تاثير استخدام المعزز الحيوي المحضر من جراثيم *Lactobacillus acidophilus* كمحفز مناعي في الحملان الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1*

عفاف عبد الرحمن يوسف واسعد جاسم عبد العمري

فرع الطب الباطني والوقائي البيطري- كلية الطب البيطري-جامعة بغداد –بغداد –العراق

تاريخ التسليم 24/08/2008
تاريخ القبول 11/11/2008

الخلاصة

صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثير المعزز الحيوي المحضر من جراثيم *Lactobacillus acidophilus* واستخدامها كمحفز مناعي لرفع الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية في الحملان الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1.

عزلت جراثيم العصيات اللبنية من جنس *Lactobacillus* من محتويات أمعاء الأغنام بعد الزرع على الوسط الخاص والتعرف على الصفات الزرعية والشكلية والصفات الكيموحيوية واختيرت عزلة من نوع *Lactobacillus acidophilus* استخدامها كمعزز حيوي اعتمادا على قابلية التصاقها العالية بالخلايا الطلائية لأمعاء الأغنام ومقاومتها للاس الهيدروجيني الواطئ وقابليتها على تحمل املاح الصفراء ،و اجري اختبار حساسية الجرثومة المعزولة للمضادات الحياتية ،ثم تضمنت التجربة استخدام 15 حملاً بأعمار مابين (5-8 شهور)،قسمت بالتساوي الى ثلاثة مجاميع تمت معاملتهم كما يأتي :

المجموعة الاولى:-(مجموعة اللقاح+المعزز الحيوي) حقنت بلقاح الحمى المالطيةRev-1 وبجرعة 1مل يحتوي 10^9CFU× 2 تحت الجلد مع اعطائها معززاً حيوياً محضر الحاوي على الجرثومة المحضرة بجرعة 10^9 CFU× 2 عن طريق الفم يومياً قبل اسبوع من اعطاء اللقاح واستمر حتى نهاية التجربة (14 اسبوع). **المجموعة الثانية:- (مجموعةاللقاح فقط)حقنت الحملان بلقاح الحمى المالطيةRev-1 فقط وبنفس الطريقة .المجموعة الثالثة(السيطرة):-حقنت 1 مل PBS تحت الجلد كمجموعة سيطرة.

اجريت الفحوصات السريرية والمناعية على الحملان قبل بدء التجربة وبعد 2و6 و10و14 اسبوع ، أظهرت الفحوصات السريرية ارتفاعاً في معدلات درجات الحرارة وفي معدلات ترداد التنفس والنبض في المجاميع الملقحة ولكن المجموعة الثانية سجلت اعلى المعدلات .ولم يطرأ أي تغيير على مجموعة السيطرة

اظهرت الحملان استجابة مناعية خلطية في المجاميع الملقحة حيث أعطى فحص الروزبنكال(RBT) نتائج موجبة، اما بأستخدام فحص التلازن الدموي المنفعل (PHA)فقد سجلت المجموعة الاولى اعلى مستوى معيار حجمي للأجسام المضادة ما بين 125.413 ± 716.80 مقارنة بالمجموعة الثانية وبفارق معنوي $P<0.05$. وقد اظهرت النتائج استجابة مناعية خلوية ففي اختبار فحص الحساسية الجلدي المتأخر(DTH test) كانت النتائج موجبة تضمنت الزيادة في قطر منطقة الاحمرار وفرق سمك الجلد حيث امتازت المجموعة الاولى بفارق اكبرمما في المجموعة الثانية ($P<0.05$) اما اختبار تشكل الزهرة E-rossete فقد اظهرت المجموعة الاولى ارتفاعاً بنسبة الخلايا اللمفاوية الفعالة حيث بلغت 4.6198± 51.976 وبفارق معنوي ($P<0.05$) عن المجموعة الثانية ونسبتها 3.6865 ± 41.22.وقد لوحظ زيادة في تركيز بروتين مصل الدم الكلي (Total serum protein)فكانت الزيادة اكبر في المجموعة الاولى حيث بلغ معدلها 0.2615 ± 9.7358عما في المجموعة الثانية ولم تظهر مجموعة السيطرة أي تغيير في جميع الاختبارات.

* البحث جزء من رسالة ماجستير للباحث الثاني

Effect of uses of Probiotic prepared from *Lactobacillus acidophilus* Bacteria as immunostimulator in lambs vaccinated with *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine

Yousif. A.A. and Al umary. A. J. A.
Dept. of internal and preventive Vet. Med.-college of Vet. Med.-Baghdad University –Baghdad - Iraq

Summary

This study was conducted to investigate the effect of probiotic prepared from *Lactobacillus acidophilus* & used as immunostimulator to improve the humeral &cellular immune response in lambs vaccinated with the Rev-1 vaccine. *Lactobacillus* isolated from intestinal contents of sheep after culturing on specific media &study the morphological & biochemical characteristic *Lactobacillus acidophilus* was selected as probiotic after definitive diagnosis and depending on their higher adherence ability to epithelial cells of the intestine and have high tolerance to low pH and bile salts .then sensitivity test of the strain against antibiotics was done The experimental study included 15 lambs (age 5-8 months) were equally divided into three groups and treated as following.

* First group was vaccinated with Rev -1 vaccine (1ml contain 2×10^9CFU- s/c as single dose) and ioculated orally with prepared probiotic (2×10^9 CFU /lamb) at one week before vaccination and continued daily to end of experiment(14 weeks).

*Second group was vaccinated only with Rev -1 vaccine at same way in first group. *Third group was inoculated with 1 ml PBS S\c as control group. Clinical and immunological tests were conducted to all lambs at 0 times & after 2, 6, 10, 14 weeks. The results of clinical tests revealed that there is increase in body temperature, respiratory &pulse rates of vaccinated animals only but the second group show the highest parameters. The vaccinated lambs shows humeral immune response by giving a positive results to rose Bengal test & by using Passive haemagglutination test, the first group revealed high significant antibody titer (716.80±125.413) than the second group and third group ($p<0.05$) . and the results of cellular immune response, as detected by delayed type hypersensitivity test which give a positive results in vaccinated groups but the first group was significantly higher ($p<0.05$)at than rates in redness area and thickness compared with the second group E. rosette test showed significant increase at($p<0.05$) of activated lymphocyte in first group (51.976±4.619)compared with second (41.22±3.6865). Serum total protein concentration was increased in first group (9.7358±0.2615) compared with other groups.

المقدمة

المعززات الحيوية (Probiotics) وهي عبارة عن الجراثيم التي توجد بصورة متعايشة وبشكل واسع في الانسان والحيوان كنبيت طبيعي (Normal flora)(1) والتي تعد احدى عوامل العلاج البايولوجي (biotherapeutic) والتي استعملت لتحسين صحة الانسان والحيوان ، وعلى حماية المضيف من الاصابات المعوية ، وتقلل من حالات الامساك ، ولها تاثير مضاد لنمو الاورام السرطانية ، وتعمل على تقليل نسبة الكوليسترول بالمصل ، وكذلك تعمل كمحفزات مناعية ، وهذا العمل يتم عن طريق الفعل التضادي المباشر لانواع خاصة من الجراثيم من خلال زيادة اعداد الجراثيم المفيدة الطبيعية وبوساطة تاثيرها عن طريق انتاجها المواد الايضية القاتلة للجراثيم الاخرى او تحفيزها للاستجابة المناعية (3,2) .

