تأثيراستخدام المعززا تـ الحيويةكمحفزا تـ مناعية في الحملان الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1

اسعد جاسم عبد العمريو عفاف عبد الرحمن يوسف
كلية الطب البيطر ي/ جامعة بغداد

الخلاصة

صممت هذه الدراسةلمعرفة تأثير المعززات الحيو ية واستخدامهاكمحفز ا ت مناعية لرفع الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية في الحملان الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1. تضمنت التجربة استخدام 15 حملاً بأعمار مابين (5–8 شهور)،قسمت بالتساوي إلى ثلاثة مجاميع.

أظهرت الفحوصات السريرية ارتفاعاً في معدلات درجات الحرارة ومعدلات ترداد التنفس والنبض في المجاميع الملقحة ولكن المجموعة الثانية سجلت أعلى المعدلات. ولم يطرأ أي تغيير على مجموعة السيطرة. أظهر ت الحملان استجابة مناعية خلطية في المجاميع الملقحة حيث أعطى فحص الروزبنكال (RBT) نتائج موجبة، أما باستخدام فحص التلازن الدموي المنفعل (PHA) فقد سجلت المجموعة الأولى أعلى مستوى معيار حجمي للأجسام المضادة ما بين (151.991 ± 524.80) مقارنة بالمجموعة الثانية وبفارق معنوي ($P<0.05$). وقد أظهر ت 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 الأولى بفارق اكبر مما في المجموعة الثانية ($P<0.05$) أما اختبار تشكل الزهرة E-rossete فقد أظهر ت المجموعة الأولى ارتفاعاً بنسبة الخلايا اللمفاوية الفعالة حيث بلغت (4.028± 46.508)و المجموعة الثانية ونسبتها (3.6865 ± 41.22).وقد لوحظ زيادة في تركيز بروتين مصل الدم الكلي Total serum protein فكانت الزيادة اكبر في المجموعة الأولى حيث بلغ معدلها (0.2177 ± 8.9108) عما في المجموعة الثانية و مجموعة السيطرة.

البحث مستل من رسالة ماجستير للباحث الأول.

Effect of uses of Probiotic as immunostimulator in lambs vaccinated with *Brucella melitensis* Rev-1 vaccine

A. J. A. Al- Umary and A. A. Yousif
College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

Abstract

This study was conducted to investigate the effect of probiotic used as immunostimulator to improve the humeral and cellular immune response in lambs vaccinated with the Rev-1 vaccine.

The experimental study included 15 lambs (age 5-8 months) were equally divided into two groups and treated as following.

Clinical and immunological tests were conducted to all lambs at 0 time and after 2,6,10,14 weeks. the results of clinical tests revealed that there is increase in body temperature, respiratory and pulse rates of vaccinated animals only but the second group show the highest parameters. The control did not show any change.

The vaccined 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 (524.80±151.911) than the second 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 (46.508±4.028) compared with second (41.22±3.6865). Serum total protein concentration was increased in first group (8.9108±0.2177) compared with second group and control group.

المقدمة

المعززات الحيوية Probiotics وهي عبارة عن الجراثيم التي توجد بصورة متعايشة وبشكل واسع في الإنسان والحيوان Normal flora، ان الاهتمام الكبير باستعمالها كمحفزات مناعية في السنين الأخيرة يعود إلى امتلاكها مواصفات التحفيز المناعي Immune stimulating properties من خلال تحفيز المناعة الخلطية والخلوية على حد سواء (1,2,3) .حيث لوحظ هناك أنواع محددة من عتر جراثيم حامض اللبنيك لها القابلية على تحفيز الجهاز المناعي (4) و أشار(5) إلى أهمية استعمال المعززات الحيوية في المجترات وذلك للتزايد المستمر باستخدام المضادات الحياتية Antibiotics ومحفزات النمو مع غذاء الحيوانات ، وهذا ولد مشاكل كبيره وتأثير واضح على صحة الحيوان لذا فان استعمال المعزز الحيوي يقلل من هذه المشاكل وبذلك يقلل من التأثيرات السلبية الناتجة من استخدام المضادات الحياتية في الحيوانات(6).

وجد ان استخدام المحفزات المناعية مع اللقاحات يؤدي إلى زيادة الاستجابة المناعيةوا ٍعطاء المضيف القدرة على مقاومة الإصابة بالجراثيم(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 (8).

