تأثير الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على الإصابة التجريبية لفروج اللحم بجرثومة Salmonella typhimurium

رعد سعد سلطان

كلية التربية الاساسية/جامعة واسط/قسم العلوم

Effect of Saccharomyces cerevisiae Cell Wall on Broiler Chickens Infected with Salmonella typhimurium

Raad Saad Sultan

radsad1975@gmail.com

Abstract

This study was designed and applied to detect the effect of addition of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae to basal diet of broiler chickens that infected experimentally with virulent Salmonella typhimurium at three weeks of age. Sixty broiler chicks (Ross) were used and divided randomly into equivalent three groups then were treated as following: treatment 1 T1(control negative) was received dietcontains Saccharomyces cerevisiae cell wall in dose of 30gm/100kg of basal diet from 2 weeks of age to the experiment end, treatment 2 T2 was received diet same of T1 in same time and drenched orally with the bacterial suspension of Salmonella typhimurium in dose of (6x107 CFU) for each bird at 3 weeks of age and treatment 3 T3 (control positive) was received basal diet without any additives and drenched orally with the bacterial suspension of Salmonella typhimurium in dose of (6x107 CFU) for each bird at 3 weeks of age.

The immunological parameters of cellular and humeral immunity were studied in addition to isolation and bacterial count of Salmonella typhimurium in intestinal contents, also mortality rate. Results refer to beneficial cellular and humeral immune response against infection of Salmonella typhimurium due to role of Saccharomyces cerevisiae cell wall which is reducing bacterial count of Salmonella typhimurium in intestine and mortality rate.

الخلاصة

هدفت دراسة البحث معرفة تأثير استخدام الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على إصابة أفراخ اللحم التجريبية بجرثومة Salmonella typhimurium الضارية بعمر ثلاثة أسابيع. استخدم ٦٠ فرخاً من دجاج اللحم نوع (روز) وقسمت عشوائياً وبالتساوي لثلاثة مجاميع المجموعة الأولى (مجموعة سيطرة سالبة) غذيت على عليقة مضافاً إليها جدار الخميرة (٣٠ غم/١٠٠ كغم علف) بعمر أسبوعان واستمرت حتى نهاية التجربة، المجموعة الثانية غذيت على عليقة مضافاً إليها جدار الخميرة (٣٠غم/١٠٠ كغم علف) بعمر أسبوعان واستمرت حتى نهاية التجربة وجرعت فموياً من العالق الجرثومي لجرثومة Salmonella typhimurium بجرعة (6x107 CFU/ml) لكل طير بعمر ثلاثة أسابيع والمجموعة الثالثة كانت مجموعة سيطرة موجبة جرعت من العالق الجرثومي لجرثومة Salmonella typhimuriumبجرعة (6x107 CFU/ml) لكل طير بعمر ثلاثة أسابيع وغذيت على علف خالٍ من أي إضافة.

المؤشرات المناعية الخلوية والخلطية تم دراسة بعضها بالإضافة إلى العزل والعد الجرثومي لجراثيم Salmonella typhimurium من محتويات الأمعاء وكذلك حساب عدد الهلاكات. أشارت النتائج إلى أن الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae قد حفز استجابة مناعية جيدة بنوعيها الخلوية والخلطية ضد جراثيم Salmonella typhimurium ، إضافة لانعدام الهلاكات مع قلة أعداد جراثيم Salmonella typhimuriumفي محتويات الأمعاء مقارنة مع مجموعة الإصابة.

المقدمة

الدواجن تعتبر مصدراً مهماً من مصادر الإنتاج الغذائي ولقد ازدادت تربية وإنتاج الدواجن في عموم العالم نظراً للحاجة الماسة للحوم البيضاء، وأشارت البحوث الحديثة إلى إن دجاج اللحم يلعب دوراً مهماً في نقل العديد من الأمراض الانتقالية للإنسان (1,2) مما يؤدي إلى حدوث أوبئة واسعة في مختلف بقاع العالم، وتعد جرثومة Salmonella typhimurium من الجراثيم المهمة ذات المنشأ الغذائي حيث تنتقل عن طريق الغذاء إلى الإنسان وتسبب إصابات شديدة ويعتبر النمط المصلي Salmonella typhimurium من أهم الأنماط الشائعة في الدواجن حيث تعتبر مشكلة صحية كبيرة كونها من الجراثيم المعوية المشتركة التي يعزى لها حالات التسمم الغذائي(3) .

استخدمت عدة طرق للسيطرة على الأمراض ومنها اللقاحات والمضادات الحياتية إلا أن اللقاحات لا زالت غير ذات كفاءة في السيطرة على انتشار مثل هذه الأمراض (4). أما المضادات الحياتية فهناك مشاكل عديدة تواجه استخداماتها منها تأثيرها السلبي على الفلورا المعوية المفيدة في الأمعاء، إضافة إلى المقاومة الوراثية لهذه المضادات من قبل هذه الجراثيم بسبب الطفرات الوراثية لهذه الجراثيم (5) وزيادة تراكم هذه المضادات في المنتجات الغذائية الحيوانية كاللحوم والبيض وبالتالي تأثيرها على جسم الإنسان وظهور أمراض الحساسية لذلك تم الاتجاه نحو طرائق أخرى بديلة عن المضادات الحياتية وهي المعززات الحيوية (Probiotic) التي تستخدم بصورة علاجية أو وقائية أو محفزات للنمو ومنها خميرة Saccharomyces cerevisiae التي تعد من أكثر أنواع الخمائر استعمالاً في المجالات الغذائية والصناعية، وأشارت دراسات عديدة إلى دورها الايجابي في مساندة جراثيم العصيات اللبنية Lactobacilli المفيدة وبالتالي إحداث التوازن في أمعاء المضيف (6)، واستخدم الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiaeفي خفض شدة الإصابة بسموم الأحياء المجهرية عموماً والسموم الفطرية بشكل خاص (7) ويتكون جدار هذه الخميرة من وحدات متعددة من سكري المانان والكلوكان Mannan ß(4-1) and Glucan ß (6-1) حيث إن تركيز قليل من هذه السكريات يكفي لغلق مواقع ارتباط البكتريا المرضية مع الخلايا الظهارية للأمعاء عن طريق الارتباط معها ثم طرحها خارج الجسم قبل أن تتأيض هذه السكريات وبالتالي ينتج عنها تأثير جيد بتنظيف الأمعاء من الأحياء المجهرية المرضية وسمومها وكما وتعد هذه السكريات محفزة للاستجابة المناعية الخلوية والخلطية (8,9).

١.المواد وطرائق العمل:

١,١. الجراثيم المستخدمة: تشتمل الجراثيم المستخدمة في التجربة على الآتي:

١- عترة جرثومة Salmonella typhimurium: جلبت من مختبر الصحة المركزي التابع لوزارة الصحة العراقية ببغداد حيث كانت قد عزلت وشخصت هناك.

٢- خميرة Saccharomyces cerevisiae : أخذت مسحات من الخميرة المنماة على علف مخمر بخميرة الخبز الجافة وزرعت على الوسط الغذائي Potato Dextrose Agar (PDA) المعقم والمتصلب وحسب طريقة (10) وبعد إجراء التشخيص لهذه الخميرة ، حفظت عزلات منها لغرض الحصول على الجدار الخلوي.

٣ – جدار خميرة Saccharomyces cerevisiae : زرعت عزلات الخميرة على الوسط السائل Potato dextrose broth لمدة خمسة أيام وبدرجة ٣٠ْ م بعدها أجريت عمليتا التجميد السريع ثم الإذابة (11)وكررت العمليتان لأكثر من عشرة مرات من اجل تكسير خلايا الخميرة بعدها أجريت عملية الطرد المركزي بسرعة ٥٠٠٠ دورة لكل دقيقة لمدة نصف ساعة واخذ الراسب وأهمل السائل الراشح وغسل الراسب بالماء المقطر ثم جرى التأكد من تكسر جميع خلايا الخميرة بالفحص تحت المجهر لبعض الشرائح المصبغة بصبغة المثيل الأزرق. ومن أجل سهولة الاستخدام والتداول أجريت عملية التجفيف لجدار الخميرة بدرجة حرارة 50ْ م باستخدام فرن كهربائي مع إجراء التقليب السريع في عملية التجفيف للحصول على متعدد السكريات مانان – كلوكان (Mannan–glucan Oligosaccharides) كسابق حيوي.

