورش و مدیریت طیور دانشگاه تربیت مدرس جداسازی شد و اثرات باکتریسیدی آن بر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از میزان جذب نوری محیط کشت نوترینت براث حاوی باکتری در دو حالت وجود فاژ و عدم وجود آن و نیز در بلدرچین ژاپنی مورد مطالعه قرار گرفت. به منظور بررسی ایمن بودن فاژ جداسازی شده، اثر روش‌های مختلف اعمال آن بر پاسخ ایمنی هومورال و وزن نسبی اندام‌های ایمنی بلدرچین ژاپنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: باکتریوفاژ جداسازی شده توانایی بالقوه‌ای در کاهش شمار *سالمونلا انتریتیدیس* نشان داد. عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند تحت تأثیر تیمارها قرار نگرفت، اما تعداد باکتری‌های اسیدلاکتیک و عیار پادتن علیه ویروس واکسن آنفلوانزا *(H9N2)*، در گروه‌های دریافت کننده فاژ بهتر از گروه شاهد مثبت بود ($P<۰/۰۵$).

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج، اعمال فاژ به روش گاواژ دهانی و آشامیدن کلواکی به ترتیب موجب حذف و کاهش شمار سالمونلا در روده باریک حیوانات چالش داده شده با این باکتری و بهبود سیستم ایمنی آن‌ها شد.

کلمات کلیدی: باکتریوفاژ لیتیک، *سالمونلا انتریتیدیس*، روش تجویز، ایمنی

کپی‌رایت ©: حق چاپ، نشر و استفاده علمی از این مقاله برای مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران محفوظ است.

مقدمه

بیماری‌های منتقل شونده از طریق مواد غذایی یکی از مهم‌ترین مشکلات سلامت عمومی می‌باشند که هر سال موجب ابتلا و مرگ‌ومیر تعداد قابل توجهی از مردم می‌شوند، لذا این بیماری‌ها موجب بروز نگرانی‌های جهانی شده‌اند (۱). بیماری‌های اسهالی ناشی از آلودگی‌های غذایی معمولاً ۲۴ تا ۴۸ ساعت بعد از ابتلا بدون هیچ‌گونه مداخله پزشکی بهبود می‌یابند و معمولاً تشخیص داده نشده و گزارش نمی‌شوند (۲). با توجه به داده‌های منتشر شده می‌توان به بخشی از مشکل پی برد، اما از آنجایی که این داده‌ها بخشی از آمار واقعی را شامل می‌شوند و تمامی موارد آلودگی‌های ناشی از پاتوژن‌هایی که از طریق غذا منتقل می‌شوند به مراکز سلامت عمومی گزارش نمی‌شود، می‌توان گفت که عمق فاجعه بسیار بیشتر از چیزی است که تصور می‌شود، بنابراین

تأمین سلامت غذا در کنار تلاش برای تهیه آن اهمیتی دو چندان دارد. پدیده جهانی شدن، توسعه گردشگری و همچنین افزایش صادرات کشورها موجب جهانی شدن بیماری‌هایی شده است که از طریق غذا منتقل می‌شوند (۲).

طبق گزارش‌های مرکز کنترل و پیشگیری از بیماری‌ها در ایالات متحده، سالانه ۷۶ میلیون مورد بیماری در اثر مصرف مواد غذایی آلوده اتفاق می‌افتد که تقریبا ۵۰۰۰ مورد از آن‌ها به مرگ می‌انجامد (۳). همواره بخشی از آلودگی به محصولات طیور نسبت داده می‌شود. در ایران ارقام فزاینده تلفات در مرغداری‌ها که گاهی به ۸۰ درصد هم می‌رسد، علاوه بر خسارات هنگفت ناشی از هزینه دارو، تلفات و کاهش وزن جوجه‌ها، آلودگی مواد غذایی، کمبود پروتئین، گسترش بیماری و بروز مسمومیت‌های غذایی در انسان را نیز باعث گردیده است که صدمات جبران ناپذیری بر بهداشت تغذیه و سلامت جامعه وارد می‌سازد. علاوه بر کاهش ضررهای اقتصادی وارد شده بر بخش صنعت پرورش طیور، تولید گوشت عاری از هر گونه آلودگی میکروبی، هدف بنیادی در این صنعت محسوب می‌شود (۴).

نتایج کشت نمونه‌های انسانی نشان دهنده این می‌باشد که *Escherichia coli*، *Salmonella enteritidis* و برخی سروتیپ‌های باکتری *Shigella*، عامل ابتلا به بیماری‌های باکتریایی منتقله از خوراک می‌باشند. سالمونلوز شایع‌ترین مسمومیت غذایی در جهان بوده که توسط سروتیپ‌های مختلف به ویژه سروتیپ انتریتیدیس ایجاد می‌شود. گزارش شده است که شایع‌ترین سروتیپ سالمونلا در مزارع پرورش طیور و نیز عفونت‌های انسانی در ایران انتریتیدیس می‌باشد (۵). همچنین از این سروتیپ به عنوان شایع‌ترین سروتیپ جدا شده از تخم بلدرچین‌های موجود در بازار ایران نام برده‌اند (۶). یکی از ویژگی‌های این میکروارگانیسم، دامنه وسیع میزبانی آن از پستانداران، پرندگان و حیوانات خون سرد تا انسان است. این میکروارگانیسم همه جا حضور دارد، اما ناقل اصلی آن مجاری روده حیوانات می‌باشد. در پرورش متراکم حیوانات زمینه برای استقرار این باکتری فراهم می‌باشد و به همین دلیل، گوشت و تخم پرندگان و فرآورده‌های آن‌ها از گسترده‌ترین مخازن سالمونلا به شمار می‌روند (۷).

