

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΘΡΕΨΕΩΣ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ
Saccharomyces cerevisiae ΣΤΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ
ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ
ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΤΟΥΣ
ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

ΕΛΕΝΗ ΝΤΑΛΑΚΑ

Εξεταστική επιτροπή:

Μουντζούρης Κ. Επίκουρος Καθηγητής

Φεγγερός Κ., Καθηγητής

Οικονομόπουλος Ι., Επίκουρος Καθηγητής

Αθήνα, Δεκέμβριος 2014

**ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΤΗΣ ΖΥΜΗΣ *Saccharomyces cerevisiae* ΣΤΟ
ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ ΚΡΕΟΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΡΝΙΘΙΩΝ ΕΠΙ ΤΗΣ ΣΥΣΤΑΣΗΣ ΤΗΣ
ΕΝΤΕΡΙΚΗΣ ΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ**

ΕΛΕΝΗ ΝΤΑΛΑΚΑ

*Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών,
Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55
email: kmountzouris@aua.gr*

Περίληψη

Σκοπός του πειράματος ήταν η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* type boulardii στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής επί της σύστασης της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων. Σε 480 ορνίθια Cobb ηλικίας 1^{ης} ημέρας χορηγήθηκε σιτηρέσιο με βάση το σίτο και το σογιάλευρο και κατανεμήθηκαν αρχικά και μέχρι την ηλικία των 14 ημερών σε δύο επεμβάσεις (με 16 επαναλήψεις ανά επέμβαση): την επέμβαση του μάρτυρα (C) χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη στο σιτηρέσιο και την επέμβαση της ζύμης (L) με προσθήκη *S.cerevisiae* σε συγκέντρωση 10⁹ CFU/kg τροφής. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* (SE) την 14^η ημέρα ηλικίας, το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε κατάλληλα διαμορφωμένο θάλαμο επιπέδου βιοασφάλειας II που κατόπιν ειδικών προσαρμογών έφερε 2 κύριους και ισοδύναμους χώρους που μέσω διαφορεικής πίεσης διασφαλιζέτο η ροή του αέρα από τον καθαρό στον μολυσμένο χώρο. Την 14^η ημέρα πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* σε 8 επαναλήψεις του μάρτυρα (C) και σε 8 επαναλήψεις της ζύμης (L) που βρίσκονταν τοποθετημένες στον μολυσματικό χώρο του θαλάμου εκτροφής. Έτσι από τη 14 ημέρα το πείραμα χωρίστηκε στις ακόλουθες τέσσερις επεμβάσεις: τον μάρτυρα (C), τη ζύμη (L), τον μολυσμένο με SE μάρτυρα (C_{SE}) και τη μολυσμένη με SE επέμβαση της ζύμης (L_{SE}). Ο προσδιορισμός της σύστασης της τυφλικής μικροχλωρίδας πραγματοποιήθηκε με τη μοριακή αναλυτική τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR) και χρησιμοποιήθηκαν κατεψυγμένα και ομογενοποιημένα δείγματα περιεχομένου τυφλών εντέρων ορνιθίων ηλικίας 15, 21 και 35 ημερών. Συγκεκριμένα μελετήθηκαν και προσδιορίστηκαν η συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων καθώς και οι συγκεντρώσεις των ακόλουθων βακτηριακών πληθυσμών *Lactobacillus spp.*,

Bacteroides spp., *Bifidobacterium spp.*, *Clostridium spp.*, *E.coli* και *Campylobacter spp.*

Γενικά δε σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές για κανένα από τα βακτήρια που μελετήθηκαν και σε καμία από τις δειγματοληψίες που εξετάστηκαν ανάμεσα στην επέμβαση του μη μολυσμένου μάρτυρα και της μη μολυσμένης ζύμης. Στα ορνίθια ηλικίας 15 ημερών, σημειώθηκε σημαντική μείωση της συγκέντρωσης των πληθυσμών *Bifidobacterium* και *Bacteroides* στις επεμβάσεις που μολύνθηκαν με SE (C_{SE} και L_{SE}) σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και L. Επιπλέον, η επέμβαση L_{SE} είχε σημαντικά χαμηλότερη συγκεντρωση των ολικών βακτηρίων, ενώ η επέμβαση του μολυσμένου μάρτυρα είχε σημαντικά χαμηλότερη συγκεντρωση βακτηρίων που ανήκουν στην ομάδα *C. coccoides* σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και L. Σημαντική μείωση παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού *Lactobacillus* ($P < 0,05$) την 35^η ημέρα ηλικίας των πτηνών στην επέμβαση C_{SE} σε σχέση με το μάρτυρα και τη μη μολυσμένη ζύμη. Συμπερασματικά, η προσθήκη της ζύμης στο σιτηρέσιο κρεοπαραγωγών ορνιθίων ηλικίας 14 ημερών σε επίπεδο 10^9 CFU/kg τροφής δε συνετέλεσε σε αλλαγή της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας που μελετήθηκε, σε αντίθεση με τη σαλμονέλλα που επηρέασε τη σύσταση αμέσως μετά τη μόλυνση.

EFFECT OF THE ADMINISTRATION OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* IN THE DIET OF BROILERS UPON THE COMPOSITION OF THEIR INTESTINAL MICROFLORA

ELENI NTALAKA

***Faculty of Animal Science & Aquaculture, Department of Nutritional Physiology and Feeding, Iera Odos 75, Athens 118 55
email: kmountzouris@aua.gr***

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of dietary administration of *Saccharomyces cerevisiae* type *boulardii* in broilers upon the composition of their caecal flora. A total of 480 Cobb one-day-old broiler chicks fed a wheat-soybean meal basal diet were divided into the following two treatments up to the age of 14 days with 16 replicates per treatment: control (C) without any addition in the basal diet and the yeast treatment (L) with feed addition of *S. cerevisiae* (concentration 10^9 CFU/ kg diet). In order to be able to challenge the chicks with *Salmonella Enteritidis* (SE) when they reached 14 days of age, the experiment took place in appropriately configured biosafety level II experimental room following specific adjustments. In particular the room was split into two separate and equivalent areas with the airflow occurring from the clean to the challenge area via differential pressure.

Therefore, on day 14, 8 replicates of control (C) and 8 replicates of yeast (L) located into the challenge area of the experimental room were challenged with SE by oral gavage. From that point onwards the experiment was divided into the following four treatments: control (C), yeast (L), control challenged with SE (C_{SE}) and yeast challenged with SE (L_{SE}). In this study, the composition of caecal microflora was determined with the molecular technique of real time polymerase chain reaction (real time PCR). Frozen and homogenized samples of caecal content of broilers aged 15, 21 and 35 day were used. The concentration of total bacteria and the concentrations of the following bacterial populations of *Lactobacillus* spp., *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *E. coli* and *Campylobacter* spp were examined and determined.

In general, there were no significant differences for any of the bacteria concentration and sampling day tested between unchallenged (C) control and unchallenged yeast (L). In 15 day-old broilers, there was a significant decrease in the concentration of *Bifidobacterium* spp and *Bacteroides* spp in the SE challenged treatments (C_{SE} and L_{SE}) in comparison with C and L. Moreover, the L_{SE} treatment had significantly lower concentration of total bacteria, while treatment of the challenged control had significantly lower concentration of bacteria belonging to the group *C. cocoides* - *E. rectale* compared with treatments C and L. There was a significant reduction of *Lactobacillus* spp (P<0,05) at treatment C_{SE} in 35 day-old broilers. In conclusion, the supplementation of yeast did not result in any change on the composition of caecal microflora. On the contrary, *Salmonella Enteritidis* affected the composition of the caecal microflora right after the broilers' challenge.

ΔΗΛΩΣΗ ΕΡΓΟΥ

Η κάτωθι υπογεγραμμένη, Ελένη Νταλάκα δηλώνω ότι το κείμενο της μελέτης αποτελεί δικό μου, μη υποβοηθούμενο πόνημα. Υποβάλλεται σε μερική εκπλήρωση των απαιτήσεων για την απόκτηση του Μεταπτυχιακού Διπλώματος Ειδίκευσης στην Διατροφή Αγροτικών Ζώων και Τεχνολογία Ζωοτροφών του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής και Υδατοκαλλιεργειών, του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Δεν έχει υποβληθεί ποτέ πριν για οιοδήποτε λόγο ή για εξέταση σε οποιοδήποτε άλλο πανεπιστήμιο ή εκπαιδευτικό ίδρυμα της χώρας ή του εξωτερικού.

.....

.....

Ελένη Νταλάκα

(ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ)

(Ημέρα, μήνας,

έτος)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης πολλοί ήταν αυτοί που συνέβαλαν. Από τη θέση αυτή θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου:

- Στον κ. Φεγγερό Κ. Καθηγητή για την συμμετοχή του στην εξεταστική επιτροπή.
- Στον κ. Οικονομόπουλο Ι. Επίκουρο Καθηγητή για την συμμετοχή της στην εξεταστική επιτροπή.
- Τον Καθηγητή Ζέρβα Γ. για τη φιλοξενία τους στο Εργαστήριο Φυσιολογίας Θρέψεως και Διατροφής
- Στην κ. Παλαμίδα Ίριδα καθώς και τον κ. Παρασκευά Βασίλη, υποψήφιοι διδάκτορες για την πολύτιμη βοήθειά τους κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους και για την υποστήριξη που μου παρείχαν καθόλη τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου μελέτης.
- Στον κ. Θεοδώρου Γεώργιο που ήταν πάντα παρών παρέχοντας μου οποιαδήποτε βοήθεια ήθελα.
- Στην οικογένεια μου, στους συναδέλφους μου, καθώς και σε πολλούς άλλους φίλους για την συμπαράσταση τους.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Μουντζούρη Κων/νο Επ.Καθηγητή, που για μία ακόμη φορά μου έδωσε την ευκαιρία να εξελιχθώ σε επιστημονικό επίπεδο. Η συνεργασία μου μαζί του μου έδωσε τη δυνατότητα να εξελιχθώ όχι μόνο σε επιστημονικό επίπεδο αλλά και να βελτιώσω στοιχεία του χαρακτήρα μου που σχετίζονται με την αποδοτικότητα μου στο εργασιακό περιβάλλον.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. ΕΝΤΕΡΙΚΟ ΟΙΚΟΣΥΣΤΗΜΑ	2
1.1.1. Αποίκηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα.....	3
1.1.2. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα.....	4
1.1.2.1. Παράγοντες που επιδρούν στην σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας.....	4
1.1.2.2. Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα.....	4
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	9
2.1. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΗ SALMONELLA	9
2.1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση του γένους <i>Salmonella</i>	10
2.1.2. Επιδημιολογία.....	11
2.1.3. Σαλμονέλλωση στην πτηνοτροφία	12
2.1.3.1. Πηγές μόλυνσης.....	13
2.1.3.2. Αποίκηση της σαλμονέλλας στον εντερικό σωλήνα	14
2.1.4. Πρόληψη και έλεγχος της σαλμονέλλας στην πτηνοτροφία.....	15
2.1.4. Ορότυποι σαλμονέλλας που εμφανίζονται στον άνθρωπο μέσω διατροφικής αλυσίδας	16
2.2. ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ ΤΗΣ ΜΙΚΡΟΧΛΩΡΙΔΑΣ.....	17
2.2.1. Χρήση του γονιδίου <i>16S r-DNA</i> για τη διερεύνηση της μικροχλωρίδας.....	17
2.2.2. Μοριακές αναλυτικές τεχνικές και διερεύνηση της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής.....	18
2.3. ΠΡΟΒΟΤΙΚΑ	19
2.3.1. Ορισμός και κριτήρια επιλογής.....	20
2.3.2. Είδη προβιοτικών οργανισμών στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής	21
2.3.3. Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών	22
2.3.3.1. Αντιμικροβιακή δράση.....	22
2.3.3.2. Ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού	22
2.3.3.3. Ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης.....	23
2.3.3.4. Μηχανισμοί δράσης ζυμών	23
2.3.4. Επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια κρεοπαραγωγής.....	26
2.4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΙΚΟΤΗΤΑ ΠΡΟΣΘΗΚΗΣ ΠΡΟΒΙΟΤΙΚΟΥ ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΕΙΣ ΜΟΛΥΝΣΗΣ ΜΕ ΠΑΘΟΓΟΝΟ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟ	28
3. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ ΜΕΛΕΤΗΣ	30
3.1. ΣΚΟΠΟΣ	30
3.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	30
3.2.1. Πειραματικό ζωικό υλικό- πειραματικός σχεδιασμός.....	30
3.3. ΜΙΚΡΟΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	31

3.3.1.	<i>Επιλογή καθαρών καλλιιεργειών.....</i>	<i>31</i>
3.3.2.	<i>Αναύσταση και ανάπτυξη πρότυπων βακτηριακών καθαρών καλλιιεργειών.....</i>	<i>32</i>
3.4.	ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ	34
3.4.1.	<i>Απομόνωση γενωμικού DNA από ομογενοποιημένα δείγματα περιεχομένου τυφλού εντέρου</i>	<i>34</i>
3.4.2.	<i>Απομόνωση βακτηριακού DNA από τις καθαρές καλλιιεργειες</i>	<i>35</i>
3.4.3.	<i>Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA</i>	<i>36</i>
3.4.4.	<i>Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου.....</i>	<i>37</i>
3.4.5.	<i>Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της real time PCR σε πήκτωμα αγαρόζης</i>	<i>46</i>
3.5.	ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	48
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	49
5.	ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ	57
6.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΣΕΙΣ.....	63

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2. 1: Οι σημαντικότεροι ορότυποι σαλμονέλλας για κάθε είδος (Πηγή: Υπουργείο Αγροτ. Αναπτ.& Τροφίμων, Δ/νση Κτηνιατρικής, 2012).....	11
Πίνακας 2. 2: Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης προβιοτικών στη μικροχλωρίδα των ορνιθίων.....	27
Πίνακας 2. 3: Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης προβιοτικών σε περιπτώσεις μόλυνσης με παθογόνο μικροοργανισμό επί της μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής	29

Πίνακας 3. 1: Κατανομή των πειραματικών επεμβάσεων με βάση την τελική σύνθεση σιτηρεσίου που χρησιμοποιήθηκε.	31
Πίνακας 3. 2: Καθαρές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση PCR.	32
Πίνακας 3. 3 Αντιστοιχία βακτηριακών πληθυσμών και θρεπτικών υλικών για την καλλιέργεια τους	33
Πίνακας 3. 4: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.....	41
Πίνακας 3. 5: Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR, με συγκέντρωση εκκινητών 200 nM.....	42
Πίνακας 3. 6: Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR, με συγκέντρωση εκκινητών 300 nM.....	43
Πίνακας 3. 7: Τα στάδια της real time qPCR.....	44

Πίνακας 4. 1: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε \log_{10} CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 15 ημερών, μία ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση με <i>Salmonella enteritidis</i>	52
Πίνακας 4. 2: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε \log_{10} CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 21 ημερών, μία εβδομάδα μετά την πειραματική μόλυνση με <i>Salmonella enteritidis</i>	53
Πίνακας 4. 3: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε \log_{10} CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 35 ημερών, τρεις εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση με <i>Salmonella enteritidis</i>	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 3. 1: Φωτομέτρο Quawell 5000 (Εργαστήριο Ζωοτεχνίας).....	36
Εικόνα 3. 2: Τυπική γραφική παράσταση Real Time PCR αντίδρασης, κατά τη φάση εκθετικής αύξησης και φάση πλατώ του PCR προϊόντος. Η ευθεία γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των PCR προϊόντων (ΔRn) αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline), ενώ ο κύκλος (cycle number) στον οποίο συμβαίνει αυτό, ονομάζεται Ct (Cycle threshold).	39
Εικόνα 3. 3: Απεικόνιση καμπυλών τήξης (melt curves) και γραφικών παραστάσεων αποτελεσματικότητας (standard curves) της αντίδρασης της real time PCR για τα ζεύγη εκκινητών bac και eco, για τους βακτηριακούς πληθυσμούς <i>Bacteroides</i> και <i>Escherichia coli</i> αντιστοίχως.....	45

Εικόνα 3. 4: Διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αгарόζης.....	47
Εικόνα 3. 5: Τα προϊόντα της PCR πραγματικού χρόνου για κάθε ζεύγος εκκινητών με χρήση της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αгарόζης 1,5% που ταυτοποιούν τον ολικό βακτηριακό πληθυσμό και τους υπό εξέταση βακτηριακούς πληθυσμούς.	48

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 2. 1: Συνοπτική παρουσίαση διάφορων πτυχών των ανταγωνιστικών ιδιοτήτων των ζυμών.....	25
Διάγραμμα 4. 1: Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της σύστασης της ολικής τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε log CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων κρεοπαραγωγής ανά επέμβαση και ανά χρόνο δειγματοληψίας. Οι στήλες ανά επέμβαση και χρόνο δειγματοληψίας αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (n=7) ± τυπικό σφάλμα.	55
Διάγραμμα 4. 2: Η επίδραση του χρόνου στη συγκέντρωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού. Οι στήλες ανά χρόνο δειγματοληψίας τυφλικού περιεχομένου αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (n=28) ± τυπικό σφάλμα.	56

1. Εισαγωγή

Ο γαστρεντερικός σωλήνας των θερμόαιμων ζώων που η διατροφή τους περιέχει σύνθετους υδατάνθρακες φιλοξενεί ένα μεγάλο αριθμό βακτηριακών πληθυσμών. Η πολύπλοκη αυτή συλλογή βακτηριακών ειδών που αποικίζει σε όλο του το μήκος τον πεπτικό σωλήνα αναφέρεται ως εντερική μικροχλωρίδα (Perry, 2006).

Παρά το γεγονός ότι οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα θεωρούνται ως επωφελείς ή συμβιωτικοί, συγκεκριμένα βακτηριακά είδη (παθογόνα ή δυνητικά παθογόνα) επιφέρουν αρνητικές επιδράσεις στην υγεία των ζώων προκαλώντας σαφή ελάττωση της ανάπτυξης μέχρι και θνησιμότητα (Perry, 2006). Συνεπώς η σχέση που αναπτύσσεται ανάμεσα στον ξενιστή και στην εντερική του μικροχλωρίδα θεωρείται ότι βρίσκεται σε μια ισορροπία ανάμεσα στην επωφελή συμβίωση και στην παθογένεια (Dumonceaux *et al.*, 2006).

Η προσθήκη των αντιβιοτικών στη διατροφή των ζώων αποτέλεσε επί δεκαετίες μέσο ρύθμισης της εντερικής μικροχλωρίδας, μειώνοντας τις βακτηριακές λοιμώξεις και βελτιώνοντας με αυτό τον τρόπο τα παραγωγικά χαρακτηριστικά των ζώων. Η απαγόρευση τους όμως έκρινε επιτακτική την ανάγκη να διερευνηθεί εις βάθος η ακριβής σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και να γίνει κατανοητός ο τρόπος που μπορεί να τροποποιηθεί, ιδιαίτερα μέσω της διατροφής. Η διατροφή παίζει καθοριστικό ρόλο στο εντερικό μικροβιακό πρότυπο. Παράγοντες όπως η σύσταση, η αναλογία των θρεπτικών συστατικών, τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά, η επεξεργασία και οι πρόσθετες ύλες του σιτηρεσίου διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη δυναμική της εντερικής μικροχλωρίδας (Oviedo-Rondon *et al.*, 2010).

Οι πρόσθετες ύλες, εκ των οποίων σημαντικό ποσοστό καταλαμβάνει η χρήση των προβιοτικών, έχουν λάβει μεγαλύτερο ενδιαφέρον για την προαγωγή της ανάπτυξης της ωφέλιμης μικροχλωρίδας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Τα προβιοτικά συντελούν στη διατήρηση ενός υγιούς γαστρεντερικού περιβάλλοντος και στη βελτίωση της εντερικής λειτουργίας μέσω της διαιτητικής πρόσληψης επαρκών ποσοτήτων ζωντανών ωφέλιμων μικροοργανισμών (Mountzouris *et al.*, 2010). Παρά

το πλήθος των εργασιών στις οποίες καταγράφονται οι ευεργετικές τους ιδιότητες, εντούτοις έως και σήμερα δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως ο τρόπος δράσης τους.

Επιπρόσθετα, η ανάγκη διερεύνησης μεθόδων εξάλειψης της σαλμονέλλας καθίσταται επιτακτική καθώς αποτελεί δημόσιο κίνδυνο. Η σαλμονέλλωση θεωρείται ως μία από τις σημαντικότερες τροφιμογενείς λοιμώξεις παγκοσμίως με τα πτηνά να αποτελούν σημαντική δεξαμενή για το ζωνόσο παθογόνο παράγοντα. Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής και πιο συγκεκριμένα το τυφλό έντερο είναι ο κύριος χώρος αποίκησης των βακτηρίων, συνεπώς και της σαλμονέλλας (Knap *et al.*, 2011). Σημαντική συμβολή προσφέρει η χρήση μοριακών αναλυτικών τεχνικών με σκοπό την έγκαιρη ανίχνευση του παθογόνου. Η γρήγορη ανίχνευση βοηθάει στον έλεγχο των παθογόνων βακτηρίων και στην πρόληψη διάδοσης της νόσου (Jordan *et al.*, 2009). Τέλος, η εξέλιξη των αναλυτικών μέσων αναμένεται να κάνει εφικτή την ακριβή ποιοτική και ποσοτική ταυτοποίηση των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών που αποικούν το γαστρεντερικό σύστημα των ορνιθίων και να γίνει δυνατή η διερεύνηση τροποποιήσεων που επιδέχονται οι πληθυσμοί αυτοί μετά από τη χορήγηση πρόσθετων υλών.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη της επίδρασης προσθήκης ζύμης επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατόπιν πειραματικής ή μη μόλυνσης με *Salmonella Enteritidis*. Για τον σκοπό αυτό, αναλύθηκαν δείγματα περιεχομένου τυφλών εντέρων ορνιθίων από σχετικό πείραμα με τη χρήση της μοριακής αναλυτικής τεχνικής της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης πραγματικού χρόνου (real time PCR).

1.1. Εντερικό οικοσύστημα

Ο εντερικός σωλήνας των ζώων είναι ένα ιδιαίτερα σημαντικό όργανο του σώματος. Κύριος σκοπός του είναι η αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών για να καλυφθούν οι ανάγκες συντήρησης και παραγωγής. Παράλληλα θεωρείται ως ένα σύνθετο οικοσύστημα διότι, αποικίζεται από μια πολύπλοκη και σε μεγάλο βαθμό εξελισσόμενη μικροβιακή κοινότητα που αποτελείται από εκατοντάδες είδη βακτηρίων (Rehman *et al.*, 2007 b). Επίσης δεν μπορεί να παραληφθεί ότι είναι ίσως το μεγαλύτερο όργανο του ανοσοποιητικού συστήματος στο σώμα (Brown, 2011).

Ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο για την υγεία και την παραγωγική ικανότητα των ορνιθίων λαμβάνει η αποίκηση του εντερικού σωλήνα από διάφορους μικροβιακούς πληθυσμούς διότι, επηρεάζει την εντερική ανάπτυξη, την βιοχημεία, την ανοσολογία, την φυσιολογία και την ανθεκτικότητα σε μολύνσεις (Torok *et al.*, 2008; Torok *et al.*, 2011). Τα παραπάνω αποδεικνύονται από έρευνες που έχουν διεξαχθεί σε ζώα απαλλαγμένα μικροβίων όπου παρουσίασαν διευρυμένο τυφλό έντερο, λεπτότερο βλεννογόνο, μικρότερου ύψους λάχνες και κρύπτες, μειωμένη κινητικότητα εντέρου, μικρότερη θερμοκρασία σώματος και ανεπαρκώς ανεπτυγμένο ανοσοποιητικό σύστημα (Niba *et al.*, 2009).

1.1.1. Αποίκηση και κατανομή της μικροχλωρίδας στον εντερικό σωλήνα

Ο εντερικός σωλήνας των νεοσσών είναι στείρος κατά τη διάρκεια της εκκόλαψης. Η αποίκηση του αποτελεί μια διαδικασία που αρχίζει κατά την έξοδο τους από το αυγό (Arajalahti, 2005). Οι μικροοργανισμοί που υπάρχουν στο κέλυφος του αυγού και στο περιβάλλον εκκόλαψης προσλαμβάνονται αμέσως από τα νεαρά ορνίθια. Οι Gabriel *et al.* (2006) επισήμαναν πως η μέγιστη βακτηριακή πυκνότητα επιτυγχάνεται περίπου μία εβδομάδα μετά την εκκόλαψη. Μετά από αυτήν τη φάση ανάπτυξης της μικροχλωρίδας, ακολουθεί η φάση «ωρίμανσης» που χαρακτηρίζεται από: (i) ένα χαμηλό ρυθμό ανάπτυξης ίσο με το ρυθμό διόδου της τροφής από τον πεπτικό σωλήνα και (ii) τη σταδιακή επιλογή των βακτηρίων που προσαρμόζονται πιο αποτελεσματικά στις συνθήκες που επικρατούν. Οι αερόβιοι καθώς και οι προαιρετικά αναερόβιοι βακτηριακοί πληθυσμοί εγκαθίστανται πρώτοι. Οι εν λόγω μικροοργανισμοί θεωρείται ότι μειώνουν το διαθέσιμο οξυγόνο που υπάρχει στον εντερικό σωλήνα, γεγονός που επιτρέπει την επακόλουθη αποίκηση από αυστηρά αναερόβιους πληθυσμούς (Dibner *et al.*, 2008).

Η κατανομή της μικροχλωρίδας στο γαστρεντερικό σωλήνα δεν αποτελεί μια τυχαία διαδικασία. Ποιοτικά καθώς και ποσοτικά οι διάφοροι βακτηριακοί πληθυσμοί οργανώνονται στα διαμήκη και στα κάθετα τμήματα του πεπτικού σωλήνα. Η διαμήκης οργάνωση της μικροχλωρίδας παραπέμπει στην κατανομή των βακτηρίων από τη στοματική κοιλότητα (ράμφος) προς το κόλον, με τη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών να διαφέρει συντριπτικά από τμήμα σε τμήμα (Παλαμίδα, 2011; Cianciullo, 2012).

Η οριζόντια οργάνωση αφορά τα ακόλουθα 4 μικροπεριβάλλοντα που σχηματίζονται εντός του εκάστοτε τμήματος του εντερικού σωλήνα και αποικίζονται από τους μικροβιακούς πληθυσμούς: α) τον εντερικό χυμό, β) το στρώμα της βλέννης που έρχεται σε επαφή με τον εντερικό αυλό, γ) το στρώμα της βλέννης που καλύπτει τις κρύπτες και δ) την επιφάνεια των επιθηλιακών κυττάρων (Dibner *et al.*, 2008). Κάθε τμήμα και κάθε οριζόντιο στρώμα του εντερικού σωλήνα φιλοξενεί συγκεκριμένους βακτηριακούς πληθυσμούς που καθορίζονται κυρίως από τους φυσικοχημικούς παράγοντες (χολικά άλατα, διαθέσιμο οξυγόνο, pH, σύσταση βλεννοπρωτεϊνών που επιστρώνουν το επιθήλιο) που χαρακτηρίζουν κάθε ένα από αυτά.