ومن أهم أهدا ف هذا البحث هو دراسة تأثير إعطاء المعزز الحيوي(التجاري) على الاستجابة المناعية في الحملان الممنعة بلقاح البروسيلا المالطية Rev-1.

المواد وطرائق العمل

1. **اللقـــاح:** اســتخدم لقــاح *Brucella melitensis* strain Rev-1 والمنــتج مــن شــركة CZ Veterinaria,Spain. الاسبانية تم الحصول علية من الشركة العامة للبيطرة.
2. **تحضير مستضد البر وسيلا** Brucella antigen:حضر المستضد حسب طر يقة (9)، واستخدم في الاختبار الجلدي وفي اختبار فحص التلازن الدمى المنفعل (غير المباشر) (P H T).
3. **المعزز الحيوي التجاري:** تم الحصول على المعزز الحيوي Labazyme والمنتج من قبل شركة ديهان الكورية والذي يحتو ي الغرام منه على:

Lactobacillus acidophilus	2.75×10^{10} CFU
Streptococcus fascium	8.25×10^{10} CFU
Bacillus subtilis	1.1×10^{10} CFU
Protease	2.750 CSU
Amylase	5.500 CSU
Cellulase	27.5 FPU

4. **تصميم التجربة:**أجر يت الدراسة على الحملان حيث اختير(15) حملا من الإناث والذكور بعمر 5–8 شهر، و غذيّ هذه الحيوانات على الأعلاف الخضراء والأعلاف المركز ة، أجريت الفحوصات البكتيرية والطفيلية والمصلية عليها قبل البدء بالتجربة للتأكد من سلامتها من الأمراض. ثم قسمت إلى ثلاثة مجاميع بالتساوي.

الأولى: (مجموعة المعزز الحيوي+اللقاح) أعطيت المعزز الحيوي وبجرعة 1غماحمل عن طريق الفم يومياً طيلة أسابيع الدراسة ثم لقحت الحيوانات بلقاح الحمى المالطية Rev-1 وبجرعة 1 مل يحتوي على (2×10^9)CFUخلية حية تحت الجلد بعد أسبوع من إعطاء المعزز الحيوي.

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

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

أجريت الفحوصات والاختبارات المناعية وبالشكل التالي:

1. **الفحوصات السريرية:** تم فحص الحيوانات سريريا لملاحظة التغيرات التي تظهرها وتم حساب معدلات درجة الحرارة والنبض والتنفس قبل إعطاء اللقاح وبعده ولمدة أسبوع. كما تمت مراقبة الحملان طول فترة البحث(14 أسبوعا). ثم جمعت عينات الدم من الوريد الوداجي بمقدار (10سم3) من الدم (للحصول على المصل) من كل حيوان قبل إعطاء اللقاح بأسبوع وبعد (2 ،6 ،10 ،14) أسبوعا من إعطاء اللقاح، ووضع المصل في أنابيب زجاجية وحفظ في درجة حرارة (–20م°) لحين إجراء الاختبارات المناعية.
2. **الاختبارات المناعية:**

A: اختبار الروزبنكال (RBPT) : اجري هذا الاختبار حسب طريقة (10).

B: اختبار التلازن الدمو ي المنفعل (غير المباشر): اجري هذا الاختبار حسب طريقة (11).

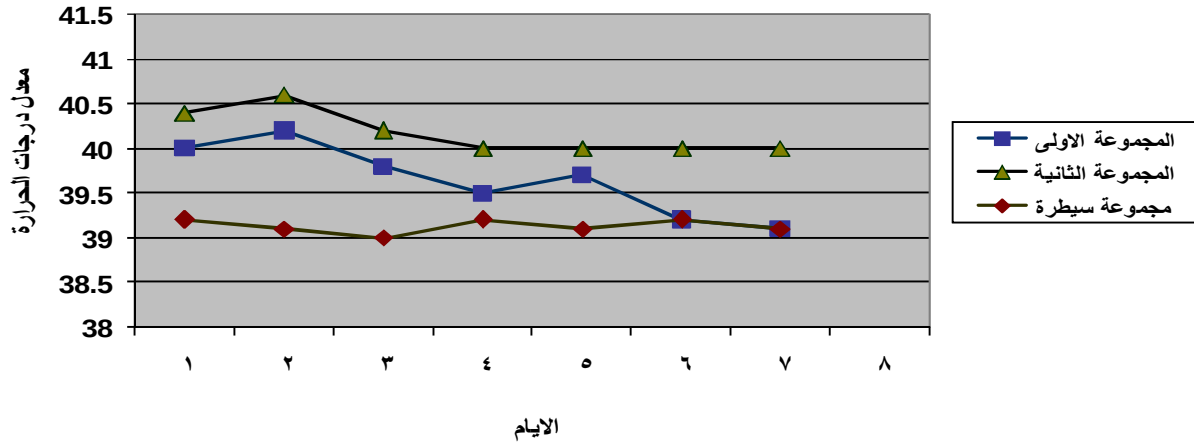
C: اختبار الحساسية الجلدي المتأخر Delyed type hypersensitivity test(DTH): اجري هذا الاختبار على الأغنام حسب طريقة (12).