تعد جراثيم العصيات اللبنية من اهم المعززات الحيوية وذلك لما تمتلكه من صفات وخواص في إظهار تأثيراتها المفيدة داخل القناة الهضمية ضد الجراثيم المرضية، وقابليتها للالتصاق بالخلايا الطلائية المبطنة للقناة الهضمية . وكذلك تحفيزها للجهاز المناعي من خلال تحفيز المناعة الخلطية والخلوية على حد سواء (6,5,4) وزيادة فعالية الانزيمات المسؤولة عن امتصاص المواد الغذائية والمعادن الضرورية (7) .

ولأهمية مرض البروسيلا الاقتصادية والصحية استخدمت العديد من الدول برامج للسيطرة عليه في الحيوانات ومنها برنامج التلقيح ,وقد استخدمت أنواع مختلفة من اللقاحات في بلدان العالم لتمنيع الأغنام ضد المرض ومنها لقاح *Brucella melitensis* strain Rev-1 ، ولزيادة المناعة المتكونة في هذه الحيوانات فقد وجد ان استخدام المحفزات المناعية مع اللقاحات لها دور كبير في زيادة الاستجابة المناعية واعطاء المضيف القدرة على مقاومة الإصابة بالجراثيم لما لها من خواص مناعية(8).

ولعدم وجود دراسة او بحث حول استعمال المعززات الحيوية كمحفزات مناعية مع لقاح Rev-1 ، لذا صممت هذه الدراسة والتي من أهم أهدافها :-- دراسة تأثير إعطاء المعززات الحيوية المعزولة من أمعاء الأغنام على الاستجابة المناعية في الحملان الممنعة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1 .

المواد وطرائق العمل

1 - اللقاح:-استخدم لقاح *Brucella melitensis* strain Rev-1 والمنتج من شركة CZ Veterinaria,Spain. الاسبانية تم الحصول علية من الشركة العامة للبيطرة.

2- **تحضير مستضد البر وسيلا (Brucella antigen):-**حضر المستضد حسب طريقة (9)، واستخدم في الاختبار الجلدي وفي اختبار فحص التلازن الدمى المنفعل (الغير مباشر) (P H T).

3- المعزز الحيوي المحضر في المختبر من جراثيم العصيات اللبنية المحبة للحموضة *Lactobacillus acidophilus* وبالطريقة التالية:-

تم عزل جراثيم العصيات اللبنية حسب طريقة (10) وذلك بأخذ وبصورة معقمة غرام واحد من محتويات ألامعاء الدقيقة الأغنام ووضعت في قناني قياسية (Universal tubes) تحتوي على 9 مل من ماء الببتون المعقم ، ثم مزجت هذه المحتويات مدة نصف دقيقة ، ثم حضرت مخففات منها لغاية التخفيف 10^{10}من مرق MRSثم حضنت لاهوائياً وبدرجة حرارة 37مْ لمدة 48ساعة ثم نقلت قطرات من هذه المخففات إلى أطباق حاوية على وسط MRSالصلب وحضنت بنفس الطريقة السابقة ، وبعد نمو الجراثيم تم عمل مسحات جرثومية وصبغها بصبغة كرام Gram stainولتأكيد التشخيص تم إجراء الفحوصات الكيموحيوية.

أ -**الاختبارات الخاصة بجرثومة *Lactobacillus***

1-اجراء اختبار الكاتليز (11).

2-النمو في القعر لوسط MRSالسائل:- اجري الاختبار حسب طريقة (12).

3- اختبار النمو على وسط الاكار المغذي هوائيا(Growth on nutrient agar): - اجري هذا اختبارحسب طريقة (13)

ب -الاختبارات الخاصة بجرثومة *Lactobacillus acidophilus*

1- اختبار النمو بدرجة حرارة 45م ْ :-اجري هذا اختبار حسب طريقة (14).

2- اختبار النمو بدرجة حرارة 15مْ اجري هذا الاختبار حسب طريقة(14).

3 -اختبار انتاج الحموضة والخثرة في وسط حليب اللتموس (Acid and Cured production test)اجري الاختبار حسب طريقة (11).

4 - اختبار النمو بتراكيز مختلفة من كلوريد الصوديوم :- اجري حسب طريقة (15) % (5.5, 4.5, 3.5)

5-اختبار تخمر السكريات Carbohydrates fermentation test

اجري هذا الاختبار لمعرفة انواع جراثيم *Lactobacillus* ، وقد استخدمت طريقة (16) في تحضير وسط التخمر ،

ج-الاختبارات الخاصة باختيار عزلات جراثيم *L. acidophilis* ذات الفعالية العالية

1- اختبار القابلية الالتصاقية لجراثيم العصية اللبنية المحبة للحموضة مع الخلايا الطلائية لأمعاء الأغنام (Adhesion to intestinal cell lines) :- اجري هذا اختبار بطريقة (17)

2 -اختبار قابلية جراثيم *L. acidophilis* على تحمل الاس الهيدروجيني الواطئ : Acid tolerance test (pH=3):- اجري حسب طريقة(18).

3-اختبار قابلية جراثيم حامض اللبنيك على مقاومة املاح الصفراء (Tolerance to bile salts test)

اجري الاختبار حسب طريقة (19).

د - اختبار حساسية جراثيم*L. acidophilis* للمضادات الجرثومية :-

اجري هذا الفحص حسب طريقة (20) لمعرفة حساسية جراثيم *L.acidophilis* للمضادات الجرثومية .

هـ - تحضير العالق الجرثومي

يتم تحضير العالق الجرثومي وعد الجراثيم من خلال استعمال انابيب ماكفيرليند (Macferlands tubes) كما اشار اليه في(11) لاستخدامها كمعزز حيوي وبجرعة 2× 10^9 خلية حية\ مل.

تصميم التجربة

أجريت الدراسة على الحملان حيث اختير15 حملا من الإناث والذكور بعمر 5-8 شهر، وغذيت هذه الحيوانات على الأعلاف الخضراء والأعلاف المركزة ، أجريت الفحوصات البكتيرية والطفيلية والمصلية عليها قبل البدء بالتجربة للتأكد من سلامتها من الأمراض. ثم قسمت إلى ثلاثة مجاميع متساوية .

المجموعة الأولى:- مجموعة(المعزز الحيوي المحضر +اللقاح) :-اعطيت المعزز الحيوي المحضر الحاوي على جراثيم*L. acidophilis* وبجرعة 2× 10^9خلية (CFU) حسب ما مذكور في(21) عن طريق الفم يومياً طيلة اسابيع الدراسة ثم لقحت الحيوانات بلقاح الحمى المالطية Rev-1 وبجرعة 1مل يحتوي على 2× 10^9CFU خلية حية تحت الجلد بعد اسبوع من اعطاء المعزز الحيوي .

المجموعة الثانية:- (مجموعة اللقاح) حقن بلقاح Rev-1 بجرعة 1 مل يحتوي على 2×10^9 خلية حية تحت الجلد.

المجموعة الثالثة -:مجموعة السيطرة تم حقنها (1مل) من المحلول الملحي الفسلجي (PBS) المعقم تحت الجلد.