آلودگی سالمونلایی در انسان موجب مسمومیت غذایی خفیف، گاستروآنتریت، تب تیفوئید و گاهی اوقات سپتی سمی کشنده می‌شود. ممکن است آلودگی به سالمونلا بدون هیچ گونه علائمی نیز رخ دهد (۸). پیدایش مقاومت در این پاتوژن عمدتاً به دلیل افزایش استفاده بیش از حد از آنتی‌بیوتیک‌ها در مراکز درمانی و صنایع پرورش طیور بوده که به مشکلی جهانی تبدیل گشته است (۹). سویه‌های باکتری مقاوم به آنتی‌بیوتیک از طریق محصولات طیور به انسان منتقل می‌شوند، همین امر موجب می‌شود که آنتی‌بیوتیک‌های درمانی در مورد انسان موثر واقع نشود. امروزه باقی ماندن آنتی‌بیوتیک در تولیدات طیور موجب ممنوعیت استفاده از آن در خیلی از کشورها شده است (۱۰). کنترل عفونت‌های سالمونلایی در سطح گله‌های گوشتی قطعاً سبب کاهش چرخه انتقال عفونت از طریق غذا به انسان می‌شود. ناکارآمد بودن روش‌های معمول کنترل سالمونلا از یک طرف و گسترش عوامل بیماری‌زای مقاوم به آنتی‌بیوتیک از سوی دیگر، بررسی و ارزیابی عوامل درمانی جایگزین آنتی‌بیوتیک‌ها را ضروری می‌سازد (۱۱).

استفاده از باکتریوفاژ به عنوان راهکاری نو در کاهش آلودگی مزارع پرورش طیور به باکتری‌های مشترک بین انسان و پرندگان رویکردی مناسب می‌باشد (۱۲). باکتریوفاژ در سال ۱۹۱۵ توسط یک میکروب شناس بریتانیایی به نام Felix Twort کشف شد، همچنین در سال ۱۹۱۷ یک میکروب شناس فرانسوی- کانادایی به نام Felix d'Herelle موفق به کشف فاژها شد، وی ماهیت باکتریوفاژها را تعیین و توانایی آن‌ها را به عنوان عوامل درمانی بیان نمود. باکتریوفاژها (فاژها) سلسله‌ای از ویروس‌ها هستند که باکتری‌ها را آلوده می‌نمایند. آن‌ها دارای دو چرخه زندگی لیتیک یا لیزوژنیک می‌باشند. فاژهای لیتیک مناسب‌ترین گزینه برای فاژ درمانی هستند، در این چرخه فاژ به سرعت تکثیر شده و سلول میزبان در جریان تولید فاژهای جدید کشته می‌شود (۱۳). تقریباً از صد سال پیش باکتریوفاژها به منظور مقابله با عفونت‌های باکتریایی مورد استفاده قرار می‌گرفتند؛ اما پس از کشف آنتی‌بیوتیک‌ها استفاده از آن‌ها کاهش و تا حدی به فراموشی سپرده شدند. امروزه با پیدایش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، محققین به استفاده از فاژها تمایل پیدا کرده‌اند. باکتریوفاژها برخلاف آنتی بیوتیک‌ها تا حدودی اختصاصی عمل می‌نمایند و تعادل طبیعی میکروفلور روده را بر هم نمی‌زنند (۷)، همچنین در قسمتی از دستگاه گوارش که میزبان آن‌ها وجود دارد تکثیر می‌شوند، بنابراین در محل عفونت که وجودشان لازم‌تر است حضور می‌یابند (۱۴).

لاکتوباسیل‌ها جزئی از میکروفلور طبیعی دستگاه گوارش می‌باشند، نقش پروبیوتیکی برخی از انواع این باکتری‌ها توسط محققین نشان داده شده است (۱۵). با توجه به توانایی تولید عوامل ضد میکروبی توسط لاکتوباسیل‌ها و اثر ممانعت کنندگی این باکتری‌ها بر باکتری‌های بیماری‌زا، اهمیت آن‌ها در سلامت روده انسان و حیوانات شناخته شده می‌باشد. با توجه به موارد مطرح شده و اهمیت بیماری‌های منتقل شده از طریق خوراک، جداسازی باکتریوفاژ تخریب کننده باکتری *S.enteritidis* از مدفوع طیور، ارزیابی کارایی آن در شرایط آزمایشگاهی و همچنین اثر روش‌های مختلف اعمال باکتریوفاژ بر *سالمونلا انتریتیدیس* و لاکتوباسیل‌ها در محتویات ایلئوم موضوع این تحقیق قرار گرفت، همچنین اثر فاژ اعمال شده بر سیستم ایمنی حیوانات آزمایشی نیز سنجیده شد.

مواد و روش‌ها

محل انجام آزمایش

مطالعات آزمایشگاهی این پژوهش شامل نمونه گیری و جداسازی فاژ در آزمایشگاه میکروبیولوژی گروه پرورش و مدیریت طیور دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و بررسی اثر فاژ جداسازی شده روی حیوانات آزمایشگاهی در مرکز تحقیقاتی پرورش طیور همان دانشگاه انجام شد. روش کار توسط کمیته پرورش و مراقبت از حیوانات دانشگاه تربیت مدرس مورد مطالعه و تائید قرار گرفت.

باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*

باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* (RITCC 1695) از گنجینه میکروبی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی تهیه شد.

جداسازی، خالص سازی، تکثیر و شمارش باکتریوفاژ

به منظور جداسازی باکتریوفاژ، ابتدا یک گرم نمونه مدفوع طیور در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر همگن شد. با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار محلول همگن شده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس در ۱۵۰۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس محلول سانتریفیوژ شده با استفاده از پالایه ۰/۲ میکرومتر صاف شد. به منظور جستجوی پلاک، ۲۵۰ میکرولیتر از محلول سانتریفیوژ شده و ۵۰ میکرولیتر از کشت ۱۲ ساعته باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* به ۷ میلی‌لیتر نوترینت آگار ذوب شده اضافه و پس از مخلوط نمودن سریع بر روی پتری دیش با پایه آگاروز (سروا، آلمان) با روش کشت دو لایه کشت شد (۱۶). پس از مشاهده پلاک، با استفاده از پیپت پاستور استریل کمی از آن برداشته و به مدت ۲۴ ساعت در محیط نوترینت براث (مرک، آلمان) غنی شد. سپس از فاژ غنی شده به منظور جستجوی پلاک استفاده شد. به منظور خالص سازی فاژ، تمامی مراحل پنج مرتبه تکرار گردید (۱۷). پس از خالص سازی باکتریوفاژ، عیار (تعداد ذرات) سوسپانسیون فاژی تعیین شد. بدین منظور ابتدا رقت‌های سریال ده‌تایی از 10^{-1} تا 10^{-10} تهیه شدند. پس از افزودن ۲۵۰ میکرولیتر از هر رقت فاژ و ۵۰ میکرولیتر کشت ۱۲ ساعته باکتری به ۷ میلی‌لیتر نوترینت آگار ذوب شده، هر کدام از رقت‌ها به طور جداگانه به پتری دیش با پایه آگاروز (سروا، آلمان) اضافه شدند. پس از شمارش پلاک‌ها عیار سوسپانسیون فاژی محاسبه گردید (۱۸).