١.٢.١ الأوساط الزرعية: استخدمت أوساط زرعيه خاصة لتمييز وعد Counting مستعمرات السالمونيلا وأوساط أخرى خاصة بالاختبارات الكيموحيوية وكما يأتي:

1. وسط اكار الدم (Blood agar): حضر الوسط ألزرعي الأساس المجهز من شركة (Biolife) وحسب تعليماتها.
2. وسط اكار فول الصويا (Trypticase Soy agar): حضر الوسط ألزرعي المجهز من شركة (BBL) وحسب تعليماتها.
3. وسط BGBA (Modified Brilliant Green Bile Agar): من شركة (Difco) ، وهو وسط انتقائي لعزل جراثيم السالمونيلا وعدها حيث يعمل على تثبيط نمو أغلب الجراثيم المعوية.
4. وسط (MacConkey agar): من شركة (Difco) لتمييز الجراثيم المخمرة لسكر اللاكتوز عن غيرها.
5. وسط نقيع القلب والدماغ BHIA (Brain Heart Infusion gar): من شركة (Biolife)، وهو وسط مغذي أستخدم لغرض حفظ العينات.
6. مرق SCB (Selenite – Cystine broth): من شركة (Difco) وهو وسط اختياري أغنائي (Selective – enrichment) لنمو جراثيم السالمونيلا حيث يعمل على تثبيط نمو اغلب الجراثيم المنافسة.
7. المرق المغذي NB (Nutrient Broth): من شركة (Oxoid) لغرض تحضير جرعة التحدي للسالمونيلا (Challenge).
8. وسط TSB (Trypticase – Soy Broth): من شركة (Oxoid) ، استخدم لتحفيز نمو الأعداد القليلة من الجراثيم في العينة حيث استخدم للكشف عن وجود السالمونيلا في الفرشة والعلف قبل بدأ التجربة.

9. وسط BPW (Buffered Peptone Water): هو وسط قبل الأغنائي (Pre-enrichment) استخدم لغرض تنمية جراثيم السالمونيلا في عينة محتويات الأمعاء ومن ثم أستخدم في التخافيف العشرية كوسط للتخفيف.

2.2.1. أوساط الاختبارات الكيموحيوية:

١. مرق (Urea) : من شركة (Flluka) لتمييز جراثيم Proteus المنتجة لأنزيم Urease عن بقية الجراثيم المعوية.

٢. وسط : TSI (Triple Sugar Iron Agar) من شركة (Oxoid) للتحري عن جراثيم السالمونيلا.

٣. وسط (Simmon's citrate Agar): من شركة (Oxoid) للتحري عن هضم الستريت كونه مصدر عال للكربون خاصة لجراثيم السالمونيلا .

٤. وسط SIM (Sulfate –Indole Motility medium): من شركة (Difco) للتحري عن قابلية الجرثومة على إنتاج غاز H2S والأندول وعن كونها متحركة أم لا وهذا مهم لتمييز جراثيم التحدي (Motile).

٥. وسط (Gelatine) من شركة (Difco).

3.2.1. المحاليل والكواشف:

١. محلول معقم من داري الفوسفات الملحي (PBS) ذو أس هيدروجيني (7.2).

٢. محلول EDTA 1% من Dipotassium – Ethelen Diamine Tetra acetic acid لغرض جمع عينات الدم لعمل المسحات الدموية .

٣. كاشف الأوكسيديز (Oxidase reagent).

٤. كاشف كوفاكس Kovac's reagent لفحص الاندول .

٥. كاشف بيروكسيد الهيدروجين Hydrogen peroxide استعمل بتركيز 3 % في فحص الكاتاليز .

3.١. طرائق جمع العينات: تم جمع نماذج العينات قبل بدء التجربة ومن كل مما يلي:

1. عينات العلف: أخذت نماذج بصورة عشوائية من العلف قبل بدأ التجربة للتأكد من خلوه من جراثيم السالمونيلا ووضعت في كيس نايلون معقم ثم خلطت بشكل جيد وأخذ 15 غم منها أضيفت إلى دورق معقم يحتوي على 90 مل من مرق(TSB) Trypticase soy broth وحضنت المحتويات بحرارة 37م° لمدة 24 ساعة ثم نقل ١مل من المستنبت وحضن في قنينة معقمة (Universal Bottle) تحتوي على 9 مل من مرق Selenite Cystine Broth (SCB) بدرجة 42 م° لمدة 24-48 ساعة (12).

2. عينات الفرشة:

أخذت 5 عينات عشوائية من الفرشة بعد تنظيف وتعقيم مكان التجربة ووضعت جميعاً في كيس نايلون معقم وخلطت جيداً ثم أخذ 25 غرام منها أضيفت إلى دورق نظيف يحتوي على 225 مل من مرق TSB وحضنت في 37 مْ لمدة 24 ساعة ثم نقل 10 مل منها إلى دورق معقم يحتوي على 90 مل من مرق SCB ،وحضنت بدرجة حرارة 42 م° لمدة 24-48 ساعة (12).

3.عينات الماء:

أخذت 100 مل من ماء الخزان قبل بدء التجربة للتأكد من خلوه من جراثيم السالمونيلا ووضعت في دورق يحتوي على 200 مل من مرق TSB و SCB على التوالي ،وحضنت في ٣٧ْ م و ٤٢ م و لمدة 24-48 ساعة (13) .

4. المسحات المجمعية:

أخذت مسحات مجمعية باستخدام مسحات قطنية معقمة (Sterile Cotton Swab) من طيور انتخبت عشوائياً قبل بدء التجربة للتأكد من خلوها من جراثيم السالمونيلا، ووضعت كل عينة في قنينة معقمة (Universal Bottle) تحتوي على 10 مل من مرق TSB و SCB على التوالي، وحضنت بدرجة ٣٧ و 42 م ° على التوالي أيضا لمدة 24-48 ساعة (13,14) .

5. محتويات الأمعاء Intestinal content:

فصلت الأمعاء بصورة معقمة بعد تشريح الأفراخ لأجل العزل الجرثومي، ثم أخذ من محتويات الأمعاء 1- 0.5غم ووضعت في قناني قياسية معقمة ، تحتوي على (4.5-9) مل من مرق TSB و SCB على التوالي، وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ و 42 م ° على التوالي أيضا ولمدة 48 ساعة (13,14).

4.1 تنمية جرثومة Salmonella typhimurium :

أخذت قطرة من المستنبت الجرثومي بوساطة الانشوطة البلاتينية (Wire Loop) وزرعت بطريقة التخطيط على وسط BGBA (Brilliant Green Bile Agar) وحضنت بدرجة C° 37 لمدة ٢٤ ساعة، ظهرت مستعمرات جرثومة Salmonella typhimurium ملساء دائرية محدبة كاملة الحواف ذات قطر ١-٣ ملم لونها وردي فاتح مع تلون الوسط المحيط لها باللون الأحمر (غير مخمرة للاكتوز) وللتأكد منها انتخبت إحدى المستعمرات وزرعت على وسط MacConkey agar فظهرت مستعمرات ملساء محدبة قطرها حوالي ١-٣ ملم عديمة اللون مع ميل الوسط إلى التلون بلون القش (15).

5.1. العد الجرثومي لجراثيم السالمونيلا :

عملت تخافيف عشـرية على وسـط الببتون ومنه ينقل 0.1 مل من كل تخفيف، وتقطر على سـطح طبق BGBA وتنشر بتحريك الأطباق وبعد النشر الجيد الذي يشمل كل سطح الطبق تحضن الأطباق بدرجة ٣٧ °م لمدة ٤٨ ساعة ، ثم تعد المستعمرات على الطبق الذي يحتوي على (٣٠-٣٠٠) مستعمرة ويحسب التخفيف على أساسها مع مراعاة زرع طبقين – أربعة أطباق لكل تخفيف ثم استخراج المعدل (16) .

6.1. تحضير جرعة الإصابة لجرثومة Salmonella typhimurium :

جرعة التحدي تم تحضـيرها حسـب طريقة (17) وجماعته حيث أخذت ٥ مسـتعمرات جرثومية نقية من Salmonella typhimurium المحفوظة بدرجة حرارة ٤ م ° على وسـط (BHIA)، ووضـعت كل مسـتعمرة في قنينة قياسية معقمة تحوي على ٥ مل من المرق المغذي NB (Nutrient Broth) ، ومزجت المحتويات بشكل جيد وحضنت بدرجة حرارة ٣٧ م ° لمدة ٢٤ ساعة ثم مزجت محتويات القناني الخمس في دورق معقم، واخذ 0.1 مل منها وزرع في قنينة قياسـية معقمة تحوي ٩ مل من المرق المغذي NB بدرجة ٣٧ م ° لمدة سـاعتين وبعدها جرى عد محتوياتها الجرثومية بطريقة (16) وكان تركيز الجراثيم في كل ١ مل حوالي ٦ × ١٠ ٧ Cfu/ml ، ثم جرعت فموياً بكمية 0.1 مل لكل طير.