اجريت الفحوصات والاختبارات المناعية وبالشكل التالي:-

1-الفحوصات السريرية:- تم فحص الحيوانات سريريا ويوميا لتثبيت المتغيرات في الشهية والتبرز والتبول وكذلك حساب معدلات درجة الحرارة والنبض والتنفس قبل اعطاء اللقاح وبعده ولمدة اسبوع ، واستمر بعد ذلك أسبوعيا

ثم جمعت عينات الدم من الوريد الو داجي بمقدار 10سم3 من الدم (للحصول على المصل) من كل حيوان قبل إعطاء اللقاح بأسبوع وبعد 2 ،6 ،10 ،14 أسبوعا طوال مدة الدارسة ، ووضع المصل في انابيب زجاجية وحفظ في درجة حرارة (-20م°) لحين اجراء الاختبارات المناعية وقياس **البروتين** الكلي . قيمت الاستجابة المناعية الخلطية باستخدام الفحوصات الاتية

2:- اختبار الروزبنكال (RBPT) : -اجري هذا الاختبار حسب طريقة (22).

ً3:- اختبار التلازن الدموي المنفعل (الغيرمباشر):-اجري هذا الاختبار حسب طريقة (23) .

اما اختبارات **المناعة الخلوية** فاهمها :-

4- اختبار الحساسية الجلدي المتأخر Delayed type hypersensitivity test(DTH) :-

اجري هذا الاختبار على الأغنام حسب طريقة (24) .

5- اختبار تشكل الزهرة E-Rosette :-اجري حسب الطريقة التي ذكرها (25).

قياس البروتين الكلي:-و للكشف عن البروتين الكلي في مصل الدم استعملت طريقة (26).

النتائج

نتائج الزرع الجرثومي وتوصيف الجراثيم :- تم الحصول على عزلات تعود الى جرثومة العصيات اللبنية *Lactobacillus* ,بعد اخذ النماذج من امعاء الاغنام ,وقد اظهرت النتائج ان عزلتين فقط تعود الى جراثيم *L.acidophilus* بعد التاكد من توصيفها وتشخيصها اعتمادا على الصفات الزرعية حيث تتميز الجراثيم بتكوين هالة شفافة حول المستعمرات اثناء النمو على وسط MRS الصلب الاوي على كاربونات الكالسيوم وكان شكل المستعمرات النامية محدبة ,دائرية وكريمية اللون ولوحظت الجراثيم عصوية موجبة لصبغة كرام ,ثنائية او مكونة سلاسل قصيرة , غير مكونة للابواغ .

كما اظهرت انواع جراثيم العصيات اللبنية نتائج مختلفة للاختبارات الكيميوحيوية وقد اعطت عزلتين (رقم 1,2)منها نتيجة موجبة للاختبارات الخاصة بجراثيم *L.acidophilus* .وكذلك اظهرت العزلتين قابليتها على تخمر السكريات المختلفة والخاصة بها يوضح نتائج التخمر (جدول 1).

أظهرت العزلتان نموها على وسط MRS الصلب عند خفض الأس الهيدروجيني الى 3 (pH:3) وأظهرت مقاومتهما لأملاح الصفراء

لوحظ من خلال الفحص المختبري لتحديد قابلية الزلات على الالتصاق بالخلايا الطلائية للأمعاء بان العزلة رقم (1) ذات قابلية عالية للالتصاق بجدار الامعاء(صورة رقم 1)اما العزلة رقم 2 فكانت قابليتها الالتصاقية ضعيفة (صورة 2) مقارنة بالعزلة الاولى.

اظهرت عزلة *L.acidophilus* رقم 1 حساسيتها لبعض الانواع من المضادات الحياتية ومقاومتها لانواع اخرى(جدول 2)

جدول (1):اهم الختبارات الكميوحيوية لجراثيم *L.acidophilus*

الاختبار	النتيجة	اختبارالسكريات	التخمر
النمو على الاكار المغذي هوائيا	-ve	كلوكوز	+ve
النمو بالقعر على وسط MRSالسائل	+ve	سكروز	+ve
النمو بدرجة حرارة **15**مْ	-ve	رايبوز	-ve
النمو بدرجة حرارة **45**مْ	+ve	مانتيول	-ve
النمو في 3.5 % NaCl	-ve	لاكتوز	+ve
النمو في 4.5 %NaCl	-ve		
النمو في 5.5 %NaCl	-ve		
حليب اللتموس	عدم حصول خثرة		
الكاتليز	-ve		

جدول (2):حساسية جراثيم *L.acidophilus* للمضادات الجرثومية

المضاد الحياتي	قطر منطقة التثبيطت إملم	النتيجة	المضاد الحياتي	قطر منطقة التثبيط إملم	النتيجة
Ampicillin	25	حساسة	Penicillin	40	حساسة
Amoxicillin	45	حساسة	Tetracylin	12	مقاومة
Chloramphenicol	47.5	حساسة	Trimethoprim	20	حساسة
Doxycyclin	25	حساسة	Ciprofloxacin	-	مقاومة
Erythomycin	10	مقاومة	Furaltidone	50	حساسة

نتائج الدراسة الحقلية

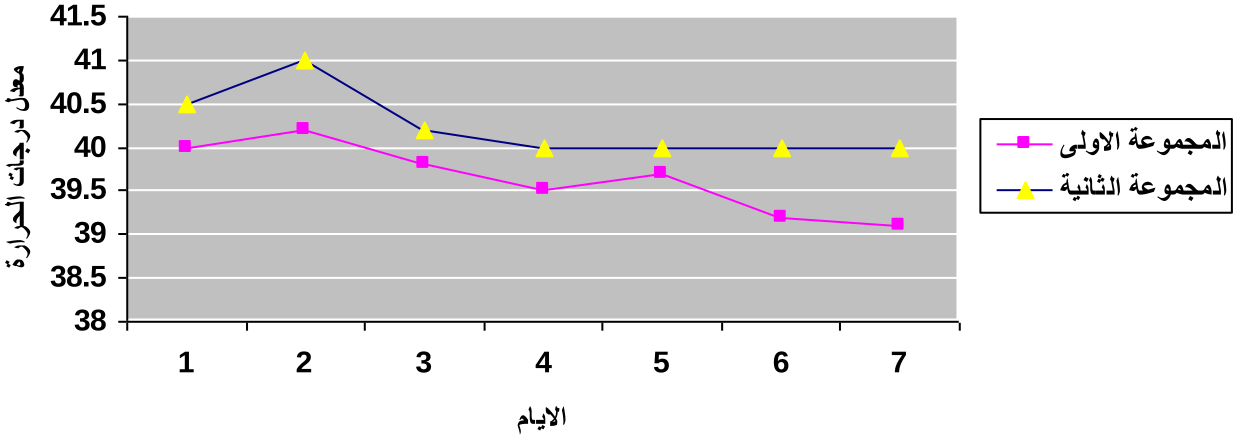
الفحوصات السريرية:-لم تظهر الحيوانات أي عرض مرضي قبل البدء بالتجربة إما بعد بدءالتجربة ، فقد أظهرت الحملان في المجموعة الاولى (اللقاح + المعزز الحيوي) والمجموعة الثانية(اللقاح فقط) ارتفاع في

درجة حرارة كنتيجة للتلقيح ، وكان اعلى معدل لها في اليوم الثاني بعد التلقيح حيث وصلت إلى 40.2 م° ، 40.8 م° اما المجموعة الثالثة (السيطرة) فقد بقيت درجات الحرارة بمعدلاتها الطبيعية ،(شكل1).