D: اختبار تشكل الزهرة E-Rosette:اجر ي حسب الطريقة التي ذكرها (13).

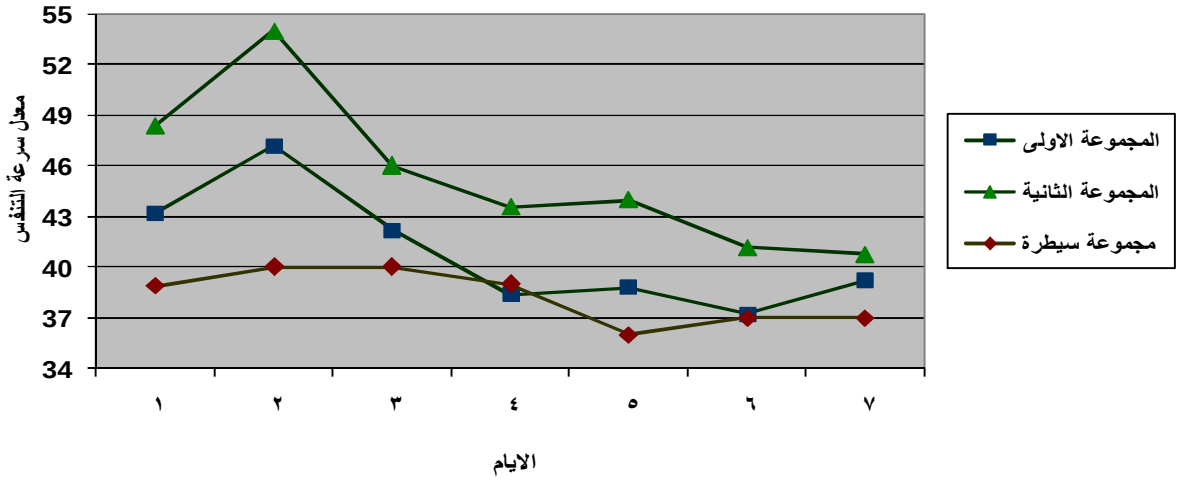
3. **قياس البروتين الكلي:** وللكشف عن البروتين الكلي في مصل الدم استعملت طريقة (14).

النتائج

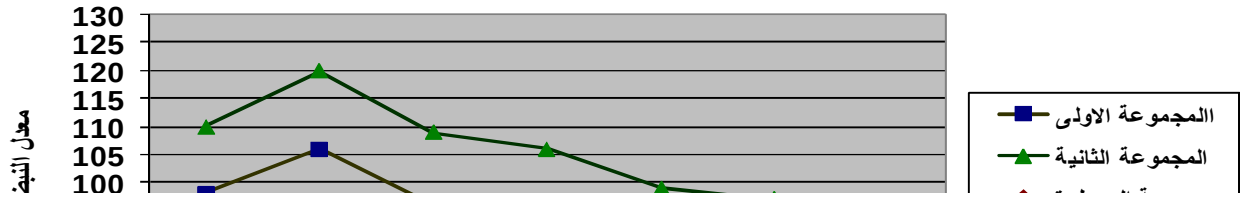
- **الفحوصات السريرية:** لم تظهر الحيوانات أي أعراض مرضية قبل البدء بالتجربة إما بعد بدء التجربة، فقد أظهر ت الحملان الملقحة في المجموعة الأولى (اللقاح + المعزز الحيوي) والمجموعة الثانية (اللقاح فقط) ارتفاع في درجة حرارة، وكان أعلى معدل لها في اليوم الثاني بعد التلقيح وسجلت المجموعة الثانية أعلى المعدلات شكل(1). كذلك لوحظ زيادة بمعدلات ترداد التنفس بعد إعطاء اللقاح حيث كان أعلى معدل لترداد التنفس في المجموعة الأولى والثانية (54.50) مرة/ دقيقة في اليوم الثاني (شكل 2)، وكان أعلى معدل للنبض في المجموعة الأولى والثانية بعد التلقيح (106.4) و(119.6) نبضة/ دقيقة(شكل 3). في حين لم تظهر مجموعة السيطرة أي تغيير في الحرارة والنبض والتنفس. كما لوحظ علامات جهازيه على الحملان مثل قلة في الشهية وخمول خلال 72 ساعة بعد إعطاء اللقاح وفي المجموعتين الأولى والثانية وكانت النتائج أعلى في المجموعة الثانية عما في المجموعة الأولى وعاد ت إلى حالتها الطبيعية في اليوم الرابع من إعطاء اللقاح.