1.1.2. Ποσοτική και ποιοτική εκτίμηση της μικροχλωρίδας του εντερικού σωλήνα

1.1.2.1. Παράγοντες που επιδρούν στην σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας

Η σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη και σταθερή αλλά θεωρείται ως ένα δυναμικό σύστημα που μεταβάλλεται ανάλογα το είδος του υπό ανάπτυξη ζωϊκού πληθυσμού και τις συνθήκες που επιδρούν σε αυτόν. Διαφοροποιείται ανάλογα με τη φυλή, το γένος, το περιβάλλον εκτροφής (Gabriel *et al.*, 2006), την ατομικότητα (Van der Wielen *et al.*, 2000; Torok *et al.*, 2011b), την διαθεσιμότητα των θρεπτικών συστατικών (Arajalahti *et al.*, 2001), την ηλικία και τη διατροφή που εφαρμόζεται. Η ηλικία καθώς και η διατροφή είναι δύο από τους παράγοντες που επηρεάζουν ιδιαίτερα τη φύση και το μέγεθος του μικροβιακού φορτίου που αποικίζει τον εντερικό σωλήνα (Mead, 2005), για αυτό και η παρακάτω ανάλυση αφορά κυρίως αυτούς τους δύο παράγοντες.

1.1.2.2. Διαφοροποίηση της σύστασης κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα

Βακτηριακή δραστηριότητα κατά μήκος του εντερικού σωλήνα εντοπίζεται στον πρόλοβο, στον ειλέο και κυρίως στα τυφλά έντερα (Gabriel *et al.*, 2006). Η παρουσία οξέων και χολικών αλάτων, ο υψηλός βαθμός απορροφητικής ικανότητας θρεπτικών συστατικών, η ταχεία διέλευση του περιεχομένου, η συνεχής ανανέωση των επιθηλιακών κυττάρων και της βλέννης και οι μηχανισμοί ανοσιακής άμυνας παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό βακτηριακών κυττάρων στον εγγύς εντερικό σωλήνα (Perry, 2006).

Πρόλοβος

Στα ορνίθια κρεοπαραγωγής παρουσιάζεται ένας πληθυσμός γαλακτοβακίλλων που συνδέεται στενά με το πλακώδες επιθήλιο του προλόβου. Αυτή η συσχέτιση συμβαίνει αμέσως μετά την εκκόλαψη και εξακολουθεί να υφίσταται καθ' όλη τη διάρκεια της ζωής του οργανισμού και δεν επηρεάζεται ούτε από τις αλλαγές στη διατροφή ούτε από το σύστημα εκτροφής που εφαρμόζεται (Fuller and Brooker, 1974).

Οι Luo *et al.* (2003), διαπίστωσαν ότι οι γαλακτοβάκιλλοι που κυριαρχούν στον πρόλοβο κυμαίνονται σε επίπεδο $10^8 - 10^9$ κύτταρα/gr περιεχομένου. Το πιο βασικό είδος του γένους *Lactobacillus* που παρουσιάζεται στον πρόλοβο είναι το *L. acidophilus* με 61,9% των απομονωμένων στελεχών καθ' όλη την παραγωγική περίοδο των ορνιθίων κρεοπαραγωγής.

Σύμφωνα με τους Guan *et al.* (2003), η μικροχλωρίδα του προλόβου των ορνιθίων ανέρχεται σε 10^8 κύτταρα /gr περιεχομένου μετά την 14^η ημέρα της ζωής τους και απαρτίζεται κυρίως από είδη που ανήκουν στο γένος *Lactobacillus*. Η σύσταση της ποικίλει με τα είδη *L. reuteri*, *L. johnsonii*, *L. crispatus*, *L. gallinarum* και *L. amylovorus* να ανιχνεύονται από την πρώτη κιόλας εβδομάδα ζωής έως και την 42^η μέρα ηλικίας των ορνιθίων ενώ τα είδη *L. acidophilus* και *L. salivarius* να εμφανίζονται μετά την 7^η και 14^η ημέρα αντίστοιχα (Guan *et al.*, 2003).

Ειλεός

Αρκετές μελέτες έχουν δείξει πως η σύσταση της μικροχλωρίδας επηρεάζει τη λειτουργία του εντέρου, την πέψη και την απορρόφηση θρεπτικών συστατικών (Gong *et al.*, 2002). Η μικροχλωρίδα του ειλεού ποιοτικά και ποσοτικά ομοιάζει με αυτήν του προλόβου με κυρίαρχο γένος να αποτελεί και πάλι αυτό του *Lactobacillus* (Lu *et al.*, 2003; Bjerrum *et al.*, 2006; Wise and Siragusa 2007).

Σε έρευνα που διεξήγαγαν οι Lu *et al.*, (2003) σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο χωρίς τη προσθήκη αντιβιοτικών και κοκκιδιοστατικών, διαπίστωσαν ότι, από τους 614 16S rDNA κλώνους που ανιχνεύτηκαν στον ειλεό το 67,5 % απαρτίζονταν από βακτηριακούς πληθυσμούς του γένους *Lactobacillus*, το 9,69 % από είδη του γένους *Clostridium*, το 6,63% και το 6,43% από είδη των γενών *Streptococcus* και *Enterococcus* αντίστοιχα. Άλλοι

βακτηριακοί πληθυσμοί που εντοπίζονται στο τμήμα του ειλεού και παρουσιάζονται σε μικρότερα ποσοστά ανήκουν στις οικογένειες *Streptococaceae*, *Enterococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Clostridiaceae*, *Coriobacteriaceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Micrococcaeae* (van der Hoeven-Hangoor *et al.*, 2013).

Σε σχετική εργασία των Bjeggum *et al.* (2006), που σκοπό της είχε τη διερεύνηση της μικροχλωρίδας ορνιθίων, που είχαν διατραφεί με συμβατικό (προσθήκη σαλινομυκίνης και εξωγενών ενζύμων) ή με οργανικό σιτηρέσιο επιβεβαιώθηκε η κυριαρχία του γένους *Lactobacillus* και σημειώθηκε ότι τα είδη που ανιχνεύτηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό ήταν τα *L. salivarius* και *L. johnsonii* που στα συμβατικής διατροφής ορνίθια αριθμούσαν το 44% και 30% των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα, ενώ στα ορνίθια οργανικής διατροφής τα *L. cripatus* και *L. salivarius*, αριθμούσαν το 61% και 20% των ολικών κλώνων των γαλακτοβακίλλων αντίστοιχα.

Τυφλό έντερο

Τα τυφλά θεωρείται ότι προσφέρουν ένα αρκετά σταθερό περιβάλλον για την εγκατάσταση ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος (Zirpin *et al.*, 2004). Το γεγονός αυτό αποδίδεται στην αργή ανανέωση του περιεχομένου των τυφλών εντέρων που έχει ως αποτέλεσμα να διατηρούνται σταθερές συνθήκες για την ευνοϊκή ανάπτυξη μικροβιακών πληθυσμών (Mead, 2005). Εκτιμάται ότι τουλάχιστον 640 διαφορετικά είδη που ανήκουν σε 140 διαφορετικά γένη ανευρίσκονται εντός των τυφλών εντέρων (Arajalahti *et al.*, 2004).

Μελέτες επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων χρονολογούνται από τις αρχές του 1970 (Jozefiak *et al.*, 2010). Ωστόσο, μέχρι και σήμερα δεν έχει ταυτοποιηθεί πλήρως η ακριβής σύνθεση της πολύπλοκης αυτής μικροβιακής κοινότητας. Τα τελευταία χρόνια βέβαια, λόγω της ανάπτυξης των μοριακών αναλυτικών τεχνικών που μπορούν να ανιχνεύουν βακτηριακούς πληθυσμούς σε σύνθετα οικοσυστήματα, έχει σχηματιστεί μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα όσον αφορά τη σύνθεση της μικροχλωρίδας.

Στους Brisbin *et al.* (2008) επισημαίνεται πως τα τυφλά περιέχουν μια ποικιλόμορφη κοινότητα από βακτήρια, συμπεριλαμβανομένων των γενών *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Escherichia*,

Fusobacterium, *Streptococcus* και *Campylobacter* (Salanitro *et al.*, 1978; Gong *et al.*, 2002; Amit-Romach *et al.*, 2004; Bjerrum *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2007). Σε ανασκόπηση των Stanley *et al.* (2014) αναφέρεται πως μεγάλο ποσοστό των βακτηριακών πληθυσμών που εντοπίζονται στα τυφλά έντερα ανήκουν κυρίως στα *Clostridiaceae*, *Bacteroidaceae* και *Lactobacillus*.

Σύμφωνα με τους ίδιους ερευνητές, η μικροχλωρίδα των τυφλών εντέρων κατά κύριο λόγο αποτελείται από τέσσερα γένη, αυτά των *Lactobacillus* (24,38%), *Clostridium* (20,13%), *Bacteroides* (15,83%) και μία ομάδα που αποτελείται από αγνώστα, μέχρι σήμερα, βακτήρια (18,95%). Σε μικρότερες ποσότητες (0,7-6,31%) εντοπίζονται τα γένη *Lachnospiraceae*, *Alphaproteobacteria*, *Faecalibacterium* και *Subdoligranulum*. Τέλος, σε ίχνη (0,01-0,11%) ανευρίσκονται τα γένη *Papillibacter*, *Coprobacillus*, *Anaerotruncus* και *Anaerovorax* (Stanley *et al.*, 2012).

Κατά τις δεκατέσσερις πρώτες μέρες ζωής ενός υγιούς ορνιθίου η σύσταση της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων είναι σχετικά απλή και αποτελείται από είδη που ανήκουν στα φύλα *Firmicutes* και *γ-Proteobacteria*. Αναλυτικότερα μέχρι και τις τέσσερις πρώτες ημέρες της ζωής ενός ορνιθίου το είδος *E. coli* της οικογένειας *Enterobacteriaceae* κυριαρχεί σε σχέση με οποιοδήποτε άλλο, ενώ μετά τις 5 πρώτες μέρες ανευρίσκονται και βακτήρια που ανήκουν στις οικογένειες *Lachnospiraceae* και *Clostridiaceae* (Tanikawa *et al.*, 2011).

Αντιθέτως, τα τυφλά των ενήλικων ορνιθίων αποικίζονται κυρίως από υποχρεωτικά αναερόβια και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, με τη συγκέντρωσή τους να ανέρχεται σε 10^{11} cfu/g εντερικού περιεχομένου. Το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηριακών πληθυσμών που ανιχνεύεται στα τυφλά, ανήκει στο φύλο *Firmicutes* (Gong *et al.*, 2002; Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Bjerrum *et al.*, 2006; Dumonceaux *et al.*, 2006), ενώ δεν απουσιάζουν και βακτηριακά είδη που εμπίπτουν στα φύλα *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* και *Proteobacteria*.

Αναφορικά με τους Lu *et al.* (2003), το 65,6% από τους 619 κλώνους που εντοπίστηκαν στο τυφλό έντερο ορνιθίων ήταν ομόλογοι με τον πληθυσμό *Clostridiaceae* (*Clostridium*, *Ruminococcus* και *Eubacterium*), ακολούθουμνα από το γένος *Fusobacterium* με 13,9% και το γένος *Lactobacillus* σε ποσοστό 7,75%, ενώ βακτηριακά είδη που ανήκουν στην κλάση *Proteobacteria* και το γένος *Bacteroides*

ανιχνεύτηκαν μόλις σε ποσοστό 2,8% και 5,1% αντίστοιχα. Ανάλογα οι Zhu *et al.* (2002), οι οποίοι ανέλυσαν τον εντερικό χυμό καθώς και τη βλέννη που καλύπτει το εντερικό επιθήλιο στο τυφλό έντερο θηλυκών ορνιθίων 42 ημερών αναφέρουν ότι, το 47,3% των αλληλουχιών που απομονώθηκαν ανήκουν στα *C. leptum* και *C. coccoides*, ενώ επισημαίνουν ότι το 20,8% αντιπροσωπεύεται από βακτηριακά είδη που ανήκουν στο φύλο Proteobacteria και με ποσοστό μικρότερο του 2% να αντιπροσωπεύεται από είδη του γένους *Bacteroides*, *Bifidobacterium* και *Pseudomonas*. Παρόμοια οι Gong *et al.* (2007), οι οποίοι μελέτησαν βακτηριακούς πληθυσμούς που σχετίζονται με τη βλέννη του επιθηλίου του τυφλού εντέρου αναφέρουν ότι το γένος *Clostridium* αντιπροσωπεύει το 40% των αλληλουχιών που ανίχνευσαν. Ακόμη, απομονώθηκαν αλληλουχίες που αντιστοιχούν στα *Faecalibacterium prausnitzii*, *Escherichia coli*, *Lactobacillus* και *Ruminococcus* σε ποσοστό 14%, 11%, 7% και 6% αντίστοιχως.

Σε έρευνα που διεξήγαγαν οι Corrigan *et al.* (2011) σε ορνίθια κρεοπαραγωγής που χορηγήθηκε σιτηρέσιο βασισμένο στον αραβόσιτο και το σογιάλευρο χωρίς την προσθήκη αντιβιοτικών και κοκκιδιοστατικών, διαπίστωσαν ότι από τους 594 16S rDNA κλώνους που εντοπίστηκαν στο τυφλό, απαρτίζονταν κυρίως από τα τρία φύλα, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* και *Proteobacteria*. Το μεγαλύτερο ποσοστό των βακτηριακών πληθυσμών στο τυφλό ανήκει στο φύλο *Firmicutes* με κύριες αλληλουχίες να αντιστοιχούν στο σύμπλεγμα *Clostridia* subclusters XIVa και IV, στην κλάση *Bacilli*, στην τάξη *lactobacillales* και άλλα στην κλάση *Clostridia*. Στο φύλο *Proteobacteria* κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό το υποφύλο *Gammaproteobacteria* με κύρια τα γένη *Escherichia* και *Shigella*.

Όπως προαναφέρθηκε η σύσταση της μικροχλωρίδας δεν είναι απόλυτη και παραλλάσει ποικιλοτρόπως. Οι διαφορές στα ποσοστά των βακτηριακών πληθυσμών που παρατηρούνται παραπάνω αποδίδονται σε παράγοντες όπως, η μέθοδος ανάλυσης της μικροχλωρίδας, το περιβάλλον εκτροφής, το είδος της διατροφής και τον γονότυπο του ορνιθίου (Bjerrum *et al.*, 2006) καθώς και το τμήμα του εντέρου (διαμήκες ή κάθετο) που εξετάζεται.

2. Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

2.1. Ανασκόπηση σχετικά με τη *Salmonella*

Η σαλμονέλλωση είναι ένα από τα μείζονα προβλήματα που προκαλεί τροφιμογενή βακτηριακή εντερίτιδα σε πολλές χώρες του κόσμου. Σε παγκόσμιο επίπεδο, έχουν αναφερθεί τουλάχιστον 1,3 δισεκατομμύρια περιπτώσεις σαλμονέλλωσης σε ανθρώπους ετησίως και περίπου τρία εκατομμύρια ασθενείς πέθαναν από τη νόσο. Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, υπολογίζονται, σε ετήσια βάση, 1.340.000 περιπτώσεις τροφιμογενών σαλμονελλώσεων και 553 θάνατοι καταγεγραμμένοι (Mead, 1999). Αυτές οι λοιμώξεις συχνά προκύπτουν από την κατανάλωση μολυσμένων τροφών, όπως πουλερικά, κόκκινο κρέας, γαλακτομικά προϊόντα, θαλασσινά, αυγά και άλλες τροφές. Ακόμη, μπορεί να μεταδοθεί από άνθρωπο σε άνθρωπο με άμεση ή έμμεση επαφή, καθώς επίσης και με απευθείας επαφή με ζώα (Soni, 2007).

Το γένος της *Salmonella spp.* στα τρόφιμα ανιχνεύεται με αρκετές μεθόδους, όπως είναι οι καλλιεργητικές μέθοδοι, οι ορολογικές δοκιμές και οι μοριακές αναλύσεις, με πιο πρόσφατη τη real time PCR. Οι καλλιεργητικές αναλύσεις διαρκούν μέχρι και 5 ημέρες για να ληφθούν τα αποτελέσματα. Η εξέταση τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών περιλαμβάνει τον πρωτογενή και δευτερογενή εμπλουτισμό και την ορολογική επιβεβαίωση των αποικιών που αναπτύχθηκαν στα τρυβλία (Lee *et al.*, 2009). Συνεπώς, οι συμβατικές μέθοδοι καλλιέργειας είναι χρονοβόρες και υψηλής εντάσεως εργαστηριακές αναλύσεις, οι οποίες δεν είναι κατάλληλες για δοκιμές ρουτίνας μεγάλων αριθμών δειγμάτων. Ως εκ τούτου, η ταχεία, αποδοτική και αυτοματοποιημένη διάγνωση των τροφιμογενών παθογόνων μικροοργανισμών σε όλη την αλυσίδα των τροφίμων εξακολουθεί να αποτελεί σημαντικό μέλημα για τη βιομηχανία αλλά και για τη δημόσια υγεία. Λόγω αυτών των αναγκών, η αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης έχει γίνει ένα ισχυρό εργαλείο για τη μικροβιολογική διαγνωστική κατά τη διάρκεια της τελευταίας δεκαετίας. Η δεύτερη γενιά PCR μεθοδολογιών, η PCR πραγματικού χρόνου, έχει την δυνατότητα να ικανοποιεί όλα τα κριτήρια, συνδυάζοντας τον πολλαπλασιασμό και την ανίχνευση σε ένα στάδιο (Malorny *et al.*, 2004).

2.1.1. Ονοματολογία και ταξινόμηση του γένους *Salmonella*

Το γένος *Salmonella* πήρε το όνομα του από τον Daniel Elmer Salmon, έναν Αμερικανό παθολόγο κτηνίατρο. Εν έτει 1886, οι Salmon και Theobald Smith ανακάλυψαν τον οργανισμό που προκαλούσε τη χολέρα των χοίρων, *Salmonella enterica* var.*Choleraesuis*, καθώς πίστευαν πως είναι η αιτία της πανώλης των χοίρων. Η σημασία του οργανισμού ως αιτία της νόσου σε χοίρους είχε παραμεληθεί για πολλά χρόνια μέχρι το είδος της *Salmonella Choleraesuis* να αναγνωριστεί ως παθογόνο που είναι ικανό να προκαλέσει αρκετά διαφορετικά σύνδρομα ασθενειών (Somyanontanagul, 2009).

Το γένος *Salmonella* ανήκει στην οικογένεια *Enterobacteriaceae* και είναι προαιρετικά αναερόβια, Gram αρνητικά βακτήρια, αρνητικά στην οξειδάση, θετικά στην καταλάση, κινητά και ραβδόμορφα. Η σαλμονέλλα μπορεί να αναπτυχθεί σε μεγάλο εύρος θερμοκρασίας, από 2 έως 54 °C, με βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης τους 37 °C. Το βέλτιστο pH για την ανάπτυξη της σαλμονέλλας είναι σε κλίμακα 6.5-7.5 με στελέχη να μπορούν να αναπτυχθούν σε υγρά θρεπτικά μέσα με τις τιμές του pH να κυμαίνονται σε εύρος 4,05-9,5 (Legendi, 2013).

Τις τελευταίες δεκαετίες, η ονοματολογία για το γένος *Salmonella* έχει υποστεί πολλές αλλαγές. Πρόσφατα, έγινε αποδεκτό από την επιστημονική κοινότητα πως το γένος αποτελείται από τα δύο είδη: i) *Salmonella enterica* και ii) *Salmonella bongori*. Το *S. enterica* υποδιαιρείται σε έξι υποείδη (subspecies): *S.enterica* subsp.*enterica* (έχει ορισθεί ως subspecies I), *S.enterica* subsp.*salamae* (subspecies II), *S.enterica* subsp.*arizonae* (subspecies IIIa), *S.enterica* subsp.*diarizonae* (subspecies IIIb), *S. enterica* subsp.*houtenae* (subspecies IV) και *S.enterica* subsp.*indica* (subspecies VI). Τα υποείδη της *Salmonella enterica* καθορίζονται από τα σωματικά (O), μαστιγιακά (H) και καψικά (K) αντιγόνα. Μέχρι σήμερα, 2610 ορότυποι έχουν γνωστοποιηθεί από τους οποίους το 99% ανήκει στο είδος *S.enterica* και το 59% στο υποείδος *S.enterica* subsp.*enterica* και προκαλεί, κατά βάση, λοιμώξεις στον άνθρωπο και σε θερμόαιμα ζώα (Uzzau *et al.*, 2000) με τους σπουδαιότερους να εμφανίζονται στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 2.1.).

Πίνακας 2. 1: Οι σημαντικότεροι ορότυποι σαλμονέλλας για κάθε είδος (Πηγή: Υπουργείο Αγροτ. Αναπτ.& Τροφίμων, Δ/νση Κτηνιατρικής, 2012)

Φορείς της <i>Salmonella</i>	Ορότυποι του γένους <i>Salmonella</i>
Άνθρωπος	<i>S. Typhi</i> και <i>S. Paratyphi</i>
Όρνιθες	<i>S. Gallinarum</i> , <i>S. Pullorum</i> , <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. Enteritidis</i>
Βοοειδή	<i>S. Typhimurium</i> , <i>S. Dublin</i> , <i>S. Enteritidis</i> και <i>S. Abortus-ovis</i>
Πρόβατο	<i>S. Dublin</i> , <i>S. Typhimurium</i> και <i>S. Abortus-ovis</i>
Χοίρος	<i>S.Cholerae-suis</i> , <i>S.Typhi-suis</i> και <i>S.Typhimurium</i>
Άλογο	<i>S. Abortus-equi</i> και <i>S. Typhimurium</i>
Πάπιες	<i>S. Typhimurium</i> και <i>S. Enteritidis</i>

2.1.2. Επιδημιολογία

Η σαλμονέλλα είναι ένα βακτήριο με παγκόσμια εξάπλωση που εντοπίζεται στο γαστρεντερικό σύστημα θερμόαιμων και ψυχρόαιμων ζώων και έχει αναγνωρισθεί ως σημαντική ζωνόσος ασθένεια με σημαντικές οικονομικές επιπτώσεις σε ζώα και ανθρώπους.

Κατά τα έτη 1987-1997, το 61% των ανθρώπινων λοιμώξεων που προκλήθηκαν, οφείλονταν στους πέντε ορότυπους, *Typhimurium* (23%), *Enteritidis* (21%), *Heidelberg* (8%), *Newport* (5%) και *Hadar* (4%) (Carter, 2008). Έχει παρατηρηθεί ότι τα κρούσματα προέρχονται κυρίως από την κατανάλωση πουλερικών, βοδινού κρέατος, γαλοπούλας και αυγών. Τα εν λόγω προϊόντα μπορούν να περιέχουν το μικρόβιο της σαλμονέλλας λόγω του μολυσμένου ζώου ή μολυσμένων κοπράνων που εμφανίζονται κατά την επεξεργασία. Ως εκ τούτου, τα προληπτικά μέτρα καθώς και οι στρατηγικές ελέγχου είναι μεγάλης σημασίας για την εξάλειψη της σαλμονέλλωσης. Επιπρόσθετα, το βακτήριο της σαλμονέλλας μπορεί να προκαλέσει νοσηρότητα και θνησιμότητα στη χοιροτροφία, προβατοτροφία καθώς και πτηνοτροφία (Knap *et al.*, 2011).

Στην Ευρώπη, οι σαλμονελλώσεις που εμφανίστηκαν στον άνθρωπο ήταν πάνω από 100.000 εν έτει 1997. Τα τελευταία χρόνια τα περιστατικά της σαλμονελλωσης έχουν μειωθεί σημαντικά στην Ευρώπη (73.000 περιπτώσεις το 2001). Περίπου το 60%

οφείλεται σε 4 ορότυπους, συμπεριλαμβανομένων τις *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Newport* και *S. Heidelberg*. Το 2004, νέα περιστατικά της *S. Newport* και *S. Javiana* έδειξαν τεράστια αύξηση 41% και 167%, αντίστοιχα, σε σχέση με τη διατία 1996-1998 (Dunkley *et al.*, 2009).

Ο έλεγχος της σαλμονέλλας είναι μια σοβαρή πρόκληση για τον κλάδο της ζωϊκής παραγωγής, λόγω της επιδημιολογίας του βακτηρίου και τους πολλούς τρόπους μετάδοσης. Για τον καθορισμό των παραμέτρων που αφορούν την προστασία της εκτροφής, η επαρκής γνώση της οικολογίας και της επιδημιολογίας του βακτηρίου είναι απαραίτητη για τη θέσπιση μέτρων ελέγχου (HACCP). Τα προγράμματα ελέγχου μαζί με την κατάλληλη υγιεινή από το αγρόκτημα ως το τραπέζι του καταναλωτή μπορεί να είναι το κλειδί για την μείωση της εμφάνισης του βακτηρίου και την συχνότητα των τροφιμογενών λοιμώξεων (Carter, 2008)

2.1.3. Σαλμονέλλωση στην πτηνοτροφία

Σε πλήθος ερευνών που αναφέρονται κρούσματα και σποραδικές περιπτώσεις σαλμονελλώσεων, έχει σημειωθεί ότι τα τρόφιμα που προσδιορίζονται ως η πιο κοινή πηγή λοιμώξεων είναι τα πουλερικά και υποπροϊόντα αυτών, συμπεριλαμβανομένων των ακατέργαστων και άψητων αυγών (Bryan *et al.*, 1995). Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος της *Salmonella* προκαλούν ασυμπτωματικές εντερικές λοιμώξεις στα πτηνά με οξείες επιδημίες και υψηλά επίπεδα θνησιμότητας να παρουσιάζονται σε νεοσσούς ηλικίας μικρότερης των 2 εβδομάδων (Dunkley *et al.*, 2009). Το κέλυφος του αυγού μπορεί να μολυνθεί κατά την διέλευση από τον γαστρεντερικό σωλήνα και της ικανότητας διεισδύσης του βακτηρίου εντός του αυγού (Dunkley *et al.*, 2009). Για παράδειγμα, η σαλμονέλλα και πιο συγκεκριμένα ο ορότυπος *S. pullorum* μπορεί να μεταδοθεί κάθετα από ένα μολυσμένο πτηνό-γονέα μέσω του αυγού στο νεοσσό. Ενώ υπάρχουν διαφορετικά και μη ειδικά κλινικά συμπτώματα, το αποτέλεσμα είναι ένας υπερβολικός αριθμός νεκρών νεοσσών μέσα στο κέλυφος και αυξημένη θνησιμότητα λίγο μετά την εκκόλαψη. Η *S. Enteritidis* έχει δείξει μεγαλύτερη ικανότητα αποίκισης του κοιλιακού επιθηλίου των ωοπαραγωγών ορνίθων σε σύγκριση με τους άλλους ορότυπους. Οι όρνιθες που είναι ασυμπτωματικοί φορείς διευκολύνουν τη μετάδοση της σαλμονέλλας στο σμήνος

(Gast *et al.*, 1998). Ο ορότυπος *S. gallinarum* που εντοπίζεται στα περιττώματα των μολυσμένων ορνιθίων μπορεί να παραμείνει στα περιττώματα για τουλάχιστον ένα μήνα ενώ στο σφάγιο παραμένει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα.