7.1. الفحوصـات الكيموحيوية: أجريت هذه الفحوصـات لتشـخيص جرثومة Salmonella typhimurium المستخدمة في فحص التحدي وبالإضـافة إلى جراثيم السـالمونيلا المعزولة من الطيور بعد التحدي (13) كما في جدول رقم (١).

جدول رقم (١) يبين نتائج الاختبارات البايوكيميائية الخاصة ببكتريا Salmonella typhimurium

الاختبار	النتيجة
تخمير اللاكتوز على وسط BGBA	مستعمرات غير مخمرة وردية اللون
تخمير اللاكتوز على وسط MacConkey	مستعمرات غير مخمرة صفراء اللون
تفاعل Oxidase	سالب
تحويل الستريت على وسط Simmon's citrate	موجب والتفاعل قاعدي (ازرق)
تخمير السكريات على وسط TSI	السطح أحمر ، والقعر اصفر منتجة لغاز H2S
اختبار الحركة (SIM) وانتاج الاندول وانتاج غاز H2S	متحركة ، غير منتجة للاندول ومنتجة H2S
اختبار Urease على وسط Urea agar	سالب

8.1.تحضير مستضد Salmonella typhimurium لإجراء الفحص الجلدي: تم زرع الجرثومة على وسط BGBA وتحضيره حسب طريقة (18).

9.1. نسبة الخلايا المتغايرة (الهتروفيل)/اللمفوسايت:

عملت مسحات دموية مباشرة على شرائح زجاجية وتم صبغ الشرائح بمزيج من صبغتي Wright–Giemsa وفقاً لطريقة (19) وأُجري العد باستعمال المجهر الضوئي وعلى قوة تكبير 100 x بوضع قطرة زيت على الشريحة حسب طريقة (20) ومن ثم حساب نسبة خلايا الهتروفيل (الخلايا المتغايرة) إلى خلايا اللمفوسايت H/L

١٠,١. فصل بروتينات المناعة :

فصلت بروتينات مصل الدم باستخدام منظومة Disc–gel electrophoresis المجهزة من شركة JOOKOH Co. LTD وعلى هلام الاكريلمايد وحسب الطريقة المقدمة من قبل الشركة المجهزة لمنظومة الفصل حيث حضر الهلام اللاصق بتركيز ٣% من متعدد الاكريلمايد المذاب في ٠,٥ مولار من المحلول المنظم Tris–HCl ذي أس هيدروجيني ٦,٨ وهلام الفصل بتركيز ٧% من متعدد الاكريلمايد المذاب في ٠,٧٥ مولار من المحلول المنظم Tris–HCl ذي الأس الهيدروجيني ٨,٨ وكان المحلول المنظم الرئيس في أحواض منظومة الفصل يتكون من ٠,٠٢٥ مولار Tris و ٠,١٩٢ مولار Glycine وله أس هيدروجيني ٨,٣ . خلط ١٠٠ مايكرون من مصل الدم مع ١ مليلتر من محلول ٠,٠٢% من صبغة Bromophenol blue المذابة في ٥٠% من الكليسرول وبعد المزج نقل ١٠٠ مايكرون منه ووضع على سطح الهلام المتصلب في الأنابيب الزجاجية لمنظومة الفصل وسمح بمرور تيار كهربائي مقداره ٢ ملي أمبير لكل أنبوبة وبعد ساعة تم زيادة التيار إلى ٤ ملي أمبير حتى نهاية الفصل عندها أخرجت أعمدة الهلام وصبغت بصبغة Coomassie brilliant blue R–250 لمدة ساعتين ثم أزيلت الصبغة من الهلام بغسلها عدة مرات بمحلول ١٠% من حامض ألخليك حتى ظهور حزم البروتينات. شخصت البروتينات بمقارنتها مع بروتينات قياسية تمثل Albumin و Transferrin و Globulin – σ المحضرة من قبل شركة Chemical–Sigma واستخرجت نسب البروتينات وحسب ما أشارت إليه (٢١) وهي قياس نسبة كل حزمة إلى الحزم الكلية للبروتينات المفصولة.

١١,١ اختبار الانتشار المناعي في الهلام Immuno–diffusion:

اعتمدت طريقة الانتشـــار المناعي المذكورة من قبل (22) حيث يتكون الهلام من ٢ غم Agarose gel و٤ غم NaCl و١٠٠ مل ماء مقطر وتسـخن المحتويات حتى الذوبان الكامل للهلام ثم تخفض درجة الحرارة إلى ٥٥ م° ويخلط 0.5 مل من antigen مع 4.5 مل من الهلام ثم تصب في أنابيب زجاجية بمقدار ٣ مل لكل أنبوبة وبعد أن يتصلب الهلام يوضع فوقه ١ مل من serum ويترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة ٢٤ ساعة لملاحظة الانتشار المناعي ويحفظ في الثلاجة لمدة لا تقل عن خمسة أيام في حالة الفحص السالب قبل أن يهمل.

١٢,١ فحص الدلايات والصـــفاق: اجري الفحص الجلدي بعد ٢١ يوما من الإصـــابة لاختبار تطور المناعة الخلوية لأفراخ التجربة، حيث حقنت بجرعة 0.1 ملم من مستضد Salmonella typhimurium في منطقة الدلايات والصـفاق وقرأت النتائج بعد ٢٤ و ٤٨ سـاعة باسـتخدام آلة القدمة Virnia لقياس سـمك الجلد بعد الحقن لتثبيت التثخن الحاصل.

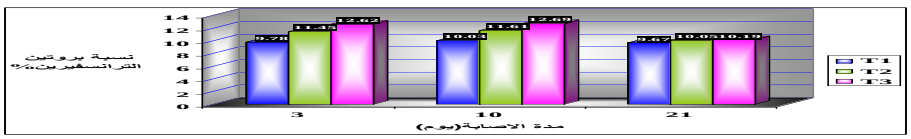
التحليل الإحصـائي: حللت البيانات وفق التحليل العشوائي الكامل وجرى مقارنة المتوسطات على وفق اختبار دنكن متعدد المديات (Duncan's multiple range test) وباستخدام التحليل الإحصائي الجاهز (23).

٢. النتائج:

١.٢. الاستجابة المناعية غير المتخصصة والخلوية:

١.١.٢. نسبة بروتين الترانسفرين:

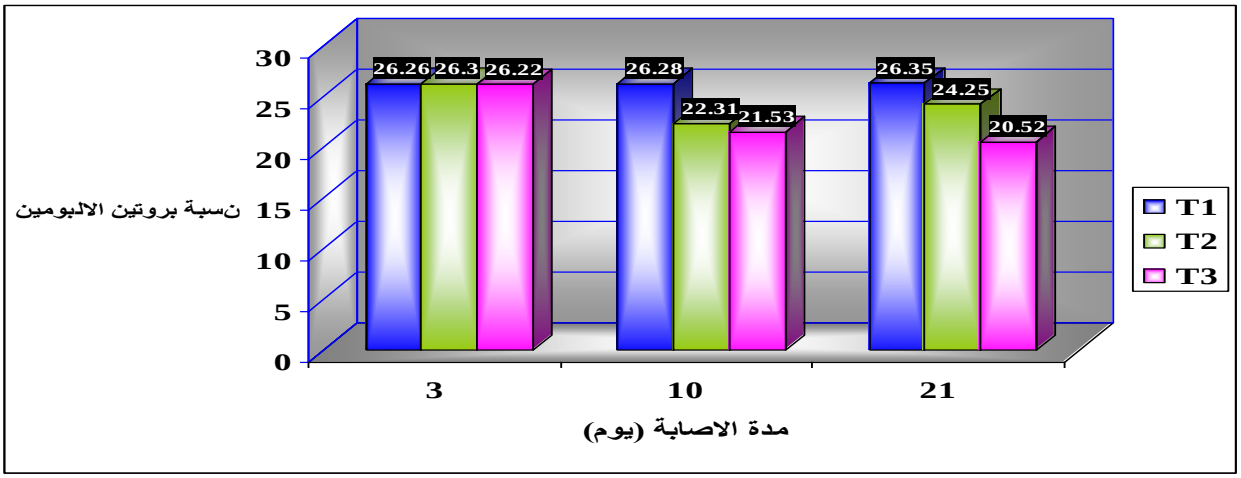
يبين الشـكل رقم (١) وجود فروق معنوية ($P<0.05$) في نسـبة بروتين ترانسـفرين مصـل دم افراخ جميع المعاملات بعد ٣ أيام من الإصـابة، حيث كانت أعلى قيمة للمعاملة T3 وسـجلت 12.62 % تلتها المعاملة T2 وبلغت 11.45 % لتسـجل المعاملة T1 اقل قيمة ومقدارها 9.78 % واسـتمر التفوق المعنوي للمعاملة T3 بعد ١٠ أيام من الإصـابة حيث بلغت 12.69 % في حين سـجلت المعاملتين T2 و T1 11.61 و 10.03 % على التوالي، وعند الوصـول إلى ٢١ يوم من الإصـابة اسـتمر تفوق المعاملة T3 وبفارق معنوي ($P<0.05$) عن بقية المعاملات حيث سجلت 10.19 % تلتها T2 وبلغت 10.05 % لتسجل T1 أدنى قيمة ومقدارها 9.67 % .