شكل (1) يوضح معدل درجات الحرارة فى الحملان



شكل (2) يوضح معدل ترداد التنفس في الحملان



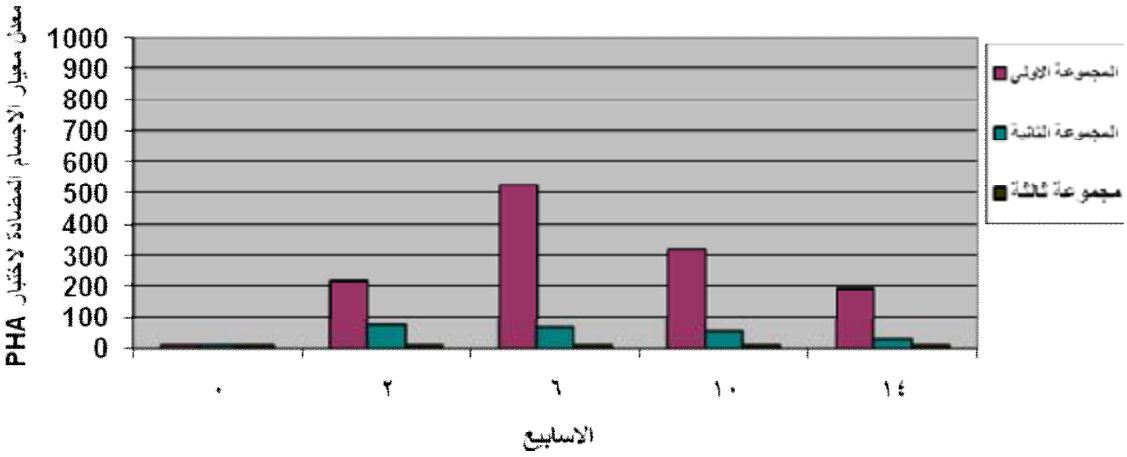
شكل (3) يوضح معدل النبض في الحملان

- **<u>الاختبارات المناعية:</u>**

1. اختبار الروزبنكال: أظهر تـ المجموعتين الأولى، والثانية نتائج موجبة لاختبار الروزبنكال بعد إعطاء اللقاح بأسبوعين، أما مجموعة السيطرة فكانت سالبة للاختبار.
2. اختبار التلازن الدوي المنفعل: أظهر تـ الحملان في المجموعة الأولى أعلى معدل في مستوى الأجسام المضادة الحجمي في الأسبوع السادس مابين (151.991 ± 524.80) أما المجموعة الثانية فقد سجلت أعلى معدل في المعيار ألحجمي للأجسام المضادة أيضا في الأسبوع السادس (15.676 ± 70.4). إحصائيا ظهر وجود فروقات معنوية بين المجموعة الأولى والثانية منذ بداية التجربة وحتى نهايتها تحت مستوى احتمالية ($P<0.05$). جدول (3) (شكل 4).

