

Diss. ETH No. 11897

**Effects of Mannanoligosaccharide on Different  
Cecal Parameters and on Cecal Concentrations of  
Enteric Pathogens in Poultry**

A dissertation submitted to the  
**SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH**  
for the degree of  
**Doctor in Technical Sciences**

presented by  
**PETER SPRING**  
**Dipl. Ing.-Agr. ETH**  
born January 25, 1965  
citizen of Schüpfen/BE

accepted on the recommendation of  
**Prof. C. Wenk, examiner**  
**Dr. K. E. Newman, co-examiner**  
**Prof. K. A. Dawson, co-examiner**

Zurich, 1996

## ABSTRACT

The ability of different enteric pathogens and coliforms to trigger agglutination of a yeast cell wall preparation (MOS), a yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*, NYCC 1026) and haemagglutination was studied. Three strains which agglutinated MOS (*Salmonella typhimurium* 29E, *Salmonella dublin* and *Escherichia coli* 15R) and one non-agglutinating strain (*S. typhimurium* 27A) were then selected as challenge organisms. The effects of dietary MOS on cecal concentrations of these challenge organisms and on activities and concentrations of the cecal microflora were evaluated in chicks under controlled conditions. Furthermore, the effects of MOS on ileal morphology were investigated.

Five of seven strains of *E. coli* and seven of ten strains of *S. typhimurium* and *Salmonella enteritidis* agglutinated MOS and *S. cerevisiae* NYCC 1026. Strains of *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella pullorum* and *Campylobacter* did not lead to agglutination. Agglutination of both yeast products could be inhibited by 25 mM of mannose. All strains that agglutinated the yeast products also triggered haemagglutination. However, haemagglutination of *E. coli* K99 could not be inhibited by mannose. Mannose sensitive agglutination of the yeast products and mannose resistant haemagglutination by *E. coli* K99 suggest that these strains express both a mannose sensitive (type-1) and a mannose resistant (K 99) type of fimbriae.

In a series of three trials in which 3 d old chicks were orally challenged with  $10^4$  CFU of *S. typhimurium* 29E, birds receiving 4000 ppm of dietary MOS had reduced cecal *S. typhimurium* 29E concentrations (5.40 vs. 4.01 log CFU/g;  $P < 0.05$ ) at d 10. In a second series of three trials with *S. dublin* as challenge organism the number of birds that tested salmonella positive in the ceca at d 10 was lower when MOS was part of the diet (90 % vs. 56 %;  $P < 0.05$ ). Mannanoligosaccharide also reduced the number of birds from which the challenge organism *E. coli* 15R could be recovered (75 % vs. 15 %). In order to test the effect of MOS on concentrations of bacteria that do no express type-1 fimbriae, a challenge trial was conducted with *S. typhimurium* 27A. However, strain 27A did not colonize the birds sufficiently to evaluate if MOS affected its

cecal concentration. Mannanoligosaccharide showed a tendency to reduce the concentrations of cecal coliforms in both series of trials with *S. typhimurium* 29E and *S. dublin*. The statistical analyses combining data from all experiments showed a significant reduction in cecal coliforms (8.80 vs. 8.54 log CFU/g; P < 0.05). Mannanoligosaccharide had no effect on cecal concentrations of lactobacilli, enterococci, anaerobic bacteria, lactate, VFA or on cecal pH.

Dietary mannanoligosaccharide led to changes in ileal morphology. Average villi length was increased by 18% (P < 0.05) and crypt depth was increased by 22 % (P < 0.05) with dietary MOS. Villi width and number of goblet cells were not affected by treatment.

## ZUSAMMENFASSUNG

Verschiedene enteropathogene und koliforme Bakterien wurden auf ihre Fähigkeit untersucht, ein Hefezellwandpräparat (MOS) und eine Hefekultur (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC 1026) zu agglutinieren und Haemagglutination zu verursachen. Drei agglutinierende Stämme (*Salmonella typhimurium* 29E, *Salmonella dublin* und *Escherichia coli* 15R) und ein nicht-agglutinierender Stamm (*S. typhimurium* 27A) wurden zur weiteren Untersuchung in Tierversuchen ausgewählt. Unter kontrollierten Umweltbedingungen wurde dann die Wirkung von MOS auf die Konzentration dieser Organismen, sowie auf die Aktivität und Konzentration der Dickdarmflora in Küken untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss von MOS auf die ileale Morphometrie getestet.

Fünf von sieben *E. coli* Stämmen und sieben von zehn *S. typhimurium* und *Salmonella enteritidis* Stämmen agglutinierten MOS und *S. cerevisiae* 1026. *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella pullorum* und *Campylobacter* Stämme agglutinierten die Hefeprodukte nicht. Agglutination beider Hefeprodukte konnte mit 25 mM Mannose blockiert werden. Alle Bakterienstämme die Hefeprodukte agglutinierten, führten auch zu Haemagglutination. Im Gegensatz zu Agglutination der Hefeprodukte konnte Haemagglutination von *E. coli* K99 aber nicht mit Mannose blockiert werden. Mannosesensitive Agglutination von Hefeprodukten und mannoseresistente Haemagglutination von *E. coli* K99 deuten darauf hin, dass diese Stämme sowohl mannosensitive (Typ-1) als auch mannoseresistente K99 Fimbrien exprimieren.

