دراسة بعض التأثيرات الحيوية لبكتريا (*Enterococcus faecium*) كمعزز حيوي في افراخ الدجاج البياض: 2 – اضداد حمة نيوكاسل و خلايا الدم البيض

عماد جواد خماس امجد حسين عليوي

فرع الامراض– كلية الطب البيطري– جامعة بغداد

الخلاصة

لمعرفة تأثير بكتريا (*Enterococcus faecium*) كمعزز حيوي على أضداد حمة نيوكاستل وعلى الصورة الدموية في افراخ الدجاج البياض تم اعطاء هذه الجرثومة بالعلف وبجرعة 1.5 غم/كغم حيث يحتوي 1كغم علف على 5×10^{11} CFU ومن اليوم الأول وحتى نهاية التجربة التي دامت 57 يوما . استخدم 150 فرخا بعمر واحد ذكور وقسمت الى خمسة مجاميع كل مجموعة 30 فرخا . اعطيت المجموعة الأولى المعزز الحيوي فقط مع العلف واعطيت المجموعة الثانية المعزز الحيوي وعرضت الأفراخ الى جهد بيئي من حرارة عالية وقلة تهوية اما المجموعة الثالثة فقد اعطيت المعزز الحيوي اضافة الى كلورتتراسيكلين بالعلف واعطيت المجموعة الرابعة المعزز الحيوي ثم خمجت ببكتيريا الأشريكيا القولونية بعمر 21 يوما . اما المجموعة الخامسة فقد اعطيت علف اعتيادي وكمجموعة سيطرة.

بينت النتائج ان اعطاء بكتيريا (*Enterococcu faecium*) كانت ذات تأثير غير مهم معنويا في زيادة معدلات مستوى اضداد حمة نيوكاسل خلال اليوم 37 من التجربة ومعنويا يوم 57 . و كان هنالك تحسنا معنويا في العد التفريقي لخلايا الدم البيض وقلة في نسبة الخلايا المتغايرة / اللمفية في المجاميع التي اعطيت المعزز الحيوي مقارنة مع مجموعة السيطرة .

Study of some Impact Of *Enterococcus faecium* As Probiotic On Chick 2- Newcastle Disease Antibody And White blood cells

Emad J.khamas and Amjad H.Elaywe

Dept. of pathology-college of Vet.Med-Baghdad university

SUMMARY

To investigate the impact of *Enterococcus faecium* as a probiotic in the performance of layer male chicks and some aspects of immunity, Newcastle disease antibodies and the blood picture, this bacteria was given in the feed of layer male chicks with a dose rate of 1.5 g\kg of feed, each kg of feed contained (5×10^{11}CFU) along the experiment which last 57 days. 150 male chicks were divided into five groups, the 1st group was given the probiotic in the feed, the 2nd group was given the probiotic and was exposed to bad ventilation and high temperature as a stress, the third group was given the probiotic and chlortetracycline in the feed, the fourth group was given the probiotic and then infected with E. coli on day 21 of the experiment, and the fifth group was given the feed only without the probiotic as a control group. Results showed that giving *Enterococcus faecium* in the feed had insignificant effect

on Newcastle antibodies tested on day 37 of the experiment, and the effect was significant on day 57. Also, the differential count of the white blood cells was increased while the heterophile\lymphocyte ratio was decreased in the groups which were given probiotic, compared with the control.

المقدمة

يعرف المعزز الحيوي(probiotic) بأنه احد المنتجات المصنعة والمتكونة من احياء مجهرية مفيدة معزولة من الفلورا المعوية في القناة الهضمية للدجاج البالغ (1) وعندها يؤدي الى اسهام بشكل فاعل في نقل هذه الأحياء المجهرية اليها (2) ومن ثم احداث تعجيل في التوازن المايكروبي , مما يؤدي الى احداث وسائل دفاعية غير مناعية (3) وكذلك تحفز الجهاز المناعي وخاصة غير النوعي (4).