شكل (١) تأثير إضافة الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على نسبة بروتين الترانسفرين للمعاملات المختلفة بعد ٣، ١٠،٢١ يوم من الإصابة التجريبية لأفراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium.

2.1.٢. نسبة ألبومين مصل الدم:

نلاحظ عدم وجود فروق معنوية في نسبة ألبومين مصل دم أفراخ المعاملات الثلاثة بعد ٣ أيام من الإصابة حيث كانت أقيامها 26.26 و 26.30 و 26.22 % على التوالي ، أما بعد ١٠ أيام من الإصابة فيلاحظ وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين المعاملات مع تفوق المعاملة T1 تلتها T2 ثم T3 وكانت القيم 26.28 و 22.31 و 21.53 % على التوالي ، واستمر الحال بعد ٢١ يوم من الإصابة بتفوق المعاملة T1 على بقية المعاملات كما مبين في شكل رقم (٢).



شكل (٢) تأثير إضافة الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على نسبة بروتين الألبومين للمعاملات المختلفة بعد ٣ ، ١٠ ، ٢١ يوماً من الاصابة التجريبية لأفراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium

3.1.2. نتائج فحص التحسس المناعي المتأخر في الدلايات والصفاق:

يلاحظ من الجدول (٢) إن المعدلات الحسابية في سمك التثخن لثلاثة أفراخ اظهرت تفاعلا موجباً لمستضد السالمونيلا بالنسبة لمجموعة الأفراخ التي أعطيت الجدار (T2) مقارنة بمجموعة الإصابة بالسالمونيلا فقط (T3) حيث كان سمك تثخن للدلايات 1.36 و 1.21 ملم بعد ٢٤ ساعة من الحقن لكل من T2 و T3 على التوالي. ثم أصبحت القيم بعد ٤٨ ساعة إلى 1.59 و 1.37 ملم مع بقاء تفوق T2 على T3 وكان سمك تثخن الصفاق 1.49 و 1.36 ملم بعد ٢٤ ساعة من الحقن لكل من T2 و T3 على التوالي. وأصبحت القيم بعد ٤٨ ساعة 1.77 و 1.56 ملم مقارنة بأفراخ المعاملة T1 التي حقنت بالمحلول الفسلجي.

جدول (٢) نتائج الاختبار الجلدي بعد ٢١ يوم من الاصابة التجريبية بجراثيم Salmonella typhimurium

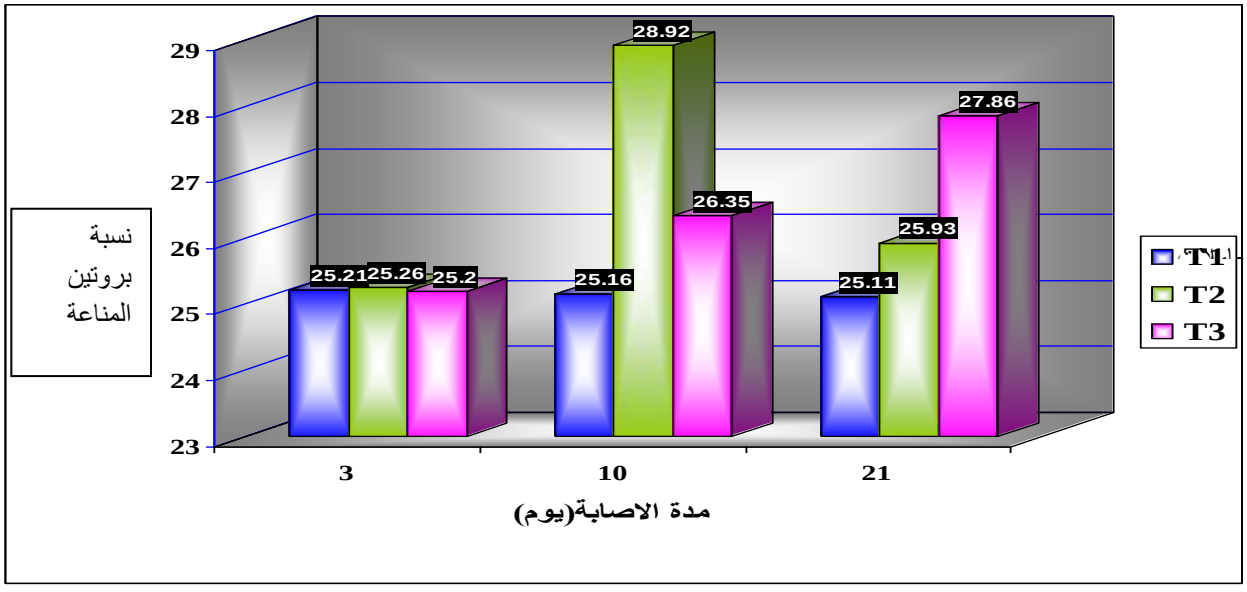
المعاملات	المعدل الحسابي لسمك التثخن			
	التفاعل بعد ٢٤ ساعة (ملم)		التفاعل بعد ٤٨ ساعة (ملم)	
	دلايات	صفاق	دلايات	صفاق
(T1) سيطرة سالبة	–	–	–	–

(T2)سالمونيلا+جدار	1.36	1.49	1.59	1.77
(T3)سالمونيلا فقط	1.21	1.36	1.37	1.56

2.2. نتائج الاستجابة المناعية الخلطية:

1.2.2. نسبة بروتين المناعة σ- globulin:

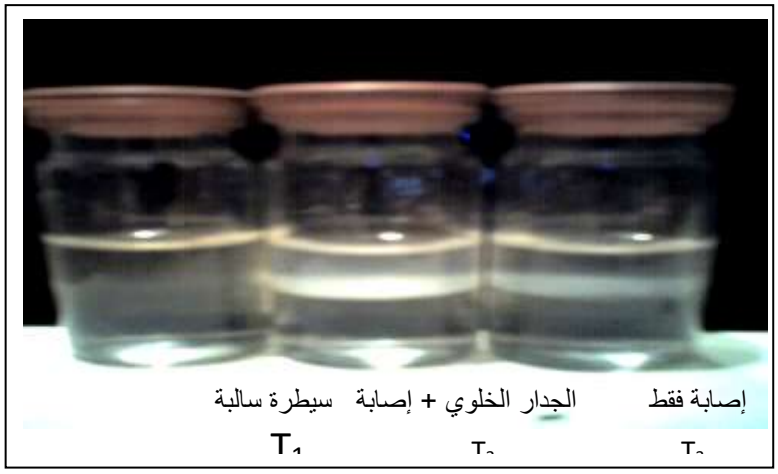
يلاحظ من الشكل رقم (٣) عدم ظهور فروق معنوية في نسبة بروتين المناعة كاما كلوبيولين في مصل دم افراخ جميع المعاملات بعد ٣ أيام من الإصابة ، وبدأت الفروق المعنوية بالظهور في اليوم العاشر من الاصابة حيث نلاحظ تفوق معنوي ($P<0.05$) للمعاملة T2 مسجلة 28.92% تلتها المعاملة T3 إذ سجلت 26.35 % وبفارق معنوي ($P<0.05$) عن افراخ المعاملة T1 التي سجلت اقل قيمة ومقدارها 25.16 % واستمرت الفروق المعنوية ما بين المعاملات الثلاثة عند تقدم العمر الى ٢١ يوم من الاصابة حيث سجلت المعاملة T3 أعلى قيمة إذ بلغت 27.86 % تلتها المعاملة T2 وقد سجلت 25.93 % لتحقق المعاملة T1 أدنى قيمة ومقدارها 25.11 % .