ارزیابی کارایی باکتریوفاژ جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی

اثرات باکتریسیدی باکتریوفاژ جداسازی شده بر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* با استفاده از میزان جذب نوری محیط کشت نوترینت براث (مرک، آلمان) حاوی باکتری در صورت وجود فاژ و عدم وجود آن مورد بررسی قرار گرفت. به همین جهت ۴ محیط کشت، هر کدام حاوی ۶۰ میلی‌لیتر نوترینت براث (مرک، آلمان) تهیه شد. به محیط کشت شماره ۱ به عنوان شاهد چیزی اعمال نشد. به محیط کشت شماره ۲ فقط ۲۰۰۰ میکرولیتر باکتریوفاژ 10^8 Plaque forming unit (PFU)/ml اضافه شد. به محیط کشت شماره ۳، ۵۰۰ µl باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* $1/2\times10^9$ Colony forming unit (CFU/ml) و ۲۰۰۰ میکرولیتر باکتریوفاژ 10^8 PFU/ml افزوده شد. به محیط کشت شماره ۴ فقط ۵۰۰ µl باکتری *سالمونلا انتریتیدیس*

CFU/ml ۱۰^۹ × ۱/۲ افزوده گشت، سپس همه محیط‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. از زمان انکوباسیون تا ۲۰ ساعت بعد، هر یک ساعت یکبار، ۱ میلی‌لیتر از هر محیط کشت برداشته و با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۵۰ نانومتر جذب نوری آن قرائت شد (۱۹).

ارزیابی کارایی باکتریوفاژ جداسازی شده در حیوانات آزمایشگاهی

حیوانات آزمایشگاهی

به منظور بررسی کارایی و تاثیر ایمنی فاژ جداسازی شده در این آزمایش از بلدرچین ژاپنی استفاده شد. دلیل انتخاب بلدرچین برای انجام این آزمایش، ویژگی‌های منحصر به فرد این پرنده شامل دوره جوجه کشی کوتاه، رشد سریع و سهولت پرورش آن می‌باشد که این پرنده را به‌عنوان حیوانی پرورشی و آزمایشگاهی مناسب نموده است.

گروه‌های آزمایشی

به منظور ارزیابی اثرات روش‌های مختلف اعمال باکتریوفاژ بر بلدرچین‌های ژاپنی چالش داده شده با *سالمونلا انتریتیدیس*، تعداد ۳۰۰ قطعه جوجه بلدرچین ژاپنی یک روزه عاری از سالمونلا بر اساس طرح بلوک‌های کامل تصادفی به پنج تیمار تقسیم شدند. هر تیمار چهار تکرار و هر تکرار مشتمل بر ۱۵ قطعه جوجه بود. تخم بلدرچین‌ها از مرکز تحقیقاتی پرورش طیور دانشگاه تربیت مدرس که در نمونه گیری‌های متعدد عدم آلودگی آن به سالمونلا تائید شده است، تهیه و در دستگاه جوجه کشی همان مرکز در شرایط بدون آلودگی خوابانده شدند. به منظور اطمینان از عاری بودن جوجه‌ها از *سالمونلا انتریتیدیس* در بدو ورود به سالن، ۱۰ قطعه جوجه به طور تصادفی انتخاب و تست-های میکروبی از لوزه‌های سکومی آن‌ها انجام شد. همچنین نمونه‌ای از خوراک پرنده‌ها به منظور مطمئن شدن از سلامت و عدم آلودگی آن به سالمونلا مورد آزمایش قرار گرفت (۲۰).

جوجه‌ها در قفس و تحت شرایط برنامه امنیت زیستی پرورش یافتند.

به پرندگان تیمار ۱ به عنوان گروه شاهد منفی، باکتری و باکتریوفاژ اعمال نشد. گروه ۲ به عنوان گروه شاهد مثبت به طریق گاواژ دهانی با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* CFU/ml ۱۰^۹ × ۱/۲ چالش داده شدند. پرندگان تیمار ۳، ۱۰۰ میکرولیتر باکتریوفاژ PFU/ml ۱۰^۹ را شش مرتبه به فواصل زمانی ۲۴ ساعت (شروع از سن ۱ روزگی) و به روش گاواژ دهانی دریافت نمودند و در سن ۴ روزگی به طریق گاواژ دهانی با ۱۰۰ میکرولیتر باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* ۱۰^۹ × ۱/۲ CFU/ml چالش داده شدند. به پرندگان تیمار ۴، پنج میکرولیتر باکتریوفاژ PFU/ml ۱۰^۱۰ ×۲، شش مرتبه به فواصل زمانی ۲۴ ساعت (شروع از سن ۱ روزگی) و به روش آشامیدن کلواکی اعمال شد و همانند پرندگان تیمار قبلی چالش داده شدند. به پرندگان تیمار ۵ به عنوان گروه شاهد فاژ، فقط باکتریوفاژ و به صورت ترکیبی از هر دو روش گاواژ دهانی و آشامیدن کلواکی داده شد.