استهدف البحث دراسة تأثير جراثيم *Enterococcus faecium* المحضرة صناعيا في العد التفريقي لخلايا الدم البيض بعد التعرض المايكروبي المبكر لبيان اضهار نسب الخلايا الدفاعية ومدى تطورها في المراحل العمرية المختلفة وكذلك معرفة منسب خلايا المتغايرات / الخلايا اللمفية وكما استهدف البحث دراسة قياس اعداد اضداد تلازن خلايا الدم الحمر لمرض نيوكاسل لمعرفة تأثر المناعة الخلطية باستخدام المعزز.

المواد وطرائق العمل

جلب 150 فرخ ذكور بياض (ISA BROWN) يعمر يوم واحد وبمتوسط وزن 32.5 غم لكل فرخ من الشركة العراقية لإنتاج وتسويق اللحوم / الغالبية , وتمت التجربة في وحدة تجارب فرع الأمراض في كلية الطب البيطري – جامعة بغداد . اسمترت التجربة 57 يوما . اعطي المعزز الحيوي مع العلف الذي اعطى بصورة حرة (*ad libidum*) على طول فترة التجربة لقحت الافراخ عند عمر 10ايام بلقاح نيوكاسيل B1 وبطريقة التقطير في العينين والمنخرين وعند عمر 20 و 30 يوما بلقاح نيوكاسيل عترة LaSota وبنفس الطريقة قسمت الأفراخ الى خمسة مجاميع وبواقع 30 فرخا للمجموعة . تم خلط العلف بالمعزز الحيوي المحتوي على *Ent. faecium* وبجرعة 1.5 غم معزز لكل كغم علف.

المجموعة الأولى : اعطيت علف معامل بالمعزز على طول فترة التجربة .

المجموعة الثانية: اعطيت علف معامل بالمعزز على طول فترة التجربة وعرضت الى جهد يدوي حيث درجة المحرار ما بين 32– 40درجة مئوية وقلة التهوية حيث غطي الموضع بالنايلون.

المجموعة الثالثة: اعطيت علف بالمعزز الحيوي على طول ايام التجربة مضاف اليه كلورتتراسيكلين وبجرعة 1 غم لكل طن علف.

المجموعة الرابعة: اعطيت علف معامل بالمعزز الحيوي على طول ايام التجربة خمجت بجراثيم اشريكيا القولون بعمر 21 يوم داخل القصبة الهوائية وباستعمال انبوب مطاطي شعري.

المجموع الخامسة: اعطيت علف غير معامل بالمعزز الحيوي وهي مجموعة السيطرة.

تم اخذ عينتي دم اسبوعيا من كل مجموعة لإجراء الصورة الدموية المتمثلة بالعدد التفريقي لخلايا الدم البيض ومنسب خلايا المتغايرات الى الخلايا اللمفية. استخدم المنتج الصناعي Biomin IMBOالحاوي على بكيريا *Ent. faecium* وبمعيار 5 × 10^{11} وحدة مكونة للمستعمرات لكل واحد كيلو غرام(CFU/kg) وبجرعة 1-1.5 غم / كغم علف اما بكتريا الاشريكيا القولونية فقد استخدمت العزلة المرضية78-0 وبجرعة خمجية 1.26×10^{8} مل/ وحدة مكونة للمستعمرات وحسب طريقة(5) وذلك لإجراء اختبار التحدي يوم 21 من التجربة حيث اعطي 0.1 مل عن طريق القصبة الهوائية .

النتائج

يبين الجدول(1) اختبار اثنباط التلازن عند اليوم 37 حيث هناك ارتفاع متجانس لكل المجاميع . اما معدل الاضداد عند عمر 56 يوم فقد اظهرت المجموعة الثالثة والخامسة ارتفاعا ملحوظا ومعنويا على مستوى $p<0.05$ مقارنة مع بقية المجاميع اما في المستوى المعنوي $p<0.05$ فقد بينت النتائج ولكل المجاميع للايام 37 ,56 وجود انخفاض معنوي تحت هذا المستوى.