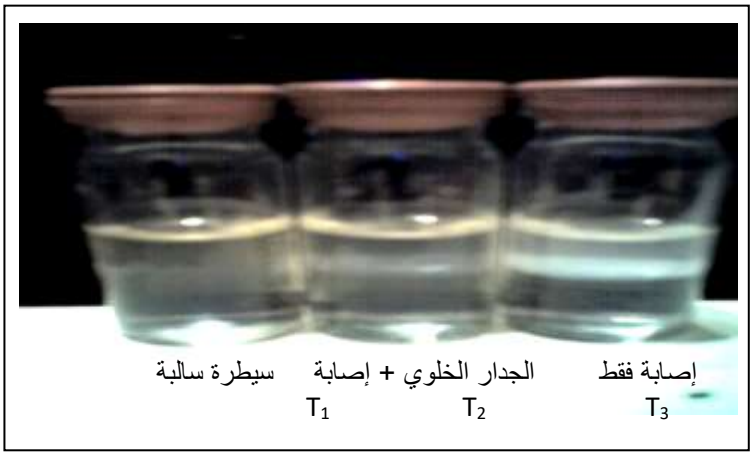
شكل (3) تأثير اضافة الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على نسبة بروتين المناعة σ- globulin للمعاملات المختلفة بعد ٣ ، ١٠ ، ٢١ يوم من الاصابة التجريبية لأفراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium

2.2.2. نتائج اختبار الانتشار المناعي Single Immuno-diffusion:

يتضح من الشكل رقم (4) صورة نتائج اختبار الانتشار المناعي على الهلام بعد ١٠ أيام من الاصابة التجريبية لافراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium حيث يتضح وجود ترسيب مناعي كبير للمعاملة T2 مقارنة مع T3 التي أظهرت ترسيب مناعي منخفض نسبياً عند هذا العمر ، في حين سجلت المعاملة T3 أعلى خط ترسيبي على الهلام بعد ٢١ يوم من الإصابة التجريبية شكل5 وسجلت المعاملة T2 خط ترسيبي اقل عند هذا العمر ولم تسجل أي ظهور للترسيب المناعي للمعاملة T1 كونها معاملة سيطرة سالبة .



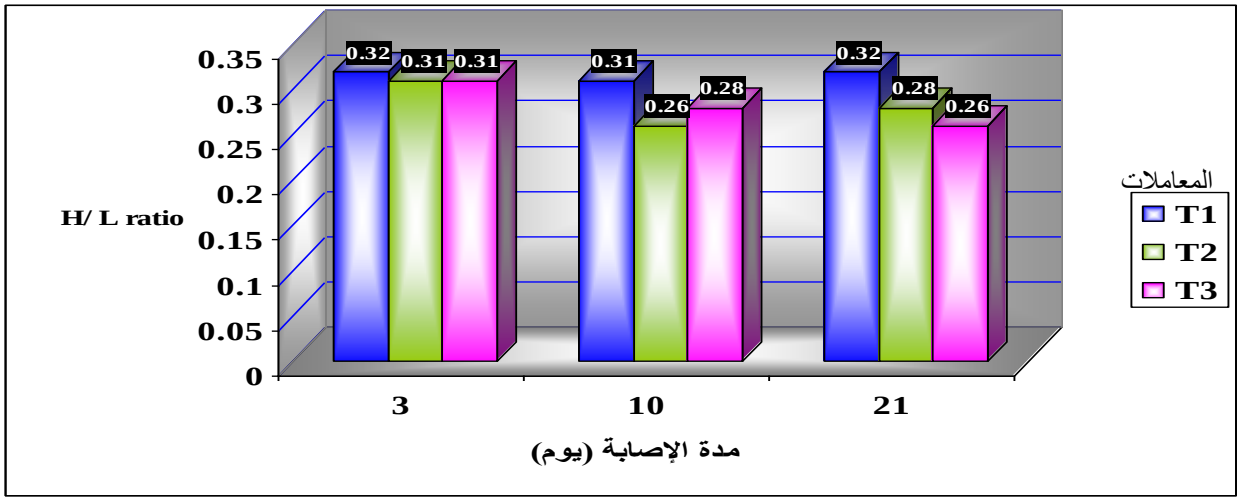
شكل (4) صورة لنتائج اختبار الانتشار المناعي على الهلام بعد ١٠ يوماً من الإصابة بجراثيم *Salmonella typhimurium*



شكل (5) صورة لنتائج اختبار الانتشار المناعي على الهلام بعد 21 يوماً من الإصابة بجراثيم *Salmonella typhimurium*

3.2.2. نسبة خلايا المتغايرات/الخلايا اللمفاوية (H/L ratio):

الشكل رقم (6) يبين عدم وجود فروق معنوية في نسبة خلايا المتغايرات إلى الخلايا اللمفاوية (H/L ratio) بعد ٣ أيام من الإصابة ولجميع المعاملات وظهرت فروق معنوية (P<0.05) بين المعاملات الثلاث بعد ١٠ أيام من الإصابة حيث تفوقت المعاملة T1 وبلغت 0.31 تلتها المعاملة T3 وبلغت 0.28 في حين سجلت المعاملة T2 اقل نسبة ومقدارها 0.26 وعند الوصول إلى ٢١ يوم من الإصابة استمر تفوق المعاملة T1 وبفارق معنوي (P<0.05) عن بقية المعاملات.



شكل (6) تأثير اضافة الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae في نسبة خلايا المتغايرات/الخلايا اللمفاوية (H/L ratio) بعد ٣ ، ١٠ ، ٢١ يوماً من إصابة أفراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium

٣. العد الجرثومي لجراثيم Salmonella typhimurium في محتويات الأمعاء:

إن إعداد جراثيم Salmonella typhimurium في محتويات الأمعاء موضحة بالجدول (3) حيث لم تعزل أي خلية من هذه الجرثومة من محتويات أمعاء أفراخ المعاملة الأولى T1 خلال الاوقات المختلفة لأخذ العينات كونها لم تتعرض لهذه الجرثومة ، أما أفراخ المعاملة الثانية T2 فقد أعطت أعداد عزل جرثومي لجرثومة Salmonella typhimurium مقداره ٩٨ × ١٠٣ خلية/غم من محتويات الأمعاء بعد ٣ أيام من الإصابة التجريبية ومع تقدم الوقت كانت الأعداد تنخفض انخفاضاً حسابياً حيث بلغت أعدادها ٨٧ × ١٠ ٢ و ٨٠ × ١٠ ٢ و ٥٢ × ١٠ ٢ و ٢١ × ١٠ ٢ خلية / غم بعد ٦ ، ١٠ و ١٥ و ٢١ يوماً من

الإصابة التجريبية بجرثومة Salmonella typhimurium ونجد إن هذه الأعداد منخفضة نسبياً مقارنة بمثيلاتها في المعاملة الثالثة T3 التي أعطيت إصابة بالسالمونيلا فقط حيث كانت الأعداد ٣٥ × ١٠ ٥ خلية جرثومة / غم من محتويات الأمعاء بعد ٣ أيام من الإصابة وأخذت بالانخفاض تدريجياً إلى ٣٤ × ١٠ ٥ و ٩٢ × ١٠ ٤ و ٨٩ × ١٠ ٤ و ٣٨ ×١٠ ٤ خلية جرثومية/غم من محتويات الأمعاء.

جدول (3) مستوى العد الجرثومي لجراثيم Salmonella typhimurium في محتويات الأمعاء.

توقيتات اخذ العينات	T1	T2	T3	المعنوية
بعد ٣ أيام	>100 c	103 × 98 b	105 × 35 a	**
بعد ٦ أيام	>100 c	102 × 87 b	105 × 34 a	**
بعد ١٠ أيام	>100 c	102 × 80 b	104 ×92 a	**
بعد ١٥ أيام	>100 c	102 × 52 b	104 × 89 a	**
بعد ٢١ يوم	>100 c	102 × 21 b	104 ×38 a	**

الحروف الصغيرة المختلفة ضمن كل صف تشير إلى وجود فرق معنوي ** عند مستوى $P < 0.01$

٤. الهلاكات:

نلاحظ من الجدول (4) عدم وجود أي هلاك في أفراخ المعاملة T1 خلال مدة التجربة كونها معاملة سيطرة سالبة، في حين نجد أفراخ المعاملة T3 قد سجلت هلاك أربعة أفراخ في الأسبوع الرابع وهلاك فرخين فقط في الأسبوع السادس لذا فان إجمالي أعداد الهلاكات للمعاملة T3 هي ٢٠ / ٦ أما أفراخ المعاملة T2 فلم تسجل أي هلاك.