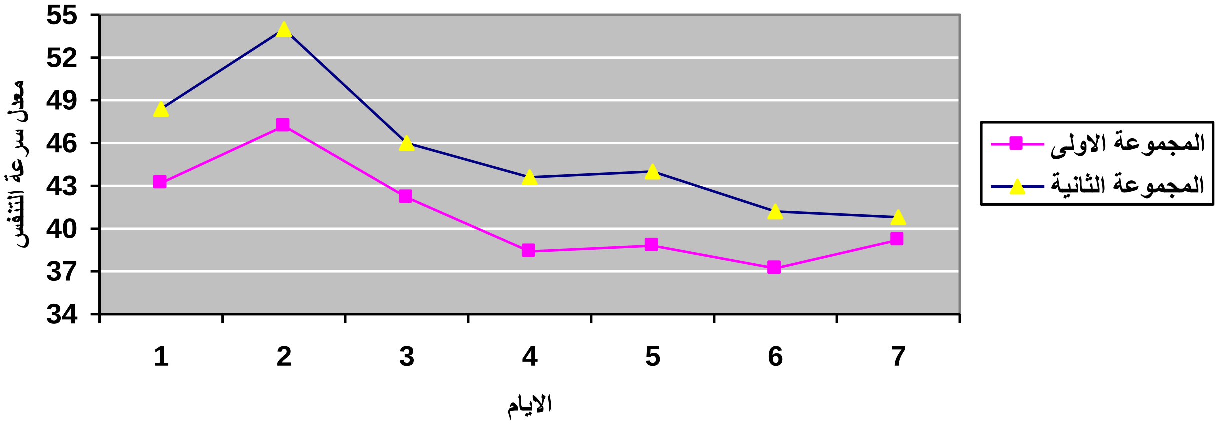
كذلك لوحظ زيادة بمعدلات ترداد التنفس بعد اعطاء اللقاح حيث كان اعلى معدل لترداد التنفس في المجموعة الثانية (54) مرة \دقيقة في اليوم الثاني مقارنة بالمجموعة الاولى ,في حين بقيت مجموعة السيطرة بمعدلاتها الطبيعية(شكل 2) ، وكان اعلى معدل للنبض في المجموعة الأولى والثانية بعد التلقيح 106.4 و119.6 نبضة \دقيقة مقارنة بمجموعة السيطرة والتي لم تظهر أي تغيير(شكل 3).

كما لوحظ علامات جهازيه على الحملان مثل قلة في الشهية وخمول خلال 72 ساعة بعد إعطاء اللقاح وخاصة في المجموعتين الاولى والثانية وكانت النتائج أعلى في المجموعة الثانية عما في المجموعة الاولى وعادت الى حالتها الطبيعية في اليوم الرابع من إعطاء اللقاح.

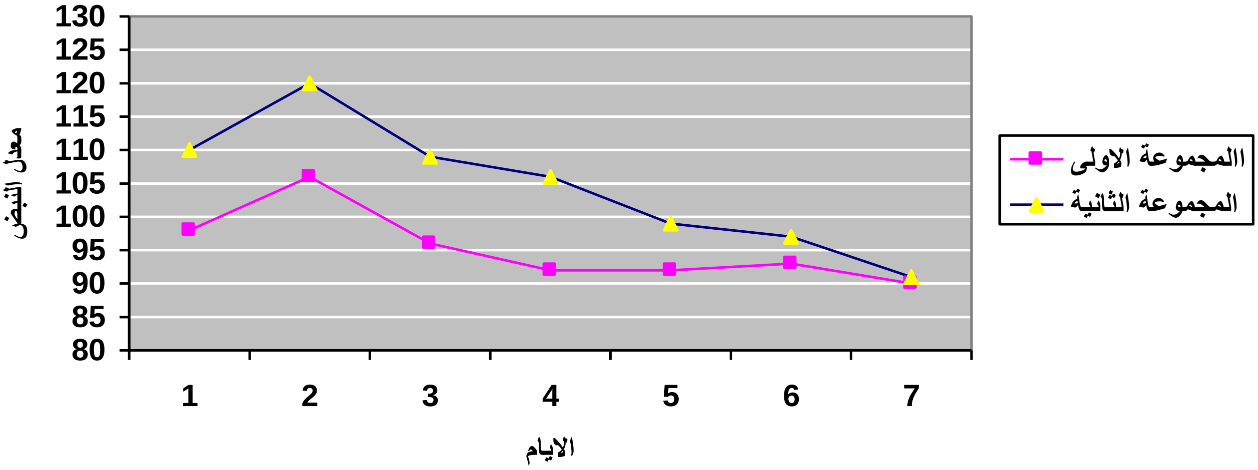
شكل (1): معدل درجات الحرارة في الحملان



شكل (2) :معدل ترداد التنفس في الحملان



شكل (3): معدل النبض في الحملان



الاختبارات المناعية

1-**اختبارالروزبنكال**:-اظهرت نتائج فحص الروزبنكال نتائج سالبة للجميع قبل بدء بالتجربة وبعد إعطاء اللقاح بأسبوعين أظهرت المجموعتين الاولى ، والثانية نتائج موجبة للاختبار ، أما مجموعة السيطرة فكانت سالبة للاختبار.

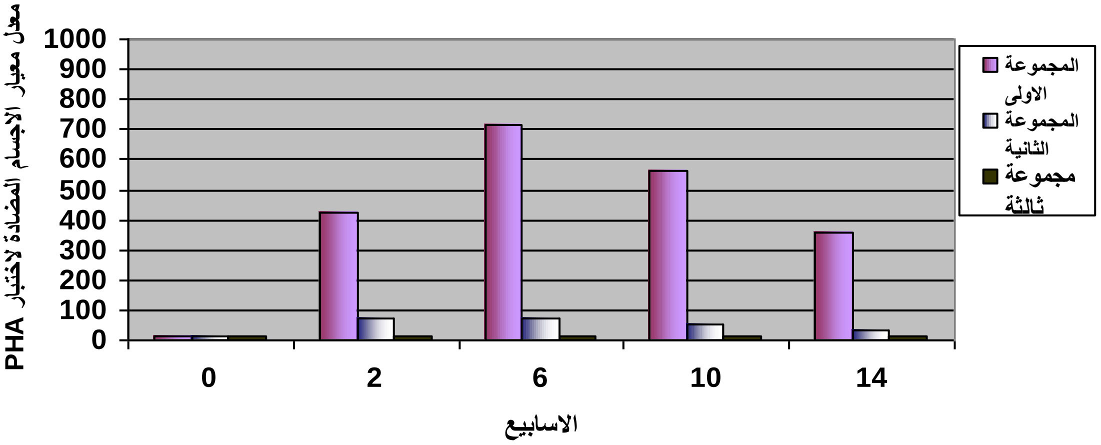
2-**اختبارالتلازن ألدموي المنفعل**:-أظهرت المجموعتين الاولى والثانية (مجموعة اللقاح والمعزز الحيوي) ارتفاع في مستوى الأجسام المضادة ولمختلف المدد الزمنية حيث سجل أعلى معيار للأجسام المضادة في المجموعة الثانية بعد 6 أسابيع(بمعدل 125.413 ± 716.80) أما المجموعة الثانية فقد سجلت أعلى معدل في المعيار ألحجمي للأجسام المضادة في الأسبوع السادس حيث وصل إلى 15.676 ± 70.4 . إحصائيا ظهر وجود فروقات معنوية بين المجموعة الأولى والثانية منذ بداية التجربة وحتى نهايتها تحت مستوى احتماليةP<0.05 حيث سجلت المجموعة الثانية أعلى معدل مقارنة بالمجموعة الأولى. (جدول 3, شكل 4).