Παρά το γεγονός ότι η παθογένεση για τη *Salmonella* έχει μελετηθεί ευρέως για τα θηλαστικά, υπάρχουν περιορισμένες πληροφορίες σχετικά με τους μηχανισμούς της στα πτηνά. Σε κοτόπουλα που έχουν μολυνθεί *in vitro* με διάφορα είδη σαλμονέλλας διεξάγονται μικροσκοπικές εξετάσεις του εντερικού σωλήνα αποδεικνύοντας παρόμοιες κυτταρικές αποκρίσεις στα διάφορα είδη σαλμονέλλας με μαζική εισβολή ετερόφιλων και μακροφάγων στην επιφάνεια του αυλού του έντερου. Η ικανότητα των ετερόφιλων και των μακροφάγων να εξουδετερώνουν τη *Salmonella* μέσω βακτηριοκτόνων δοκιμασιών σχεδιάστηκαν *in vitro* από τους Stabler *et al.* (1994). Αν το παθογόνο δεν εξαιρεθεί από το ανοσοποιητικό σύστημα, τότε ακολουθεί η αποίκισή του στο εντερικό επιθήλιο και δύναται να μετακινηθεί στο εσωτερικό και να αποικήσει άλλα κύτταρα καταλαμβάνοντας θέσεις άλλων βακτηρίων. Μελέτες έχουν δείξει πως η *in vitro* χορήγηση και η επακόλουθη μόλυνση του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων, έχει ως αποτέλεσμα την μετανάστευση του παθογόνου σε άλλα εσωτερικά όργανα, όπως στον σπλήνα, το ήπαρ και τις ωοθήκες (Dunkley *et al.*, 2009). Αυτό υποδηλώνει πως τουλάχιστον το πειραματικό αυτό μοντέλο μόλυνσης των ορνιθίων, περιλαμβάνει τη διαδοχική μόλυνση των εσωτερικών οργάνων και είναι παρόμοιο με αυτό των θηλαστικών.

2.1.3.1. Πηγές μόλυνσης

Στον κλάδο της πτηνοτροφίας, πηγές μόλυνσης της σαλμονέλλας αποτελούν κυρίως τα μολυσμένα ζώα, είτε με οριζόντια είτε με κάθετη μετάδοση, οι μολυσμένες ζωοτροφές και το νερό (Rodriguez *et al.*, 2006). Ο Guard-Petter (2001) αναφέρει ακόμη τα μολυσμένα τρωκτικά και τα άγρια πτηνά, καθώς και έντομα και παράσιτα, τα οποία μπορεί να μεταφέρουν μηχανικά το βακτήριο. Η υγρασία και η οργανική ουσία των κτιρίων της πτηνοτροφικής μονάδας είναι ακόμη μία εστία του παθογόνου. Επιπρόσθετα, η μετάδοση της σαλμονέλλας συμβαίνει αερογενώς, μέσω της ανανέωσης της σκόνης σε μία πτηνοτροφική μονάδα, ακόμη και έξι εβδομάδες μετά την εξάλειψη του παθογόνου (Higgins *et al.*, 1982). Η διάδοση της σαλμονέλλας δεν

μπορεί να εξαλειφθεί εάν δεν αποσαφηνιστούν πλήρως οι πηγές μόλυνσης και οι τρόποι μετάδοσης του παθογόνου.

2.1.3.2. Αποίκηση της σαλμονέλλας στον εντερικό σωλήνα

Το γένος *Salmonella*, παρά το γεγονός ότι ανήκει στα παθογόνα βακτήρια, συχνά αποικίζει στον εντερικό σωλήνα των ορνιθίων χωρίς το ζώο να νοσεί. Ως ασυμπτωματικός φορέας του παθογόνου, δεν θεωρείται αποτελεσματική η ένδειξη παρουσίας άρρωστων ορνιθίων στην εκτροφή για την ύπαρξη και αποίκηση της σαλμονέλλας στον εντερικό σωλήνα (Callaway *et al.*, 2008).

Η πρώτη γραμμή άμυνας για την αποίκηση της σαλμονέλλας στο γαστρεντερικό σωλήνα είναι η φυσιολογική γαστρική οξύτητα, που τείνει να είναι θανατηφόρα για το παθογόνο αυτό. Έχει διαπιστωθεί μείωση της παρουσίας του παθογόνου στο στομάχι σε υγιή άτομα, με αποτέλεσμα λίγα παθογόνα βακτήρια να εισέρχονται στο έντερο. Η μείωση αυτή οφείλεται στη φυσική εντερική μικροχλωρίδα που αποικεί στο έντερο σε συνδυασμό με το συνεχή καθαρισμό, με αποτέλεσμα τη γρήγορη απομάκρυνση των βακτηρίων. Ένας άλλος μηχανισμός άμυνας είναι η έκκριση αντισωμάτων του βλεννογόνου σε μια προσπάθεια προστασίας του οργανισμού. Συνεπώς, όταν οι γραμμές άμυνας έχουν διαταραχθεί, ο οργανισμός βρίσκεται σε ανοσοκαταστολή και είναι ευάλωτος στη σαλμονέλλωση (Carter, 2008).

Τα πτηνά είναι ευαίσθητα στη σαλμονέλλα και μπορεί να υπάρξει σημαντική μείωση της με ψεκάσμο ή χορήγηση μέσω στοματικής κοιλότητας αναερόβιας καλλιέργειας μικροχλωρίδας τυφλού εντέρου πριν από την έκθεση και ιδανικά κατά την εκκόλαψη. Με τον τρόπο αυτόν αναστέλλεται η αποίκηση του παθογόνου στον εντερικό σωλήνα με την ταυτόχρονη παραγωγή οξέων και άλλων ανασταλτικών ουσιών και διεγείρεται το επιθήλιο του βλεννογόνου του εντέρου, παρατηρείται δηλαδή ανοσιακή απόκριση του οργανισμού (Mead, 2000; Revollo *et al.*, 2006).

Το τυφλό έντερο είναι ο κύριος χώρος ζύμωσης του γαστρεντερικού σωλήνα και καταγράφεται ο μεγαλύτερος αριθμός βακτηρίων. Έχουν απομονωθεί πάνω από 200 διαφορετικά είδη βακτηρίων και είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από παράγοντες όπως είναι η διατροφή, η ηλικία και η υγεία του πτηνού.

Συνοπτικά, οι παράγοντες που επηρεάζουν την επιδεκτικότητα αποίκησης της σαλμονέλλας κατά τη διέλευση από τον εντερικό σωλήνα είναι (Revolledo *et al.*, 2006):

- Η ηλικία των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Οι νεοσσοί είναι πιο επιρρεπείς στην αποίκηση παθογόνου σε σχέση με ορνίθια μεγαλύτερης ηλικίας
- Η επιβίωση του παθογόνου μετά τον γαστρικό φραγμό που εξαρτάται από το χορηγούμενο στέλεχος και τη δόση
- Η υγιεινή κατάσταση των ορνιθίων
- Ο ανταγωνισμός μεταξύ σαλμονέλλας και των άλλων βακτηρίων
- Το περιβαλλοντικό στρες που αυξάνει τις πιθανότητες για αποίκηση του παθογόνου στο εντερικό επιθήλιο
- Οι κληρονομικοί παράγοντες
- Η φαρμακευτική αγωγή και οι αντιμικροβιακές πρόσθετες ύλες που αλλάζουν την σύσταση του εντέρου.

2.1.4. Πρόληψη και έλεγχος της σαλμονέλλας στην πτηνοτροφία

Η απειλή του παθογόνου *S. Enteritidis* στην πτηνοτροφία παραμένει σε έξαρση και είναι δύσκολο να επιτευχθεί η εξάλειψη του χωρίς να χρησιμοποιηθούν νέες προσεγγίσεις. Παλαιότερα, γινόταν χρήση αντιβιοτικών ως προληπτικά μέσα της αποφυγής ασθενειών ή ως αυξητικοί παράγοντες. Από τον Ιανουάριο 2006 απαγόρευτηκαν στην Ε.Ε όλα τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνταν στη διατροφή των ζώων προληπτικά λόγω δημιουργίας ανθεκτικών στελεχών (Dibner *et al.*, 2005).

Ο ορότυπος *S. Enteritidis* έχει εντοπιστεί ακόμη και μετά από καθαρισμό και απολύμανση των πτηνοτροφικών μονάδων, με την πλήρη εξάλειψη του ορότυπου αυτού να είναι αποθαρρυντική (Omwandho and Kubota, 2010). Επιπρόσθετα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ανάλυση των αποτελεσμάτων που προέρχονται από αιματολογικές εξετάσεις σε εμβολιασμένα σμήνη. Παρά το γεγονός ότι ο εμβολιασμός με ανενεργό στέλεχος *S. Gallinarum* εμποδίζει την αποίκηση της *S. Enteritidis* στον εντερικό σωλήνα, αυτό είναι δυσδιάκριτο με τη χρήση αιματολογικών εξετάσεων (Callaway *et al.*, 2008).

Ωστόσο, τα ποσοστά μόλυνσης μπορούν να μειωθούν σημαντικά με πολλαπλές και παράλληλες προσεγγίσεις από τους ερευνητές, τις περιβαλλοντικές υπηρεσίες, τα

τιμήματα που ασχολούνται με τη δημόσια υγεία, τους εκτροφείς, τους χειριστές των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένων των μεταφορέων και εκείνων που εργάζονται στα σφαγεία, τους εργαζόμενους σε εστιατόρια και τέλος των καταναλωτών (Omwandho and Kubota, 2010). Απαιτείται λεπτομερής γνώση των πιο σημαντικών παραγόντων κινδύνου όπου σχετίζονται με την παρουσία της σαλμονέλλας στο σύστημα παραγωγής όπως η τροφή και το νερό.

Στους Marin *et al.* (2010) υπογραμμίζεται πως ακόμη και ελάχιστη ανεύρεση παθογόνου στη ζωοτροφή, δηλαδή η παρουσία μικρότερης ακόμη και από 1 σαλμονέλλα/g τροφής σε ορνίθια κρεοπαραγωγής 1-7 ημερών είναι ικανή για να αποικίσει στον εντερικό σωλήνα. Νεοσσοί κρεοπαραγωγής που αποκτούν πρόσβαση σε ταΐστρες και επιμολυσμένες ζωοτροφές κατά τις πρώτες εβδομάδες είναι συνυφασμένη με υψηλότερη απέκκριση του παθογόνου στα περιττώματα (Van Immerseel *et al.*, 2004).

Τέλος, η προσθήκη πρόσθετων υλών σε σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής ή η αλλαγή της σύστασης του σιτηρεσίου μεταβάλλει την σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας και θα αναλυθεί εκτενέστερα στο υποκεφάλαιο 2.3.4.

2.1.4. Ορότυποι σαλμονέλλας που εμφανίζονται στον άνθρωπο μέσω διατροφικής αλυσίδας

Η σαλμονέλλωση είναι μία από τις πιο κοινές αιτίες τροφιμογενούς διαρροϊκής νόσου. Οι περισσότερες είναι ζωνόνες και μεταδίδονται από ζώα που είναι φορείς στους ανθρώπους μέσω μολυσμένων τροφίμων (Somyanontanagul, 2009).

Σε παγκόσμια κλίμακα, το 99% των μολύνσεων στον άνθρωπο και στα θερμόαιμα ζώα οφείλεται στο είδος *S. enterica* subsp. *enterica*. Το 2010 το 47% των σαλμονελλώσεων άνηκε στον ορότυπο *S. enterica* serovar *Enteritidis*. Ο δεύτερος πιο συχνά εμφανιζόμενος ορότυπος που εντοπίζεται στον άνθρωπο είναι ο *S. enterica* serovar *Typhimurium* με ποσοστό περί το 35%. Ακολουθούν οι ορότυποι *S. enterica* serovar *Infantis* (2%), *Derby* (0,8%), *Kentucky* and *Virchow* (0,5%). Το 8,5% των άλλων περιστατικών οφείλεται σε άλλους ορότυπους του είδους *S. enterica* subsp. *enterica*. Ωστόσο, έχουν παρατηρηθεί διαφορές στην επικράτηση οροτύπων ανάλογα με την περιοχή που μελετάται. Για παράδειγμα, ο *S. enterica* serovar *Heidelberg* αναφέρεται πιο συχνά στην Βόρεια Αμερική καταλαμβάνοντας την τέταρτη θέση,

ακολουθούμενη από την Ευρώπη (ένατη θέση), ενώ σε Αφρική και Ασία δεν εντοπίζεται ανάμεσα στους πιο συχνά εμφανιζόμενους ορρότυπους (Legendi, 2013).

2.2. Αναλυτικές τεχνικές διερεύνησης της μικροχλωρίδας

Ένας μεγάλος αριθμός βακτηρίων που απαρτίζουν την εντερική μικροχλωρίδα παραμένει έως σήμερα αδιευκρίνιστος (Torok *et al.*, 2008). Εκτιμάται ότι το 20% του ολικού βακτηριακού πληθυσμού του εντερικού περιεχομένου μπορεί να προσδιοριστεί με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας εξαιτίας (Hume *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2013):

- ✓ άγνωστων αναγκών ανάπτυξης των μικροοργανισμών
- ✓ εκλεκτικότητας των θρεπτικών υλικών
- ✓ καταπόνησης των μικροοργανισμών από την διαδικασία καλλιέργειας
- ✓ απουσίας αυστηρώς αναερόβιων συνθηκών.

Επιπρόσθετα, οι βασιζόμενες στην καλλιέργεια τεχνικές εμφανίζουν δύο σημαντικά προβλήματα (Oviedo-Rondon *et al.*, 2009):

- 1^ο) Απουσία φυλογενετικής ταξινόμησης
- 2^ο) Ανέφικτη ανίχνευση βακτηρίων που είναι αδύνατο να καλλιεργηθούν ή είναι πολύ απαιτητικά στις συνθήκες καλλιέργειας ή βρίσκονται σε πολύ μικρή συγκέντρωση με συνέπεια να μην μπορούν να εντοπιστούν.

Τα παραπάνω μειονεκτήματα είναι δυνατό να αντιμετωπιστούν με την εφαρμογή μοριακών τεχνικών προσδιορισμού της μικροχλωρίδας. Οι σύγχρονες μοριακές τεχνικές βασίζονται στην σύγκριση αλληλουχιών των νουκλεϊκών οξέων (DNA, RNA). Είναι σχετικά γρήγορες, χαμηλού κόστους και ικανές για καταγραφή γονιδιακών περιοχών πολύπλοκων πληθυσμών (Torok *et al.*, 2008).

2.2.1. Χρήση του γονιδίου 16S r-DNA για τη διερεύνηση της μικροχλωρίδας

Τα γονίδια που κωδικοποιούν το ριβοσωμικό RNA (rRNA) προμηθεύουν μία μεγάλη ποσότητα από αξιόλογες πληροφορίες στη μικροβιακή φυλογένεση, ποικιλομορφία

και εξέλιξη (Perry, 2006). Το βακτηριακό ριβοσώμα αποτελείται από δύο υπομονάδες, την 50S και την 30S υπομονάδα. Η 50S υπομονάδα περιέχει το 5S rRNA και το 23S rRNA, ενώ η 30S υπομονάδα περιέχει το 16S rRNA. Οι ριβοσωμικές αλληλουχίες θεωρούνται άριστα μόρια για την εκτίμηση της εξελικτικής σχέσης μεταξύ των μικροοργανισμών (Blaut *et al.*, 2002). Έχουν κρίσιμες λειτουργίες όπως την καθολική τους κατανομή μεταξύ όλων των κυτταρικών τύπων που υπάρχουν στη ζωή, τις υψηλά διατηρημένες αλληλουχίες κωδικοποίησης του rRNA και τέλος την εξελικτική τους διαφοροποίηση. Ο πιο συχνός τύπος rRNA που χρησιμοποιείται για την εκτίμηση της μικροβιακής ποικιλομορφίας είναι το 16S rRNA (1500 nt) καθώς θεωρείται ότι το γονίδιο είναι μικρό και εμπεριέχει πολλές συντηρημένες περιοχές (conserved regions) και διότι το 5S rRNA (300 nt) παρέχει περιορισμένες πληροφορίες, ενώ το 23S rRNA (3000 nt) παρά το γεγονός ότι δίνει περισσότερες πληροφορίες, χρειάζεται περαιτέρω αλληλούχιση (Mackie and Cann, 2005).

2.2.2. Μοριακές αναλυτικές τεχνικές και διερεύνηση της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής

Η εντερική μικροχλωρίδα των ορνιθίων έχει μελετηθεί εκτενώς με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας (Kabir *et al.*, 2005; Rehman *et al.*, 2007b; Salim *et al.*, 2013). Ωστόσο, όπως προαναφέρθηκε υστερούν σε βασικά σημεία. Έτσι η μέχρι τώρα εικόνα για τη σύσταση της μικροχλωρίδας ίσως είναι ανακριβής και ελλιπής (Gong *et al.*, 2007).

Μέχρι σήμερα, έχουν εφαρμοστεί διάφορες μοριακές αναλύσεις για τον προσδιορισμό και την σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής που περιλαμβάνουν:

1. την αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης σε πραγματικό χρόνο (real time PCR) (Wise and Siragusa 2005; Harrow *et al.*, 2007; Wise and Siragusa 2007)
2. την φθορίζουσα *in situ* υβριδοποίηση (Zhu and Joerger 2003; Collado and Sanz 2007; Gerard *et al.*, 2008; Olsen *et al.*, 2008; Jozefiak *et al.*, 2010)
3. την ηλεκτροφόρηση πηκτώματος με διαβαθμισμένη αποδιατακτική σύσταση (DGGE) (Guan *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2007; Nava *et al.*, 2009; Tanikawa *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2013)

4. τον πολυμορφισμό μήκους περιοριστικών τεμαχίων (T-RFLP) (Gong *et al.*, 2002; Lan *et al.*, 2004; Czerwinski *et al.*, 2010)
5. την αλληλούχηση του 16S rRNA γονιδίου (Zhu *et al.*, 2002; Lu *et al.*, 2003; Bjerrum *et al.*, 2006; Gong *et al.*, 2007; Torok *et al.*, 2011 b).

Η συνεχής εξέλιξη των μοριακών αναλυτικών μέσων πρόκειται να προσφέρει καινούριες προοπτικές για την απάντηση βασικών ερωτημάτων που αφορούν την εντερική μικροχλωρίδα και περιλαμβάνουν τα εξής (Perry, 2006):

- ✓ την πραγματική έκταση της μικροβιακής ποικιλομορφίας, συμπεριλαμβανομένης της ανίχνευσης των μη καλλιεργήσιμων οργανισμών
- ✓ την επίδραση της διατροφής και των διακυμάνσεων μεταξύ των ξενιστών όσον αφορά τη σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας
- ✓ την ακολουθία του πρωίμου αποικισμού και
- ✓ την αποίκηση συγκεκριμένων βακτηριακών επιθηλιακών θέσεων προσκόλλησης στα διαφορετικά τμήματα του εντερικού σωλήνα.

2.3. Προβιοτικά

Αν και η έννοια των προβιοτικών εισήχθη στις αρχές του εικοστού αιώνα, δεν είχε καθιερωθεί πριν τη δεκαετία του '60. Ο ορισμός του όρου έχει εξελιχθεί με το πέρασμα των χρόνων. Σύμφωνα με τους Fooks *et al.* (1999) η λέξη προβιοτικό προέρχεται από δύο ελληνικές λέξεις που σημαίνουν «για τη ζωή». Ο Parker (1974) ήταν ο πρώτος συγγραφέας που χρησιμοποίησε τη λέξη προβιοτικό στο πλαίσιο συμπληρωμάτων διατροφής των ζώων και ορίστηκε ως «οργανισμοί και ουσίες που συνέβαλαν στην ισορροπία της εντερικής χλωρίδας». Αργότερα, το 1989 ο Fuller όρισε τα προβιοτικά ως συμπληρώματα διατροφής που περιέχουν ζωντανούς μικροοργανισμούς που επηρεάζουν θετικά τον ξενιστή. Πολλοί ακόμη ορισμοί έχουν δημοσιευθεί (Sanders, 2003), όμως ο πιο ευρέως αποδεκτός είναι ότι «τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί που χορηγούμενοι σε συγκεκριμένες ποσότητες παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή» (FAO/WHO, 2001).

Στην πτηνοτροφία πρωτοπόρος της χρήσης σκευασμάτων που περιείχαν ζωντανά βακτήρια θεωρείται ο Tortuero, ο οποίος απέδειξε ότι η χορήγηση γαλακτοβάκιλλων είχε τα ίδια αποτελέσματα με αυτά που λαμβάνονται όταν είχαν χορηγηθεί

αντιβιοτικά, όπως αύξηση σωματικού βάρους και βελτίωση του συντελεστή εκμετάλλευσης της τροφής (Mountzouris *et al.*, 2007). Την ίδια χρονική περίοδο (1973) οι Nurmi και Rantala παρατήρησαν ότι η χορήγηση περιττωμάτων προερχόμενα από ενήλικα ορνίθια περιόρισε την αποίκηση του είδους *Salmonella infantis* στο τυφλό έντερο νεοεκκολαπτόμενων ορνιθίων (Revolledo *et al.*, 2006).

2.3.1. Ορισμός και κριτήρια επιλογής

Κατά την πάροδο των ετών η λέξη προβιοτικά έχει λάβει διάφορους ορισμούς με τον πιο πρόσφατο να αποτελεί τον εξής: τα προβιοτικά είναι ζωντανοί μικροοργανισμοί, χορηγούμενοι σε συγκεκριμένες ποσότητες να παρέχουν οφέλη για την υγεία του ξενιστή (FAO/WHO, 2001).

Για να θεωρηθεί ένας μικροοργανισμός ως προβιοτικός θα πρέπει να κατέχει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά και να τηρεί και συγκεκριμένα κριτήρια ασφάλειας, τα οποία περιλαμβάνουν τα εξής (Gaggia *et al.*, 2010):

- Να μην είναι τοξικός
- Να μην είναι παθογόνος
- Να έχει προέλευση από το ξενιστή
- Να επιζεί, να αποικίζει και να είναι μεταβολικά ενεργός στη θέση στόχο, που συνεπάγεται να είναι ανθεκτικό στη γαστρική οξύτητα και στα χολικά άλατα, να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο ή στη βλέννη και να ανταγωνίζεται με την ενδογενή μικροχλωρίδα.
- Να παράγει αντιμικροβιακές ουσίες
- Να ανταγωνίζεται παθογόνα βακτήρια
- Να ρυθμίζει την ανοσιακή απάντηση
- Να είναι ικανός να ασκεί ένα τουλάχιστον επιστημονικά υποστηριζόμενο χαρακτηριστικό για την προαγωγή της υγείας
- Να είναι γενετικά σταθερός
- Να διατηρεί σταθερά τα επιθυμητά χαρακτηριστικά του κατά την επεξεργασία, αποθήκευση και διανομή
- Να διατηρεί τη βιωσιμότητα του σε υψηλούς πληθυσμούς
- Να έχει επιθυμητά οργανοληπτικά και τεχνολογικά χαρακτηριστικά όταν επιδέχεται βιομηχανική κατεργασία.

2.3.2. Είδη προβιοτικών οργανισμών στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής

Ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί πολυάριθμα είδη βακτηρίων, μυκήτων και ζυμών στη διατροφή των αγροτικών ζώων. Συγκεκριμένα στη διατροφή των ορνιθίων κρεοπαραγωγής τα γένη των βακτηρίων που έχουν ωφέλιμα αποτελέσματα είναι κυρίως τα οξυγαλακτικά βακτήρια (lactic acid bacteria) *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* και *Streptococcus*. Τα βασικά κριτήρια για έναν τέτοιο μικροοργανισμό είναι να είναι ανθεκτικό στη γαστρική οξύτητα και στα χολικά άλατα, να προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο ή στη βλέννη και να ανταγωνίζεται με την ενδογενή μικροχλωρίδα (Brown, 2011). Ζυμες που χρησιμοποιούνται ως προβιοτικοί μικροοργανισμοί είναι οι: *Aspergillus oryzae*, *Saccharomyces boulardii* και *Saccharomyces cerevisiae*, με τον τελευταίο να είναι αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας.

Παρά το γεγονός ότι η μικροχλωρίδα αποτελείται κατά βάση από βακτήρια, παρατηρείται μεγάλο ενδιαφέρον χρησιμοποίησης των ζυμών ως πρόσθετων υλών. Σε σύγκριση με τα βακτήρια, οι ζύμες είναι ευκαρυωτικοί οργανισμοί, μεγαλύτεροι σε μέγεθος και το κυτταρικό τους τοίχωμα αποτελείται από γλυκάνες, χιτίνη και μαννόζη. Επιπλέον, οι ζύμες δεν έχουν μεγάλη ικανότητα για προσκόλληση στο εντερικό επιθήλιο, αλλά έχουν τη δυνατότητα για συνεργιστική επίδραση με άλλους μικροοργανισμούς (Liong, 2011).

Η προσθήκη ζυμών στα σιτηρέσια των ζώων φέρει σημαντικά πλεονεκτήματα. Έχουν την ικανότητα να εξουδετερώνουν ενδοτοξίνες και να είναι ανθεκτικές στη γαστρική οξύτητα. Άλλο ένα βασικό πλεονέκτημα των ζυμών είναι η έλλειψη της ικανότητας μεταφοράς της γενετικής πληροφορίας. Μέχρι και πριν λίγα χρόνια, κυριαρχούσε ανησυχία στην επιστημονική κοινότητα για τη μεταφορά του γονιδίου αντίστασης σε αντιβιοτικά όσον αφορά τα προβιοτικά. Ωστόσο, δεν έχει επιβεβαιωθεί για κανένα ευκαρυωτικό προβιοτικό (Czerucka *et al.*, 2007). Δηλαδή, οι ζύμες σημειώνουν έλλειψη τέτοιων πλασμιδίων που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια και η χορήγηση τους είναι χρήσιμη κατά τη θεραπεία με αντιβιοτικά.