بخصوص الصورة الدموية فقد ازدادت الخلايا اللمفية في الأسبوع الرابع وبفرق معنوي $p<0.05$ عن باقي الأسابيع وسجلت اقل النتائج في الاسبوع الثاني وبنفس الفرق المعنوي (جدول 2) اما الخلايا المتغايرة فقد سجلت اعلى النتائج في الأسبوع الثاني والثالث (جدول 3) اما نسبة الخلايا احادية النواة فقد سجلت ادنى نسبة في الأسبوع الثالث وبفرق معنوي $p<0.05$ (جدول 4) وكانت اقل نسبة لخلايا العقدة في الأسبوع الثامن وبفرق معنوي $p<0.05$ (جدول 5) اما اعلى نسبة لخلايا الحمضة خلال الأسبوع الثالث وبفرق معنوي $p<0.05$ وكانت النسبة في الأسبوع الثاني والرابع والثامن غير مهمة احصائيا (جدول 6) اما نسبة الخلايا المتغايرة/ اللمفية فكان اعلى مقدار لها في الأسبوع الثاني وبفرق معنوي ($p<0.05$) واقل مستوى في الأسبوع الرابع

(جدول 7) بينما سجل الأسبوع السادس والسابع والثامن قيم متساوية وبفرق مهم احصائيا .

جدول(1) :تاثير التعرض المايكروبي ل *Enterococcus faecium* في المعيار الحجمي لاضداد مصل الدم للحمة المسببة لمرض نيوكاسل

المجموعة	المتوسط ± الخطأ القياسي	
	اختيار HI (37) يوم	اختبار HI (56) يوم
الاولى	6.00± 2.00 A	16.00± 0 AB
الثانية	4.50± 3.50 A	3.00± 1.00 B
الثالثة	2.50± 1.50A	24.00±± 8.00A
الرابعة	18.00± 14.00 A	2.50± 1.50B
الخامسة	6.00± 2.00A	24.00± 8.00A
مستوى المعنوية ($p<0.05$)	NS	*

- الارقام تمثل المعدل± الخطا القياسي
- الحروف المختلفة تمثل وجود فرق معنوي (B,A) .
- معدل القيم من الاعلى الى الاسفل حسب تسلسل الحروف (B,A).
- الاشارة * تمثل وجود فرق معنوي على مستوى ($p<0.05$) .

جدول(2):نسبة الخلايا اللمفية

نسبة الخلايا اللمفية	الأسابيـــع						
	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	34.70 ± 3.50	39.50 ± 1.54	61.45 ± 1.37	46.90 ± 1.90	53.80 ± 2.16	53.80 ± 2.16	55.10 ± 2.80
قيمة LSD 7.980	*	*	*	*	*	*	*
مستوى المعنوية (P<0.05)	E	D	A	C	B	B	B

- تمثل WK الاسبوع
- تمثل الاشارة * وجود فرق معنوي .
- الاحرف المختلفة (E,D,C,B,A) تعني وجود فرق معنوي .
- * الف لكل ملم^3

جدول(3):نسبة الخلايا المتغايرة

نسبة الخلايا	الأسابيـــع						
المتغيرة	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	55.20 ± 3.74	51.90 ± 1.58	26.00 ± 1.55	43.00 ± 1.97	37.20 ± 1.60	37.20 ± 1.60	34.70 ± 2.77
قيمة LSD 7.789	*	*	*	*	*	*	*
مستوى المعنوية (P<0.05)	A	A	D	B	C	C	C

- تمثل WK ألاسبوع
- تمثل الاشارة وجود فرق معنوي .
- الاحرف المختلفة (D,C,B,A) تمثل وجود فرق معنوي .
- * الف لكل ملم^3

جدول(4): نسبة خلايا الاحادية النواة*

نسبة الخلايا	الأسابيـــع						
احادية النواة	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	5.52 ± 3.74	3.50 ± 0.40	8.72 ± 0.55	7.70 ± 0.63	5.80 ± 0.89	5.80 ± 0.89	7.90 ± 6.69
قيمة LSD 2.566	*	*	*	*	*	*	*
مستوى المعنوية (P<0.05)	C	C	A	A	A	B	A

- تمثل WK الاسبوع - تمثل الاحرف المختلفة (C,B,A) وجود فرق معنوي
- تمثل الاشارة * وجود فرق معنوي . * الف لكل ملم^3