جدول (3):معدل معيار الاجسام المضادة المقاسة باختبار التلازن الدموي للحملان الملقحة والمعاملة بالمعززات الحيوية

المجاميع / الاسابيع	المجموعة الاولى اللقاح+المعزز الحيوي	المجموعة الثانية اللقاح فقط	الثالثة السيطرة
	الخطأ القياسي+المعدل	الخطأ القياسي+المعدل	الخطأ اللقياسي+المعدل
0	-ve	-ve	-ve
2	a409.60±168.843	a 60.8±19.20	-ve
6	a716.80±125.413	B70.40±15.6767	-ve
10	a 563.2±125.41	b 54.4±19.984	-ve
14	a 358.40±62.706	b32±8.76	-ve

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروقات معنوية على مستوى P<0.05 .

شكل (4): معيار الاجسام المضادة مقاسة باختبار التلازن الدموي المنفعل



(

النسب المئوية للخلايا للمفاوية الفعالة نوع (T) في الحملان القاسة باختبار تشكل الزهرة

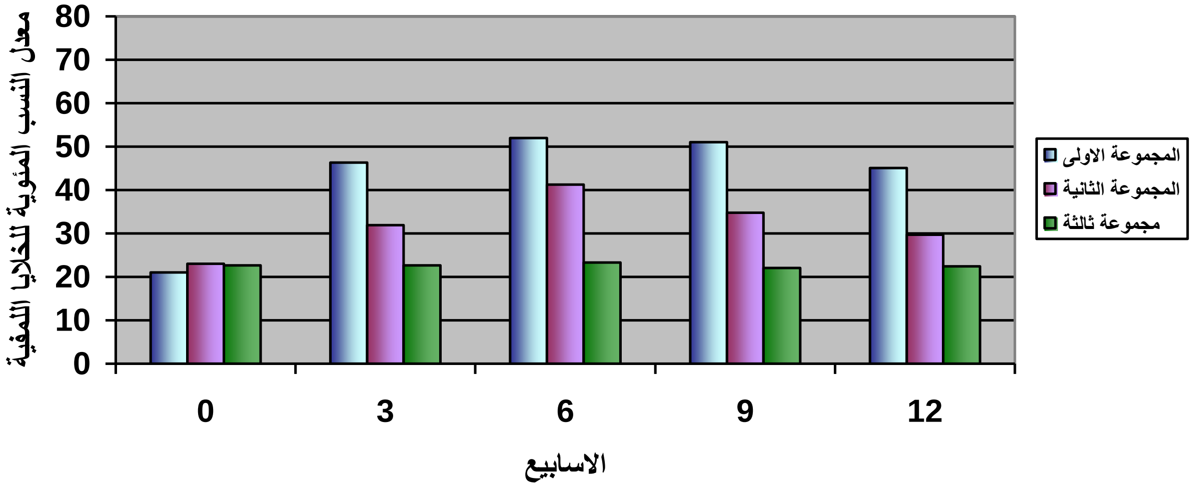
كانت معدلات نسبة الخلايا اللمفية الفعالة في المجاميع الاولى والثانية والسيطرة في بداية التجربة على التوالي (23.32)و (22.506) و (22.62) % ولم يلاحظ وجود فروقات معنوية بين المجاميع ، ويلاحظ ان الاختلافات المعنوية على مستوى المعنوية (P<0.05) اصبحت واضحة منذ الاسبوع الثالث نتيجة الزيادة الحاصلة في نسبة الخلايا اللمفية الفعالة في المجموعتين الاولى والثانية ولكن هذه الزيادة امتازت بها المجموعة الاولى منذ بداية التجربة وحتى نهايتها مقارنة بالمجموعة الثالثة والتي لم تظهر أي زيادة عن النسب الطبيعية طيلة فترة الدراسة. (شكل 5 وجدول 4) اما الصورة (صورة 3) فقد وضحت تجمع كريات الدم الحمراء خول الخلايا اللمفاوية الفعالة مكونة شكل الزهرة.

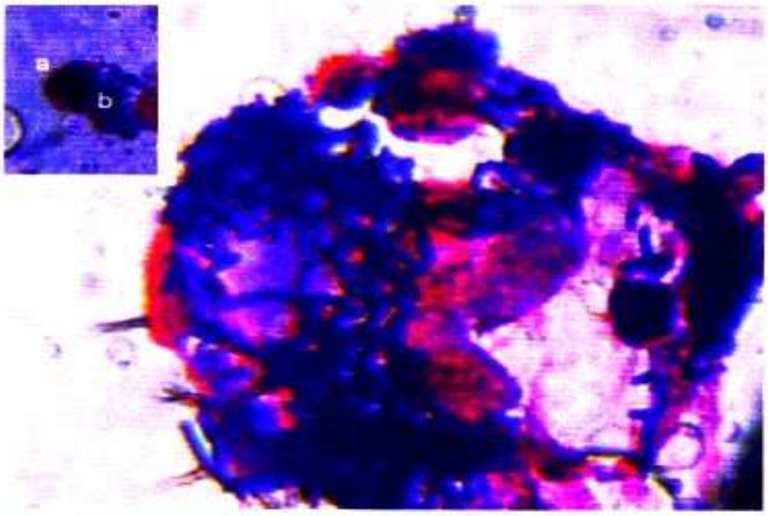
جدول (4): النسب المئوية للخلايا اللمفية الفعالة نوع (T) المكونة للشكل الزهري في الحملان

المجاميع / الاسابيع	الاولى (اللقاح+معزز حيوي)	الثانية (اللقاح فقط)	الثالثة (السيطرة)
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	23.32±0.9703a	22.506 ±1.2411a	22.62±1.0141a
3	46.360±2.698 b	31.90 ±2.2367a	22.62±1.0141a
6	51.976 ±4.6198b	41.220 ±3.6865a	23.32±0.9703c
9	51.0600±3.2459b	34.7800±2.2473a	22.06 ± 0.46c
12	45.0500 ±0.9386b	29.720 ±1.2278a	22.43 ± 0.40c

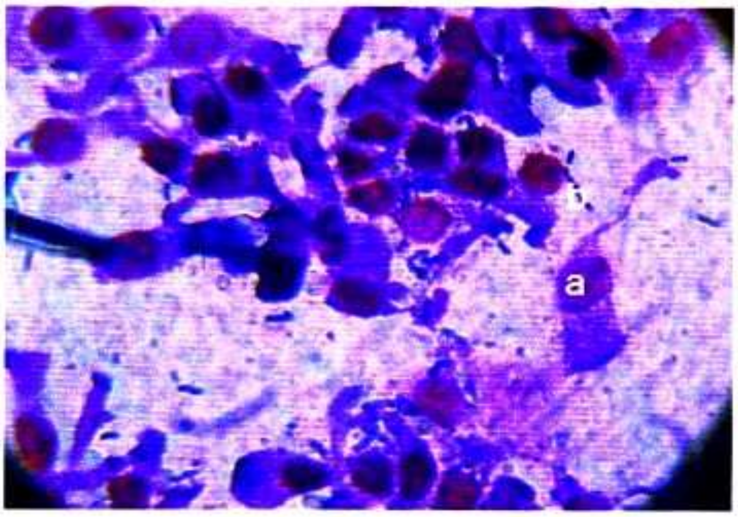
- الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير الى وجود فروقات معنوية على مستوى P<0.05 .