بازیابی *سالمونلا انتریتیدیس* از محتویات ایلئوم روده باریک

در پایان آزمایش (۳۵ روزگی) به ازای هر گروه آزمایشی ده قطعه بلدرچین نر به طور تصادفی انتخاب شد. به منظور رعایت اصول اخلاق در پژوهش، در ابتدا پرنده‌ها با استفاده از گاز دی اکسید کربن بی‌جان گشته (۲۱) و پس از کالبد گشایی، اندام‌های داخلی از هم جدا و توزین شدند. به منظور جداسازی *سالمونلا انتریتیدیس* یک گرم از محتویات بخش ایلئوم روده کوچک پرنده‌ها در شرایط بدون آلودگی برداشته شد و به لوله‌های استریل حاوی ۱۰ میلی لیتر محلول بافر آب پپتون (مرک، آلمان) منتقل و به مدت ۲۴ ساعت در گرم خانه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفتند. به منظور غنی سازی، پس از ۲۴ ساعت، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول بافر آب پپتون به لوله‌های حاوی ۱۰ میلی لیتر Rapaport-Vassilidias broth (مرک،

آلمان) منتقل و پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، یک لوپ از محلول روی محیط کشت Xylose-Lysine Desoxycholate (XLD) agar (مرک، آلمان) به صورت خطی کشت داده و مجدد در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شد. بعد از ۲۴ ساعت، کلنی‌های سیاه به عنوان *سالمونلا انتریتیدیس* در نظر گرفته شدند. به منظور تایید کلنی‌های مشکوک به سالمونلا تست‌های بیوشیمیایی شامل TSI، سیترات، اندول، متیل رد، اوره، VP، H_2S، KCN، فنیل آلانین دآمیناز و اورنیتین دکربوکسیلاز با استفاده از محیط‌های کشت مربوطه (مرک، آلمان) انجام شد (۲۲). تعداد کلنی‌های سالمونلا در هر گروه به صورت واحد لگاریتم در هر گرم نمونه محتویات ایلئوم گزارش شد (۲۳).

تعیین جمعیت لاکتوباسیل‌ها در محتویات ایلئوم

به منظور تعیین جمعیت لاکتوباسیل‌ها یک گرم از محتویات بخش ایلئوم روده کوچک هر یک از ده پرنده در شرایط بدون آلودگی برداشته و سپس سری رقت با استفاده از بافر فسفات سالین استریل تهیه و شمارش به روش قطره‌ای و در محیط کشت Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar (مرک، آلمان) انجام شد. پرگنه‌های ظاهر شده پس از ۲۴ تا ۴۸ ساعت گرم‌خانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس شمارش و بر اساس واحد لگاریتم در هر گرم نمونه محتویات ایلئوم گزارش شدند (۲۴).

تیتر پادتن علیه پادگن گلبول قرمز گوسفند و ویروس واکسن آنفلوانزا

به منظور بررسی عملکرد سیستم ایمنی هومورال، در ۲۱ و ۲۸ روزگی به عضله سینه دو پرنده از هر واحد آزمایشی مقدار ۰/۱ میلی لیتر آنتی ژن ۵ درصد گلبول قرمز گوسفند سه بار شسته شده در بافر فسفات سالین استریل تزریق و هفت روز بعد از تزریق دوم جهت تعیین تیتر آنتی بادی، خون گیری انجام شد. برای تعیین عیار پادتن تولید شده در پاسخ به تزریق گلبول قرمز گوسفند از روش هماگلوتیناسیون میکروتیتر استفاده گردید. واکسن آنفلوانزا (H9N2) در سن ۲۱ روزگی به روش تزریقی استفاده شد و دو هفته بعد از آن، در پایان آزمایش (سن ۳۵ روزگی) خون گیری انجام و تیتر پادتن علیه واکسن آنفلوانزا با روش Haemagglutination inhibition (HI) تعیین گردید (۲۵).

وزن نسبی اندام‌های ایمنی

پس از تعیین وزن بدن پرنده‌ها، بورس فابریسیوس و طحال جدا و با ترازوی با دقت ۰/۰۱ گرم توزین شد. به منظور تصحیح تاثیر اندازه بدن بر وزن اندام‌های لنفاوی، وزن این اندام‌ها به ازای صد گرم وزن بدن محاسبه و تجزیه و تحلیل گردید (۲۶).

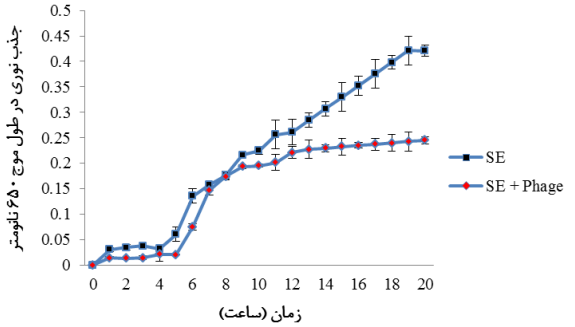
بررسی آماری

داده‌های حاصل از این مطالعه با استفاده از رویه GLM نرم افزار آماری (۲۰۰۳) SAS آنالیز شده و مقایسه میانگین‌ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن صورت گرفت. سطح معنی داری ($P<۰/۰۵$) در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

ارزیابی کارایی باکتریوفاژ جداسازی شده در شرایط آزمایشگاهی

طی ۲۰ ساعت آزمایش جذب نوری محیط کشت‌های شماره ۱ و ۲ به عنوان گروه‌های شاهد تغییری نشان نداد. با توجه به نمودار ۱، با وجود عدم تغییر چشمگیر در جذب نوری محیط کشت حاوی فاژ و باکتری (گروه ۳)، جذب نوری کشت باکتریایی در غیاب فاژ (گروه ۴) بطور پیوسته‌ای رو به افزایش بود. به گونه‌ای که ۲۰ ساعت بعد از انکوباسیون مقادیر آن برای گروه ۳ و ۴ به ترتیب برابر با ۰/۵۲۵ و ۰/۴۲۱ بود که تفاوت جذب نوری برای گروه ۳ با گروه ۴ که فقط باکتری در محیط کشت شده بود برابر با ۰/۱۷۶ محاسبه گردید.