جدول(5):نسبة خلايا القعدة*

نسبة الخلايا القعدة	الأسابيـــع						
	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	2.40 ± 0.30	2.20 ± 0.32	2.45 ± 0.28	2.10 ± 0.34	2.20 ± 0.29	2.20 ± 0.29	1.10 ± 0.23
قيمة LSD 1.04	*	*	*	*	*	*	*
مستوى المعنوية (P<0.05)	A	A	A	A	A	A	B

- تمثل WK الاسبوع
- تمثل الاشارة * وجود فرق معنوي .
- تمثل الاحرف المختلفة (B,A) وجود فرق معنوي .
- * الف لكل ملم^3

جدول (6) :نسبة الخلايا الحمضة*

نسبة الخلايا احادي النواة	الأسابيـــع						
	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	2.1 ± 0.58	2.90 ± 0.43	2.18 ± 0.43	1.20 ± 0.29	1.20 ± 0.29	1.20 ± 0.29	2.20 ± 0.32
قيمة LSD 1.320	NS	*	NS	*	*	*	NS
مستوى المعنوية (P<0.05)	AB	A	AB	B	B	B	AB

- تمثل WK الاسبوع
- تمثل الاشارة * وجود فرق معنوي.
- تمثل الاشارة NS عدم وجود فرق معنوي .
- تمثل الاحرف المختلفة (B,A) وجود فرق معنوي .
- * الف لكل ملم^3

جدول(7):نسبة الخلايا المتغايرة / اللمفية

نسبة الخلايا المتغايرة/اللمفية	الأسابيـــع						
	2	3	4	5	6	7	8
المتوسط ± الخطأ القياسي	1.81 ± 0.25	1.34 ± 0.09	0.42 ± 0.03	0.96 ± 0.05	0.70 ± 0.05	0.70 ± 0.05	0.66 ± 0.07
قيمة LSD 0.392	*	*	*	*	*	*	*
مستوى المعنوية ($P<0.05$)	A	B	E	C	D	D	D

- تمثل WK الاسبوع
- تمثل الاشارة * وجود فرق معنوي .
- تمثل الاحرف المختلفة (E,D,C,B,A) وجود فرق معنوي .

المناقشة

الاضداد المتولدة ضد حمة نيوكاسل خلال الايام 37 يوما بينت ارتفاعا متجانسا لكل المجاميع و قد يرجع سبب ذلك الى ماجاء به (6) وهو ان مستحضرات التعرض المايكروي هي عبارة عن احياء مجهرية طبيعية مقيدة معزولة من الفلورا المعوية لذا لا تكون استجا بة مناعية متخصصة ضد هذه المستحضرات والتي قد ترجع الى التشابه المستضدي بينها وبين انسجة القناة الهضمية في حين جاءت نتائج يوم 56بفرق مهم معنويا على مستوى $p<0.05$ وهذا ما اكده (7) بان استخدام المعززات الحيوية يعطي تأثيرا معنويا في تحفيز الأستجابة المناعية الخلطية والخلوية كذلك وجد (8) ان استخدام المعزز الحيوي *Ent. faecium* ذو تأثير كناقل مناعي نتيجة تحسين مقاومة المضيف. اعطاء المستحضرات المايكروية يعمل على تحفيز الخلايا اللمفية نوعBوT والخلايا البلعمية ويحفز الأنسجة اللمفية في القناة الهضمية (9). انخفضت الخلايا المتغايرة بتقدم الزمن وذلك نتيجة زيادة الأجسام المضادة المتكونة من الخلايا البائية والذي اكده ايضا (10). تأثير الأسابيع على عدد الخلايا وحيدة النواة كان يتصاعد تدريجيا الى اعلى قيمة في الاسبوع الثامن بينما كانت اقل قيمة لخلايا الحمضة في الأسابيع الأخيرة وهذا يتناسب مع أليـة عملها حيث تعمل على بلعمة الالتهابات القديمة ومما يدل على الأستقرار الحاصل في القناة الهضمية للأفراخ خلال الأسابيع الأخيرة من عمر التجربة هناك تأثير واضح على نسبة الخلايا اللمفية الى المتغايرة خلال الاسبوع الأول بسبب الأجهاد الحاصل للمجاميع وكذلك في المجموعة الرابعة المعرضة للاشريكيا القولونية وهذه النتائج تتفق مع نتائج (11) التي توكد ان الأجهاد بصورة عامة يعمل على تحفيز الغدة الكرظية وزيادة في افراز الهرمونات وخاصة الأستيرون القشراي الذي له تأثير مباشر في تحليل الخلايا اللمفية والذي بدوره ينتج زيادة في الخلايا المتغايرة مما يؤدي الى ارتفاع قيم L/H .