جدول (4) تأثير إضافة الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae في أعداد الهلاكات بعد الإصابة التجريبية لأفراخ اللحم بجراثيم Salmonella typhimurium

المعاملات	أسبوع ثالث	أسبوع رابع	أسبوع خامس	أسبوع سادس	المجموع الكلي
T1	٠	٠	٠	٠	٠ /٢٠
T2	٠	٠	٠	٠	٠ /٢٠
T3	٠	4	٠	2	٣ /20

٥. المناقشة:

اجري البحث لتحديد دور الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae على الإصابة التجريبية ببكتريا Salmonella typhimurium وتحفيز الاستجابة المناعية، فضلاً عن تحسين الأداء الصحي لأفراخ الدجاج المصاب تجريبياً بجرثومة Salmonella typhimurium ، حيث جرعت الأفراخ بمقدار 1 مل (٦ × ١٠٧ CFU) لكل طير فموياً من جرثومة Salmonella typhimurium ، واستخدام الجدار الخلوي بمقدار ٣٠ غم/ ١٠٠ كغم من العلف لملاحظة تأثيره على الإصابة التجريبية بهذه الجراثيم. أظهرت مجموعة الدجاج التي أصيبت Salmonella typhimurium علامات سريريه واضحة وهي الخمول، نفوش الريش، إسهال، تجمع الفضلات حول المجمع، قلة استهلاك العلف والماء وعدم القدرة على الحركة وهذا يتفق مع الأعراض المسجلة لمثل هذه الإصابة (2) .

1.٥ الاستجابة المناعية غير المتخصصة والخلوية:

أشارت اغلب الدراسات إلى إن المناعة الخلوية لها الدور الرئيسي في الحماية ضد الإصابة بالسالمونيلا (24)، إن الاستجابة المناعية الأولية تتميز بتداخل بين عناصر مناعية غير متخصصة متمثلة بالعدلات Neutrophils وخلايا البلعم الكبير Macrophages والخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cells (NK) وعناصر متكيفة Adaptive متمثلة بخلايا T-cell (25) وعليه فان أول الخلايا التي تواجهها البكتريا عند دخولها للجسم هي خلايا العدلات وتوازيها في الدجاج خلايا مشابهه لها تسمى المتغايرات Heterophiles التي لها دور في الدفاع عن الجسم ضد الجراثيم (26)، وعندما تكون الجراثيم ذات ضراوة عالية فان المتغايرات تخفق في قتلها في موقع الخمج الأول وبالتالي تنتشر الجراثيم في الجسم،

بعد هذه المرحلة تحدث عملية بلعمة الجراثيم من قبل الخلايا البلعمية، يؤدي ß– glucan دوراً مهماً في هذه العملية من خلال ارتباطه بالمستقبلات الموجودة على سطح الخلايا البلعمية والخلايا القاتلة NK ويتداخل مع جزيئاتها ثم يتم تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية المساعدة (CD4+ TH1) مما يؤدي إلى إفرازها للمدورات الخلوية Cytokines مثل الانترفيرون الفاσ–INF والانترلوكين IL1، و IL 2 حيث يعمل الأول الذي ينتج من الخلايا القاتلة على تحفيز الخلايا البلعمية لإنتاج عدة عوامل منها عامل التنخر السرطاني (Tumor Necrosis Factor (TNF_ α) و Nitric oxide و hydrogen peroxide التي تسهم في التخلص من الجراثيم داخل وخارج الخلية ، كما يقوم الكلوكان بتحفيز إنتاج الخلايا المناعية من مصادرها الأساسية في نقي العظم (Bone marrow) إلى مجرى الدم ومنها إلى الأعضاء اللمفاوية المختلفة في الجسم (27,28) .

وأشار (29) إلى إن الكلوكان له القدرة على تحفيز استجابة مناعية خاصة تعرف بفعالية المنشطرات Mitogenic activity التي تحفز الخلايا المناعية في الدخول لطور الانقسامات الخلوية وهذا يؤدي إلى زيادة فعالية الخلايا القاتلة الطبيعية Nk وخلايا T–cell (30).

ومن نتائج تجربتنا نلاحظ إن بروتين الترانسفرين قد ارتفع تركيزه في مصل دم أفراخ المعاملة T3 وبفارق معنوي ($P<0.05$) عن T1و T2 بعد اليوم ٢١،١٠،٣ من الإصابة وهو من البروتينات ذات المقاومة الجرثومية غير المتخصصة. نسبة هذا البروتين في مصل أفراخ المعاملة T2 فكانت منخفضة مقارنة بالمعاملة T3 مما يبين دور الجدار الخلوي للخميرة في تقليل شدة الإصابة وبالتالي عدم ارتفاع تركيز هذا البروتين، ويتفق هذا مع (31) من أن استخدام مادة ß–1,3–Linked glucopyranose polymer المعزولة من الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae تعمل على تحفيز البلعميات وعلاج الإصابات الخمجية. وكذلك لوحظ ارتفاع في تركيز هذا البروتين بالدم لأفراخ المعاملة T3 كمؤشر لحدوث الالتهاب نتيجة التجرثم الدموي Septicaemia وهذا يتفق مع ما أشارت إليه (32) .

وفيما يتعلق بنسبة ألبومين مصل الدم فيلاحظ ارتفاع نسبته في دم أفراخ المعاملة T1 كونه البروتين الرئيس في بروتينات الدم وله دور مهم في استقرار الجسم ويعتبر خزين جيد للأحماض الامينية كما ويعد مؤشر جيد للحالة الصحية والإنتاجية للدجاج (٢١)، في حين يلاحظ انخفاض نسبة هذا البروتين في دم أفراخ المعاملة T3 وبفارق معنوي عن المعاملتين T1 و T2 نتيجة الإصابة التي تسهم في تثبيط عمل الكبد في تصنيع البروتينات المختلفة نتيجة الضرر الحاصل فيه (33)، أما نسبته في أفراخ المعاملة T2 فكانت اقل من T1

وأعلى من T3 ويرجع ذلك إلى دور مكونات الجدار الخلوي للخميرة في زيادة تركيز هذا البروتين وإعادة موازنة نسبته في الجسم من خلال خفض شدة الإصابة التجريبية وهذا يتفق مع (34) إذ وجدوا إن إعطاء Mannanoligosaccharides بنسبة 0.11 % في عليقه دجاج أمهات البياض يؤدي إلى زيادة نسبة البروتين في البيضة، كما وان ارتفاع الألبومين في دم أفراخ المعاملة T2 بعد ١٠ أيام من الإصابة من اجل تعزيز إنتاج كاما كلوبيولين في هذه الفترة.

من خلال فحص الدلايات والصفاق لاحظنا استجابة خلوية جيدة، حيث اجري الفحص الجلدي بعد ٢١ يوم من التجريع ويشير جدول ١ إلى إن المعدلات الحسابية أظهرت تفاعلاً موجباً لمستضد السالمونيلا بالنسبة لمجموعة الأفراخ التي أعطيت الجدار (T2) مقارنة بمجموعة الإصابة بجرثومة السالمونيلا فقط (T3) حيث كان سمك التثخن للدلايات 1.36 و 1.21 ملم بعد ٢٤ ساعة من الحقن لكل من T2 و T3 على التوالي مع بقاء تفوق T2 على T3 بسبب دور الجدار الخلوي للخميرة في تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية، ثم ارتفعت هذه الاقيام بعد ٤٨ ساعة وقد يعود ذلك إلى التواجد الكثير لجرثومة السالمونيلا في السوائل خارج الخلوية (35) حيث تنتشر في الجسم عن طريق الدم مسببة تجرثماً دموياً Septicaemia فيحاول جسم المضيف التغلب على هذه الحالة ، وعليه لا يحصل ارتشاح شديد لهذه الخلايا في منطقة الإصابة خلال ٢٤ ساعة مقارنة بإصابات جرثومية أخرى، ويعود ذلك إلى الدور الذي يلعبه الجدار الخلوي للخميرة والمكون من سكري الكلوكان والمانان في تنشيط الخلايا اللمفية التائية المساعدة T-helper cells والتي بدورها تعمل على تحفيز وتنشيط الخلايا البلعمية حيث تصبح أكثر قدرة على عملية البلعمة (27,28) ثم انخفضت هذه الاقيام للقراءات التي اجريناها بعد ٤٨ ساعة مع بقاء تفوق T2 على T3، إن السبب في ارتفاع قيمة المعدل الحسابي لسمك التثخن ثم انخفاضها قد يعود إلى طبيعة جرثومة السالمونيلا حيث تبقى متواجدة داخل الخلايا وفي محاولة الجسم السيطرة على الجرثومة تحدث استجابة خلوية سريعة من خلال ارتشاح شديد للخلايا وحيدة النواة Monocytes إلى منطقة الإصابة بعد ٢٤ ساعة مما يشير إلى تحفيز مناعي جيد وهذا يتفق مع (36) في تفسير آلية التثخن الجلدي حيث سيتم إنتاج المدورات الخلوية التي بدورها تجذب البلاعم الكبيرة Macrophages في مكان الفحص الجلدي وتمنع هجرتها بوساطة عامل مانع هجرة البلاعم بالإضافة إلى جذب الخلايا القاعدية Basophils والبدينه Mast cells وبدورها تفرز الهستامين الذي يوسع الأوعية الدموية ويزيد نفوذيتها مما يعجل من هجرة الخلايا وحيدة النواة إلى منطقة الإصابة (37)، ونفس الشيء حصل لسمك تثخن الصفاق.