نمودار ۱: مقایسه جذب نوری در محیط کشت حاوی *S. enteritidis* بدون فاژ و محیط کشت حاوی هر دوی فاژ و باکتری

بازیابی *سالمونلا انتریتیدیس*

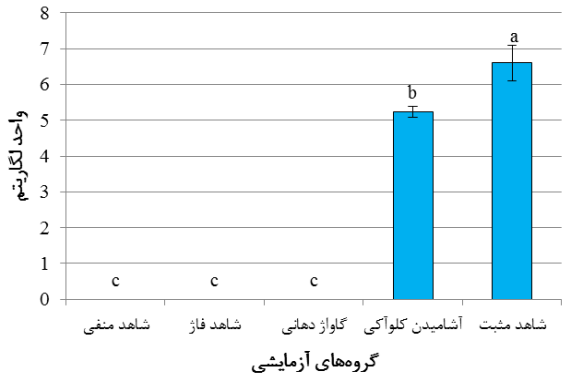
در نمونه گیری از محتویات ایلئوم پرندگان، از هیچ کدام از پرندگان گروه‌های شاهد منفی، شاهد فاژ و گاواژ دهانی *سالمونلا انتریتیدیس* بازیافت نشد، حال آنکه شمار باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* بازیابی شده در گروه‌های آشامیدن کلواکی و شاهد مثبت به ترتیب برابر با ۵/۲۳ و ۶/۶۰ واحد لگاریتم در هر گرم نمونه محتویات ایلئوم بود (نمودار ۲). هر دو روش اعمال فاژ شمار *سالمونلا انتریتیدیس* را در مقایسه با گروه شاهد مثبت کاهش دادند (P<۰/۰۵). در گروه گاواژ دهانی سالمونلا حذف و در روش آشامیدن کلواکی مقدار کاهش برابر با ۱/۳۷ واحد لگاریتم بود.

جمعیت لاکتوباسیل‌ها در محتویات ایلئوم

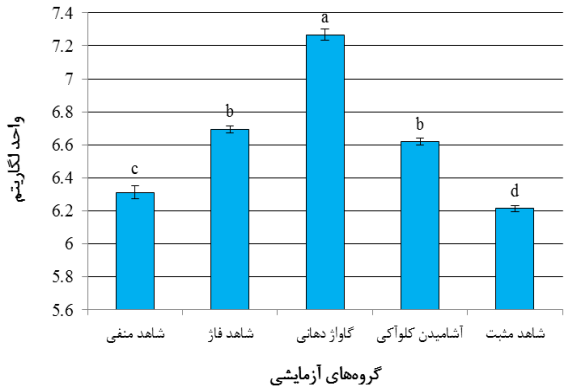
با توجه به نمودار ۳ شمار لاکتوباسیل‌ها تحت تاثیر تیمار-های آزمایشی قرار گرفت، به گونه‌ای که بیشترین تعداد آن‌ها در گروه اعمال دهانی باکتریوفاژ و کمترین تعداد در گروه شاهد مثبت مشاهده شد (P<۰/۰۵).

اثر تیمارهای آزمایشی بر شاخص‌های ایمنی

عیار پادتن علیه گلبول قرمز گوسفند تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت (جدول ۱)، اما عیار پادتن علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در گروه دریافت کننده فاژ به روش گاواژ دهانی بیشتر از گروه شاهد مثبت و گروه تیمار شده با روش آشامیدن کلواکی بود (P<۰/۰۵). عیار پادتن علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در گروه شاهد فاژ تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد منفی نداشت.



نمودار ۲: اثر روش‌های مختلف اعمال فاژ بر شمار *S. enteritidis* بازیافت شده از محتویات ایلئوم پرندگان آزمایشی



نمودار ۳: اثر روش‌های مختلف اعمال فاژ بر شمار لاکتوباسیل‌های موجود در محتویات ایلئوم پرندگان آزمایشی

جدول ۱: اثر روش‌های اعمال فاژ بر وزن نسبی اندام‌های ایمنی و عیار پادتن تولید شده علیه ویروس واکسن آنفلوانزا و گلبول قرمز خون گوسفند بلدرچین‌های ژاپنی چالش داده شده با *S. enteritidis*

تیمار	باکتری (CFU/ml)	فاژ (PFU/ml)	بورس فابریسیوس [۱]	طحال [۱]	عیار پادتن	
					علیه ویروس واکسن آنفلوانزا [۲]	علیه گلبول قرمز گوسفند [۳]
شاهد منفی			۰/۰۹	۰/۰۷	۸/۰۰[a]	۲/۰۰
شاهد مثبت	۱/۲ ×۱۰^{۹}		۰/۱۱	۰/۰۵	۳/۰۰[c]	۱/۵۰
گاواژ دهانی	۱/۲ ×۱۰^{۹}	۱۰^{۹}	۰/۱۱	۰/۰۵	۷/۲۵[ab]	۱/۵۰
آشامیدن کلواکی	۱/۲ ×۱۰^{۹}	۲ ×۱۰^{۱۰}	۰/۰۷	۰/۰۴	۴/۲۵[bc]	۱/۶۷
شاهد فاژ		۲ ×۱۰^{۱۹}	۰/۱۱	۰/۰۵	۶/۵[ab]	۲/۰۰
SEM			۰/۰۰۷	۰/۰۰۴	۰/۶۰	۰/۱۱
p-value			۰/۵۱	۰/۳۶	۰/۰۲	۰/۳۹
مقایسه‌های مستقل						
شاهد منفی *vs* شاهد مثبت			۰/۳۱	۰/۲۲	۰/۰۰۴	۰/۱۶
آشامیدن کلواکی *vs* گاواژ دهانی			۰/۱۳	۰/۲۲	۰/۵۶	۰/۶۳
شاهد فاژ *vs* آشامیدن کلواکی و گاواژ			۰/۴۴	۰/۶۵	۰/۵۷	۰/۱۸

[۱] گرم در صد گرم وزن بدن

[۲] لگاریتم در مبنای دو عکس آخرین رقت که از هماگلوتیناسیون پیشگیری کرده است.

[۳] لگاریتم در مبنای دو عکس آخرین رقت که سبب هماگلوتیناسیون شده است.