اما الاسبوع الرابع فقد شهد اقل قيمة وبفرق معنوي $p<0.05$ وذلك للتأثير الايجابي للمعزز الحيوي وهذا مشابه لما جاء به (12) حيث اعطى بكتيريا *B. natto* الى افراخ لحم فأحدثت زيادة معنوية $p<0.01$ في اعداد الخلايا اللمفية BوT. في الطحال مما وفر اقل قيمة من نسبة L/H . في حين كانت الأسابيع الثلاثة الأخيرة ذات مستوى واحد وذلك للسيطرة الميكروبية داخل القناة الهضمية مما يؤكد التأثير الايجابي للمعزز الحيوي في موازنة الاجهاد الحاصل نتيجة للظروف البيئية المختلفة التي تعمل على زيادة نسبة الخلايا المتغايرة الى اللمفية.

ان نسبة خلايا L/H من المؤشرات العالمية للحالة الفسلجية الحقيقية والى الاستجابة الدقيقة ضد الاجهاد العام .

المصادر

1. Reuter G,(2001) Probiotics – Possibilities and limitations of their application in food , animal feed, and in pharmaceutical preparations for man and animals Ber. Mun. Tier. Woch. 114 (11-17): 410-419.
2. Simmering R, and .Blaut M, (2001) Pro – and Prebiotics. The tasty guardian angels Review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 55 (1): 19-28.
3. Salminen S, Von Wright A, Morelli L, Marteau P, Brassart D, .DE vos W M, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland S E, and Mattila-Sandholm T, (1998) Demonstration of safety of probiotics-a review . Int. J. Food Microbiol. 44 (1-2): 93-106
4. Sanders M E, (1999) Probiotics. Scientific status summary. Application of the institute of food and Technology lists, expert panel of food safety and Nutrition.
5. Qin Z R, Fukata T, Baha F, and Arakawa.A, (1995) Effect of lactase and Lactobacillus acidophilus on the colonization of Salmonella enteritidis in chickens concurrently infected with Eimeria tenella. Avian Dis,, 39; 548-553
6. Edens F W, and Doerfler R E, (1998) Poultry enteritis and mortality syndrome: definition and nutritional interventions. In: Biotechnology in the feed industry. Proc. Alltech's 13th Ann. Symp. (T.P. Lyons and K.A. Jacques, Eds.) Nottingham University Press, Loughborough, Leics, UK. PP. 521-538.
7. Jones F T, Qureshi M A, and Brake J (1993) Effect of a Direct-fed microbial compound on performance and intestinal microbiology of heat stressed broiler inoculated with *Salmonella typhimurium* . Poult. Sci., 72(Suppl.1) : 16 (Abstr.).
8. Ferencik M, Ebringer L, Mikes Z, Jahnova E, and Cizzar I, (1999) Successful modification of human intestinal microflora with oral administration of lactic acid bacteria. Bratisl-Lek.. Listry. 100 (5) : 45-58 (Abstr.). .

9. Edens F W, Parkhurst C R, Cassas I A, and Dobragasz W J, (1997) Principles of Ex- ovo competitive exclusion and in –ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. Poultry sci., 76: 169-179
10. Ferencik , M.; Z. Mikes, L. Ebringer; E-Jahnova and I. Ciznar. 2000. Immunostimulatory and other beneficial health effects of lactic acid bacteria. Bratisl – lek-listy., 101(1) : 3-51 . (Abstr.)
11. Gross W B, and Siegel H S, (1983) Evaluation of heterophil /lymphocyte ratio as measure of stress in chickens. Avian. Dis., 27:927-979.
12. Inooka S, Uehera S, and Kimura M, (1986) The effect of Bacillus watto on the T and B lymphocyte from spleen of feeding chicken. Poul .Sci-65.1217-1219.