2.3.3. Μηχανισμοί δράσης προβιοτικών

Ο μηχανισμός που τα προβιοτικά δρουν και επιτυγχάνουν τη διατήρηση της ωφέλιμης μικροχλωρίδας εξαρτάται από το στέλεχος του προβιοτικού που χορηγείται και δεν είναι ακόμη πλήρως αποσαφηνισμένος. Παρ'όλα αυτά αναφέρεται ότι επηρεάζουν τη λειτουργικότητα του εντερικού σωλήνα σε τρία διαφορετικά επίπεδα, επιδρώντας: α) στο περιβάλλον του εντερικού χυμού, β) στη λειτουργία του επιθηλιακού και βλεννογόνιου φραγμού και γ) στο ανοσοποιητικό σύστημα (Ng *et al.*, 2009). Αναλυτικότερα τα προβιοτικά :

- ✓ ασκούν αντιμικροβιακή δράση
- ✓ ενισχύουν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού
- ✓ ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση

2.3.3.1. Αντιμικροβιακή δράση

Τα προβιοτικά τροποποιούν το εντερικό περιβάλλον με τέτοιο τρόπο που τα παθογόνα βακτήρια αδυνατούν να επιζήσουν. Η τροποποίηση αυτή επιτυγχάνεται μέσω: α) της παραγωγής αντιμικροβιακών ουσιών και ενδιάμεσων μεταβολιτών, β) του ανταγωνισμού για θέσεις προσκόλλησης στο εντερικό επιθήλιο και γ) του ανταγωνισμού για θρεπτικά συστατικά (Brown, 2011).

2.3.3.2. Ενίσχυση της λειτουργίας του εντερικού φραγμού

Φυσιολογικά η ακεραιότητα του εντέρου επιτυγχάνεται με δύο τρόπους. Πρώτον, από την ικανότητα των εντεροκυττάρων να παράγουν ένα παχύ στρώμα βλέννης, που εκκρίνεται από τα καλυκοειδή κύτταρα και διασκορπίζεται σε όλο το εντερικό επιθήλιο και δεύτερον, από την ιδιαίτερη δομή-κατασκευή του επιθηλίου που χαρακτηρίζεται από εντεροκύτταρα που συνδέονται μέσω στενο-συνδέσμων (tight junctions) (Chichlowski *et al.*, 2007 a). Τα προβιοτικά φαίνεται να ενισχύουν και να διατηρούν τη λειτουργία του εντερικού φραγμού αυξάνοντας την έκκριση της βλέννης (Brown, 2011) και διατηρώντας σταθερή τη δομή του κυτταροσκελετού στον εντερικό σωλήνα.

2.3.3.3. Ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης

Οι μικροοργανισμοί στο εντερικό σύστημα έρχονται σε στενή επαφή με τα εντεροκύτταρα και τους τοπικούς κλάδους του ανοσοποιητικού συστήματος. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των κυττάρων του ξενιστή και των μικροβιακών κυττάρων οδηγεί στη διαμόρφωση της ανοσιακής απάντησης από τα T- ή B- λεμφοκύτταρα. Η προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων ενισχύει την ανοσιακή απάντηση σε τοπικό και συστημικό επίπεδο (ορός και αίμα). Είναι πιθανό η μείωση των παθογόνων που παρατηρείται κατά την κατανάλωση προβιοτικών να οφείλεται εν μέρει στη διέγερση των αντισωμάτων που προκαλούν (Haghighi *et al.*, 2006). Ο ακριβής μηχανισμός της ρύθμισης της ανοσιακής απάντησης δεν είναι ακόμα διευκρινισμένος.

2.3.3.4. Μηχανισμοί δράσης ζυμών

Τα προβιοτικά ή αλλιώς DFM (direct-fed microbials) ταξινομούνται σε δύο μεγάλες κατηγορίες, με την πρώτη να απαρτίζεται από είδη που αποικίζουν το γαστρεντερικό σωλήνα με τα κύρια γένη που την αντιπροσωπεύουν να είναι τα *Lactobacillus* και *Enterococcus*, ενώ η δεύτερη να αποτελείται από είδη των γένων *Bacillus* και *Saccharomyces* χωρίς όμως να αποικίζουν το εντερικό επιθήλιο αλλά να κυκλοφορούν στον εντερικό αυλό (Huyghebaert *et al.*, 2011). Αναλυτικότερα, οι ζύμες ανήκουν στους ευκαρυωτικούς μικροοργανισμούς και τα κύτταρα τους περιέχουν πρωτεΐνες, πολυσακχαρίτες, λιπίδια και νουκλεϊκά οξέα, οι συγκεντρώσεις των οποίων ποικίλλουν ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης και το είδος και δεν έχουν την ικανότητα να αποικίζουν στον πεπτικό σωλήνα.

Ενώ έχουν μελετηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια οι μηχανισμοί που δρουν τα ανταγωνιστικά βακτήρια για παρεμπόδιση ανάπτυξης παθογόνων μικροοργανισμών, μικρή σημασία έχει δοθεί στις ζύμες με παρόμοιο ρόλο. Ο ανταγωνισμός των μικροοργανισμών από ζύμες έχει αποδοθεί κυρίως: (1) στον ανταγωνισμό που υπάρχει για τα θρεπτικά συστατικά, (2) σε μεταβολές του pH που συμβαίνουν ως αποτέλεσμα της αυξημένης ανταλλαγής ιόντων ή της παραγωγής οργανικών οξέων, (3) στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, (4) στην έκκριση αντιβακτηριακών ενώσεων και την απελευθέρωση αντιμικροβιακών ενώσεων, που ονομάζονται μυκοσίνες (mycocins).

Οι μυκοσίνες είναι εξωκυτταρικά πρωτεϊνικά μόρια ή γλυκοπρωτεΐνες οι οποίες διαταράσσουν τη λειτουργία της κυτταρικής μεμβράνης των ζυμών που φέρουν ειδικούς υποδοχείς για τις ενώσεις αυτές. Η πρώτη μυκοσίνη είχε ταυτοποιηθεί το 1969 στη ζυθοποιία σε συνδυασμό με τη ζύμη *S. cerevisiae*. Μέχρι σήμερα έχουν απομονωθεί αρκετές μυκοσίνες από διάφορα γένη ζυμομυκήτων όπως *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* και *Zygosaccharomyces*. Οι κύριοι μηχανισμοί δράσης των μυκοσινών είναι η διακοπή της κυτταρικής διαίρεσης εμποδίζοντας τη σύνθεση του DNA, η αναστολή σύνθεσης των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος β-1,3 γλυκανών και η διάχυση ιόντων που προκαλείται από τον σχηματισμό διαύλων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, που εμφανίζονται αναλυτικότερα στο διάγραμμα 2.1.

Οι γλυκάνες που εκχυλίζονται από τη ζύμη *S. cerevisiae* είναι σημαντικό δομικό στοιχείο του κυτταρικού τοιχώματος της ζύμης. Είναι πολυσακχαρίτες που αποτελούνται από μικρότερες μονάδες ενωμένες με β-1,3 δεσμούς, για αυτόν το λόγο και ονομάζονται β-1,3 γλυκάνες. Οι Onwurah *et al.* (2013) τονίζουν πως υπάρχει ένας υποδοχέας για τις β-1,3 γλυκάνες στην επιφάνεια των μακροφάγων που, όταν ενεργοποιηθεί, διεγείρει μία αλληλουχία γεγονότων μετατρέποντας τον οργανισμό σε "οπλοστάσιο άμυνας". Θεωρούνται ως ενεργοποιητές των μακροφάγων και έχει διαπιστωθεί πως ξεπερνά τις αρνητικές επιδράσεις της ανοσοκαταστολής.

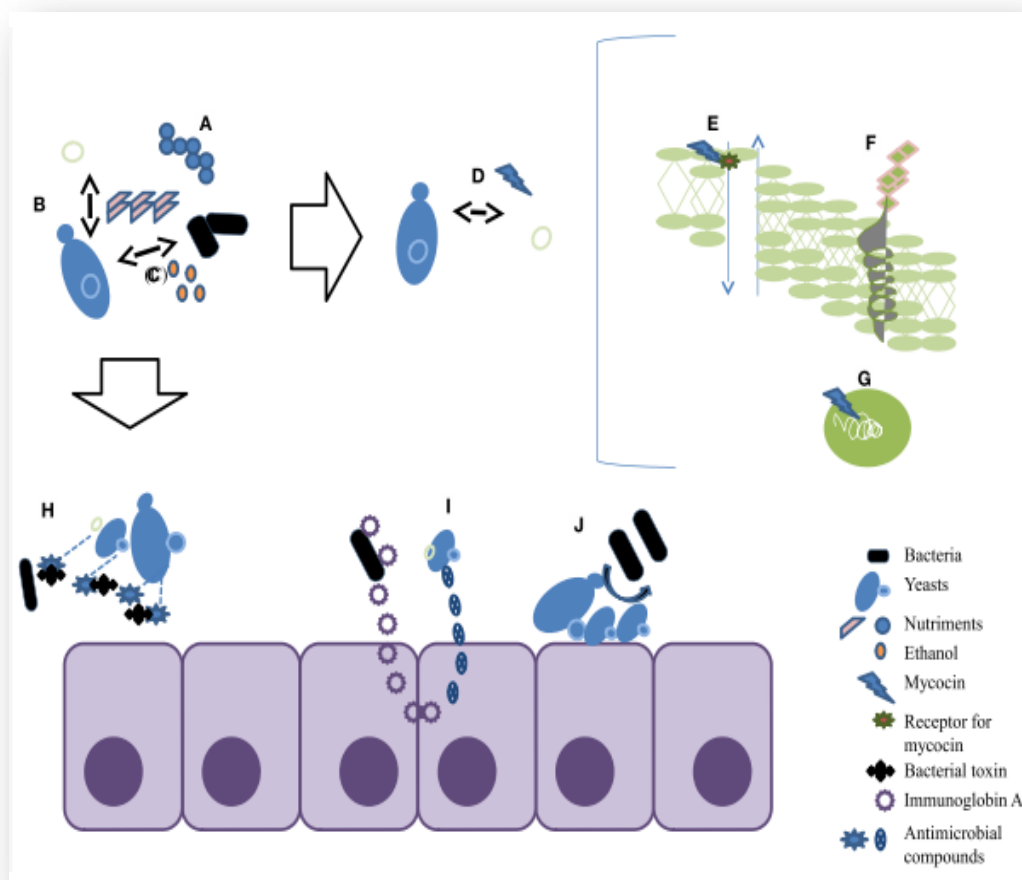
Οι Line *et al.* (1998) επισημαίνουν πως οι ζύμες δρουν ως συγκολλητικά παθογόνων της μικροχλωρίδας και έτσι δεσμεύουν τους παθογόνους μικροοργανισμούς που εισέρχονται στον γαστρεντερικό σωλήνα πριν αυτοί εγκατασταθούν στο εντερικό τοίχωμα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Για αυτό ευθύνεται η D-μαννόζη, συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των ζυμών, που έχει αποδειχθεί πως είναι ικανός αναστολέας της βακτηριακής προσκόλλησης και η ειδικότητα που επιδεικνύουν κάποια παθογόνα στη σύνδεσή τους με σάκχαρα, όπως η D-μαννόζη.

Πιο συγκεκριμένα η ζύμη *S. cerevisiae* χρησιμοποιείται στη διατροφή των ζώων ως προβιοτικός οργανισμός, μόνη ή σε συνδυασμό. Αναλυτικότερα, ο μηχανισμός δράσης της ζύμης περιλαμβάνει (Hatoum *et al.*, 2012):

- τη ρύθμιση του ανοσοποιητικού συστήματος
- την απελευθέρωση ισταμίνης

- την πρόσδεση σε τοξίνες και παθογόνα κύτταρα ή αναστολή παραγωγής βακτηριακών τοξινών (Musa et al., 2009) και
- την αλληλεπίδραση με τα συστατικά του εντερικού σωλήνα

Στην πτηνοτροφία η προσθήκη προβιοτικού αποσκοπεί στη διατήρηση της υγιούς μικροχλωρίδας λόγω ανταγωνιστικού αποκλεισμού, μείωση της κατανάλωσης τροφής, βελτίωση της πεπτικότητας των θρεπτικών συστατικών, ρύθμιση ανοσοποιητικής απάντησης και αύξησης σωματικού βάρους των ορνιθίων κρεοπαραγωγής (Hatoum et al., 2012; Hassanein et al., 2010; Gao et al., 2008).



Διάγραμμα 2. 1: Συνοπτική παρουσίαση διάφορων πτυχών των ανταγωνιστικών ιδιοτήτων των ζυμών. (A) ανταγωνισμός για θρεπτικά συστατικά, (B) αλλαγές pH, (C) παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων αιθανόλης, (D) τοξίνες ή μυκοσίνες, (E) οι μυκοσίνες προκαλούν διάχυση ιόντων με τον σχηματισμό διύλων στην κυτταροπλασματική μεμβράνη, (F) οι μυκοσίνες παρεμποδίζουν την σύνθεση β-1,3 γλυκανών, (G) οι μυκοσίνες σταματούν την κυτταρική διαίρεση, διακόπτοντας τη σύνθεση του DNA, (H) οι πρωτεάσες υποβαθμίζουν τις βακτηριακές τοξίνες, (I) διεγείρουν την ανοσοαπόκριση και (J) οι ζύμες παρεμποδίζουν την πρόσδεση βακτηρίων στα επιθηλιακά κύτταρα (Πηγή: Hatoum et al., 2012)

2.3.4. Επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια κρεοπαραγωγής

Στις συμβατικές εκτροφές τα νεοεκκολαπτόμενα ορνίθια στερούνται επαφής με τις ενήλικες όρνιθες, με συνέπεια να μην εγκαθίσταται αμέσως προστατευτική μικροχλωρίδα και τα ορνίθια να είναι επιρρεπή στην αποίκηση από παθογόνα. Επιπρόσθετα, τα ορνίθια υποκύπτουν σε διαφόρων ειδών καταπονήσεις που προκαλούνται από πρακτικές που εφαρμόζονται στην εντατική εκτροφή όπως αλλαγές στη διατροφή, μεταφορά και υψηλή πυκνότητα πληθυσμού. Σε καταστάσεις καταπόνησης (stress) η ωφέλιμη μικροχλωρίδα και συγκεκριμένα οι γαλακτοβάκιλλοι έχουν την τάση να μειώνονται και να αυξάνονται υπερβολικά τα μη ωφέλιμα βακτήρια, γεγονός που ίσως προδιαθέτει την εμφάνιση νόσου ή την υποκλινική παρουσία της και συνεπώς τη χειρότερη παραγωγικών χαρακτηριστικών. Τα προβιοτικά λοιπόν αποτελούν μια πιθανή στρατηγική για να ελέγχουν την ανάπτυξη παθογόνων βακτηρίων και να διατηρήσουν μια ωφέλιμη ενδογενή μικροχλωρίδα.

Οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια έχουν αναφερθεί σε πλήθος εργασιών. Αναφορικά με τους Mountzouris *et al.* (2010), τα προβιοτικά βελτιώνουν τα παραγωγικά χαρακτηριστικά, αυξάνουν την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών, ρυθμίζουν την εντερική μικροχλωρίδα, παρεμποδίζουν την ανάπτυξη παθογόνων και τέλος ρυθμίζουν την ανοσιακή απάντηση. Στον πίνακα 2.2. που ακολουθεί παρουσιάζονται μελέτες που αναφέρονται τυχόν τροποποιήσεις της εντερικής μικροχλωρίδας κατόπιν χορήγησης προβιοτικών στο σιτηρέσιο ορνιθίων.

Πίνακας 2. 2: Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης προβιοτικών στη μικροχλωρίδα των ορνιθίων

Μικροοργανισμός	Επίδραση στη μικροχλωρίδα	Σημείο πεπτικού σωλήνα	Ηλικία (ημέρες)	Βιβλιογραφία
<i>S. cerevisiae</i>	↑ <i>Lactobacillus spp.</i> Καμία αλλαγή σε ολικά αερόβια και coliforms	Νήστιδα,ειλεός τυφλό	42 d 21 d, 42 d	Abdel-Raheem <i>et al.</i> , 2012
<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium butiricum</i>	Καμία αλλαγή	Νήστιδα,ειλεός	21 d, 42 d	Houshmand <i>et al.</i> , 2012
<i>L. acidophilus</i> <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Clostridium butiricum</i>	↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>E.coli</i>	τυφλό	35 d	Zhang and Kim, 2014
<i>Bacillus subtilis</i> DSM 17299	↓ <i>Salmonella</i>	τυφλό	42 d	Knap <i>et al.</i> , 2011
<i>S. cerevisiae</i>	↑ lactic acid bacteria ↓ <i>E.coli</i>	τυφλό	21 d	Koc <i>et al.</i> , 2010
Βοτανικό σκεύασμα με γαλακτοβάκιλλους	↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Cl.perfringens</i>	αμάρα	56 d	Murry <i>et al.</i> , 2006
Σκεύασμα Toyocerin (εμπεριέχει <i>Bac.cereus var. tyoi</i>)	↓ <i>Salmonella</i>	τυφλό	28 d	Vila <i>et al.</i> , 2009
<i>S. cerevisiae</i>	↑ lactic acid bacteria ↓ <i>E.coli</i> , <i>Cl.perfringens</i> , <i>Klebsiella sp.</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Campylobacter</i>	ειλεό	70-79 week (ωοτόκες)	Hassanein and Soliman, 2010
<i>Lactobacillus sp</i> , <i>Enterococcus sp.</i>	↓ <i>Clostridium</i>	περριτόματα	42 d	Decroos <i>et al.</i> , 2004

2.4. Αποτελεσματικότητα προσθήκης προβιοτικού σε περιπτώσεις μόλυνσης με παθογόνο μικροοργανισμό

Η επιστημονική κοινότητα έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη χορήγηση εναλλακτικών των αντιβιοτικών πρόσθετων υλών στη διατροφή ορνιθίων κρεοπαραγωγής καθώς και στη μείωση ή/και εξάλειψη των παθογόνων μικροοργανισμών. Οι ευεργετικές επιδράσεις των προβιοτικών στα ορνίθια έχουν αναφερθεί σε πλήθος μελετών. Βελτιώνουν τις αποδόσεις των ορνιθίων αυξάνοντας την πεπτικότητα των θρεπτικών συστατικών και διατηρώντας μία ισορροπία στην μικροχλωρίδα στον εντερικό σωλήνα, μειώνοντας τους πληθυσμούς των παθογόνων μικροοργανισμών όπως είναι η *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.* και *E. coli*. Η σαλμονέλλωση και η καμπυλοβακτηρίωση έχουν αυξημένη συχνότητα εμφάνισης στα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης και αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης στον άνθρωπο. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι τα παθογόνα *Salmonella* και *Campylobacter* αντίστοιχα, αποκίζουν στον εντερικό βλεννογόνο των ζώων (Newly και Fearley, 2003).

Η χορήγηση ωφέλιμων βακτηριακών πληθυσμών σε ορνίθια ηλικίας μίας ημέρας οδηγεί στην αποίκηση του εντερικού βλεννογόνου σχηματίζοντας ένα στρώμα μικροχλωρίδας που καταλαμβάνει τις θέσεις προσκόλλησης, προστατεύοντας τα ορνίθια έναντι της μόλυνσης από την σαλμονέλα (Jin *et al.*, 1997). Η παρατήρηση αυτή ενισχύει τη θεωρία ότι ο ανταγωνισμός για τις θέσεις προσκόλλησης είναι ο κύριος μηχανισμός παρεμπόδισης των παθογόνων βακτηρίων από τους προβιοτικούς μικροοργανισμούς, διότι την πρώτη μέρα ζωής των ορνιθίων η προστασία έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών δεν μπορεί να είναι αποτέλεσμα της μικροβιακής δραστηριότητας. Βέβαια ο ανταγωνισμός για τις θέσεις προσκόλλησης δε φαίνεται να είναι και ο μοναδικός μηχανισμός. Στην εργασία του Mead (2000) αναφέρεται η παρουσία της *Salmonella kedougou* στον εντερικό αυλό, χωρίς να φαίνεται ότι ανταγωνίζεται με τα ωφέλιμα βακτήρια για θέσεις προσκόλλησης στο βλεννογόνο του εντερικού επιθηλίου. Συνεπώς, βασική προσέγγιση ελέγχου για τη μετάδοση αυτών των παθογόνων στον άνθρωπο είναι η μείωση των πληθυσμών αυτών στο περιεχόμενο του εντέρου και τη γενικότερη ισορροπία της μικροβιακής χλωρίδας στα ορνίθια κρεοπαραγωγής με την προσθήκη προβιοτικών στην τροφή ή το νερό.

Πίνακας 2. 3: Επίδραση της διαιτητικής προσθήκης προβιοτικών σε περιπτώσεις μόλυνσης με παθογόνο μικροοργανισμό επί της μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής

Μόλυνση με παθογόνο μικρ/σμό	Προσθήκη μικροοργανισμού	Επίδραση στη μικροχλωρίδα	Σημείο πεπτικού σωλήνα	Ηλικία (ημέρες)	Βιβλιογραφία
<i>S. typhimurium</i> <i>C. jejuni</i>	<i>S. boulardii</i>	↓ <i>Salmonella</i> NS <i>Campylobacter</i>	τυφλό έντερο	25 d	Line <i>et al.</i> , 1998
<i>S. enteritidis</i>	<i>S. cerevisiae</i>	↓ <i>Salmonella</i> ↓ <i>E. coli</i>	λεπτό έντερο	21 d	Haldar <i>et al.</i> , 2011
<i>S. typhimurium</i>	<i>L. plantarum</i> (+xylanase)	↓ <i>Salmonella</i> ↑ <i>Bifidobacterium</i>	περριτώματα	42 d	Vandeplas <i>et al.</i> , 2009
<i>S. enteritidis</i>	<i>Lactobacillus FM-B11</i>	↓ <i>Salmonella</i>	λεμφικός ιστός τυφλού εντέρου	1 d.	Higgins <i>et al.</i> , 2008
<i>C. jejuni</i>	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Bif. animalis</i> , <i>L. reuteri</i> <i>L. salivarius</i>	↓ <i>C. jejuni</i>	Τυφλό έντερο	8 d., 15 d.	Ghareeb <i>et al.</i> , 2012
<i>S. enteritidis</i>	<i>Lactobacillus</i>	↓ <i>Salmonella</i>	Λεμφικός ιστός τυφλού εντέρου	4 d.	Vicente <i>et al.</i> , 2008
<i>Salmonella pullorum</i>	<i>S. cerevisiae</i>	↑ <i>E. coli</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>E. coli</i> ↓ <i>Lactobacillus</i>	Βλεννογόνος περιεχόμενο	52 d. 52 d.	Muthusamy <i>et al.</i> , 2011

3. Μεθοδολογία της μελέτης

3.1. Σκοπός

Σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης ήταν ο προσδιορισμός της επίδρασης της προσθήκης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας αυτών, υπό συνθήκες πειραματικής μόλυνσης με *Salmonella Enteritidis*.

3.2. Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1. Πειραματικό ζωικό υλικό- πειραματικός σχεδιασμός

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στις πειραματικές εγκαταστάσεις του εργαστηρίου Φυσιολογίας θρέψεως και Διατροφής του Τμήματος Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής & Υδατοκαλλιεργειών του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Για το σκοπό του πειράματος καταρτίστηκε σιτηρέσιο με βάση τον σίτο και το σογιάλευρο για κάθε φάση ανάπτυξης και διεξήχθη πείραμα με 480 ορνίθια (υβρίδιο Cobb) τα οποία κατανεμήθηκαν σε δύο επεμβάσεις (16 επαναλήψεις ανά επέμβαση), την επέμβαση του μάρτυρα (καμία επιπλέον προσθήκη στο σιτηρέσιο) και την επέμβαση της ζύμης (προσθήκη της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae type boulardii* I-1079 σε συγκέντρωση 1×10^9 CFU/kg τροφής). Την 14^η ημέρα ηλικίας των ορνιθίων πραγματοποιήθηκε πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* ATCC 13076 σε 8 επαναλήψεις του μάρτυρα και σε 8 επαναλήψεις της ζύμης. Συνεπώς μετά την 14^η ημέρα το πείραμα χωρίστηκε στις ακόλουθες τέσσερις επεμβάσεις: την επέμβαση του μάρτυρα (C) χωρίς καμία επιπλέον προσθήκη στο ΒΣ, την επέμβαση L με την προσθήκη της ζύμης σε συγκέντρωση 10^9 CFU/kg τροφής, την επέμβαση C_{SE} με πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* και την επέμβαση L_{SE} με προσθήκη της ζύμης σε συγκέντρωση 10^9 CFU/kg τροφής και πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* (Πίνακας 3.1).

Πραγματοποιήθηκαν δειγματοληψίες περιεχομένου τυφλών εντέρων σε τρεις διαφορετικούς χρόνους και συγκεκριμένα την 15^η ημέρα ηλικίας των ορνιθίων δηλαδή μία ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση με *σαλμονέλλα*, την 21^η (μία εβδομάδα μετά την μόλυνση) και την 35^η ημέρα ηλικίας (τρεις εβδομάδες μετά την μόλυνση). Τα δείγματα περιεχομένου τυφλών εντέρων που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ομογενοποιημένα σε φωσφορικό ρυθμιστικό διάλυμα (1:10 PBS) και διατηρήθηκαν μέχρι να αναλυθούν στην κατάψυξη (-30° C).

Πίνακας 3. 1: Κατανομή των πειραματικών επεμβάσεων με βάση την τελική σύνθεση σιτηρεσίου που χρησιμοποιήθηκε.

Επεμβάσεις	C	L	C _{SE}	L _{SE}
Σιτηρεσίου	ΒΑΣΙΚΟ ΣΙΤΗΡΕΣΙΟ βασισμένο σε σίτο και σογιάλευρο			
Προβιοτικό (1g/kg τροφής)	-	10 ⁹ CFU/kg τροφής	-	10 ⁹ CFU/kg τροφής
Μόλυνση με <i>σαλμονέλλα</i> (0,1 ml)	-	-	log 6,3 CFU/πτηνό	log 6,3 CFU/πτηνό

3.3. Μικροβιολογικές αναλύσεις

Οι μικροοργανισμοί καλλιεργούνται στο εργαστήριο σε καθαρές καλλιέργειες, δηλαδή σε καλλιέργειες που αποτελούνται από ένα μόνο είδος μικροοργανισμού. Η ανάπτυξη των μικροοργανισμών στο εργαστήριο προϋποθέτει την παρασκευή και τη χρησιμοποίηση θρεπτικών υλικών, καθώς επίσης και τη διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών καλλιέργειας όπως θερμοκρασία και pH. Το θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι υγρό ή στερεό, αν σε αυτό προστεθεί άγαρ σε συγκέντρωση 10-15%.