In einer ersten Versuchsreihe, in welcher 3-tägigen Küken  $10^4$  KBE *S. typhimurium* 29E verabreicht wurden, verminderte MOS Supplementierung (4'000 ppm) die Konzentration von *S. typhimurium* 29E im Blinddarm (5,40 vs. 4,01 log KBE/g;  $P < 0,05$ ) am zehnten Lebenstag. In einer zweiten Reihe mit *S. dublin* Verabreichung reduzierte der MOS-Zusatz den Anteil der Küken, von welchen der verabreichte Salmonellenstamm isoliert werden konnte (90 % vs. 56 %;  $P < 0,05$ ). Zusätzlich reduzierte MOS den prozentualen Anteil der Küken, aus deren Verdauungstrakt *E. coli* 15R kultiviert werden konnte (75 % vs.

15 %). In einem nächsten Versuch wurde der Einfluss von MOS auf die Blinddarmkonzentration eines Bakterienstammes, der keine Typ-1 Fimbrien exprimiert (*S. typhimurium* 27A), untersucht. Stamm 27A kolonisierte die Küken aber nur ungenügend, wodurch eine Aussage über die Wirkung von MOS auf dessen Konzentration unmöglich war. Der Zusatz von Mannanoligosaccharid führte in beiden Versuchsreihen mit *S. typhimurium* 29E und *S. dublin* zu leicht niedrigeren Konzentrationen der koliformen Keime. Die statistische Auswertung über alle Experimente ergab signifikant tiefere Koliformkonzentrationen mit MOS Zusatz (8,80 vs. 8,54 KBE/g; P < 0,05). Supplementierung mit MOS hatte keinen Einfluss auf die Konzentration der Laktobazillen, Enterokokken, anaeroben Keime sowie auf Laktat- und flüchtige Fettsäurenkonzentrationen und Dickdarm pH.

Zusatz von MOS führte zu Veränderungen in der ilealen Morphometrie. Darmzotten waren 18 % höher (P < 0,05) und Darmkrypten waren 22 % tiefer (P < 0,05) mit MOS Zusatz. Darmzottenbreite und Anzahl der Becherzellen wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst.

## RÉSUMÉ

Cette étude montre la capacité des différentes bactéries entérique pathogènes et coliforme de provoquer l'agglutination d'une préparation de parois cellulaires de levures (MOS: mannan-oligosaccharides), d'une culture de levures (*Saccharomyces cerevisiae* NYCC 1026) et de provoquer une hémagglutination. Trois souches qui agglutinent le MOS (*Salmonella typhimurium* 29E, *Salmonella dublin* and *Escherichia coli* 15R) et une souches non-agglutinante (*S. typhimurium* 27A) sont ensuite sélectionnées comme micro-organismes infectants. L'effet du MOS dans la ration sur les concentrations caecaes de ces micro-organismes et sur l'activité et les concentrations de la microflore caecale est évalué sur des poussins dans des conditions contrôlées. Les effets du MOS sur la morphologie de l'iléon sont également étudiés.

Cinq de sept souches d'*E. coli* ainsi que sept de dix souches de *S. typhimurium* et *Salmonella enteritidis* agglutinent les MOS et *S. cerevisiae* NYCC 1026. Les souches de *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella pullorum* et *Campylobacter* n'ont pas contre montré aucune agglutination. L'agglutination des deux produits de levures peut être inhibée par une solution de mannose (25 mM). Toutes les souches qui agglutinent les produits de levures provoquent aussi une hémagglutination. Cependant l'hémagglutination d'*E. coli* soit inhibée par le mannose et que l'hémagglutination de ces même bactéries soit résistante au mannose suggère que ces souches possède deux types de cils: un type sensible au mannose (type-1) et un type résistant au mannose (K99).

Dans une série de trois essais, des poussins de trois jours sont infectés par voie orale avec  $10^4$  CFU de *S. typhimurium* 29E. Les poussins reçoivent 4'000 ppm de MOS dans leur ration ont des concentrations caecaes de *S. typhimurium* 29E réduites (4,01 par rapport à 5,40 log CFU/g; P < 0,05) à l'âge de 10 jours. Dans une seconde série de trois essais avec *S. dublin* comme agent infectant, le nombre de poussins contaminés par la salmonelles dans le caecum, à l'âge de 10 jours, est moins élevé lorsque le MOS est inclus dans la ration (90 % par rapport à 56 %; P < 0,05). Le mannan-oligosaccharide réduit également le nombre de poussin contaminés par *E. coli* 15R après infection

expérimentale (75 % par rapport à 15 %). Afin de tester l'effet du MOS sur les concentrations de bactéries ne possédant pas des cils de Type-1, un essai est conduit avec *S. typhimurium* 27A. Mais cette souches n'a pas suffisamment colonisé les poussins pour pouvoir déterminer si le MOS affecte les concentrations caecaless en *S. typhimurium* 27A. L'utilisation du MOS tend à réduire les concentrations de coliformes caecaux dans les deux séries d'essais avec *S. typhimurium* 29E et *S. dublin*. L'analyse statistique combinant tous les essais montre une réduction significative du nombre de coliformes caecaux (8,54 par rapport à 8,80 log CFU/g; P < 0,05). Le mannan-oligosaccharide n'a aucun effet sur les concentrations caecaless en lactobacilles, entérocoques, bactéries anaérobies, le lactate, le AGV et le pH ceacal.

Le mannan-oligosaccharide induit des changements de morphologie de l'iléon. La longueur moyenne des villosités est augmentée de 18% (P < 0,05) et la profondeur des cryptes de 22 % (P < 0,05) chez les poussins recevant le MOS dans leur ration. La largeur des villosités et le nombre de cellules caliciformes ne sont pas modifiés par le traitement MOS.