شكل (5): النسب المئوية للخلايا للمفاوية الفعالة في الحملان القاسة باختبار تشكل الزهرة

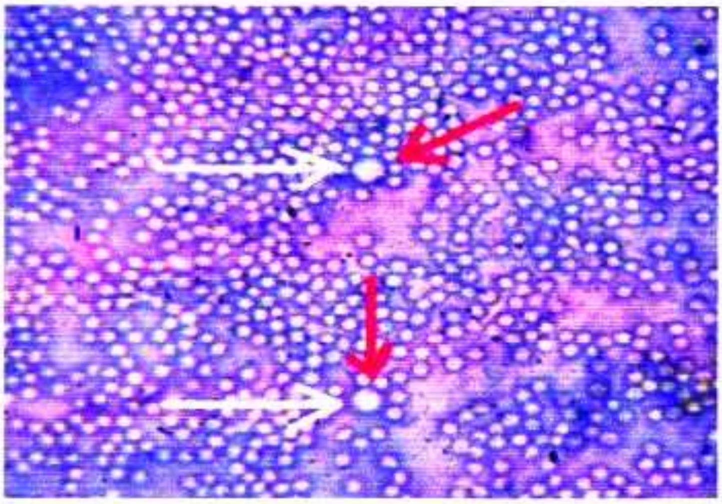




صورة (1) تظهر الالتصاقية العالية لجراثيم العصيات اللبنية عزلة رقم (1) مع الخلايا الظلائية لامعاء الاغنام ((a) خلية ظهارية (b) جراثيم العصيات اللبنية (صبغة كرام ×1000)



صورة (2) تظهر التصاقية ضعيفة للعزلة رقم(2) مع خلايا الظلائية لامعاء الاغنام (a) خلية ظهارية (b) جرثومة العصية اللبنية (صبغة كرام ×1000)



صورة (**3**) توضح تجمع كريات الدم الحمراء (سهم الاحمر)حول الخلايا اللمفاوية نوع T مكونة شكل الزهرة (سهم الابيض) (صبغة تريبان الزرقاء ×1000)

نتائج اختبار الحساسية الجلدي المتأخر في الحملان:-

أظهرت نتائج اختبار الحساسية الجلدي المتأخر في الحملان احمرار وتورم حول منطقة الحقن بمستضد البروسلين ومن خلال مراقبة التغيرات الحاصلة على الجلد ، وقياس سمك الجلد قبل وبعد الحقن حيث أظهرت النتائج وجود فروقات معنوية($P<0.05$) بين معدلات قطر الاحمرار وفرق سمك الجلد بين المجموعتين الاولى والثانية مقارنة مع المجموعة الاولى وقد أظهرت المجموعة الاولى اعلى المعدلات بعد 24 ساعة واستمرت الفروقات لحد 48 ساعة (جدول 4).

جدول (4) : نتائج اختبار الحساسية الجلدي المتأخر في الحملان

المجاميع	قطر منطقة الاحمرار (ملم)			فرق سمك الجلد (ملم)		
	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 72 ساعة	بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 72 ساعة
	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي	المعدل± الخطأ القياسي
الاولى(اللقاح+ المعزز الحيوي)	13.2±0.867	0.6±0.726	9.2±0.334	7.65±0.647	6.35±0.67	4.75±0.37
الثانية (اللقاح فقط)	8.4±0.920	6.4±0.536	4.2±0.521	4.75±0.235	2.9±0.195	2.1±0.054
مجموعة السيطرة	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve
PBS*	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve	-ve

*حقن محلول داريء الفوسفات الملحي المعقم بالجرعة نفسها اسفل منطقة حقن المستضد .

<u>بروتين مصل الدم الكلي:-</u> يوضح الجدول (جدول5) معدلات تركيز بروتين مصل الدم الكلي ضمن الاسابيع المختلفة خلال فترة الدراسة حيث بدات تراكيز البروتين بالارتفاع منذ الاسبوع الثاني وسجلت اعلى التراكيز في الاسبوع السادس وبدات بالانخفاض التريجي في الاسبوع العاشر في جيع الحملان وكن حملان المجموعة الاولى اعطت تراكيز اعلى من المجموعة الثانية ولم يطرا أي تغيير على مجموعة السيطرة .وقد أظهرت الفحوصات الإحصائية وجود فروقات ($P<0.05$) بين المجموعة الأولى والمجموعة الثانية من جهة كما امتازت المجموعة الاولى بتفوقها على المجموعة الثانية والسيطرة.

جدول (5) : نتائج قياس بروتينات مصل الدم الكلية(غم/ 100سم3)

المجاميع / الاسابيع	الاولى اللقـــاح +المعـــزز الحيوي	الثانية اللقاح فقط	الثالثة السيطرة
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	6.568±0.1326	6.3460±1014	6.14±0.05
2	8.7636±0.2844	7.5956±1.1588	6.64±0.05
6	9.7358±0.2615	8.1498±0.1194	6.568±0.132
10	9.5298±0.2120	7.564±0.1904	6.14±0.06
14	8.9406±0.3417	7.1748±0.1048	6.14±0.06

المناقشة

العزل الجرثومي

ان عزل جراثيم *Lactobacillus acidophilus* ولاول مرة من محتويات الامعاء واستعمالها كمحفزات مناعية في هذه الدراسة تعد الخطوة الاولى في استخدام المعززات الحيوية وتطويرها في المجترات .وذلك وان امكن استخدام سلالات جرثومية معزولة من مضائف اخرى ولكن لن تعطي النتائج المماثلة للجراثيم المعزولة من الاغنام لما تمتلكه هذه الجراثيم من خصوصية حيال المضيف وهذا ماجاء مؤكدا لما ذكره (1) وكذلك خصوصيتها في المعيشة في الكرش والامعاء كما اكدها (27) اهذا تم اختيار الامعاء الدقيقة لعزلها .

واظهرت الجراثيم المعزولة صفات مشابهة للانواع القياسية وذلك بنموها على على وسط MRS الصلب والذي يعد من الاوساط المفضلة لنموها وهذا ماشار اليه (10) وجاءت الفحوصات البايوكيميائية لما وجده (11) وقد تطابقت جميع فحوصات النمو بدرجات الحرارة المختلفة والنمو بتراكيز مختلفة من NaCl واجراء فحوصات تخمرالسكريات مع (16,15,28).