[a-c] حروف نامشابه در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

بحث

باکتریوفاژها در همه جا در محیط یافت می‌شوند و کاندیدهای مناسبی برای درمان حیوانات می‌باشند. در مطالعات فاژ درمانی، فاژها به کرات از منابع مختلف جداسازی شده‌اند (۲۷). در این پژوهش بر اساس این فرضیه که فاژهای جداسازی شده از مدفوع نسبت به فاژهای موجود در سایر محیط‌ها مقاومت و پایداری بیشتری در برابر شرایط دستگاه گوارش دارند، مدفوع طیور به عنوان منبع جداسازی باکتریوفاژ انتخاب شد. اگر نمونه‌ای از محلول فاژی روی کشت انبوه سلول‌های باکتریایی به پتری‌دیش محتوی آگار مغذی اضافه شود، به دور هر نقطه ای که ذره فاژی قرار بگیرد، یک ناحیه شفاف (پلاک) یا اصطلاحاً حفره پدید می‌آید. این حفره‌ها محتوی میلیون‌ها ذره فاژ جدید می‌باشند که در نتیجه متلاشی شدن سلول‌های باکتریایی آزاد شده‌اند، حال در محیط کشت براث حضور فاژ موجب کاهش کدورت محیط می‌شود. طی انجام آزمایش در هیچ کدام از محیط‌های کشت شماره ۱ و ۲ تغییر جذب نوری مشاهده نشد. عدم ایجاد کدورت در این محیط کشت‌ها نشان از وجود شرایط بدون آلودگی در آزمایش و وابستگی فاژ به باکتری جهت تکثیر می‌باشد. کاهش جذب نوری در محیط شماره ۳ حاوی فاژ و باکتری در مقایسه با محیط شماره ۴ که فقط حاوی باکتری بود، نشان دهنده کاهش رشد باکتری در حضور فاژ می‌باشد (نمودار ۱). یافته‌های ما مبنی بر کاهش جذب نوری کشت توام باکتری سالمونلا و فاژ با نتایج Turki و همکاران (۲۰۱۲) موافقت کامل دارد. این محققین گزارش نمودند که اضافه نمودن باکتریوفاژ به محیط کشت‌های حاوی سه سروتیپ باکتری سالمونلا شامل Anatum، Zanzibar و Kentuky منجر به کاهش جذب نوری آن‌ها در مقایسه با محیط کشت‌ها در حالت عادی (نبود فاژ) می‌شود (۱۹). همچنین Atterbury و همکاران (۲۰۰۷) کاهش جذب نوری باکتری *سالمونلا تیفی موریوم* را در حضور باکتریوفاژ گزارش نموده‌اند (۷).

طبق نتایج تحقیق حاضر اعمال باکتریوفاژ به روش گاواژ دهانی توانست به طور کامل مانع استقرار *سالمونلا انتریتیدیس* در روده باریک بلدرچین ژاپنی شود. در حالیکه اعمال فاژ به روش آشامیدن کلواکی با وجود کاهش شمار *سالمونلا انتریتیدیس* در محتویات ایلئوم منجر به حذف کامل باکتری نشد (نمودار ۲). نتایج حاضر مبنی بر توان ضد باکتریایی فاژ علیه سالمونلا با نتایج سایر محققین موافقت کامل دارد. در آزمایش-های Borie و همکاران (۲۰۰۸) اعمال باکتریوفاژ منجر به کاهش *سالمونلا انتریتیدیس* بازیافتی از محتویات ایلئوم شد (**۲۸**).

از آنجا که غلظت فاژ اعمال شده در هر دو روش اعمال برابر بود، به نظر می‌رسد علاوه بر غلظت فاژ اعمال شده، حجم فاژ نیز نقش مهمی در خاصیت ضد باکتریایی آن داشته باشد. در مطالعات Huff و همکاران (۲۰۰۲) برای درمان تورم کیسه‌های هوایی که از علائم کلی باسیلوز در پرندگان می‌باشد، از باکتریوفاژ استفاده شد. اعمال باکتریوفاژ به روش تزریق به کیسه‌های هوایی سینه‌ای توانست منجر به بهبود قابل توجه و کاهش علائم بیماری شود؛ اما اعمال همان باکتریوفاژ به صورت محلول در آب آشامیدنی در جلوگیری از بروز علائم بیماری غیر موثر بود. این نشان می‌دهد که حضور باکتریوفاژها بطور مستقیم در محل عفونت مهم می‌باشد (**۲۹**). در این تحقیق نیز به نظر می‌رسد از آنجایی که چالش حیوانات با *سالمونلا انتریتیدیس* به روش گاواژ دهانی بوده است، اعمال فاژ به همین روش کارآمدتر بوده و به عبارتی فاژ اعمال شده از این روش، تمامی بخش‌های دستگاه گوارش را پوشش داده است؛ اما احتمالاً این امر در مورد فاژ اعمال شده به روش آشامیدن کلواکی اتفاق نیفتاده است و باکتری‌های موجود در بخش‌های بالایی دستگاه گوارش در معرض فاژ قرار نگرفته‌اند؛ بنابراین برای موفق شدن در فاژدرمانی علاوه بر تعداد ذرات کافی فاژ، حضور موثر آن در محل آلودگی نیز حائز اهمیت است.

تاکنون اطلاعات بسیار اندکی در رابطه با اثر باکتریوفاژها بر میکروفلور طبیعی روده انسان و نقش آن‌ها بر سلامت انسان گزارش شده است (**۳۰**). با توجه به اهمیت لاکتوباسیل‌ها در سلامت روده حیوانات و انسان، اثر فاژ جداسازی شده در این تحقیق بر این باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت. کمترین تعداد لاکتوباسیل‌ها در گروه شاهد مثبت مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در شرایط چالش با سالمونلا و استقرار آن‌ها در روده باریک رقابت بر سر مواد غذایی که مورد مصرف باکتری‌های مفید قرار می‌گیرند، صورت می‌گیرد و شرایط برای رشد باکتری‌های مفید مانند لاکتوباسل‌ها مهیا نمی‌شود؛ بنابراین کاهش شمار باکتری‌های مفید در پرندگان گروه شاهد مثبت می‌تواند ناشی از چالش این پرندگان با *سالمونلا انتریتیدیس* باشد. حضور فاژ در دستگاه گوارش رشد باکتری *سالمونلا انتریتیدیس* را مهار می‌کند، با حذف یا کاهش تعداد *سالمونلا انتریتیدیس* بازیافتی از محتویات روده همانند آنچه که در روش اعمال فاژ به روش گاواژ دهانی و آشامیدن کلواکی صورت می‌گیرد، شرایط برای رشد لاکتوباسیل-ها نیز فراهم می‌شود. به گونه‌ای که بیشترین تعداد لاکتوباسیل‌ها در روش اعمال فاژ به روش گاواژ دهانی مشاهده شد (نمودار ۳).