2.5 الاستجابة المناعية الخلطية:

أما الاستجابة المناعية الخلطية فقد تمثلت بارتفاع تركيز بروتين المناعة كاما كلوبيولين في مصل دم أفراخ المعاملة T2 بعد ١٠ أيام من الإصابة بجرثومة السالمونيلا حيث يلاحظ ارتفاع تركيز كاما كلوبيولين في مصل دم أفراخ المعاملة T2 بعد ١٠ أيام من الإصابة مقارنة بالمعاملة T3 مما يشير إلى حصول تحفيز مناعي جيد ضد جراثيم السالمونيلا وذلك لدور الجدار الخلوي للخميرة في تحفيز إنتاج الأجسام المضادة Immunoglobulinsالتي تؤدي دوراً مهماً كعامل مساعد في عملية البلعمة Phagocytosis حيث تعمل الأجسام المضادة على جذب الجراثيم للخلايا البلعمية من اجل التهامها (4,27,28) وهذا يتفق مع (25) إذ وجدوا إن الأجسام المضادة لجراثيم السالمونيلا تبدأ تتحفز بعد ٤ أيام وتصل القمة خلال مدة ١٠-١٤ يوماً من الإصابة وهذا أيضا يتوافق مع نتائج فحص الانتشار المناعي على الهلام Immuno diffusion حيث نجد أن أكثر انتشار مناعي قد حصل للمعاملة T2 بعد ١٠ أيام في حين ارتفعت للمعاملة T3 بعد ٢١ يوماً ، ويؤكد ذلك أيضاً نتائج فحصH/L ratio حيث ظهر انخفاضا معنويا في هذه النسبة في دم أفراخ المعاملة T2 لانخفاض الإجهاد الناتج من الإصابة التجريبية وفي نفس الوقت كمؤشر لزيادة أعداد الخلايا اللمفاوية المسئولة عن المناعة (38)، مما يشير لدور الجدار الخلوي للخميرة ومكوناته مثل ß-glucan في تسريع الاستجابة المناعية الخلطية من خلال تحفيز إنتاج الأجسام المضادة التي تعمل على طهي Opsonizing الجراثيم وتحضير عرضها على الخلايا البلعمية لالتهامها (39,28).

3.5 الهلاكات:

يلاحظ انعدام الهلاكات لأفراخ T2 وذلك لارتفاع مستوى المناعة عن طريق تنشيط الاستجابة المناعية المتخصصة وغير المتخصصة وهذا يتفق مع (40) حيث وجدا إن إضافة ß(1-6,1-3) كلوكان المشتق من جدار خميرة Saccharomyces cerevisiae إلى عليقة فروج اللحم يقلل من نسبة الهلاكات المتسببة عن الأمراض التنفسية التي تحصل بسبب بكتريا Escherichia coli.

وفي حالة الاصابة بجراثيم السالمونيلا فإنها تمثل مشكلة صحية حيث تسبب تدهوراً في الصفات الإنتاجية لما تسببه الجرثومة من قلة شهية وهزال وخمول (41) إضافة إلى أن الجرثومة تحدث ضرراً في نسيج بطانة الأمعاء لأنها من الجراثيم الانتهازية ولها قابلية استيطان وغزو بطانة الأمعاء ثم الدخول للدورة الدموية، وتهلك الأفراخ عندما تصل أعداد كبيرة من الجراثيم إلى الكبد والطحال وأيضاً نتيجة الصدمة السمدمية (Septecemic shock) (42) إضافة للسموم التي تنتج من قبل هذه الجرثومة (43) .

٤.5 العد الجرثومي لجراثيم Salmonella typhimurium في محتويات الأمعاء:

أما بالنسبة للطرح الجرثومي من محتويات الأمعاء فيلاحظ ارتفاعاً معنوياً في أعداد جراثيم السالمونيلا بعد ٣ أيام من الإصابة لأفراخ المعاملة T3 وهذا يتوافق مع نتائج (44) وذلك لان بيئة الأمعاء مناسبة لنمو هذه الجراثيم.

أما سبب انخفاض أعداد هذه الجراثيم لأفراخ المعاملة T2 وذلك لدور مركبات الجدار الخلوي للخميرة (سكري المانان والكلوكان) حيث تعمل هذه السكريات كمادة جاذبة للجراثيم المعوية، إذ تقوم بالإحلال محل النسيج الظهاري أي غلق مواقع ارتباط الجراثيم بالخلايا الظهارية للأمعاء من خلال عملها كمادة رابطة للكتينات الموجودة على سطح الخلية الجرثومية وبالتالي طرحها خارج الجسم وينتج عنها تأثير جيد بغسل جدار الأمعاء وتمنع تخريب الزغابات المعوية وتغيير شكلها ومن ثم تحسين الامتصاص(45) كما تعمل هذه السكريات على تحفيز الاستجابة المناعية الموضعية للأمعاء (28) وان وجودها يكون مساندا للعصيات اللبنية في إيصال البيئة الداخلية للأمعاء إلى التوازن الجرثومي المناسب(46).

6. الاستنتاجات:

إن استخدام الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae بتركيز ٣٠ غم/١٠٠ كغم علف قد سرع الاستجابة المناعية الخلوية من خلال زيادة سمك تثخن الدلايات والصفاق مقارنة بمجموعة الإصابة، أيضاً فأن استخدام الجدار الخلوي لخميرة Saccharomyces cerevisiae بتركيز ٣٠ غم/ ١٠٠ كغم علف قد سرع الاستجابة المناعية الخلطية من خلال زيادة أعداد الخلايا اللمفاوية وانخفاض نسبة H/L مع زيادة نسبة بروتين المناعة σ– globulin الذي تم قياسه بطريقة الترحيل الكهربائي. كذلك أفاد استخدام الجدار الخلوي للخميرة في تقليل شدة الإصابة التجريبية بجرثومةSalmonella typhimurium في أفراخ اللحم من خلال خفض نسبة الهلاكات وتقليل أعداد الجراثيم المرضية في محتويات الأمعاء.

References

1. Bermudez, A.J. (2003). Principles of Diseases Prevention:Diagnosis and Control.Diseases of Poultry 11th ed. Saif, Y.M.; Barnes, H.J.; Glisson, J. R.; Fadly, A.M.; McDougald, L.R. and Swayne, D.E. ed. Iowa State Press, Ames. Poult. Dis. Pp: 3-6

2. Gast,R.K. (2008). Paratyphoid infections. In “Diseases of Poultry”. 12th Ed., Iowa State Univ. Press. Blackwell Publishing Company, Iowa, USA. Pp: 583-600.

3. Randall, L. P. and Ward, M. J. (2001). Role of the marlocus in Virulence of Salmonella enterica serovar typhimurium DT 104. In chickens. J. Med. Microbiol., 50:770-779.

4. Masteronie,J.A. ; Harrison ,C.E. and Hormaeache ,A.(1994). Natural resistance and acquired immunity to Salmonella. Fundamental and clinical Immunology. 2 (2):83-94.

5. Arcangioli, M.; Sertin, S. ; Martel, J. And Dancla, E.(2000). Evoluation of clormphinicol resistance with emergency of cross rresistance to florfenicol in bovine Salmonella typhimurium strains implication definitive Phage type (DT) 104. J. Med. Microbiol., 49: 103-110.

6. Safalaoh,A.C.L.(2006). Body weight gain, dressing percentage, abdominal fat and serum cholesterol of broilers supplemented with a microbial preparation AF.J. Food Agriculture Nutrition and development. 6 (1): 173-179.

8. Fleet,G.H. (2006).The commercial and community significance of yeast in food and Beverage production.The yeast Handbook: yeasts in food and Beverages © Springer–verlag Berlin, Heidelberg. 9. Vetvicka,V.; Bohuslave Dvorak ; Jana Vetvickova Jan Richter ; Jiri Krizan ; Petrsima and Jean–claude Yvin (2007) . Orally administration of marine (1->3) –ß-D- glucan phycarine stimulates both humoral and cellular immunity. International journal of biological macro molecules. 40: 165-174.