وبعد اختيار عزلة ذات قابلية عالية على تحمل الاس الهيدروجيني الوأطي وتحمل املاح الصفراء فقد تطابقت النتائج مع (18,19) وكانت الجرثومة ذات قابلية التصاقية عالية حيث اتفقت النتائج مع ما وجده (17,28),وكنتيجة لهذه الواصفات تم اختيارها كمعزز حيوي للحملان الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية

الدراسة الحقلية

المعايير السريرية:-

يلاحظ من خلال النتائج حصول ارتفاع في معدل درجات الحرارة في المجموعتين الملقحة ، وهذه الحالة طبيعية تؤكد على الاستجابة المناعية ضد اللقاح ولوحظ ان معدلات درجات الحرارة في المجموعة التي اعطيت المعزز الحيوي مع اللقاح كانت اقل وعادت الى وضعها الطبيعي بمدة اقصر مقارنةً بالمجموعة التي اعطيت اللقاح لوحده ، وهذا ربما يعود الى ان المعزز الحيوي قد حفز الجهاز المناعي لرفع الاستجابة المناعية وعملت على حماية الجسم من عوامل الاجهاد .

ان الارتفاع في درجات حرارة الجسم في الحملان الملحقة بلقاح الـRev.1 مقارنة بالمجموعة السيطرة ، متفقة مع ما ذكره (29). ويمكن تفسير ذلك على ان جراثيم البروسيلا هي سالبة لصبغة كرام (G^-) ممتلكة الذيفان الداخلي (Endotoxin) المحدثة للحمى لذلك فأن تأثيرها في مراكز الحرارة عالي الشدة ، وقد يعزى الارتفاع ايضاً الى تحفيز الخلايا الالتهابية والبلاعم الكبيرة وخلايا العدلات التي تنتج مسخنات داخلية (Endogens pyrogen) مسؤولة بصورة مباشرة على انتاج الحمى بتأثيرها في مراكز تنظيم الحرارة تحت المهاد Hypothalmus. واتخذ ارتفاع معدلات ترددات التنفس (مرة /دقيقة) ومعدل اعداد النبض (نبضة / دقيقة) نفس مسار ارتفاع درجة الحرارة .ولم يلاحظ أي علامات سريرية على الحملان مثل الاسهال عند اعطاء الحيوانات جراثيم *lactobacillus acidophilus* وهذا يوكد انها جراثيم غير مرضية وليس لها تاثير على المضيف ,جاءت النتائج مشابهة لما وجده (31,30).

الاختبارات المناعية:-

اظهرت جميع الحيوانات الملقحة نتائج موجبة لاختبارالروزينكال طوال مدة التجربة. مما يوكد فعالية اللقاح المستعمل وحصول استجابة مناعية من قبل الحملان للقاح الـRev-1 ، كما واستخدام اختبار التلازن الدمي المنفعل (PHA) لقياس مستوى الاجسام المضادة في مصول الحملان ، ويعد هذا الفحص من الاختبارات المصلية الحساسة التي تجرى على نطاق واسع لقياس مستوى الاجسام المضادة لانواع عديدة من المستضدات ، وقد اتفقت نتائجه مع (30).

ومن خلال هذه الدراسة لوحظ تاثير واضح للمعززات الحيوية في رفع مستوى الاجسام المضادة المتكونة مقارنة بمجموعة اللقاح فقط وتتفق نتائج هذه الدراسة مع(6) ومع ماتوصل اليه (32) الذي لاحظ ارتفاع في الاجسام المناعية الخاصة بجراثيم *S.typhimurim* اربع مرات للاشخاص الذين تناولوا غذاء يحتوي على *L.acidophillus* عن الاشخاص الذين لم ياخذوا هذه الجراثيم. واتفقت هذه الدراسة مع (33) الذي وجد أن إعطاء جراثيم *L.reuteri* ادى الى زيادة الاجسام المضادة الجهازية والموضعية.

وتضمنت الدراسة ايضا معرفة مدى تائير المعززات الحيوية في رفع الاستجابة المناعية الخلوية باستخدام اختبار تشكل الزهرة حيث لوحظ في الاختبار الاخيرارتفاع واضح بالنسبة المئوية للخلايا المفاوية نوع T في المجموعتين الملقحة ولكن الزيادة اكبر في مجموعة اللقاح +المعزز الحيوي وقد اتفقت دراستنا مع (30) والذي استخدم اختبار تشكل الزهرة كمقياس للاستجابة المناعية الخلوية المحفزة نتيجة لتلقيح الاغنام بلقاح Rev -1 ولاحظ ان الزيادة اكبر في مجموعة اللقاح+ المحفزات المناعية

ان الزيادة الكبيرة في المجموعة الاولى يؤكد الدور الذي تلعبه المعززات في تحفيز الاستجابة الخلوية, وهذا جاء متفقا مع مالاحظه الباحثين(2,34) عند اعطائهم جراثيم Lactobacilus قد ادت الى تعزيز الفعالية البلعمية phagocytosis للبلعمات الكبيرةmacrophage , واتفقت النتيجة مع (35) الذي وجد زيادة معنوية بفعالية الخلايا البلعمية في الفئران التي تغذت على حليب متخمر يحتوي على جراثيم *L.casei,L.acidophilus* وكذلك استخدم اختبار الحساسية الجلدي المتأخرللكشف عن المناعة الخلوية في الحملان الملقحة والمعاملة بالمحفزالمناعي ، اظهرت هذه الحيوانات استجابة مناعية بانها اعطيت تفاعلاً جلدياً متميزاً من حيث الزيادة في فرق سمك الجلد وقطر منطقة الاحمرارمقارنة بالسيطرة ، وهذا يتفق مع (30,36).

ان مدى الاستجابة المناعية عند اعطاء المعززات الحيوية يعتمد على جنس ونوع الجراثيم المستخدمة كمعززات حيوية وكذلك قابلتها على الالية على الالتصاق وتاثيرها المباشر على مناطق الجهاز المناعي وكما اكد (5) من ان جراثيم *L.casei,L.plantarum* فانها تتداخل مع لطخات باير peyer s patches اما جرثومة *L.acidophilus* فانها تتداخل مع لطخات باير ومع الخلايا الظهارية للامعاء الدقيقة وهذا يفسر الاختلاف في الية التحفيز المناعي لجراثيم حامض اللبنيك نتيجة التداخل الخاص بالعترة Strain specific interaction

البروتين الكلي:-

ان التغيرات الحاصلة في مستوى بروتين مصل الدم الكلي تعتمد على الحالة الفسلجية او الى بعض الحالات المرضية ، ويمكن ان يفسر اعتماداً على الحالة المناعية للحيوان كنتيجة لزيادة الكلوبيولينات المناعية بسبب التحفيز المناعي, تشير النتائج الى ارتفاع مستوى البروتين الكلي في المجاميع الملقحة ويعزى السبب الى اللقاح الذي ادى الى زيادة الكلوبيولينات المناعية وبهذا يزداد مستوى البروتين اما السبب الذي ادى الى تفوق المجموعة الاولى عن مجموعة اللقاح فقط هو التحفيز الذي أنتجته جراثيم *L.acidophilus* في زيادة بروتينات المصل وهذا جاء مطابقا مع (28,37).