3.3.1. Επιλογή καθαρών καλλιεργειών

Για τους σκοπούς της παρούσας μελέτης που ήταν ο προσδιορισμός του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού και των παρακάτω ειδών ή πληθυσμών, *E.coli*, *Bacteroides spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Clostridium spp.* και *Campylobacter spp* επιλέχθηκαν οι καθαρές καλλιέργειες που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.2.

Πίνακας 3. 2: Καθαρές καλλιέργειες που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία πρότυπων καμπυλών αναφοράς για την ανάλυση PCR.

Στέλεχος αναφοράς (Reference strains)	Υπό μελέτη βακτηριακοί πληθυσμοί
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Escherichia coli</i> . Ολικά βακτήρια
<i>Bacteroides fragilis</i> NCTC 9343	<i>Bacteroides</i> spp.
<i>Bifidobacterium animalis</i> DSM 20104	<i>Bifidobacterium</i> spp.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> ATCC 314	<i>Lactobacillus</i> spp.
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	<i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium perfringens</i> subgroup (Clostridial Cluster I)
<i>Clostridium clostridioforme</i> DSM933	<i>Clostridium coccooides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> subgroup (Clostridial cluster XIVa)
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 29428	<i>Campylobacter</i> spp.

3.3.2. Ανασύσταση και ανάπτυξη πρότυπων βακτηριακών καθαρών καλλιεργειών

Παρασκευή θρεπτικών υλικών

Για την παρασκευή των θρεπτικών υλικών χρησιμοποιήθηκαν φιάλες θέρμανσης των 250, 500 και 1000 ml, φιαλίδια καλλιέργειας για τα υγρά θρεπτικά υλικά καθώς και τρυβλία petri για τα στερεά θρεπτικά υλικά, τα οποία πληρώθηκαν με κατάλληλα αποστειρωμένα θρεπτικά υλικά. Για την αποφυγή μολύνσεων η πλήρωση των τρυβλίων λάμβανε χώρα μέσα σε θάλαμο νηματικής ροής. Τα θρεπτικά υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την καλλιέργεια των διαφόρων βακτηριακών πληθυσμών αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 3.3.

Πίνακας 3. 3 Αντιστοιχία βακτηριακών πληθυσμών και θρεπτικών υλικών για την καλλιέργειά τους

Βακτηριακός πληθυσμός	Θρεπτικό υλικό
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	MRS Broth and Agar
<i>Bacteroides fragilis</i>	Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth and Agar
<i>Bacteroides vulgatus</i>	Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth and Agar
<i>Bifidobacterium animalis</i>	Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth and Agar
<i>Escherichia coli</i>	Tryptic Soy Broth and Agar
<i>Campylobacter jejuni</i>	Preston broth and mCCDA agar
<i>Clostridium perfringens</i>	Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth and Agar
<i>Clostridium clostridioforme</i>	Wilkins-Chalgren Anaerobe Broth and Agar

Παρασκευή αραιωτικών

Για την πραγματοποίηση διαδοχικών δεκαδικών αραιώσεων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα πεπτόνης στο οποίο είχε προστεθεί άνυδρη υδροχλωρική κυστεΐνη. Το διάλυμα πεπτόνης κατανεμήθηκε σε φιαλίδια ανά 9 ml και εν συνεχεία ακολούθησε αποστείρωση για 15 min στους 121° C.

Διαδικασία παρασκευής καθαρών καλλιιεργειών

Η διαδικασία περιλαμβάνει την παρασκευή κατάλληλων υγρών θρεπτικών υλικών των 10 ml (broths) και τον άσηπτο ενοφθαλισμό τους με 1 bead αποθηκευμένης στους -80 C καθαρής καλλιέργειας. Ακολουθούσε επώαση των ενοφθαλισμένων θρεπτικών υλικών στους 37 °C για 18- 48 ώρες υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες ανάλογα τον μικροοργανισμό και με περιοδική ήπια ανακίνηση προς αποφυγή ιζήματος. Στο τέλος της επώασης γίνονταν σειριακή αραιώση και καλλιέργεια σε κατάλληλα για κάθε μικροοργανισμό θρεπτικά άγαρ για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης κυττάρων (Colony forming Units). Επιπλέον γίνονταν παράλληλη αποθήκευση δείγματος καλλιέργειας για τη μετέπειτα απομόνωση DNA με σκοπό την κατασκευή των πρότυπων καμπυλών για την ποσοτικοποίηση των δειγμάτων ανάλογα με τον εξετασθέντα βακτηριακό πληθυσμό. Τα τρυβλία για τις καλλιέργειες των προεραϊκά αναερόβιων των γενών

Campylobacter και του κολοβακτηρίου *E.coli* επώαστηκαν αερόβια για 24 ώρες. Ενώ τα τρυβλία για την καλλιέργεια των αναερόβιων, Gram⁺ κόκκων, των γενών *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* και Gram⁻ κόκκων του γένους *Bacteroides* επώαστηκαν αναερόβια για 48 ώρες. Για την αναερόβια επώαση έγινε χρήση κατάλληλων καταλυτών (anaerocult) και δοχείων που εξασφαλίζουν αναερόβιο περιβάλλον. Τέλος, πραγματοποιήθηκε καταμέτρηση των μεμονωμένων αποικιών στα τρυβλία όπου παρατηρήθηκαν 30-300 αποικίες και υπολογίστηκε ο μικροβιακός πληθυσμός.

3.4. Μοριακές αναλύσεις

Για την απομόνωση γενωμικού DNA από ομογενοποιημένα δείγματα περιεχομένου τυφλών εντέρων καθώς και για την απομόνωση βακτηριακού DNA από καθαρές καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε το PSP Spin Stool DNA kit της εταιρίας STRATEC Molecular. Εφαρμόστηκαν κάποιες αλλαγές κατά τη διαδικασία αυτή με σκοπό την καλύτερη λύση των κυττάρων και τον πιο αποδοτικό καθαρισμό του DNA. Το εν λόγω kit είναι κατάλληλο για δείγματα με υψηλές συγκεντρώσεις αναστολέων που δύναται να παρεμποδίσουν την PCR. Το πρωτόκολλο που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά στο υποκεφάλαιο 3.4.1.

3.4.1. Απομόνωση γενωμικού DNA από ομογενοποιημένα δείγματα περιεχομένου τυφλού εντέρου

Πραγματοποιείται παραλαβή 2ml ομογενοποιημένου δείγματος από τυφλικό περιεχόμενο και φυγοκέντρωση στους 4°C, 12000×g για 15min. Στο ίζημα προστίθεται 1,5 ml Lysis Buffer P και 20 µl Lysis Enhancer, έντονο vortex για 1min και επώαση (95°C, 900rpm) σε thermoblock για 20min και vortex κάθε 5min (40% full scale). Εν συνεχεία, τοποθέτηση των δειγμάτων στον πάγο για 5min και προσθήκη 5 ZIRCONIA BEADS. Ακολουθεί vortex 2min και επώαση (95°C, 900rpm) σε thermoblock για 3min, vortex για 2min και φυγοκέντρωση 13400×g για 1min. Πραγματοποιείται παραλαβή υπερκειμένου σε Invi-Adsorb Tube και έντονο vortex για 30sec, σε θερμοκρασία δωματίου για 1min και φυγοκέντρωση 13400×g για

3min. Το υπερκείμενο τοποθετείται σε 1,5ml Receiver Tube και φυγοκεντρείται 13400×g για 3 min. Πραγματοποιείται παραλαβή 400μl από το υπερκείμενο και προσθήκη 25μl Proteinase K. Ακολουθεί vortex (40% full scale-intervals 5sec για 15sec) και επώαση (70°C) σε thermoblock για 30min και vortex ανά 10min (40% full scale). Ακολούθως, πραγματοποιείται προσθήκη 20μl RNase A (10 mg/ml) και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 15min. Προστίθεται 200μl Binding Buffer, vortex, πιπετάρισμα και μεταφορά σε RTA Spin Filter. Παραμένει για 5min σε θερμοκρασία δωματίου, ακολουθεί φυγοκέντρωση 9300×g για 2 min και τοποθέτηση του RTA Spin Filter σε νέο RTA Receiver Tube και προσθήκη 500μl Wash Buffer I. Ακολουθεί φυγοκέντρωση 9300×g για 1min και τοποθέτηση RTA Spin Filter σε νέο RTA Receiver Tube και προσθήκη 700μl Wash Buffer II. Εν συνεχεία πραγματοποιείται ξανά φυγοκέντρωση 9300×g για 1min, το υποκείμενο απορρίπτεται και φυγοκέντρωση 13400× g για 3min (RTA Spin Filter στο ίδιο RTA Receiver Tube). Απορρίπτεται το RTA Receiver Tube, τοποθετείται το RTA Spin Filter σε 1,5ml Receiver Tube και προσθήκη 200μl προθερμασμένου Elution Buffer P. Τέλος, παραμένει 3min σε θερμοκρασία δωματίου, απορρίπτεται το RTA Spin Filter και πραγματοποιείται αποθήκευση στους -20°C (eluted total DNA).

3.4.2. Απομόνωση βακτηριακού DNA από τις καθαρές καλλιέργειες

Για την απομόνωση των καθαρών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το PSP Spin Stool DNA kit της εταιρίας STRATEC Molecular. Επιπρόσθετο βήμα είναι η προσθήκη 20μl λυσοζύμης (50 mg/ml) σε συνολικό όγκο 3 ml καθαρής καλλιέργειας και επώαση στους 37° C σε thermoblock για 30 min για τα Gram+ βακτήρια (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Clostridium perfringens* και *Clostridium clostridioforme*), με σκοπό την διάσπαση των πεπτιδογλυκανών των κυτταρικών τοιχωμάτων των Gram+ βακτηρίων. Εν συνεχεία, ακολουθείται το πρωτόκολλο όπως περιγράφηκε στο υποκεφάλαιο 3.4.1.

3.4.3. Προσδιορισμός της συγκέντρωσης DNA

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των δειγμάτων γενωμικού και βακτηριακού DNA που προέκυψαν, έγινε με τη χρήση φωτομέτρου Quawell 5000 (εικόνα 3.1., Εργαστήριο Ζωοτεχνίας), το οποίο μετράει τη συγκέντρωση νουκλεϊκών οξέων ή πρωτεϊνών σε ένα διάλυμα.



Εικόνα 3. 1: Φωτομέτρο Quawell 5000 (Εργαστήριο Ζωοτεχνίας)

Αρχικά, γίνεται μηδενισμός της συσκευής με το διάλυμα έκλουσης του DNA (elution buffer). Έπειτα, τοποθετείται μία σταγόνα DNA δείγματος, όγκου 1 μl, στην ειδική βάση όταν ο βραχίονας είναι ανοιχτός. Όταν ο βραχίονας κλείσει, το δείγμα σχηματίζει μία στήλη. Η συγκέντρωση του δείγματος υπολογίζεται με τη βοήθεια οπτικών ινών. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων, καταγράφονται αυτόματα στον υπολογιστή που βρίσκεται συνδεδεμένος με τη συσκευή. Στο τέλος κάθε μέτρησης, σκουπίζεται με χαρτί η βάση του μηχανήματος.

Η φωτομέτρηση για το DNA γίνεται σε μήκος κύματος 260 nm και από την τιμή της οπτικής απορρόφησης (O.D.), το Quawell υπολογίζει αυτόματα τη συγκέντρωση. Παράλληλα, γίνεται μέτρηση του ίδιου δείγματος και στα 280 nm για τον έλεγχο της περιεκτικότητας του δείγματος σε πρωτεΐνες. Ο λόγος της $O.D._{260nm} / O.D._{280nm}$ εκφράζει την καθαρότητα του δείγματος DNA. Όταν ο λόγος ισούται με 1.8-2, τότε το δείγμα θεωρείται καθαρό. Αντίθετα, όταν ο λόγος είναι μικρότερος από 1.8, τότε πιθανότατα υπάρχουν προσμίξεις πρωτεϊνών ή αλκοόλης στο δείγμα.

Επιπλέον, πραγματοποιείται και μία δεύτερη μέτρηση, στα 230 nm, για τον υπολογισμό της καθαρότητας του δείγματος. Ο λόγος $O.D._{260nm} / O.D._{230nm}$ ο οποίος κυμαίνεται μεταξύ 1.8-2.2 δηλώνει ότι το δείγμα είναι καθαρό.

Τα δείγματα του γενωμικού DNA μετρήθηκαν εις διπλούν και είχαν ένα εύρος τιμών από 24 ng/μl έως 123 ng/μl και όλοι οι λόγοι $O.D._{260nm} / O.D._{280nm}$ κυμαίνονταν εντός ορίων. Όσον αφορά τις καθαρές καλλιέργειες, οι συγκεντρώσεις κυμάνθηκαν σε ένα εύρος 2,5 ng/μl έως 60 ng/μl.

3.4.4. Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης πραγματικού χρόνου

Αρχή της μεθόδου:

Στα μέσα της δεκαετίας του 1990 αναπτύχθηκε μια νέα μέθοδος ανάλυσης και ποσοτικού προσδιορισμού του DNA ή του RNA, η οποία βασίζεται στη μέθοδο PCR κινητικής φθορισμού και επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) (Higuchi et al., 1993, Heid et al., 1996, Gibson et al., 1996). Στη συγκεκριμένη μέθοδο, το βρωμιούχο αιθίδιο αντικαθίσταται από άλλες φθορίζουσες χρωστικές που παρεμβάλλονται στη δίκλωνη αλυσίδα του DNA (intercalating dyes). Επίσης, η αντίδραση της Real-time PCR έχει εμπλουτισθεί με νέες τεχνολογίες στις οποίες συγκαταλέγονται οι ανιχνευτές υδρόλυσης (ή σύστημα TaqMan), οι ανιχνευτές υβριδοποίησης (Hybridization probes), οι μοριακοί «φάροι» (molecular beacons) και οι «σκορπιοί». Σε αντίθεση με τις κλασικές μεθόδους τελικού σημείου (end point PCR), η τεχνική αυτή επιτρέπει τον ποσοτικό προσδιορισμό των προϊόντων της PCR κατά την εκθετική φάση της αντίδρασης. Έχει δηλαδή σχεδιαστεί ώστε να προσφέρει πληροφορίες ταυτόχρονα με τη διαδικασία πολλαπλασιασμού, χωρίς να απαιτούνται περαιτέρω χειρισμοί μετά την πραγματοποίηση της αντίδρασης PCR.

PCR πραγματικού χρόνου με χρωστικές που παρεμβάλλονται στο DNA

Μία αρκετά δημοφιλής τεχνική ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των προϊόντων της PCR πραγματικού χρόνου βασίζεται στη χρήση παρεμβαλλόμενων χρωστικών φθορισμού. Η χρωστική SYBR Green I (και οι νεότερες χρωστικές όπως EvaGreen, SYBR Green II, LC Green), είναι λιγότερο τοξική από το βρωμιούχο αιθίδιο και ενσωματώνεται στη μικρή αύλακα του δίκλωνου DNA, γεγονός που αυξάνει σε μεγάλο βαθμό το φθορισμό του. Κατά την πορεία της αντίδρασης PCR, η

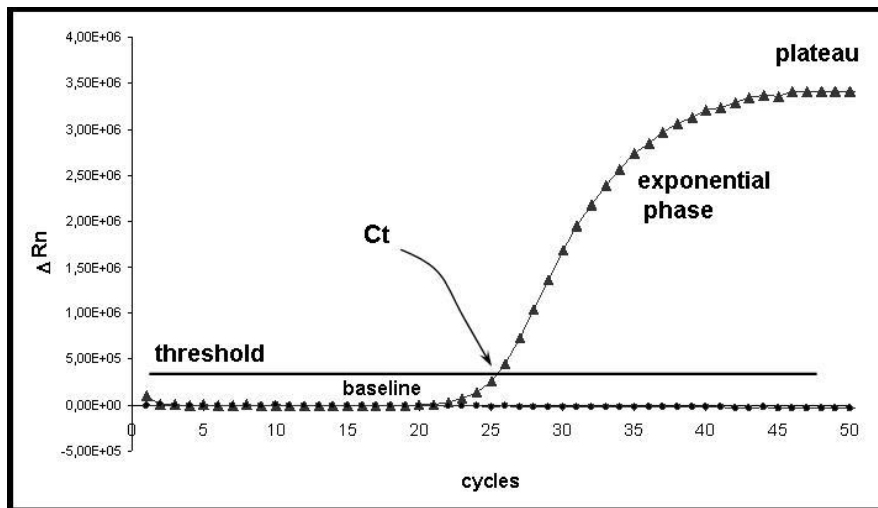
ποσότητα του δίκλωνου DNA-στόχου αυξάνεται εκθετικά, με παράλληλη αύξηση της ποσότητας της χρωστικής SYBR Green που ενσωματώνεται, και άρα αύξηση του φθορισμού που εκπέμπεται. Σε κάθε κύκλο, ο εκπεμπόμενος φθορισμός αυξάνεται σταδιακά κατά τη φάση επιμήκυνσης της αντίδρασης, ενώ είναι μικρός ή απουσιάζει εντελώς κατά τη φάση αποδιάταξης. Οι θερμοκυκλοποιητές πραγματικού χρόνου, στους οποίους πραγματοποιείται η αντίδραση της Real-time PCR, παρέχουν τη δυνατότητα μέτρησης του φθορισμού σε κάθε κύκλο της αντίδρασης.

Ένα μειονέκτημα της μεθόδου είναι η σχετικά μικρή ειδικότητά της, λόγω του κινδύνου πολλαπλασιασμού μη ειδικών προϊόντων PCR ή διμερών των εκκινητών. Για να διακριθούν τα ειδικά από τα μη ειδικά προϊόντα της PCR, πρέπει να πραγματοποιηθεί ανάλυση με καμπύλη τήξης (Melt curve analysis) μετά τον τερματισμό της αντίδρασης PCR. Με τον τρόπο αυτόν, το κλάσμα του φθορισμού που προέρχεται από τον ειδικό στόχο μπορεί να διακριθεί από το φθορισμό που προέρχεται από διμερή εκκινητή ή από προϊόντα μη ειδικού πολλαπλασιασμού. Η ανάλυση αυτή πραγματοποιείται με σταδιακή αύξηση της θερμοκρασίας από τους 40 °C στους 95 °C, με συνεχή παρακολούθηση της εκπομπής φθορισμού. Ο φθορισμός είναι χαμηλός στις μικρές θερμοκρασίες, όπου όλα τα προϊόντα της PCR είναι δίκλινα, και αυξάνεται σημαντικά κοντά στη θερμοκρασία τήξης του προϊόντος της PCR. Η αρχή αυτής της μεθόδου ανάλυσης της καμπύλης τήξης βασίζεται στο γεγονός ότι τα προϊόντα της PCR με διαφορετικό μήκος θα έχουν διαφορετικές θερμοκρασίες τήξης, με αποτέλεσμα να ληφθούν διαφορετικές κορυφές όταν σχεδιαστεί η γραφική παράσταση της πρώτης αρνητικής παραγώγου του φθορισμού έναντι της θερμοκρασίας.

Υπολογισμός ποσοτικών δεδομένων

Στην Real Time PCR, οι αντιδράσεις χαρακτηρίζονται από το χρονικό σημείο στο οποίο η ποσότητα του προϊόντος υπερβαίνει ένα ορισμένο επίπεδο ανίχνευσης. Ο ποσοτικός προσδιορισμός βασίζεται στο γεγονός ότι, όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός των μορίων DNA στην αρχή της αντίδρασης τόσο μικρότερος είναι ο αριθμός των κύκλων πολλαπλασιασμού που χρειάζονται για να παραχθεί ένας ορισμένος αριθμός προϊόντων. Ακόμη, η ανάλυση της Real-time PCR αξιοποιεί το γεγονός ότι η παραγωγή του προϊόντος συσχετίζεται γραμμικά με τον εκπεμπόμενο φθορισμό. Στους πρώτους κύκλους της αντίδρασης PCR παρατηρείται μικρή ή

μηδενική μεταβολή στο φθορισμό. Οι τιμές που μετρώνται στο στάδιο αυτό συνιστούν στη γραφική παράσταση της αντίδρασης του πολλαπλασιασμού το βασικό επίπεδο (baseline). Το όριο ανίχνευσης του φθορισμού (threshold) επιλέγεται αυθαίρετα με βάση τη διακύμανση της τιμής του βασικού επιπέδου. Ως όριο συνήθως επιλέγεται το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης του βασικού επιπέδου, όπως αυτό υπολογίζεται από τον κύκλο 3 έως το κύκλο 15. Όμως, η τιμή αυτή μπορεί να τροποποιηθεί ανάλογα με τις ανάγκες του πειράματος. Ο κύκλος ορίου (threshold cycle, C_t) προσδιορίζεται ως το σημείο στο οποίο η τιμή του φθορισμού υπερβαίνει το βασικό επίπεδο. Η τιμή C_t αντιστοιχεί στον αριθμό του κύκλου στο συγκεκριμένο σημείο και χρησιμοποιείται για την ποσοτική μέτρηση του μορίου-στόχου. Κατά συνέπεια, οι τιμές C_t μειώνονται γραμμικά καθώς αυξάνεται η ποσότητα του μορίου-στόχου που προστίθεται στην αρχή της αντίδρασης. Σε κάθε κύκλο της Real Time PCR μετράται η εκπομπή φθορισμού από το προϊόν η οποία ορίζεται ως Rn^+ , ενώ Rn^- είναι η εκπομπή φθορισμού στο βασικό επίπεδο. Η αύξηση του φθορισμού (ΔRn) προκύπτει από την εξίσωση $\Delta Rn = Rn^+ - Rn^-$ και παρίσταται γραφικά στον άξονα y, όπως αποτυπώνεται στην εικόνα 3.2.



Εικόνα 3. 2: Τυπική γραφική παράσταση Real Time PCR αντίδρασης, κατά τη φάση εκθετικής αύξησης και φάση πλατώ του PCR προϊόντος. Η ευθεία γραμμή δείχνει το κατώφλι (threshold) στο οποίο ο φθορισμός των PCR προϊόντων (ΔRn) αρχίζει να ξεχωρίζει από το βασικό επίπεδο (baseline), ενώ ο κύκλος (cycle number) στον οποίο συμβαίνει αυτό, ονομάζεται C_t (Cycle threshold).

Διαδικασία:

Στην παρούσα μελέτη, εφαρμόστηκε η τεχνική της ποσοτικής Real-Time PCR (quantitative RT-PCR, qRT-PCR), προκειμένου να εξετασθεί η σύσταση της μικροχλωρίδας του τυφλού εντέρου σε ορνίθια κρεοπαραγωγής, ως προς τα ολικά βακτήρια και ως προς επιμέρους βακτηριακούς πληθυσμούς. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε το προτυποποιημένο σύστημα 2 x Green DYE Master Mix της εταιρίας ROVALAB. Το συγκεκριμένο kit αποτελείται από ένα έτοιμο μίγμα που περιλαμβάνει όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια της PCR εκτός από τους εκκινητές και το υπόστρωμα, με στόχο την ελαχιστοποίηση λαθών κατά τον χειρισμό της πιπέτας και άλλων πιθανών πηγών σφάλματος. Περιλαμβάνει την DNA πολυμεράση (ROVABSOLUTE Hot Start Taq DNA-polymerase), το ρυθμιστικό διάλυμα και τα ελεύθερα δεοξυνουκλεοτίδια (dNTPs) σε κατάλληλη συγκέντρωση. Η χρωστική Green DYE απορροφά μπλε φως σε μήκος κύματος 498-500 nm και εκπέμπει πράσινο φθορισμό στα 522-530 nm. Στην αντίδραση προστέθηκε και η παθητική χρωστική αναφοράς ROX, από την ίδια εταιρία, η οποία διεγείρεται σε μέγιστο βαθμό σε μήκος κύματος στα 584 nm και έχει μέγιστο εκπομπής στα 612 nm. Η προσθήκη του ROX στην αντίδραση είναι βοηθητική και η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται ρυθμίζεται μεμονωμένα από τον ερευνητή. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 50 nM (0,2μl/20μl reaction). Επιπλέον, η χρωστική αυτή είναι φωτοευαίσθητη και αποθηκεύεται και χρησιμοποιείται υπό συνθήκες σκότους. Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά την προετοιμασία της PCR προστίθεται MgCl₂, το οποίο ευνοεί την σύνδεση των εκκινητών με το στόχο και ενισχύει την δράση της πολυμεράσης, όπως επίσης και παράγοντες που διευκολύνουν την αποδιάταξη του δίκλωνου DNA, όπως το DMSO (Dimethyl sulfoxide) ή το BSA (Bovine serum albumin). Στη συγκεκριμένη μελέτη, χρησιμοποιήθηκε το BSA από την εταιρία Biolabs (20 mg/ml), σε συγκέντρωση 40 ng/μl (×500), όπου έχει διαπιστωθεί από άλλες μελέτες ότι μειώνει την επίδραση των αναστολέων που υπάρχουν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και συνεπώς ενισχύει την αποδοτικότητα (efficiency) και την ειδικότητα (specificity) της real time PCR (Rudi et al., 2004; Lund et al., 2004; ROVALAB application manual).

Η προετοιμασία των real time PCR αντιδράσεων έγινε στον αποστειρωμένο χώρο του θαλάμου νηματικής ροής με UV. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν strips 8 θέσεων όγκου 0,2 ml το καθένα και πλάκες PCR 96 θέσεων, filter tips και νερό αποστειρωμένο και

απαλλαγμένο από DNase και RNase. Η αντίδραση της real time PCR πραγματοποιήθηκε στο θερμικό κυκλοποιητή 7500 Real-time PCR System της εταιρίας Applied Biosystems.

Για τη βελτιστοποίηση της real time PCR είναι απαραίτητη η ρύθμιση πολλών παραμέτρων, μεταξύ των οποίων η T_m των εκκινητών στην αλληλουχία-στόχο, οι συγκεντρώσεις των αλάτων και η χρονική διάρκεια κάθε επιμέρους βήματος. Θεωρητικά, η T_m μίας αντίδρασης PCR πρέπει να είναι περίπου 5°C χαμηλότερη από την T των εκκινητών. Στην πραγματικότητα όμως αυτό δεν είναι απόλυτο. Για αυτό το λόγο δοκιμάστηκαν αρχικά διάφορες θερμοκρασίες και χρόνοι υβριδισμού για όλα τα ζεύγη εκκινητών (primers) ώστε να καταλήξουμε στον πιο κατάλληλο συνδυασμό, όπου η αντίδρασή έχει την καλύτερη απόδοτικότητα που παρουσιάζονται στον πίνακα 3.4.