در این تحقیق علاوه بر کارایی فاژ جداسازی شده در کاهش جمعیت باکتری میزبان، ایمن بودن آن و پاسخ پرنده‌های آزمایشی به اعمال آن مورد بررسی قرار گرفت. تیتر آنتی بادی تولید شده علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در پرندگان چالش داده شده که فاژ را دریافت کرده بودند، تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد منفی نداشت ($P<۰/۰۵$)، اما تیتر آنتی بادی تولید شده علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در گروه گاواژ دهانی بیشتر از گروه شاهد مثبت بود ($P<۰/۰۵$). بهبود سیستم ایمنی در این گروه را می‌توان به کاهش باکتری سالمونلا نسبت داد. با توجه به نقش لاکتوباسیل‌ها در بهبود ایمنی، علت احتمالی افزایش پاسخ ایمنی به اعمال دهانی فاژ کنترل باکتری سالمونلا توسط فاژ و بهبود شرایط برای رشد باکتری‌های مفید در روده پرندگان تیمار شده می‌باشد. کمترین تیتر آنتی بادی تولید شده علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در پرندگان گروه شاهد مثبت مشاهده شد (جدول ۱).

ممکن است کاهش تیتر آنتی بادی علیه ویروس واکسن آنفلوانزا به دلیل کاهش تعداد لاکتوباسیل‌ها در شرایط چالش با سالمونلا باشد. تیتر آنتی بادی تولید شده علیه ویروس واکسن آنفلوانزا در گروه شاهد فاژ تفاوت معنی‌داری با گروه شاهد منفی نداشت. همچنین وزن نسبی اندام‌های ایمنی تحت تاثیر تیمارها قرار نگرفت و در کالبد شکافی‌ها هیچ گونه هیپرتروفی یا تحلیل اندام‌های داخلی که نشان از تحت تاثیر قرار گرفتن عملکرد آن‌ها بواسطه اعمال باکتریوفاژ باشد، مشاهده نشد. نتایج حاصل از این تحقیق در رابطه با ایمن بودن باکتریوفاژ در توافق با سایر مطالعات انجام شده می‌باشد. گزارش شده است که قبل از استفاده از فاژ در درمان افراد مبتلا به عفونت‌های باکتریایی، Felix d'Herelle ایمن بودن فاژهای جداسازی شده را با مصرف آن‌ها به روش آشامیدن و تزریق به خودش تضمین می‌کرد. اولین

گزارش‌های موفقیت آمیز فاژ درمانی در انسان، درمان دو مورد اسهال خونی و وبا توسط این محقق می‌باشد (۳۱).

در آزمایشی امنیت باکتریوفاژها با مصرف خوراکی آن برای افراد داوطلب مورد بررسی قرار گرفت، نتایج حاکی از بی ضرر بودن فاژ اعمالی بود و هیچ اثر مضری در وضعیت سلامتی افراد داوطلب مشاهده نشد (۳۲). علاوه بر این در آزمایش‌های انجام شده روی موش صحرایی، هیچ گونه اثر نامطلوبی در اثر اعمال دهانی باکتریوفاژ به مدت پنج روز متوالی گزارش نشد، این نتایج نشان می‌دهند که باکتریوفاژها می‌توانند به عنوان عواملی ایمن و بی‌خطر در نظر گرفته شوند (۳۳). امروزه با پیدایش گونه‌های باکتریایی مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌های مرسوم که از عوامل مخاطره آمیز برای انسان، جانداران و محیط زیست می‌باشند، نیاز به استفاده از فاژها به عنوان عوامل ضد باکتریایی ایمن، بیش از پیش احساس می‌شود. علاوه بر این گزارش شده است که به خاطر ایمن بودن فاژها می‌توان از آن‌ها برای درمان افرادی که نسبت به برخی آنتی‌بیوتیک‌ها حساسیت دارند، استفاده نمود (۳۴).

با توجه به نتایج این پژوهش، می‌توان نتیجه گرفت که باکتریوفاژها توانایی بالقوه‌ای در مبارزه با پاتوژن‌های باکتریایی دارند و استفاده از بلدرچین ژاپنی به‌عنوان یک حیوان آزمایشگاهی در زمینه انجام مطالعات به منظور به کار گرفتن فاژ-ها برای مبارزه با باکتری‌های مشترک بین انسان و دام امری آسان و مقرون به صرفه می‌باشد. در شرایط چالش با عوامل بیماری‌زا اعمال باکتریوفاژ به روش گاواژ دهانی می‌تواند ضمن کنترل باکتری بیماری‌زا، منجر به بهبود سیستم ایمنی موجود زنده نیز شود. یافته‌های ما و سایر محققین حاکی از نتایج امید بخشی می‌باشند که با توجه به آن‌ها می‌توان نتیجه گرفت که فاژها قابلیت کاهش جمعیت باکتریایی را در شرایط *In vitro* و *In vivo* دارند، بنابراین می‌توان از آن‌ها به عنوان ابزارهای قدرتمند بیولوژیک علیه باکتری‌ها در شرایط کاربردی و عملی استفاده نمود.

تقدیر و تشکر

نویسندگان از همه کسانی که در انجام این پژوهش، همکاری نمودند، کمال تشکر و قدردانی را می نمایند.