References

1. Moreira,J.L.;Mota,R.M.;Horta,M.F.;Teixeira,S.M.;Neumann,E.;Niecoli,J.R. and Nunes,A.C.(2005).Identification to the species level of lactobacillus isolated in probiotics prospecting studies of human ,animal or food orgin by 165-235 rR restriction profiling ,BMC.Microbiology ,1(5): 5-15.
2. Oyetayo,V.O.and Oyetayo,F.L.(2005).Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system,African Journal of Biotechnology .4(2):123-127.
3. Casey,P.G.;Gardiner,G.E.;Casey,G.;Brodshaw,B.;Lawlor,P.G.;Lynch,P.B.and et al. (2007).A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding with *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.App.Envir-onmental Micro-biology.1858-1863.
4. Meydani,S.N.and Ha,W.K.(2000).Immunological effect of yogurt.Am.J. Clinical Nutrition ,71(4):861-872.
5. Perdigon,G.;Fuller,R.and Raya,R.(2001).Lactic acid bacteria and their effect on the immune system.curr.Issues Intest.Microbiol .2(1):27-42.
6. Galdeano,C.M.;de LeBlanc,A.D.;Vinderola,G.;Bibes,M.E.and Perdigon,G. (2007).Proposed model:Mechanisms of Immunomodulation induced by probiotic Bacteria .Clin.Vaccine Immonology .14(5):485-492.
7. Klaenhammer,T.R.(2000).Probiotic bacteria;today and tomorrow,The American society for Nutritional sciences ,J.of Nutrition 130:415-416.
8. Fangac,H.;Elinaa,T.;Heikkib,A.and Seppoa,S.(2000).Modulation of humoral immune response through probiotic intake .FEMS Immunol.Med.Microbiol .29(1):47

9. Bercovich,Z.;Eger,A.;Dekker,T.and Haagsma,J. (1995). Production of Brucella allergens and evaluation of their biological activity in a Guinea pigs Bio assay.J. Vet. Med. B 42:19-27.
10. Deman,J.C.;Rogosa,M.and Sharpe,M.E.(1960).Amedium for cultivation of Lactoobacilli:J.Appl.Bect.23:130-135.
11. - العبيدي,ابتسام جواد علي(2001) استخدام جراثيم العصيات اللبنية كمعزز حيوي ضد الاصابة بجراثيم اشيريكيا القولونية وسالمونيلا تايفيميوريم . رسالة ماجستير \كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.
12. Baron, E. J., Peterson, L. R. and Fingold, S. M. (1994). Baily and Scott's Diagnostic microbiology, 9th edition, Mosby. St Louis.
13. Teuber,M.(1995).The Genus Lactobacillus in :The Genera of Lactic acid Bacteria Edited by (wood ,B.J.B.and Holzapfol-,W.H.Blackie,A.and P.
14. Bhattacharya,P.R. & Majumdar,M.K.(1983).Survival of orally administered isolated intestinal Lactobacillus acidophilus indifferent part of gastrointestinal tract of mice printed India ,J.Biosci,Vol.5,number 1,PP.97-105.
15. Salminen,S.and Wright,A.(1992).Lactic Acid Bacteria.Marcel Dekker,Inc.-Newyork
16. Harrigan, W. F. and McCance, M. F. (1976). Laboratory methods in food and dairy microbiology. Academic Press. London.
17. Fuller, R (1975). Nature of the determinant responsible for the adhesion of lactobacilli to chicken crop epithelial cells. Journal of General Microbiology; 87 (2) : 245 – 250.
18. Hood,S.K.,and Zottola,A.(1988).Effect of low pH on the ability of Lactobacillus acidophilus to survive and adhere to human intesine cells.J.Food .Sci.53:1514-1516
19. Chou,L.S.and Weimer,B.(1999).Isolation and Characterization of acid and bile –tolerance isolates from strains of Lactobacillus acidophilus .J.Dairy Sci.82:23-31.
20. Cruickshank,R(1975).”Medical Microbiology “.12th .ed. Churchill livingston .Edinburgh,London and NewYork pp.199-200.
21. Ware, D. R. ; Read, P. L. and Manfredi, E. T. (1988). Lactation performance of two large dairy herds fed Lactobacillus acidophilus strain RT 138 in a switch back experiment. J. Dairy. Sci. ; 71 (1) : 219.
22. Morgan,W.J. (1967). The serological diagnosis of bovine brucellosis-.Vet.Rec. 80:612-620.
23. Boyden,S.V.(1951). Fixation of bacterial products by erythrocytes treated with tannic acid and subsequent heamagglutination by anti-protein sera. J.Exp .Med.,93-107.
24. Kolar,J. (1990). The allergic skin test in diagnosis of brucellosis. Zoonotic disease seminar ,FAO/ Kuwait 12th-24th January.
25. Braganza,C.M.;Stathopoulos,G.;Davies,A.J.S.;Elliott,E.V.and Kerbel,R.S.-(1975).Lymphocyte :Erythrocyte (L.E)Rosettes Variety of Mammalian species .cell,vol.4,103-106.
26. Henry,R.J. ; Carnnon,D.C. and Winkelman,J.W. (1974) Clinical chemistry, principles and techniques 2nd ed. Harper and Row.
27. Collado,M.C. and Sanz, Y.(2007).Quantification of mucosa-adhered microbiota of and calves by the use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques .Vet.Microbial,15,121(3-4):299-306.
28. Muhsen,R.K.(2007).The use of Lactobacillus acidophilus as a probiotic in the prevention and treatment of Salmonella typhimurium infection in Puppies .PH.D.thesis.University of Baghdad .
29. 29-Juma , K.H. ; Al- Kass , J. E and Injidi , M. H. (1982). A note on Studies on heat tolerance in Hungarian & Awassi rams. Iraqi Journal of vet. medicine 6,PP.92
30. - طلال,اسعد خلف (2007) تأثير استخدام الليفاميزول وفيتامين ه في الاستجابة المناعية لخنازير غينيا والاغنام الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية وتأثيره في الكفاءة الانتاجية والتناسلية .اطروحة دكتوراه –كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.
31. Conway,P.L.(1996).Selection criteria for probiotic microorganisms, Asia pacific J.Clin.Nutr.5:10-14.
32. Link-Amster,H.;Rochat,F.;Saudan,K.;Mignot,O.and Aeschliman ,J. (1994).-Modulation of aspecific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk ,FEMs Immunol.Med.Microbiol .10:55-63.
33. Valeur,N.;Engel,P.;Carbajal,N.;Connolly,E.and Ladefoged,K.(2004).Colon-ization and immunomodulation by Lactobacillus reuteri ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract.Applied and Enviromental microbiology .70(2):1176.

34. Perdigon,G.;Macais ,M.;Alvarez,S.;Oliver,G.and DeRuiz-Holgado,A.A.-(1986) Effect of per-orally administered Lactobacilli on Macrophage activiation in mice .Infection and immunity ,53:404-410.

35. Kirijavainen,P.V.;El-Nezami,H.S.Salminen,S.J.;Ahokas,J.T.and Wright,P.F.-(1999).-The effect of orally administered viable probiotic and diary lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation FEMS.Immunol .Med.Microbiol.26,131-135.

36. - الزبيدي,ابراهيم عبدالحسين (2007) تحضير وتجربة مستضد مستخلص من بعض عتر البروسيلا اللقاحية. اطروحة دكتوراه –كلية الطب البيطري –جامعة بغداد.

37. Abas,I.;Kutay,H.C.;Kahraman,R.;Toker,N.Y.;Ozcelik,D.;Ates,F.andKacakci,A. (2007). Effects of Organic Acid and Bacterial Direct –Feed microbial on Fattening preformance of kivircik-male yearling lambs .Pakistan Journal of Nutrition, 6(2):149-154.