Πίνακας 3. 4: Τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Target group or organism	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)	Annealing temperature	reference
Total bacteria	Uni_F: ACTCCTACGGGAGGCAGCAG Uni_R: ATTACCGCGGCTGCTGG	198	60°C 1min	Clifford, 2012
Lactobacillus group	Lab_F: GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTC Lab_R: GGCCAGTTACTACCTCTATCCTTCTTC	126	60°C 1min	Peinado, 2013 Delroisse, 2008
Bacteroides group	Bac_F: GAGAGGAAGGTCCCCCAC Bac_R: CGCTACTTGGCTGGTTTACG	108	60°C 1min	Peinado, 2013 Delroisse, 2008
Bifidobacterium group	Bif_F: CGCGTCYGGTGTGAAAG Bif_R: CCCACATCCAGCATCCA	244	60°C 1min	Peinado, 2013 Delroisse, 2008
Escherichia coli	Eco_F: CATGCCGCGTGTATGAAGAA Eco_R: GGGTAACGTCAATGAGCAAAGG	95	60°C 1min	Silkie, 2010
Campylobacter group	Camp_F: CACGTGCTACAATGGCATAT Camp_R: GGCTTCATGCTCTCGAGTT	108	58°C 1min*	Le Blanc, 2013 Lund,2004
Clostridium	Clos_F: CGCATAACGTTGAAAGATGG Clos_R: CCTTGGTAGGCCGTTACCC	105	58°C 1min*	Wu, 2011
Cluster I	ClosI_F: TACCHRAGGAGGAAGCCAC ClosI_R: GTTCTTCCTAATCTCTACGCAT	232	56°C 1min*	Boroogeni 2014
C.coccoides (cluster XIVa)	ClosXIVa_F: AAATGACGGTACCTGACTAA ClosXIVa_R: CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA	444	53°C 1min*	Boroogeni 2014

Η διαδικασία της real time PCR περιγράφεται στους παρακάτω πίνακες:

Κατά την αντίδραση της real time PCR αναμείχθηκαν με τη σειρά που αναγράφονται, τα αντιδραστήρια για τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 200 nM και 300 nM, στους πίνακες 3.5. και 3.6., αντιστοίχως.

Πίνακας 3. 5: Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR, με συγκέντρωση εκκινητών 200 nM

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Αρχική</u> <u>συγκέντρωση</u> <u>ανά αντίδραση</u>	<u>Τελική</u> <u>συγκέντρωση</u> <u>ανά αντίδραση</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
H ₂ O (PCR grade)	-	-	6 μl
BSA	40 μg/ml	40 ng/ αντίδραση	1 μl
Ευθύς εκκινητής (Forward primer)	10μM	200 nM	0,4 μl
Αντίστροφος εκκινητής (reverse)	10μM	200 nM	0,4 μl
2x Green DYE Master Mix	2x	1x	10 μl
ROX	5 μM	50 nM	0,2 μl
Template DNA	25 ng/μl	50 ng/αντίδραση	2 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	-	-	20μl

Πίνακας 3. 6: Οι ποσότητες και οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιήθηκαν για την qPCR, με συγκέντρωση εκκινητών 300 nM

<u>Αντιδραστήριο</u>	<u>Αρχική</u> <u>συγκέντρωση ανά</u> <u>αντίδραση</u>	<u>Τελική</u> <u>συγκέντρωση ανά</u> <u>αντίδραση</u>	<u>Όγκος (μl)</u>
H ₂ O (PCR grade)	-	-	5,6 μl
BSA	40 μg/ml	40 ng/αντίδραση	1 μl
Ευθύς εκκινητής (Forward primer)	10μM	300nM	0,6 μl
Αντίστροφος εκκινητής (reverse)	10μM	300nM	0,6 μl
2x Green DYE Master Mix	2x	1x	10 μl
ROX	5 μM	50 nM	0,2 μl
Template DNA	25 ng/μl	50 ng/αντίδραση	2 μl
Τελικός όγκος αντίδρασης	-	-	20μl

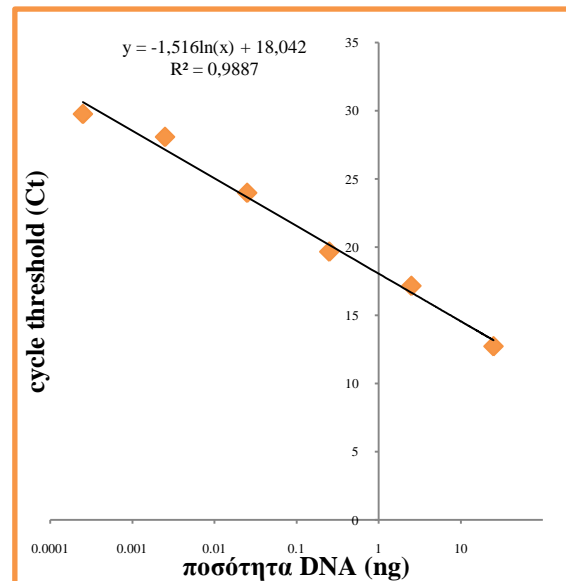
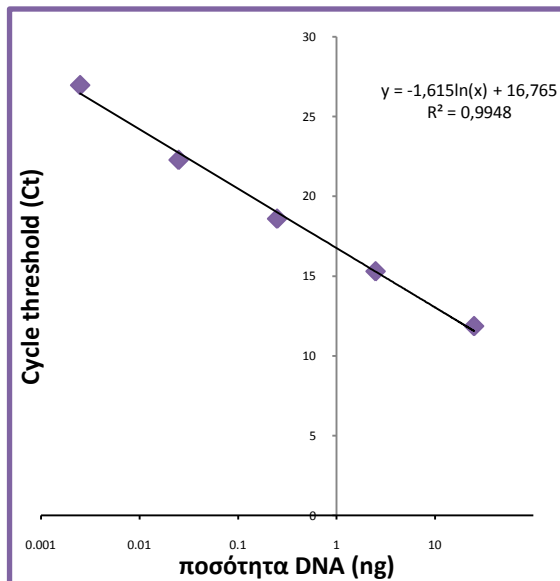
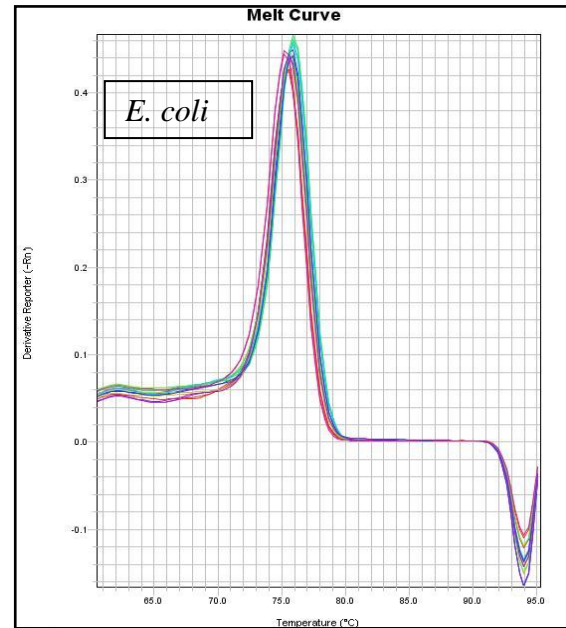
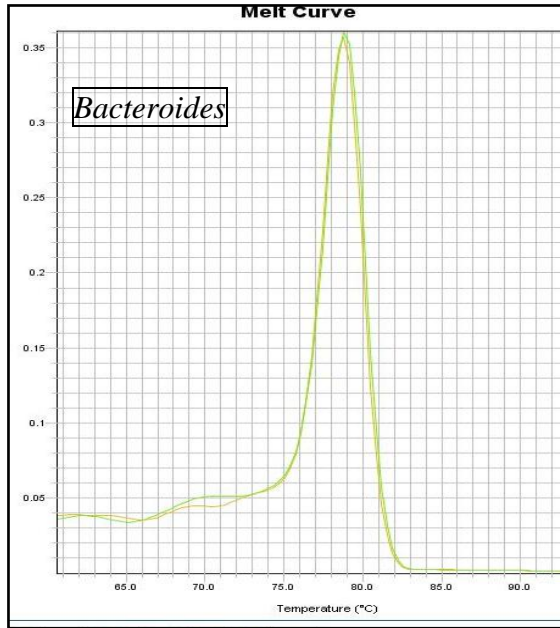
Οι συνθήκες της real time PCR αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα 3.7:

Πίνακας 3. 7: Τα στάδια της real time qPCR

Φάσεις	Θερμοκρασία	Χρόνος	Αριθμός πραγματοποιούμενων κύκλων
Προετοιμασία αντίδρασης/ενεργοποίηση ενζύμου (initialization stage)	95 °C	10 min	1 X
Αποδιάταξη δίκλωνου DNA (denaturation)	95 °C	30 sec	40 X
Υβριδισμός (annealing)	53-60 °C *	1 min	40 X
Επιμήκυνση εκκινητών (extension)	72 °C	33 sec	40 X
Τελική επιμήκυνση εκκινητών (holding stage)	72 °C	1 min	1 X

(*) : Στη φάση του υβριδισμού η ιδανική θερμοκρασία κάθε ζεύγους εκκινητών κυμάνθηκε από 53-60 °C και είναι διαφορετική και εξαρτώμενη από παράγοντες όπως το μήκος και η σύνθεση των εκκινητών (Πίνακας 3.4)

Στο τέλος κάθε ανάλυσης ακολουθούσε αξιολόγηση των αποτελεσμάτων για πιθανά παραπροϊόντα ή διμερή τα οποία δίνουν ξεχωριστές καμπύλες τήξης από αυτές των αναμενόμενων προϊόντων, στο “Melt Curve” γράφημα. Αξιολογείται επίσης και η αποδοτικότητα της αντίδρασης από το “standard curve” γράφημα, όπως αυτά φαίνονται από την ακόλουθη εικόνα 3.8. Μετά το τέλος της real time PCR τα δείγματα τοποθετούνταν στο ψυγείο (4°C) και ακολούθησε ηλεκτροφόρηση πήγματος αγαρόζης όπως αυτή περιγράφεται στο επόμενο υποκεφάλαιο 3.4.5.2.



Εικόνα 3. 3: Απεικόνιση καμπυλών τήξης (melt curves) και γραφικών παραστάσεων αποτελεσματικότητας (standard curves) της αντίδρασης της real time PCR για τα ζεύγη εκκινητών bac και eco, για τους βακτηριακούς πληθυσμούς *Bacteroides* και *Escherichia coli* αντιστοίχως.

3.4.5. Ηλεκτροφόρηση προϊόντων της real time PCR σε πήκτωμα αγαρόζης

Αρχή της μεθόδου:

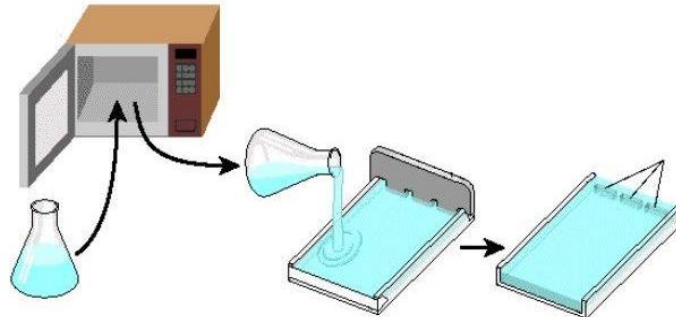
Η ηλεκτροφόρηση είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό ηλεκτρικώς φορτισμένων μορίων σε διάλυμα μέσω της διαφορετικής μετανάστευσής τους υπό την επίδραση ενός ηλεκτρικού πεδίου. Έτσι, το DNA ως αρνητικά φορτισμένο μόριο, θα κινηθεί προς το θετικά φορτισμένο πόλο αν βρεθεί μέσα σε ένα ηλεκτρικό πεδίο. Η ταχύτητα με την οποία μετακινούνται τα τμήματα του DNA μέσα σε ένα πήκτωμα είναι συνάρτηση του μήκους τους, του φορτίου τους και του σχήματός τους. Γενικά, τα μικρά τμήματα κινούνται γρηγορότερα από τα μεγάλα, μέσω των στενών πόρων του πηκτώματος, δηλαδή, θα κινηθούν μέσα στο πήκτωμα σε μεγαλύτερη απόσταση. Τα τμήματα DNA καθίστανται ορατά με προσθήκη μίας χρωστικής, του βρωμιούχου αιθιδίου (EtBr), στο πήκτωμα και έκθεση σε υπεριώδη ακτινοβολία (UV). Το βρωμιούχο αιθίδιο έχει την ικανότητα να παρεμβάλλεται ανάμεσα στις αλυσίδες του DNA και να φθορίζει κατά την έκθεση σε UV. Εκθέτοντας το πήκτωμα σε UV, τα τμήματα DNA εμφανίζονται σαν μία σειρά από φωτεινές ζώνες, καθεμία από τις οποίες αντιστοιχεί σε ένα τμήμα συγκεκριμένου μεγέθους. Τα μεγέθη μπορούν να προσδιοριστούν μετά από σύγκριση με μόρια DNA γνωστού μεγέθους (μάρτυρας μοριακών μεγεθών, DNA ladder). Με τη διαδικασία της ηλεκτροφόρησης γίνεται έλεγχος τόσο της απόδοσης της PCR, όσο και της πιθανότητας επιμόλυνσης (πρόσμιξη των δειγμάτων με ξένο DNA).

Στη συγκεκριμένη μελέτη παρασκευάστηκε πήκτωμα αγαρόζης με περιεκτικότητα 1,5% w/v.

Διαδικασία :

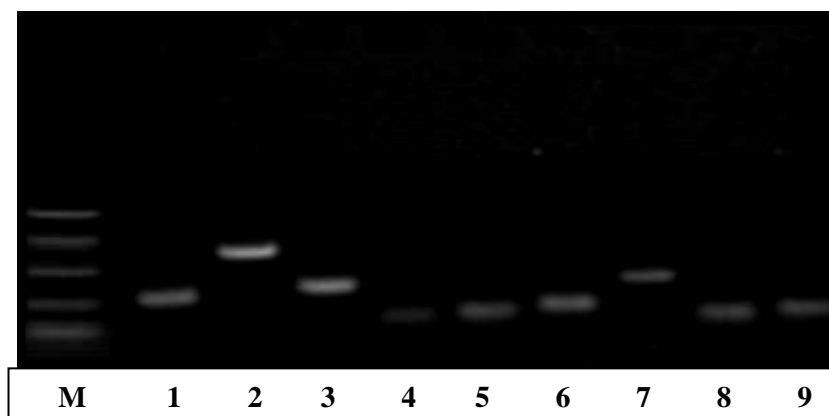
- i. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος TAE (running buffer) με την παρακάτω σύσταση (10X): 48,4 g Tris, 2,92 g EDTA (pH 8,2), 10,9 g Glacial acetic acid και απεσταγμένο νερό με τελικό όγκο 1000 ml
- ii. Διαλυτοποίηση με θέρμανση 1,5 g αγαρόζης σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος TAE (1X), αφού γίνει η προσθήκη 50 μl EtBr (0,5 μg/ml) στο διάλυμα TAE (1X)
- iii. Μεταφορά του μείγματος σε κατάλληλο καλούπι για να στερεοποιηθεί. Παράλληλα, πριν τον πολυμερισμό, τοποθετείται σε απόσταση περίπου 2 cm από την άκρη του καλουπιού μία πλαστική «χτένα», κάθετα στο υγρό,

βυθισμένη σε αυτό, έτσι ώστε μετά τον πολυμερισμό, να δημιουργηθούν τα κατάλληλα μικρά «πηγαδάκια» στο πήκτωμα, σημεία στα οποία θα τοποθετηθούν τα προς διαχωρισμό δείγματα DNA (εικόνα 3.4)



Εικόνα 3. 4: Διαδικασία παρασκευής πηκτώματος αγαρόζης

- iv. Μετά τον πολυμερισμό, το πήκτωμα τοποθετείται στην συσκευή ηλεκτροφόρησης και προστίθεται διάλυμα ηλεκτροφόρησης TAE (Running buffer), έτσι ώστε το πήκτωμα να βρίσκεται πλήρως βυθισμένο σε αυτό
- v. Στην επιφάνεια ενός parafilm, μεταφέρονται 5 μl δείγματος και προστίθεται ποσότητα 1μl loading buffer (6X) το οποίο αυξάνει το ιξώδες τους, με αποτέλεσμα τα δείγματα να καθιζάνουν στα «πηγαδάκια». Ύστερα φορτώνονται στα «πηγαδάκια» προσεκτικά και σε ένα «πηγαδάκι» προστίθενται 10 μl από τον μάρτυρα μοριακών μεγεθών (PCR ladder)
- vi. Στη συνέχεια, με τη βοήθεια κατάλληλου τροφοδοτικού, εφαρμόζεται ηλεκτρικό πεδίο (70 volt για 60 λεπτά) στα δύο άκρα της δεξαμενής ηλεκτροφόρησης, με κατεύθυνση πάντα από τον αρνητικό φορτισμένο στο θετικά φορτισμένο πόλο
- vii. Τέλος, το πήκτωμα αφαιρείται από τη συσκευή ηλεκτροφόρησης και τοποθετείται πάνω σε λάμπα UV (UV Transilluminator), όπου διακρίνονται τα μόρια DNA, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 3.5.



Εικόνα 3. 5: Τα προϊόντα της PCR πραγματικού χρόνου για κάθε ζεύγος εκκινητών με χρήση της ηλεκτροφόρησης σε πήκτωμα αγαρόζης 1,5% που ταυτοποιούν τον ολικό βακτηριακό πληθυσμό και τους υπό εξέταση βακτηριακούς πληθυσμούς. M = PCR marker (Biolabs), 1= universal primer (198 bp), 2= clos primer_cluster XIVa (444 bp), 3= clos primer_cluster I (232 bp), 4= c. perfringens primer (105 bp), 5= bac primer (108 bp), 6= lab primer (126 bp), 7= bif primer (244 bp), 8= eco primer (95 bp) και 9= camp primer (108 bp).

3.5. Στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων

Η στατιστική ανάλυση των πειραματικών δεδομένων πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή της ανάλυσης διακύμανσης (ANOVA) με τη χρήση του στατιστικού πακέτου S.P.S.S. 16.0. Αναλύθηκαν 7 δείγματα για κάθε επέμβαση (C, C_{SE}, L, L_{SE}) και ηλικία (15, 21 και 35 σε ημέρες), με σκοπό τη σύγκριση της μικροχλωρίδας ανάμεσα στις επεμβάσεις. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε ανάλυση διακύμανσης ως προς τον παράγοντα ηλικία για τη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων εντός της κάθε επέμβασης και συνολικά για όλες τις επεμβάσεις. Όπου προέκυψαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, η σύγκριση των μέσων όρων μεταξύ των επεμβάσεων έγινε με το κριτήριο Duncan και ως επίπεδο σημαντικότητας ορίστηκε το 5% ($P \leq 0,05$).

4. Αποτελέσματα

Στην παρούσα μελέτη αναλύθηκαν δείγματα περιεχομένου από τα τυφλά έντερα ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με σκοπό τον προσδιορισμό της ολικής μικροχλωρίδας και επιλεγμένων βακτηριακών πληθυσμών.

Στον πίνακα 4.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύστασης της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων κατά την 15^η ημέρα ηλικίας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, μία ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis*.

Σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με τη συγκέντρωση της ολικής βακτηριακής χλωρίδας. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων στα τυφλά έντερα των ορνιθίων που λάμβαναν ζύμη και είχαν μολυνθεί με σαλμονέλλα (L_{SE}), την προηγούμενη ημέρα της δειγματοληψίας, ήταν σημαντικά ($P < 0,001$) χαμηλότερη σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα C. Οι επεμβάσεις L και C_{SE} είχαν ενδιάμεσες συγκεντρώσεις που δεν διέφεραν από τις επεμβάσεις C και L_{SE} .

Η συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών *C.coccoides-Eubacterium rectale* (cluster XIVa) στις επεμβάσεις που δε μολύνθηκαν με σαλμονέλλα ήταν σημαντικά ($P=0,004$) υψηλότερη σε σύγκριση με την επέμβαση C_{SE} , με την επέμβαση L_{SE} να λαμβάνει ενδιάμεσες τιμές που δεν διέφερε από τις άλλες τρεις επεμβάσεις. από την ομάδα της ζύμης και του μάρτυρα σε σχέση με τις επεμβάσεις της σαλμονέλλας

Στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων των ορνιθίων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση μεταξύ των επεμβάσεων όσον αφορά στις συγκεντρώσεις βακτηρίων των γενών *Bifidobacterium* και *Bacteroides*. Συγκεκριμένα οι επεμβάσεις που είχαν μολυνθεί με σαλμονέλλα είχαν σημαντικά χαμηλότερες συγκεντρώσεις *Bifidobacterium* και *Bacteroides* ($P=0.017$ και $P=0.048$, αντίστοιχα) σε σύγκριση με την επέμβαση του μάρτυρα. Και για τα δύο παραπάνω γένη, η επέμβαση L είχε ενδιάμεσες τιμές που δεν διέφεραν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επιπλέον, στις επεμβάσεις που μολύνθηκαν με σαλμονέλλα παρατηρήθηκε μείωση στη συγκέντρωση του είδους *E. coli* που στην περίπτωση της επέμβασης C_{SE} ήταν σημαντική ($P=0.038$) σε σύγκριση με τις επεμβάσεις C και L.

Καμία σημαντική ($P>0,05$) διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δε σημειώθηκε στις συγκεντρώσεις των υπολοίπων υπό εξέταση βακτηριακών πληθυσμών στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων ορνιθίων ηλικίας 15 ημερών.

Στον πίνακα 4.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύστασης της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων ορνιθίων ηλικίας 21 ημερών, μία εβδομάδα μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis*.

Δε σημειώθηκαν σημαντικές διαφορές στην συγκέντρωση της ολικής μικροχλωρίδας μεταξύ των επεμβάσεων. Επιπροσθέτως, καμία διαφορά ($P>0,05$) δεν παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών που μελετήθηκαν ανάμεσα στις τέσσερις επεμβάσεις.

Στον πίνακα 4.3. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της σύστασης της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων κατά την 35^η ημέρα ηλικίας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, τρεις εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis*.

Σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων αναφορικά με την σύσταση της μικροχλωρίδας εντοπίστηκαν στο γένος *Lactobacillus* καθώς και σε βακτήρια της υποομάδας I (cluster I) του είδους *C. perfringens*. Πιο συγκεκριμένα, η επέμβαση του μολυσμένου με σαλμονέλλα μάρτυρα (C_{SE}) είχε σημαντικά ($P=0,003$) χαμηλότερη συγκέντρωση *Lactobacillus* spp., σε σύγκριση με τις μη μολυσμένες επεμβάσεις C και L, με την επέμβαση L_{SE} να λαμβάνει ενδιαμέσες και σημαντικά διαφορετικές τιμές.

Όσον αφορά στη συγκέντρωση των βακτηρίων που ανήκουν στο *C. perfringens* (cluster I) οι επεμβάσεις της ζύμης (L) και του μολυσμένου με σαλμονέλλα μάρτυρα (C_{SE}) είχαν σημαντικά ($P=0,012$) υψηλότερα επίπεδα σε σχέση με την επέμβαση του μάρτυρα C και την επέμβαση L_{SE} .

Επιπρόσθετα, καμία άλλη σημαντική ($P>0,05$) διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων δε σημειώθηκε τόσο όσον αφορά στη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την 35^η ημέρα ηλικίας, όσο και στους βακτηριακούς πληθυσμούς *Escherichia coli.*, *Bacteroides* spp., *Bifidobacterium* spp., *C. perfringens* και *C. coccoides-Eubacterium rectale* (cluster XIVa).

Τέλος, στο διαγράμμα 4.1 (Α, Β, Γ, Δ) παρουσιάζονται οι μέσοι όροι της συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων ως προς την ηλικία για τις τέσσερις επεμβάσεις C, C_{SE}, L, L_{SE}, αντιστοίχως. Καμία σημαντική διαφορά ($P>0,05$) δε σημειώθηκε ως προς τον χρόνο σε καμία από τις επεμβάσεις. Στο διάγραμμα 4.2. παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μέσων όρων της συνολικής συγκέντρωσης των ολικών βακτηρίων. Δεν παρουσιάζεται καμία σημαντική διαφορά ($P>0,05$) στη συνολική συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων του τυφλικού περιεχομένου των ορνιθίων κρεοπαραγωγής ως προς το χρόνο.

Πίνακας 4. 1: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε \log_{10} CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 15 ημερών, μία ημέρα μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella enteritidis*

Βακτηριακός πληθυσμός ¹	Επεμβάσεις ²				Στατιστικά	
	C	C _{SE}	L	L _{SE}	SEM ³	P _{ANOVA}
Ολικά βακτήρια	10.25 ^b	9.72 ^{ab}	9.93 ^{ab}	9.62 ^a	0.168	<0.001
<i>Escherichia coli.</i>	9.03 ^b	8.39 ^a	8.99 ^b	8.61 ^{ab}	0.240	0.038
<i>Lactobacillus spp.</i>	7.67	7.01	6.80	7.10	0.589	0.505
<i>Bifidobacterium spp.</i>	7.11 ^b	6.00 ^a	6.40 ^{ab}	5.74 ^a	0.416	0.017
<i>Bacteroides spp.</i>	8.82 ^b	8.05 ^a	8.60 ^{ab}	8.27 ^a	0.279	0.048
<i>Clostridium perfringens</i> subgroup (Clostridial Cluster I)	7.46	6.88	7.32	6.93	0.329	0.235
<i>Clostridium perfringens</i>	5.41	5.40	5.25	5.38	0.404	0.978
<i>C. coccooides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> subgroup (Clostridial cluster XIVa)	9.10 ^b	7.87 ^a	9.06 ^b	8.42 ^{ab}	0.339	0.004

¹Μέσος όρος μετρήσεων 7 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) διαφέρουν σημαντικά .

²C= μάρτυρας, C_{SE}= πειραματική μόλυνση με *S. enteritidis*, L= ζύμη σε συγκέντρωση 10⁹ cfu/kg τροφής, L_{SE}= συνδυασμός ζύμης και πειραματικής μόλυνσης με *S. enteritidis*

³Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων Πίνακας 4. 2: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε log₁₀ CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 21 ημερών, μία εβδομάδα μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella enteritidis*

Βακτηριακός πληθυσμός ¹	Επεμβάσεις ²				Στατιστικά	
	C	C _{SE}	L	L _{SE}	SEM ³	P _{ANOVA}
Ολικά βακτήρια	9.87	9.93	9.60	9.76	0.198	0.378
<i>Escherichia coli</i>	8.44	8.80	8.29	8.94	0.270	0.079
<i>Lactobacillus spp.</i>	6.93	6.85	7.14	8.04	0.495	0.087
<i>Bifidobacterium spp.</i>	6.75	6.05	5.97	6.43	0.527	0.436
<i>Bacteroides spp.</i>	8.51	8.60	8.31	8.74	0.345	0.656
<i>Clostridium perfringens</i> subgroup (Clostridial Cluster I)	6.07	7.07	5.67	6.68	0.524	0.059
<i>Clostridium perfringens</i>	5.86	6.40	5.90	6.18	0.227	0.084
<i>C. coccoides –Eubacterium rectale</i> subgroup (Clostridial cluster XIVa)	8.46	9.22	8.39	7.98	0.476	0.099

¹Μέσος όρος μετρήσεων 7 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) διαφέρουν σημαντικά .