تعارض منافع:

بین نویسندگان و مجله میکروب‌شناسی پزشکی ایران هیچ گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

References

1. Newell DG, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A, Sprong H, et al. Food-borne diseases—the challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. Int J Food Microbiol. 2010; 139: S3-S15.
2. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M-A, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens. Emerg Infect Dise. 2011;17(1).
3. Nyachuba DG. Foodborne illness: is it on the rise? Nutr Rev. 2010;68(5):257-269.
4. Rahimi S, Shiraz ZM, Salehi TZ, Karimi Torshizi MA, Grimes JL. Prevention of *Salmonella* infection in poultry by specific egg-derived antibody. Int J Poult Sci. 2007;6(4):230-235.
5. Ranjbar R, Giammanco GM, Farshad S, Owlia P, Aleo A, Mammina C. Serotypes, antibiotic resistance, and class 1 integrons in *Salmonella* isolates from pediatric cases of enteritis in Tehran, Iran. Foodborne Pathog Disf. 2011;8(4):547-553.
6. Javan A, Staji H, Ghazvinian K, Javaheri Vayeghan A, Mahdavi A. Prevalence of Salmonella spp. in the quail egg interior contents: A provincial study. Iran J Vet Med. 2012;6(3):191-196.
7. Atterbury R, Van Bergen M, Ortiz F, Lovell M, Harris J, De Boer A, et al. Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. Appl Environ Microb. 2007;73(14):4543-4549.
8. Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe R. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. Epidemiol Infecte. 2002;129(01):1-8.
9. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LRd, Pilotto F, de Moraes HL, Salle CTP, et al. Antibiotic resistance in

Salmonella Enteritidis isolated from broiler carcasses. Braz J Microbiol. 2006;37(3):368-371.

10. Hungaro HM, Mendonça RCS, Gouvêa DM, Vanetti MCD, Pinto CLdO. Use of bacteriophages to reduce *Salmonella* in chicken skin in comparison with chemical agents. Food Res Int. 2013;52(1):75-81.

11. Dias de Oliveira Sl, Siqueira Flores F, dos Santos LR, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. Int J Food Microbiol. 2005;97(3):297-305.

12. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45(3): 649-459.

13. Sabour PM, Griffiths MW. Bacteriophages in the control of food-and waterborne pathogens: ASM Press;2010.

14. Connerton P, Connerton I, Mead G. Microbial treatments to reduce pathogens in poultry meat, Food safety control in the poultry industry. Cambridge: Woodhead Ltd. 2005:414-427.

15. Karimi Torshizi MA, Rahimi S, Mojgani N, Esmaeilkhanian S, Grimes J. Screening of indigenous strains of lactic acid bacteria for development of a probiotic for poultry. Asian-Aust J Anim Sci. 2008;21(10):1495-1500.

16. Adams MH. Bacteriophages. Bacteriophages. New York: Inter science Publishers, 1959. p. 121-132.

17. Wong CL, Sieo CC, Tan WS, Abdullah N, Hair-Bejo M, Abu J, et al. Evaluation of a lytic bacteriophage, Φ *st*1, for biocontrol of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in chickens. Int J Food Microbiol. 2014;172:92-101.

18. Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broilers. Vet Microbiol. 2005;109(3):275-283.

19. Turki Y, Ouzari H ,Mehri I, Ammar AB, Hassen A. Evaluation of a cocktail of three bacteriophages for the biocontrol of *Salmonella* of wastewater. Food Res Int. 2012;45(2):1099-1105.

20. Bell C, Kyriakides A. *Salmonella*: a practical approach to the organism and its control in foods Microbiology series. London. UK. 2008. P. 89-120.

21. Andreatti Filho R, Higgins J, Higgins S, Gaona G, Wolfenden A, Tellez G, et al. Ability of bacteriophages isolated from different sources to reduce *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in vitro and in vivo. Poultry Sci. 2007;86(9):1904-1909.

22. Van Kessel, J.A., J.S. Karns, J.E. Lombard, C.A. Kopral. Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies. J Food Protect. 2011;74(5):759-768.

23. Hashemzadeh Z, Torshizi Karimi MA, Rahimi S, Razban V, Zahraei Salehi T. Prevention of *Salmonella* colonization in neonatal broiler chicks by using different routes of probiotic administration in hatchery evaluated by culture and PCR techniques. J Agr Sci Tech. 2010;12:425-432.

24. Samli H, Dezcan S, Koc F, Ozduven M, Okur AA, Senkoylu N. Effects of *Enterococcus faecium* supplementation and floor type on performance, morphology of erythrocytes and intestinal microbiota in broiler chickens. Brit Poultry Sci. 2010;51(4):564-568.

25. Peterson A, Qureshi M, Ferket P, Fuller J. Enhancement of cellular and humoral immunity in young broilers by the dietary supplementation of β-hydroxy-β-methylbutyrate. Immunopharm Immunot. 1999;21(2):307-330.

26. Sadeghi AA, Mohammadi A, Shawrang P, Aminafshar M. Immune responses to dietary inclusion of prebiotic-based mannan-oligosaccharide and β-glucan in broiler chicks challenged with *Salmonella enteritidis*. Turk J Vet Anim Sci. 2013;37(2):206-213.

27. Sillankorva S, Pleteneva E, Shaburova O, Santos S, Carvalho C, Azeredo J, et al. *Salmonella* Enteritidis bacteriophage candidates for phage therapy of poultry. J Appl Microbiol. 2010;108(4):1175-1186.

28. Borie C, Albala I, Sànchez P, Sánchez ML, Ramírez S, Navarro C, et al. Bacteriophage treatment reduces *Salmonella* colonization of infected chickens. Avian Dis. 2008;52(1):64-67.

29. Huff W, Huff G, Rath N, Balog J, Donoghue A. Prevention of *Escherichia coli* infection in broiler chickens with a bacteriophage aerosol spray. Poult Sci. 2002;81(10):1486-1491.

30. Dalmasso M, Hill C, Ross RP. Exploiting gut bacteriophages for human health. Trends Microbiol. 2014; 22(7): 399-405.

31. Sharp R. Bacteriophages: biology and history. J Chem Technol Biot. 2001;76(7):667-672.

32. Bruttin A, Brüssow H. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of

phage therapy. Antimicrob Agents Chemother. 2005;49(7):2874-2878.

33. Carlton R, Noordman W, Biswas B, De Meester E, Loessner M. Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: Genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. Regul Toxicol Pharm. 2005;43(3):301-312.

34. Elbreki M, Ross RP, Hill C, O'Mahony J, McAuliffe O, Coffey A. Bacteriophages and their derivatives as biotherapeutic agents in disease prevention and treatment. Journal of Viruses. 2014; Volume 2014, Article ID 382539, 20 pages. Available at: http://dx.doi.org/10.1155/2014/382539.