10. Harrigan, W.F.and McCance, M.E. (1976). Laboratory Methods in Microbiology. Academic press. London, UK.

11. Work, E. (1971). Cell walls methods in microbiology. 3rd Ed. By Novis, J.R. and Ribbons D.W., Academic press Inc.,NewYork. USA. P.p:361 – 418.

12. Bhatia ,T.R.S. ; McNabb ,C.D.; Wyman, H. and Nayar , G.P.S. (1979). Salmonella isolation from litter as an indicator of flock and carcass contamination. J. of Avian Dis. 24(4): 838-847.

13. Quinn, P.J.; Markey, B.K.; Carter, M.E.; Donnelly, W.J.C. ; Leonard, F.C. ; and Maghire, D.(2006). Veterinary microbiology and microbial diseases. 6th ed. Blackwel Sci. Ltd, Blackwell publishing company, Great Britain.

14. Barrow , P.A.;Simpson ,J.M. and Lovell ,M.A.(1988) . Intestinal colonization in the chicken by food poisoning Salmonella serotypes ;Microbial characteristics associated with faecal excretion. Avian .Pathol .17:571-588

15. Cruick shank , R.; Duquid, J.P. ; Marmoin , B.P. and Swain, R.H. (1975). Medical microbiology 12th ed. Churchill Livingstone Edinburg London and N.Y. Pp: 403-419.

16. Miles ,A.A. ; Misra, S.S. and Irwin, J.O. (1938). Estimation of bacterial power plate. J. Hyg. Camp. 38:739 – 749. Cited by Quinn,P.J. ; Carter , M.E.; Markey ,B.K. and Carter ,G.R.(1998).Veterinary Microbiology and microbial disease. 4th ed. Blackwel Sci. Ltd, a Blackwell publishing company Great Britain. Pp: 174.

17. Pivinick , H.;B. Blanchfield , and J.Y. D'Aoust (1981) . Prevention of Salmonella infection in chicks by pretreatment with fecal cultures from mature chickens (Nurmi culture).J. food protect.44 (12):909-916.

18. Halliburton, B. L. and Blazkovec, A. A. (1975). Delayed hypersensitivity and acquired cellular resistance in guinea pigs infected with Listeria monocytogenes. Infect. Immun. 11:1-7.

19. Shen ,P.F. and Patterson ,L.T. (1983). A simplified wright's stain technique for routine Avian blood smear staining. Poult.Sci. 62:923-924.

20. Burton,R.P. and Guion , C.W.(1968). The differential Leukocyte blood count: its precision and individuality in the chicken .Poultry Sci.47:1945 –1949.

22. Tizard, I.R.(1996).Veterinary Immunology: An Introduction,5thed.,W.B.Saunders company. Philadelphia, U.S.A. Chap.18: Serology: The detection and measurement of antibodies.

23. SAS (2001). SAS / STAT Users Guide for Personal Computer. Release 6.18. SAS Institute, Inc., Cary, N.C., USA.

24. Habasha, F.G.; Smith, B.P. ; Schwartz, L. ; Ardans , A. and Guerra , M.R. (1985). Correlation of macrophage migration inhibition factor and protection from challenge exposure in calves vaccinated with Salmonella typhinmurium. Am. J. Vet. Research. 46(7):1415-1421.

25. Mitove, I.; Denchen,V. and Linde, K. (1992). Humoral and cell mediated immunity in mice after immunization with live oral vaccines of Salmonella typhimurium: auxo trophic mutans with two attenuating markers vaccine. J.Exp.Med. 10:61-66.

26. Powell, P. (1987). Macrophages and other non lymphoid cells contributing to immunity .In :Avian Immunology Basis and Practice edit .Toivanen , A. and Toivanen ,P.CRC.Press .Inc.Boca Rota. Pp: 206. 27. Jamous, F. ; Ferrieres, V. ; Guegan, J.P. ; Yvin,J.C.; Plusquellec ,D. ,vetvicka, v. (2004). Glucan like synthetic oligosaccharides and immunostimulatory effects. J. Biochem. Glycobiology 15: 393-407. 28. Hunter , K.; Gault, R. and Jordan, F. (2001). Mode of action of B-Glucan immunopotentiators– research summary release. Department of Microbiology, University of Nevada school of Medicine. 29. Williams, D.L.; Broder I.W., and Dilzio (2004). Beta glucan pro enzyme nutrition http//www. Bet /gtuc/ n.org/ history.

30. Browder, W.; Williams, D. and Preus, H. (1990). Beneficial Effect of Enhanced Macrophage function in the trauma patients. J. Ann. Surg.; vol. 211:605-613. Dept of surg and physiol,Tulane U Sch of Med, LA and Institute Di chirurgia D' Urgenza , U of Torino , Torino ,Italy.

32. Dunn,P.L. and North ,R.J.(1991). Early r-interferon production by natural killer cells is important in defence against murine Listeriosis .Infect .Immun. 59 85 – 102.

33. Zaghini, A. ; Martelli, G. ; Rooncada, P.; Simioli, M. and Rizzi, I. (2005). Mannan oligosaccharides and aflatoxin B1 in feed for laying hens: Effect on Egg , and Aflatoxin B1 levels in liver. Poult. Sci. J.; 84: 825 -832.

34. Gallois, J.L.;Thomas, A.M. and Steven, N.S. (2001).Immunological and pathological study of Salmonella. J.Immunol. 168: 2235-2245.

35. Vetvicka,V. and Vetvickova, J. (2007). Evaluation of the Immunological Activities of commercially available (1->3) –ß-D- glucan. JANA,Vol.10, No.1.

36.Tizard, L. (1982). An introduction to veterinary immunology. 2nd Ed .W.B.Saunders .Co.Canda.P.:300. 37. Ramzi, C.; Vinayak and Stanely, L.R. (1994). Robbin's pathological basis of diseases, 5th ed.Philadelphia, London, Toronto, Montreal.Tokyo, P.:1754.

38. Gross ,W.B. and Siegel, H.S. (1983). Evaluation of Heterophile/ Lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. J. Avian dis.; 27: 972 -979.

39. Thornton,B.P.;V.Vetvicka ,M.Pitman ,R.C. Goldman, and G.D. Ross ,(1996). Analysis of the sugar specificity and molecular location of the ß-glucan – binding site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18).J.Immuol.,156:1238-1245.

40. Huff, G.R. ; Huff, W.E. ; Rath, N.C. and Tellez, G. (2006). Limited treatment with beta – 1,3/1,6- glucan improves production value of broiler chickens challenged with Escherichia coli .Poult.Sci.;85(4):613-618.

41. William ,J.E.(1978).In disease of poultry 7th ed Hosted , M.S.Calneck ,B.W. ;Hembodldt ,C.F. Raid , M.W. and Yoder ,H.W.(eds) Pp: 117-1120 .Iowa .U.S.A.

42. Zhang-Barbara , L . ; Turner, A.K. and Barrow , P . A . (1999). Vaccination for contol of Salmonella in Poultry Vaccine.J. Poult .Sci. 17:2538-2545. 43. Muir,W.I.;Bryden,W.L. and Hudband , A.J.(2000). Immunity , vaccination and the avian intestinal tract .Develop.comparat. Immune 24:325-342.

45. Wysong, D.L. (2003). Rational for probiotics supplementation (www.wysong.net).

46. Nurmi, E. and Rantala, M. (1973). New aspects of Salmonella infection in broiler production. Nature. 241: 210-211.

المصادر العربية:

٧. الروشان، سالم حسين (٢٠٠٦). استخدام بعض المعالجات في تقليل اثر الافلاتوكسين في افراخ اللحم. اطروحة دكتوراه – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

٢١. الشديدي، شهرزاد محمد (٢٠٠١). تأثير استخدام نسب من خميرة الخبز والعلف المخمر بها على الأداء الإنتاجي والصفات النوعية لفروج اللحم. رسالة ماجستير – كلية الزراعة – جامعة بغداد.

٣١. رشيد، آمنة حميد (١٩٩٨). فصل بروتينات اللاكتوفرين من لبأ الأبقار وتنقيته وتوصيفه ودراسة فعالية بعض أنواع البكتريا المرضية. رسالة ماجستير– كلية الزراعة– جامعة بغداد.

٤٤. القطان، غادة عبد الخالق (٢٠٠٦). تحضير مرادف حيوي من خميرة الساكرومايسس واستخدامه في خفض الإصابة التجريبية بجراثيم السالمونيلا في أفراخ اللحم. رسالة ماجستير– كلية الطب البيطري– جامعة بغداد.