²C= μάρτυρας, C_{SE}= πειραματική μόλυνση με *S. enteritidis*, L= ζύμη σε συγκέντρωση 10⁹ cfu/kg τροφής, L_{SE}= συνδυασμός ζύμης και πειραματικής μόλυνσης *S. enteritidis*

³Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων

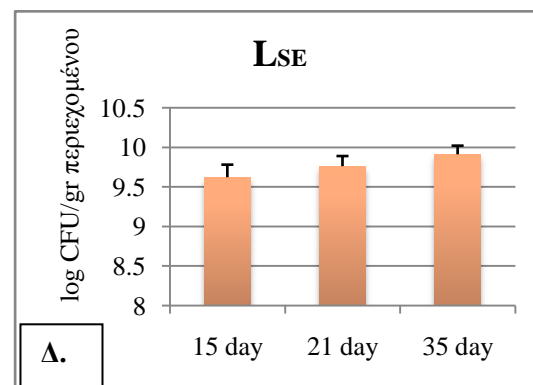
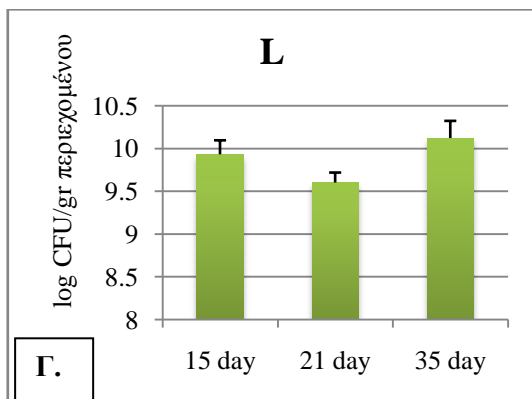
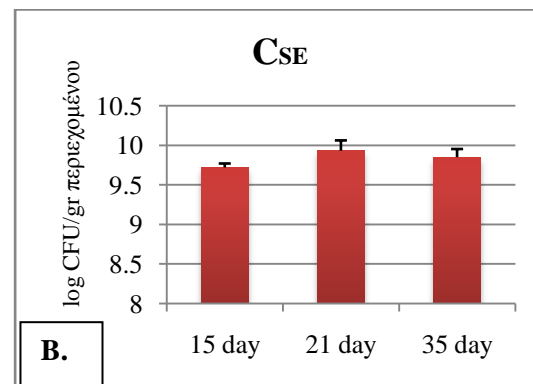
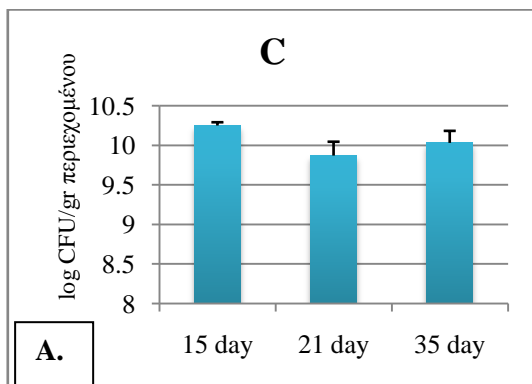
Πίνακας 4. 3: Σύσταση της τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε \log_{10} CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων 35 ημερών, τρεις εβδομάδες μετά την πειραματική μόλυνση με *Salmonella enteritidis*

Βακτηριακός πληθυσμός ¹	Επεμβάσεις ²				Στατιστικά	
	C	C _{SE}	L	L _{SE}	SEM ³	P _{ANOVA}
Ολικά βακτήρια	10.03	9.85	10.12	9.91	0.207	0.568
<i>Escherichia coli</i>	8.55	8.66	9.00	8.50	0.288	0.128
<i>Lactobacillus spp.</i>	8.50 ^b	7.58 ^a	8.61 ^b	8.06 ^{ab}	0.269	0.003
<i>Bifidobacterium spp.</i>	5.27	4.96	5.96	5.06	0.414	0.097
<i>Bacteroides spp.</i>	8.42	8.04	8.53	8.08	0.328	0.365
<i>Clostridium perfringens</i> subgroup (Clostridial Cluster I)	5.76 ^a	6.35 ^b	6.56 ^b	5.80 ^a	0.266	0.012
<i>Clostridium perfringens</i>	5.88	6.17	6.00	6.06	0.321	0.732
<i>C. coccoides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> subgroup (Clostridial cluster XIVa)	8.22	8.13	8.24	8.23	0.349	0.988

¹Μέσος όρος μετρήσεων 7 ορνιθίων ανά επέμβαση. Σε κάθε γραμμή, μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (a, b) διαφέρουν σημαντικά .

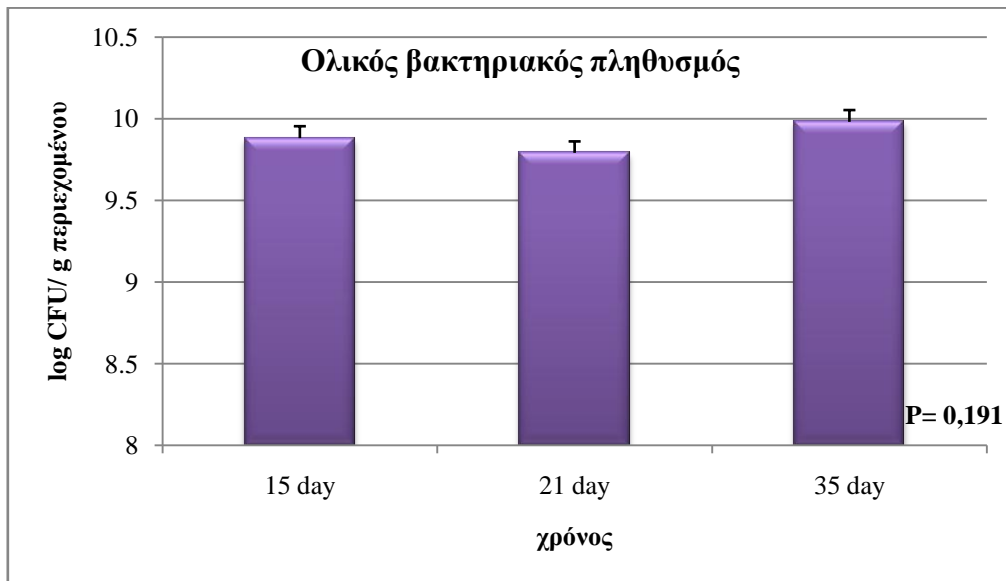
²C= μάρτυρας, C_{SE}= πειραματική μόλυνση με *S. enteritidis*, L= ζύμη σε συγκέντρωση 10⁹ cfu/kg τροφής, L_{SE}= συνδυασμός ζύμης και πειραματικής μόλυνσης με *S. enteritidis*

³Συγκεντρωτικό τυπικό σφάλμα των μέσων όρων



Διάγραμμα 4. 1: Μέσοι όροι της συγκέντρωσης της ολικής τυφλικής μικροχλωρίδας (εκφρασμένη σε log CFU/g ομογενοποιημένου περιεχομένου) ορνιθίων κρεοπαραγωγής ανά επέμβαση και ανά χρόνο δειγματοληψίας. Οι στήλες ανά επέμβαση και χρόνο δειγματοληψίας αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο ($n=7$) \pm τυπικό σφάλμα.

Οι μέσοι όροι με διαφορετικούς εκθέτες (*a*, *b*) διαφέρουν σημαντικά ($P \leq 0,05$)



Διάγραμμα 4. 2: Η επίδραση του χρόνου στη συγκέντρωση του ολικού βακτηριακού πληθυσμού. Οι στήλες ανά χρόνο δειγματοληψίας τυφλικού περιεχομένου αντιπροσωπεύουν το μέσο όρο (n=28) ± τυπικό σφάλμα.

5. Σχολιασμός

Τα ορνίθια κρεοπαραγωγής αναπτύσσονται κάτω από εντατικές συνθήκες και εκτίθενται σε αρκετούς παράγοντες που προκαλούν stress. Το αυξημένο stress προκαλεί μειωμένη ανάπτυξη και αυξημένη ευαισθησία στις ασθένειες (Blajman *et al.*, 2014). Στο παρελθόν, τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνταν ως αυξητικοί παράγοντες στη διατροφή των ζώων. Ωστόσο, μετά την απαγόρευση τους, χρησιμοποιούνται εναλλακτικές των αντιβιοτικών πρόσθετες ύλες, όπως είναι τα προβιοτικά (European Commission 2003). Η χρήση των προβιοτικών αποτελεί μια διατροφική προσέγγιση σύμφωνα με την οποία, όταν προσλαμβάνονται σε επαρκείς ποσότητες, προάγουν την καλή λειτουργία του γαστρεντερικού οικοσυστήματος και βελτιώνουν την εντερική λειτουργία (Mountzouris *et al.*, 2010). Αναφέρεται ότι, τα προβιοτικά βοηθούν και διατηρούν την ισορροπία της εντερικής μικροχλωρίδας που έχει ως αποτέλεσμα την προάσπιση της υγείας και την αύξηση του σωματικού βάρους στα ορνίθια (Blajman *et al.*, 2014). Άρα, η διατήρηση και η βελτίωση της λειτουργίας του πεπτικού συστήματος είναι απαραίτητη για την ευζωία και την παραγωγικότητα των ζώων.

Η μικροχλωρίδα που αποικίζει το γαστρεντερικό σωλήνα θεωρείται πως συμβάλλει σε μία ενεργή μεταβολική διαδικασία του οργανισμού (O'Hara and Shanahan, 2006). Σε φυσιολογικές συνθήκες, οι ενδογενείς βακτηριακοί πληθυσμοί αποτελούν ένα ουσιαστικό στοιχείο για την υγεία, με προστατευτική επίδραση επί της εντερικής δομής και ομοιοστασίας και με εμπλοκή στη διατροφική κατάσταση του οργανισμού. Ο βακτηριακός ανταγωνισμός, η σύνθεση βιταμινών, η μετατροπή προκαρκινικών και καρκινογόνων ουσιών σε ουσίες με μη καρκινογόνο δράση και η διαμόρφωση της ανοσιακής απάντησης αποτελούν μέρος της ωφέλιμης δράσης της ενδογενούς μικροχλωρίδας (Gabriel *et al.*, 2006). Παρά το γεγονός ότι η σύσταση της μικροχλωρίδας είναι σύνθετη και αποτελείται κατά 99% από βακτήρια, υπάρχει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον για τη χρησιμοποίηση ζυμών ως προβιοτικά στη διατροφή των ζώων (Liong *et al.*, 2011).

Σημειώνεται επίσης ότι η *S. Enteritidis* προκαλεί σημαντικές τροφιμογενείς λοιμώξεις παγκοσμίως με τα πτηνά να αποτελούν σημαντική δεξαμενή για τον παθογόνο παράγοντα. Ο γαστρεντερικός σωλήνας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής και πιο

συγκεκριμένα τα τυφλά έντερα είναι ο κύριος χώρος αποίκησης των βακτηρίων, καθώς και της σαλμονέλλας (Brisbin *et al.*, 2008; Knap *et al.*, 2011).

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να μελετηθεί η επίδραση της προσθήκης της ζύμης *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής υπό πειραματικές συνθήκες μόλυνσης ή μη με *Salmonella Enteritidis* επί της σύστασης της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων αυτών.

Η υψηλή συγκέντρωση βακτηριακών πληθυσμών στα τυφλά έχει αναφερθεί από πλήθος ερευνών (Chichlowski *et al.*, 2007 a) καθώς, τα τυφλά έντερα αποτελούν ένα ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος. Τα τυφλά έντερα των ενήλικων ορνιθίων αποικίζονται κυρίως από υποχρεωτικά αναερόβια και σε πολύ μικρότερο ποσοστό από προαιρετικά αναερόβια βακτήρια, με τη συγκέντρωση των βακτηρίων να ανέρχεται σε επίπεδο 10^{11} cfu /g εντερικού περιεχομένου (Arajalahti *et al.*, 2004; Ur Rehman *et al.*, 2007; Brisbin *et al.*, 2008). Στην παρούσα μελέτη η ολική βακτηριακή μάζα του περιεχομένου των τυφλών εντέρων προσδιορίστηκε και για τις τέσσερις επεμβάσεις σε επίπεδα της τάξης των 10^{10} cfu/ g νωπού εντερικού περιεχομένου.

Στο μάρτυρα σημειώθηκε αυξημένη συγκέντρωση ($P < 0,001$) των ολικών βακτηρίων στο τυφλικό περιεχόμενο ορνιθίων ηλικίας 15 ημερών σε σύγκριση με τη μολυσμένη ζύμη, ενώ οι επεμβάσεις της ζύμης και του μολυσμένου μάρτυρα έλαβαν ενδιάμεσες τιμές και δε διέφεραν από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Σε συμφωνία βρίσκονται και οι μελέτες τόσο των Wise και Siragusa (2007) όσο και του Mondal (2013), οι οποίοι διαπίστωσαν αυξημένη συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων στην επέμβαση του μάρτυρα.

Αναλυτικότερα, οι Gabriel *et al.* (2006) αναφέρουν πως διακρίνονται τρεις τύποι βακτηρίων που συναντώνται κατά μήκος του γαστρεντερικού σωλήνα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, με την πρώτη κατηγορία να αποτελείται από τα επικρατέστερα βακτήρια ($>10^6$ CFU/g περιεχομένου), τη δεύτερη από τα υποδεσπόζοντα βακτήρια (10^6 - 10^3 CFU/g περιεχομένου) και την τελευταία από τα υπολλειμματικά βακτήρια ($<10^3$ CFU/g περιεχομένου). Επιπρόσθετα, οι βακτηριακοί πληθυσμοί αντιπροσωπεύονται από τα ωφέλιμα βακτήρια (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*), τα δυνητικά παθογόνα για τον άνθρωπο (*Campylobacter* sp) και τα προαιρετικά

παθογόνα για τα ίδια τα ορνίθια (*Clostridium spp*, *E.coli*). Κατά συνέπεια, στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι παραπάνω βακτηριακοί πληθυσμοί.

Ανεξαρτήτως της επέμβασης και της ημέρας δειγματοληψίας, από τους επιμέρους πληθυσμούς που ανιχνεύτηκαν, κυρίαρχη ομάδα αποτέλεσε αυτή των *C. coccoides-E. rectale* (Σύμπλεγμα *Clostridium* XIVa). Η ποσοτική κυριαρχία αυτών των πληθυσμών στο περιεχόμενο ή στο βλεννογόνο των τυφλών εντέρων υποστηρίζεται από πλήθος ερευνών (Zhu and Joerger 2003; Gerard *et al.*, 2008; Jozefiak *et al.*, 2010; Van den Abbeele; 2010). Τα *Clostridiales* έχει αποδειχθεί πως παράγουν μικράς αλύσου λιπαρά οξέα (SCFA), με το σύμπλεγμα IX να παράγει κυρίως προπιονικό οξύ και τα συμπλέγματα IV (*C. leptum*) και XIVa (*C. coccoides*) να παράγουν πρωτίστως βουτυρικό οξύ. Το βουτυρικό οξύ είναι γνωστό για τη βακτηριοστατική δράση που έχει (Van Immerseel *et al.*, 2004a; Bjerrum *et al.*, 2006; Barman *et al.*, 2007). Το σύμπλεγμα *C. coccoides* ενδέχεται να είναι σημαντικό για την αντίσταση στην αποίκηση εντεροπαθογόνων βακτηρίων παρεμποδίζοντας τα να εισβάλουν στα επιθηλιακά κύτταρα του τυφλού εντέρου (Torok *et al.*, 2011).

Οι Barman *et al.* (2007) πραγματοποίησαν πειραματική μόλυνση με *S. enterica serovar Typhimurium* (σε συγκέντρωση 10^8 CFU) σε ποντίκια και ανάλυση της μικροχλωρίδας τυφλικού περιεχομένου με την μοριακή ανάλυση PCR. Η συγκέντρωση των βακτηριακών πληθυσμών τόσο για *C.coccoides* όσο και για *Bacteroides* ήταν σημαντικά υψηλότερη στην επέμβαση του μάρτυρα σε σύγκριση με την επέμβαση που πραγματοποιήθηκε μόλυνση με *S. Typhimurium* και έρχεται σε συμφωνία με την παρούσα μελέτη.

Όπως τονίζουν οι Garcia *et al.* (2012), το γένος *Bacteroides* έχει μελετηθεί εκτενώς σε πλήθος ερευνών με μεγάλο εύρος τιμών να κυμαίνονται από 10^7 έως 10^{10} CFU/g τυφλικού περιεχομένου ή περιττωμάτων σε ορνίθια κρεοπαραγωγής για το διάστημα $14^{ης}$ - $40^{ης}$ ημέρας. Σε συμφωνία βρίσκονται τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης με τη συγκέντρωση του βακτηριακού πληθυσμού *Bacteroides* να είναι 10^8 CFU/g, με σημαντική μείωση να εντοπίζεται την $15^{η}$ ημέρα στις επεμβάσεις που μολύνθηκαν με σαλμονέλλα (C_{SE} και L_{SE}). Όπως αναφέρει ο Phillips (Corrigan *et al.*, 2011) το γένος *Bacteroides spp.* ανήκει στα εντερικά βακτήρια που πιθανόν να εμπλέκονται σε σημαντικές μεταβολικές δραστηριότητες όπως είναι οι ζυμωτικές αντιδράσεις πολυσακχαριτών, η χρήση αζωτούχων υποστρωμάτων και η παρεμπόδιση αποίκησης

συγκεκριμένων επιβλαβών βακτηριακών πληθυσμών. Ωστόσο, δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί ένας τέτοιος ισχυρισμός στη παρούσα εργασία, διότι δεν πραγματοποιήθηκε προσδιορισμός των πτητικών λιπαρών οξέων.

Στην παρούσα μελέτη δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά στη συγκέντρωση του παθογόνου *C. perfringens* ανάμεσα στις επεμβάσεις σε καμία χρονική περίοδο, με τα επίπεδα να κυμαίνονται σε 10^5 - 10^6 CFU/ g. Σε συμφωνία βρίσκονται οι Engberg *et al.* (2004) πραγματοποίησαν πείραμα σε ορνίθια (με ή χωρίς προσθήκη ξυλανάσων) που τους χορηγήθηκε σιτηρέσιο με βάση το σίτο και το σογιάλευρο. Κατέληξαν στο συμπέρασμα πως η συγκέντρωση του *C. perfringens* ήταν σε επίπεδα της τάξης 10^6 CFU/ g τυφλικού περιεχομένου και δε διέφερε ανάμεσα στις επεμβάσεις. Αυτό υποδηλώνει πως παρά την έκδηλη παρουσία του είδους *C. perfringens* σε όλα τα δείγματα, δεν επηρέασε την υγεία των ορνιθίων και δεν προκάλεσε νεκρωτική εντερίτιδα (Wise and Siragusa, 2005). Επιπροσθέτως, την 35^η ημέρα δεν εντοπίστηκε σε καμία από τις επεμβάσεις το εντερικό Gram (-) παθογόνο για τον άνθρωπο, *Campylobacter sp.*

Γενικά, η προσθήκη προβιοτικών στη διατροφή των ορνιθίων μπορεί να οδηγήσει στην τροποποίηση της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας. Για παράδειγμα οι Li *et al.* (2009) παρατήρησαν σημαντική αύξηση των ωφέλιμων βακτηρίων (*Lactobacillus* και *Bifidobacterium*) στο περιεχόμενο του τυφλού εντέρου ορνιθίων 42 ημερών σε σχέση με το μάρτυρα μετά από τη χορήγηση προβιοτικού που αποτελούνταν από το είδος *Bacillus cereus* και είδη του γένους *Lactobacillus*.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στην επέμβαση του μάρτυρα C και της ζύμης L σε καμία από τις τρεις δειγματοληψίες. Σε συμφωνία με το παραπάνω είναι και τα αποτελέσματα της μελέτης των Abdel-Raheem *et al.* (2012) όπου δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στις συγκέντρωσεις των *Lactobacillus spp.*, coliforms και *E. coli* στο περιεχόμενο των τυφλών εντέρων ορνιθίων ηλικίας 21 και 42 ημερών ανάμεσα στο μάρτυρα και στην επέμβαση της ζύμης *S.cerevisiae* που είχε προστεθεί σε επίπεδο 3×10^{10} cfu/kg τροφής. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξαν και οι Salim *et al.* (2013) οι οποίοι δεν διαπίστωσαν αλλαγή του βακτηριακού πληθυσμού *Lactobacillus* στο περιεχόμενο τυφλού εντέρου ορνιθίων κρεοπαραγωγής κατά την 35^η ημέρα μετά την χορήγηση πολυστέλεχου προβιοτικού που αποτελούνταν από *S. cerevisiae*, *L. reuteri* και *B.*

subtilis. Παρόμοιες μελέτες προσθήκης ζύμης έχουν εφαρμοστεί και σε χοίρους χωρίς να παρατηρείται καμία αλλαγή στην σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας (White *et al.*, 2002; Van Heugten *et al.*, 2003).

Στην παρούσα εργασία δε σημειώθηκε σημαντική διαφορά στον πληθυσμό του *E.coli* κατά τη διάρκεια του πειράματος ανάμεσα στην επέμβαση του μάρτυρα και της ζύμης. Ωστόσο, την 15^η ημέρα (1 ημέρα μετά την μόλυνση με SE) παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του *E. coli* στην επέμβαση του μάρτυρα που μολύνθηκε με σαλμονέλλα (C_{SE}) σε σχέση με αυτή των επεμβάσεων C και L.

Γενικότερα όμως όσον αφορά την οικογένεια *Enterobacteriaceae*, τα αποτελέσματα άλλων μελετών δε συνηγορούν υπερ της μείωσης της συγκέντρωσης *Enterobacteriales* του εντερικού περιεχομένου με την πειραματική μόλυνση με *Salmonella* (Juricova *et al.*, 2013). Οι Juricova *et al.* (2013) επισήμαναν πως ο πληθυσμός *Enterobacteriales* στο τυφλικό περιεχόμενο ήταν αυξημένος στη μολυσμένη με SE (σε συγκέντρωση 10^7 CFU) επέμβαση σε σχέση με την επέμβαση των μη μολυσμένων με SE κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

Στην παρούσα μελέτη δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις επεμβάσεις μολυσμένης (L_{SE}) και μη μολυσμένης (L) ζύμης όσον αφορά τη συγκέντρωση *E.coli*. Ωστόσο, οι Haldar *et al.* (2011) δεν συμφωνούν με τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης. Πραγματοποιήθηκε πείραμα σε 128 ορνίθια Cobb που είχε γίνει προσθήκη ζύμης στο στήρσιο και μόλυνση με *S. Enteritidis* (συγκέντρωση 10×10^7 CFU/ml) την 21^η ημέρα και διαπίστωσαν πως η συγκέντρωση *E. coli* στο περιεχόμενο του λεπτού εντέρου ήταν χαμηλότερη στη μολυσμένη με SE επέμβαση της ζύμης σε σχέση με το μάρτυρα (προσθήκη ζύμης χωρίς μόλυνση με SE). Οι Muthusamy *et al.* (2011) επισήμαναν πως μία εβδομάδα μετά (52^η ημέρα) τη μόλυνση με *S. pullorum* ($0,5\text{ml } 2 \times 10^8$ CFU/ml), οι βακτηριακοί πληθυσμοί στο λεπτό έντερο διαφοροποιήθηκαν στο μολυσμένο μάρτυρα καθώς και στη μολυσμένη ζύμη (*S.cerevisiae* 1g/kg). Πιο συγκεκριμένα, η προσθήκη ζύμης συντέλεσε σε αυξημένη συγκέντρωση *E. coli* και *Lactobacillus spp.* στο βλεννογόνο του δωδεκαδακτύλου, της νήστιδας και του ειλεού ($P < 0,001$) και μειωμένη συγκέντρωση του πληθυσμού των γαλακτοβάκιλλων και *E. coli* στο περιεχόμενο του λεπτού εντέρου.

Παρά το γεγονός της αυξανόμενης χρήσης των μοριακών αναλυτικών τεχνικών για την ακριβή ποσοτική και ποιοτική ταυτοποίηση των βακτηριακών πληθυσμών που αποικούν στο γαστρεντερικό σύστημα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής, η καλλιέργεια και η απομόνωση των βακτηριακών στελεχών είναι ακόμη αναπόσπαστο μέρος (Bjerrum *et al.*, 2006). Επιπλέον, διαφοροποιήσεις στη μικροχλωρίδα των ορνιθίων κρεοπαραγωγής μπορούν να σημειωθούν και εντός των επεμβάσεων λόγω της ατομικότητας και των περιβαλλοντικών συνθηκών που επικρατούν (Stanley *et al.*, 2014). Πιθανώς, σε αυτό το γεγονός να οφείλεται η διαφοροποίηση που παρατηρείται στην ομάδα των κλωστριδίων του συμπλέγματος I στο τυφλικό περιεχόμενο των ορνιθίων 35 ημερών ανάμεσα στις επεμβάσεις.

Τέλος, έχει αναφερθεί υψηλή συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων στα τυφλά έντερα των ορνιθίων από πλήθος ερευνών καθώς τα τυφλά προσφέρουν ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη ενός σύνθετου μικροβιακού οικοσυστήματος. Η ανάλυση του περιεχομένου των τυφλών εντέρων με τη χρήση της real time PCR επιβεβαιώνει την άποψη αυτή. Η ολική βακτηριακή μάζα στο τυφλικό περιεχόμενο ανέρχεται σε αρκετά υψηλό επίπεδο και συγκεκριμένα σε συγκέντρωση 10^{11} κύτταρα/g εντερικού περιεχομένου, που έρχεται σε συμφωνία με τους Jozefiac *et al.* (2010) και Czerwinski *et al.* (2010). Στην παρούσα μελέτη διαπιστώθηκε υψηλή συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων που ανέρχεται σε επίπεδα της τάξης 10^{10} CFU/ g νωπού τυφλικού περιεχομένου ανεξαρτήτως επέμβασης και χρόνου. Σε συμφωνία έρχονται και άλλες μελέτες που αναφέρουν πως μετά την εκκόλαψη, η συγκέντρωση των ολικών βακτηρίων ανέρχεται σε επίπεδα 10^{10} CFU/ g εντερικού περιεχομένου (Zhu and Joerger, 2003; Rehman *et al.*, 2007). Τα τυφλά έντερα αντιπροσωπεύονται από μία ποικιλόμορφη κοινότητα βακτηρίων που παραλάσσει με την ηλικία των ορνιθίων. Ωστόσο, ο ολικός βακτηριακός πληθυσμός παραμένει σταθερός αμέσως μετά την εκκόλαψη.

6. Συμπεράσματα και συστάσεις

- Η χορήγηση της ζύμης *S. cerevisiae var. boulardii* σε συγκέντρωση 10^9 CFU/kg τροφής στο σιτηρέσιο ορνιθίων κρεοπαραγωγής δε συντέλεσε στη μεταβολή της σύστασης της μικροβιακής χλωρίδας των τυφλών εντέρων.
- Η *S. Enteritidis* προκάλεσε αλλαγή στη σύσταση της μικροχλωρίδας των τυφλών εντέρων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής 15 και 35 ημερών.
- Η πειραματική μόλυνση που πραγματοποιήθηκε με το στέλεχος *S. Enteritidis* συντέλεσε σε μείωση των βακτηριακών πληθυσμών των γενών *Bifidobacterium* και *Bacteroides* στο περιεχόμενο τυφλών εντέρων των ορνιθίων κρεοπαραγωγής ηλικίας 15 ημερών (μία ημέρα μετά την μόλυνση με SE).
- Η επέμβαση του μολυσμένου μάρτυρα παρουσίασε μειωμένη συγκέντρωση του ωφέλιμου πληθυσμού *Lactobacillus* σε σχέση με τις επεμβάσεις του μάρτυρα και της ζύμης στο περιεχόμενο τυφλών εντέρων ορνιθίων κρεοπαραγωγής 35 ημερών, δηλαδή 3 εβδομάδες μετά την μόλυνση.

Συμπερασματικά, η υπό εξέταση ζύμη δεν επηρέασε την σύσταση της εντερικής μικροχλωρίδας των ορνιθίων κρεοπαραγωγής και πιθανώς να οφείλεται στο στέλεχος, τη συγκέντρωση ή/ και τον τρόπο χορήγησής του. Περαιτέρω έρευνα κρίνεται αναγκαία ώστε να διερευνηθεί λεπτομερώς ο μηχανισμός που οι ζύμες δρουν και επηρεάζουν το εντερικό οικοσύστημα. Τέλος, η πειραματική μόλυνση με *Salmonella Enteritidis* υποδεικνύει πως παρά την απουσία κλινικών συμπτωμάτων, επέφερε αλλαγές στη σύσταση της μικροχλωρίδας του περιεχομένου των τυφλών εντέρων των κρεοπαραγωγών ορνιθίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abdel-Raheem S.M., Abd-Allah S., Khaled M.S., Hassanein M.A., 2012. The Effects of Prebiotic, Probiotic and Synbiotic Supplementation on Intestinal Microbial Ecology and Histomorphology of Broiler Chickens, 6:277-289.

Amit-Romach E., Sklan D. and Uni Z., 2004. Microbial ecology of the chicken intestine using 16 S ribosomal DNA primers. *Poult. Sci.*, 83: 1093-1098.

Apajalahti J., 2005. Comparative gut microflora, metabolic challenges and potential opportunities. *The Journal of Applied Poultry Research* 14:444.

Apajalahti J., Kettunen A., Graham H., 2004. Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken. *World's Poultry Science Journal* 60:223-232.

Apajalahti J.H., Kettunen A., Bedford M.R., and Holben W.E., 2001. Percent G+C profiling accurately reveals diet-related differences in the gastrointestinal microbial community of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:5656–5667

Barman M., Unold D., Shifley K., Amir E., Hung K., Bos N., Salzman N., 2008. Enteric salmonellosis disrupts the microbial ecology of the murine gastrointestinal tract. *Infect. Immun.*, 76, pp. 907–915.

Bjerrum L., Engberg R., Leser T., Jensen B., Finster K. and Pedersen K., 2006. Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques. *Poultry science* 85:1151.

Blajman J.E., Frizzo L.S., Zbrun M.V., Astesana D.M., Fusari M.L., Soto L.P., Rosmini M.R. and Signorini M.L., 2014. Probiotics and broiler growth performance: a meta analysis of randomised controlled trials. *British poultry science* DOI: 10.1080/00071668.2014.931930

Blaut M., Collins M., Welling G., Dore J., Van Loo J. and De Vos W., 2002. Molecular biological methods for studying the gut microbiota: the EU human gut flora project. *British Journal of Nutrition* 87:203-211.

Brisbin J.T., Gong J., Sharif S , 2008. Interactions between commensal bacteria and the gut-associated immune system of the chicken. *Anim Health Res Rev* 9: 101–110.

Brown M., 2011. Modes of action of probiotics: recent developments. *Journal of animal and veterinary advances* 10: 1895-1900.

Bryan FL, Doyle MP., 1995. Health risks and consequences of *Salmonella* and *Campylobacter jejuni* in raw poultry. J Food Protect, 58:326–44.

Callaway T. R., Edrington T. S., Anderson R. C., Byrd J. A., Nisbet D. J., 2008. Gastrointestinal microbial ecology and the safety of our food supply as related to *Salmonella*. J. Anim. Sci. 86(14 Suppl.):E163–E172.

Carter M., 2008. Development of a rapid detection on method of *Salmonella spp.* on chicken skin by real time polymerase chain reaction.

Chichlowski M., Croom J., McBride B., Havenstein G., Koci M., 2007a. Metabolic and physiological impact of probiotics or direct-fed-microbials on poultry: a brief review of current knowledge. International Journal of Poultry Science 6:694-704.

Cianciullo D., 2012. Effect of prebiotic and synbiotic injected in ovo on performance, meat quality and hystopathological changes in muscle of broiler chickens. University of Molise, department of agricultural, environmental and food science.

Collado M. and Y. Sanz., 2007. Characterization of the Gastrointestinal MucosaAssociated Microbiota of Pigs and Chickens Using Culture-Based and Molecular Methodologies. Journal of Food Protection 174; 70:2799-2804.

Corrigan A., Horgan K., Clipson N., Murphy R.A., 2011. Effect of dietary supplementation with a *Saccharomyces cerevisiae* mannan oligosaccharide on the bacterial community structure of broiler cecal contents. Appl.Environ.Microbiol. 77 (18): 6653.

Czerwinski, J., Jberg O.H, Smulikowska S., Engberg R.M. and Mieczkowska A., 2010. Influence of dietary peas and organic acids and probiotic supplementation on performance and caecal microbial ecology of broiler chickens. British Poultry Science 51:258-269.

Czerucka D., Piche T., Rampal P., 2007. Review article: yeast as probiotics–*Saccharomyces boulardii*. Aliment Pharmacol Ther 26:767–778.

Decroos K., Vercauteren T., Werquin G. and Verstraete W., 2004. Repression of *Clostridium* population in young broiler chickens after administration of a probiotic mixture. Communications in agricultural and applied biological sciences 69: 5-13.

Dibner J., Richards J. and Knight C., 2008. Microbial imprinting in gut development and health. The Journal of Applied Poultry Research 17:174.

Dibner J. and Richards J., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. Poultry Science 84(4): 634.

Dumonceaux T., Hill J., Hemmingsen S. and Van Kessel A., 2006. Characterization of intestinal microbiota and response to dietary virginiamycin supplementation in the broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 72:2815

Dunkley K.D., Callaway T.R., Chalova V.I., McReynolds J.L., Hume M.E., Dunkley S.C., Kubena L.F., Nisbet D.J., Ricke S.C., 2009. Foodborne *Salmonella* ecology in the avian gastrointestinal tract. *Anaerobe* 15: 26-35.

Engberg R.M., Hedemann M.S., Jensen B.B., 2002. The influence of grinding and pelleting of feed on the microbial composition and activity in the digestive tract of broiler chickens. *Brit Poult Sci* 43:569 – 579.

European Commission. 2003. Regulation 1831 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. *Official Journal of the European Union* L 268/29.

Fooks L.J., Fuller R., Gibson G.R., 1999. Prebiotics, probiotics and human gut microbiology. *Int Dairy J* 9:53–61.

Fuller R. and Brooker B.E., 1974. *Lactobacilli* which attach to the crop epithelium of the fowl. *Am. J. Clin. Nut.*; vol27; no11: 1305-1312.

Fuller R., 1989. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 66:365–78.

Gabriel I., Lessire M., Mallet S. and Guillot J., 2006. Microflora of the digestive tract: critical factors and consequences for poultry. *World's Poultry Science Journal* 62:499-511.

Gaggia F., Mattarelli P. and Biavati B., 2010. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. *International Journal of Food Microbiology* 141:S15-S28

Gao J., Zhang H.J., Yu S.H., Wu S.G., Yoon I., Quigley J., *et al.*, 2008. Effects of yeast culture in broiler diets on performance and immunomodulatory functions. *Poult. Sci.* 87, 1377–1384.

Garcia G.D., Carvalho M.A.R., Diniz C.G, Marques J.L., Nicoli J.R., Farias I.M., 2012. Isolation, identification and antimicrobial susceptibility of *Bacteroides fragilis* group strains recovered from broiler faeces. *Brit. Poult. J.*, DOI 10.1080/00071668.2012.662272.

Gast RK, Holt PS, 1998. Persistence of *Salmonella enteritidis* from one day of age until maturity in experimentally infected layer chickens. *Poult Science*.77:1759–62.

Gerard P., Brezillon C., Quere F., Salmon A. and Rabot S., 2008. Characterization of cecal microbiota and response to an orally administered *Lactobacillus* probiotic strain in the broiler chicken. *Journal of molecular microbiology and biotechnology* 14:115.

Ghareeb K., Awad W.A., Mohnl M., Porta R., Biarnes M. and Schatzmayr G., 2012. Evaluating the efficacy of an avian-specific probiotic to reduce the colonisation of *Campylobacter jejuni* in broiler chickens. *Poultry Science* 91:1825-1832.

Gong J., Si W., Forster R., Huang R., Yu H., Yin Y., Yang C. and Han Y., 2007. 16S rRNA gene-based analysis of mucosa-associated bacterial community and phylogeny in the chicken gastrointestinal tracts: from crops to ceca. *FEMS microbiology ecology* 59:147-157.

Gong J., Forster R., Yu H., Chambers J., Sabour P., Wheatcroft R. and Chen S., 2002. Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen. *FEMS microbiology letters* 208:1-7.

Guan L., Hagen K., Tannock G., Korver D., Fassenko G. and Allison G., 2003. Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6750.

Guard-Petter Jean, 2001. The chicken, the egg and *Salmonella Enteritidis*, *Environmental Microbiology*, 3 (7); 421-430.

Haghighi H., Gong J., Gyles C., Hayes M., Zhou H., Sanei B., Chambers J. and Sharif S., 2006. Probiotics Stimulate Production of Natural Antibodies in Chickens. *Clinical and Vaccine Immunology* 13:975-980.

Haldar S., Ghosh T.K., Toshiwati and Bedford M.R., 2011. Effects of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) and yeast protein concentrate on production performance of broiler chickens exposed to heat stress and challenged with *Salmonella enteritidis*. *Anim. Feed Sci. Technol.* 168:61–71

Harrow S. A., Ravindran V., Butler R. C., Marshall J.W. and Tannock G. W., 2007. Real-time quantitative PCR measurement of ileal *Lactobacillus salivarius* populations from broiler chickens to determine the influence of farming practices. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7123.

Hassanein S.M. and Soliman K.N., 2010. Effect of Probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) Adding to Diets on Intestinal Microflora and Performance of Hy-Line Layers Hens. *Journal of American Science* 6(11).

Hatoum R., Labrie S., Fliss I., 2012. Antimicrobial and Probiotic Properties of Yeasts: from fundamental to novel applications. *Frontiers in Food Microbiology* 3:1-12.

Higgins R., Malo R., René-Roberge E. and Gauthier R., 1982. Studies on the dissemination of *Salmonella* in nine broiler-chicken flocks. *Avian Diseases* Vol. 26, No. 1, pp. 26-33.

Higgins S. E., Higgins J.P., Wolfenden A.D., Henderson S.N., Torres-Rodriguez A., Tellez G., and Hargis B., 2008. Evaluation of a *Lactobacillus*-based probiotic culture for the reduction of *Salmonella Enteritidis* in neonatal broiler chicks. *Poult. Sci.* 87:27–31

Houshmand M., Azhar K., Zulkifli I., Bejo M.H., Kamyab A., 2012. Effects of non-antibiotic feed additives on performance, immunity and intestinal morphology of broilers fed different levels of protein. *South African Journal of Animal Science* 2012, 42 (No.1)

Hume M., Kubena L., Edrington T., Donskey C., Moore R., Ricke S., Nisbet D., 2003. Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poultry science* 82:1100.

Huyghebaert G.T., Ucatelle R. and Van Immersel F., 2011. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. *The Veterinary Journal*, 187:182–188.

Jin L., Ho Y., Abdullah N. and Jalaludin S., 1997. Probiotics in poultry: modes of action. *World's Poultry Science Journal* 53(04): 351-368.

Jordan R., van Heerden E., Hugo C.J., Piater L.A., 2009. Using current molecular techniques for rapid differentiation of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium. *African J. Biotechnology* vol 8 (9) pp. 1815-1818.

Jozefiak D., Rutkowski A., Kaczmarek S., Jensen B., Engberg R. and H jberg O., 2010. Effect of β -glucanase and xylanase supplementation of barley-and rye-based diets on caecal microbiota of broiler chickens. *British poultry science* 51:546-557.

Juricova H., Videnska P., Lukac M., Faldynova M., Babak V., Havlickova H., Sisak F., Rychlik I., 2013. Influence of *Salmonella* enteric serovar Enteritidis infection on the development of the cecum microbiota in newly hatched chicks. *Appl. Environ. Microbiol* 79 (2): 745-749

Kabir S., Rahman M., Rahman M., Hosain M., Akand M. and Das S., 2005. Viability of Probiotics in Balancing Intestinal Flora and Effecting Histological Changes of Crop and Caecal Tissues of Broilers. *Biotechnology* 4.

Knap I., Kehlet A.B., Mathis G.F., Hofacre C.L., Lumpkins B.S., Jensen M.M., Raum M. and Lay A., 2011. *Bacillus subtilis* (DSM17299) significantly reduces *Salmonella*

in broilers. *Poult. Sci.*, 90: 1690-1694.

Koc F., Samli H., Okur A., Ozduven M., Akuyrek H., Senkoyolu N., 2010. Effects Of *Saccharomyces Cerevisiae* and/or mannanoligosaccharide on performance, blood parameters and intestinal microbiota of broiler chicks. *Bulgarian Journal of Agricultural Science*, 16 (No 5) 2010, 643-650

Lan P., Sakamoto M. and Benno Y., 2004. Effects of two probiotic *Lactobacillus* strains on jejunal and cecal microbiota of broiler chicken under acute heat stress condition as revealed by molecular analysis of 16S rRNA genes. *Microbiology and immunology* 48:917-929.

Lee S.H., Jung B.Y., Rayamahji N., Lee H.S., Jeon W.J., Choi K.S. *et al.*, 2009 A multiplex real-time PCR for differential detection and quantification of *Salmonella spp.*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* and *Enteritidis* in meats. *J. Vet. Sci.*, 10: 43–51.

Legendi V., 2013. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food and characterization of epidemiologically important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovars isolated from livestock, food and humans.

Line J.E., Bailey J.S., Cox N.A., Stern N.J., Tompkins T., 1998. Effect of yeast supplemented feed on *Salmonella* and *Campylobacter* populations in broilers. *Poult. Sci.* 77, 405-410.

Liong Min Tze, 2011. Probiotics. *Biology, Genetics and Health Aspects*. Springer, chapter 3, p.30-45.

Lu J., Idris U., Harmon B., Hofacre C., Maurer J. and Lee M., 2003. Diversity and succession of the intestinal bacterial community of the maturing broiler chicken. *Applied and Environmental Microbiology* 69:6816.

Luo Gan L., Hagen K.E., Tanock G.W., Korver D.R., Fasenko G.M., Allison G.E., 2003. Detection and Identification of *Lactobacillus* Species in Crops of Broilers of Different Ages by Using PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis and Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis. *App. Envir. Microb.* 69: 6750-6757.

Mackie R. and Cann I., 2005. A review of gastrointestinal microbiology with special emphasis on molecular microbial ecology approaches. *Applications of Gene-Based Technologies for Improving Animal Production and Health in Developing Countries* 175-198.

- Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge F., Martin A. and Helmuth R., 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 7046-7052.
- Marin C., Balasch S., Vega S., Lainez M., 2011. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. *Preventive Veterinary Medicine* 98;39–45.
- Mead G. C., 2005. Food safety control in the poultry industry, CRC.
- Mead G.C., 2000. Prospects for competitive exclusion treatment to control *Salmonellas* and other foodborne pathogens in poultry. *Vet. J.*, 159, 111–123.
- Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV, 1999. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* : 5, 607-625.
- Mondal, 2013. Effects of probiotic and antibiotic on growth performance and immune response in broiler.
- Mountzouris K., Tsirtsikos P., Palamidi I., Arvaniti A., Mohnl M., Schatzmayr G. and Fegeros K., 2010. Effects of probiotic inclusion levels in broiler nutrition on growth performance, nutrient digestibility, plasma immunoglobulins, and cecal microflora composition. *Poultry Science* 89:58
- Mountzouris K.C., Tsirtsikos P., Kalamara E., Nitsch S., Schatzmayr G. and Fegeros K., 2007. Evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, and *Pediococcus* Strains in promoting broiler performance and modulating caecal microflora composition and metabolic activities. *Poultry Science* 86: 309-317.
- Murry A.C., Hinton A.J. and Buhr R.J., 2006. Effect of botanical probiotic containing *Lactobacilli* on growth performance and populations of bacteria in the ceca, cloaca, and carcass rinse of broiler chickens. *International Journal of Poultry Science* 5: 344-350.
- Musa H., Wu H.S.L., Zhu C.H., Seri H.I. and Zhu G.Q., 2009. The potential benefits of probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8:313-321.
- Muthusamy N., Haldar S., Ghosh T.K., Bedford M.R., 2011. Effects of hydrolyzed *Saccharomyces cerevisiae* yeast and yeast Cell wall components on live performance intestinal histomorphology and humoral immune response broilers. *Br.Poult.Sci.*, inpress.

Nava G., Attene-Ramos M., Gaskins H. and Richards J., 2009. Molecular analysis of microbial community structure in the chicken ileum following organic acid supplementation. *Veterinary Microbiology* 137:345-353.

Newel D.G. and Fearnley C., 2003. Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens. *Appl. Environ. Microb.* 69 no. 8: 4343-4351

Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J. and Knight S.C., 2009. Mechanisms of action of probiotics: Recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases* 15:300-310.

Niba A., Beal J., Kudi A. and Brooks P., 2009. Bacterial fermentation in the gastrointestinal tract of non-ruminants: Influence of fermented feeds and fermentable carbohydrates. *Tropical animal health and production* 41:1393-1407.

O'Hara A.M. and Shanahan F., 2006. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO reports* 7:688-693.

Olsen K., Henriksen M., Bisgaard M., Nielsen O. and Christensen H., 2008. Investigation of chicken intestinal bacterial communities by 16S rRNA targeted fluorescence in situ hybridization. *Antonie van Leeuwenhoek* 94:423-437.

Omwandho C. and Kubota T., 2010. *Salmonella enterica* serovar *Enteritidis*: a Mini-review of Contamination Routes and Limitations to Effective Control. *JARQ* 44, 7-16.

Onwurah F.B., Amaefule K.B., Ahamefule F.O., 2013. Effect of Baker's Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Inclusion in Feed and in Drinking Water on Performance of Broiler Birds. *British Journal of Applied Science & Technology* 4(1): 144-151.

Oviedo-Rondon, E. 2009. Molecular methods to evaluate effects of feed additives and nutrients in poultry gut microflora. *Revista Brasileira de Zootecnia* 38:209-225.

Parker RB., 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim Nutr Health* 29:4-8.

Perry G. C., 2006. Avian gut function in health and disease, CABI Publishing.

Phillips, M. L., 2009. Gut reaction: environmental effects on the microbiota. *Environ Health Perspect* 117.

Rehman H., Vahjen W., Awad W. and Zentek J., 2007 b. Indigenous bacteria and bacterial metabolic products in the gastrointestinal tract of broiler chickens. *Arch Anim Nutr* 61:319-35

Revolledo L., Ferreira A.J.P. and Mead G.C., 2006. Prospects in *Salmonella* control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. J. Appl. Poult. Res., 15, 341–351.

Rodriguez, A., P. Pangloli, H. A. Richards, J. R. Mount, and F. A. Draughon, 2006. Prevalence of *Salmonella* in diverse environmental farm samples. J. Food Prot. 69:2576–2580.

Salim, .M., Kang H.K., Akter N., Kim D.W., Kim J.H., Kim M.J., Na J.C., Jong H.B., Choi H.C., Suh O.S. and Kim W.K., 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(8): 2084-2090.

Sanders M.E., 2003. Probiotics: considerations for human health. Nutr Rev 61:91–9.

Soni V., 2007. Genetic approach to understanding the behavior of *Salmonella* in meat and poultry.

Somyanontanagul N., 2009. Comparison between detecting *Salmonella spp.* by bacteriological method and Real-Time PCR assay in samples from pig herds.

Stabler JG, McCormick TW, Powell KC, Kogut MH, 1994. Avian heterophils and monocytes: phagocytic and bactericidal activities against *Salmonella enteritidis*. Vet Microbiol.38:293–305.

Stanley D., Hughes R.J., Moore R.J., 2014. Microbiota of the chicken gastrointestinal tract: influence on health, productivity and disease. Appl. Microbiol. Biotechnol. 98:4301–4310

Stanley D., Denman S.E., Hughes R.J., Geier M.S., Crowley T.M. *et al.*,2012. Intestinal microbiota associated with differential feed conversion efficiency in chickens. Appl Microbiol Biotechnol 96: 1361–1369.

Sun H., Tang J.W., Fang C.L., Yao X.H., Wu H.F., Wang H., Feng H., 2013. Molecular analysis of intestinal bacterial microbiota of broiler chickens fed diets containing fermented cottonseed meal.

Tanikawa T., Shoji N., Sonohara N., Saito S., Shimura Y., Fukushima J. and Inamoto T., 2011. Aging transition of the bacterial community structure in the chick ceca. Poultry Science 90:1004.

Torok VA., Hughes R.J., Mikkelsen L.L., Perez-Maldonado R., Balding K., MacAlpine R., Percy N.J., Ophel-Keller K., 2011b. Identification and characterization

of potential performance-related gut microbiotas in broiler chickens across various feeding trials. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 5868–5878.

Torok V., Ophel-Keller K., Loo M., Hughes R., 2008. Application of methods for identifying broiler chicken gut bacterial species linked with increased energy metabolism. *Applied and Environmental Microbiology* 74:783.

Uzzau S, Brown DJ, Wallis T, Rubino S, Leori G, Bernard S, *et al.*, 2000. Host adapted serotypes of *Salmonella enterica*. *Epidemiol Infect*;125:229–55.

Van den Abbeele P. *et al.*, 2010. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and *Clostridium* cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:5237–5246.

van der Hoeven-Hangoor E, van der Vossen JM, Schuren FH, Verstegen MW, de Oliveira JE, Montijn RC, Hendriks WH, 2013. Ileal microbiota composition of broilers fed various commercial diet compositions. *Poult Sci* 92:2713–2723

Van der Wielen P., Biesterveld S., Notermans S., Hofstra H., Urlings B. and van Knapen F., 2000. Role of Volatile Fatty Acids in Development of the Cecal Microflora in Broiler Chickens during Growth. *Applied and Environmental Microbiology* 66:2536-2540.

Vandeplass S., Dubois Dauphin R, Thiry C., Beckers Y., Welling G. W., Thonart P., Théwis A., 2009. Efficiency of a *Lactobacillus plantarum*-xylanase combination on growth performances, microflora populations, and nutrient digestibilities of broilers infected with *Salmonella Typhimurium*. *Poult. Sci.* 88:1643–1654.

Van Heugten E., Funderburke D.W., Dorton K.L., 2003. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.*; 81:1004–1012

Van Immerseel F., Meulemans G., De Buck J., Pasmans F., Celge P., Bottreau E., Haesebrouck F., Ducatelle R., 2004. Bacteria host interactions of *Salmonella Paratyphi B dT+* in poultry. *Epidemiol. Infect.* 132, 239–243.

Vicente J.L., Torres-Rodriguez A., Higgins S., Pixley C., Tellez G., Donoghue A.M. and Hargis B.M., 2008. Effect of a selected *Lactobacillus spp.*-based probiotic on *Salmonella Enteritidis* infected broiler chicks. *Avian Dis.* 52:143–146

Vila B., Fontgibell A., Badiola I., Esteve-Garcia E., Jimenez G., Castillo M., Brufau, J., 2009. Reduction of *Salmonella enterica* var. *enteritidis* colonization and invasion by *Bacillus cereus* var. *toyoi* inclusion in poultry feeds. *Poultry Science*, 88(5), 975–979.

White L.A., Newman M.C., Cromwell G.L., Lindemann M.D., 2002. Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *J. Anim. Sci.*; 80:2619–2628.

Wise M.G. and Siragusa G.R., 2007. Quantitative analysis of the intestinal bacterial community in one- to three-week-old commercially reared broiler chickens fed conventional or antibiotic-free vegetable-based diets. *J Appl Microbiol* 102:1138-49.

Wise M.G. and Siragusa G.R., 2005. Quantitative detection of *Clostridium perfringens* in the broiler fowl gastrointestinal tract by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 71:3911.

Zhang Z.F., Kim I.H., 2014. Effects of multistrain probiotics on growth performance, apparent ileal nutrient digestibility, blood characteristics, cecal microbial shedding, and excreta odor contents in broilers *Poultry Science* 93 :364–370.

Zhou H., Gong J., Brisbin J., Yu H., Sanei B., Sabour P. and Sharif S., 2007. Appropriate chicken sample size for identifying the composition of broiler intestinal microbiota affected by dietary antibiotics, using the polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis technique. *Poultry science* 86:2541.

Zhu X.Y., Zhong T., Pandya Y., Joerger R.D., 2002. 16S rRNA-based analysis of microbiota from the cecum of broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:124–137

Zhu, X. and R. Joerger, 2003. Composition of microbiota in content and mucus from cecae of broiler chickens as measured by fluorescent in situ hybridization with group-specific, 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Poultry science* 82:1242.

Ziprin, R., R. Beier, S. Pillai and T. Phillips (2004). *Preharvest and Postharvest Food Safety: Contemporary Issues and Future Directions*.

Παλαμίδα Ι., 2011. Μελέτη της επίδρασης των προβιοτικών επί της σύστασης της εντερικής μικροχλωρίδας ορνιθίων κρεοπαραγωγής. Μεταπτυχιακή μελέτη.