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

المجاميع الأسابيع	المجموعة الأولى اللقاح+المعزز الحيوي	المجموعة الثانية اللقاح فقط	الثالثة السيطرة
	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	-ve	-ve	-ve
2	217.6±79.936	60.8±19.20	-ve
6	524.80±151.991	70.40±15.6767	-ve
10	320.0±85.865	54.4±19.984	-ve
14	192±40.477	32±8.76	-ve

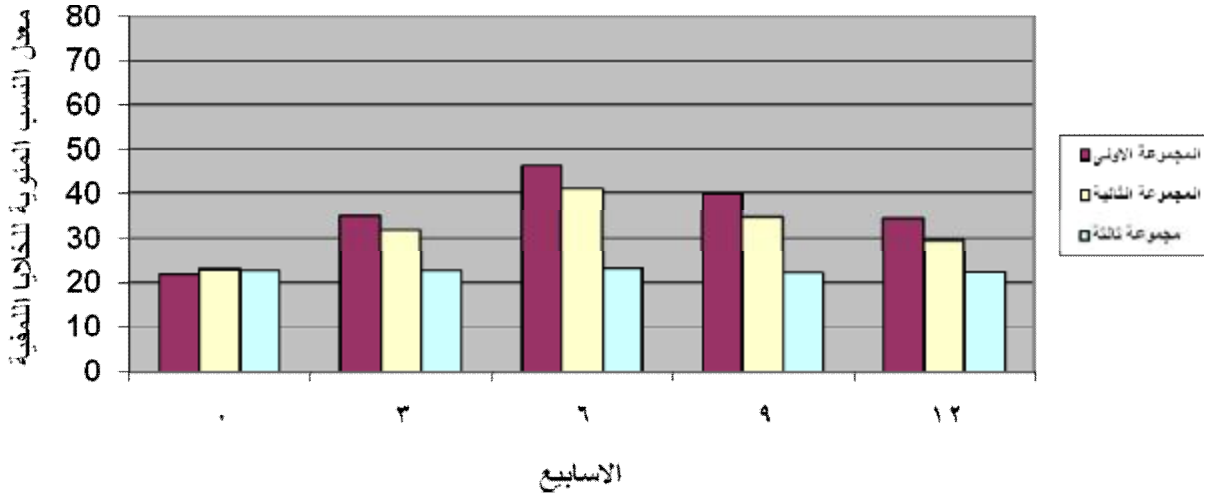


شكل (4) يوضح معيار الأجسام المضادة مقاسة باختبار التلازن الدموي المنفعل

- **النسب المئوية للخلايا للمفاوية الفعالة نوع (T) في الحملان المقاسة باختبار تشكل الزهرة:** كانت معدلات نسبة الخلايا اللمفية الفعالة في المجاميع الأولى والثانية والسيطرة في بداية التجربة على التوالي (22.62) و(22.506) و(22.62)% ولم يلاحظ وجود فروقات معنوية بين المجاميع، ويلاحظ ان الاختلافات المعنوية على مستوى المعنوية ($P<0.05$) أصبحت واضحة منذ الأسبوع الثالث نتيجة الزيادة الحاصلة في نسبة الخلايا اللمفية الفعالة في المجموعتين الأولى والثانية وسجلت المجموعة الأولى أعلى النسب حيث بلغت 46.508% في الأسبوع السادس ولم تظهر مجموعة السيطرة أي زيادة عن النسب الطبيعية شكل (5)و جدول(4).

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

المجاميع	الأولى (اللقاح+معزز حيوي تجاري)	الثانية (اللقاح فقط)	الثالثة (السيطرة)
الأسابيع	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي	المعدل ± الخطأ القياسي
0	23.32±0.9703	22.506 ±1.2411	22.62±1.0141
3	35.336±1.437	31.90 ±2.2367	22.62±1.0141
6	46.508 ±4.028	41.220 ±3.6865	23.32±0.9703
9	40.0±1.00	34.7800±2.2473	22.06 ± 0.46
12	34.574 ±0.636	29.720 ±1.2278	22.43 ± 0.40



شكل (5) يوضح النسب المئوية للخلايا للمفاوية الفعالة في الحملان المقاسة باختبار تشكل الزهرة

- **نتائج اختبار الحساسية الجلدي المتأخر في الحملان:** أظهرت نتائج اختبار الحساسية الجلدي المتأخر في الحملان احمرار وتورم حول منطقة الحقن بمستضد البروسلينومن خلال مر اقبة التغيرات الحاصلة على الجلد، وقياس سمك الجلد قبل وبعد الحقن حيث أظهر ت النتائج وجود فروقات معنوية ($P<0.05$) بين معدلات قطر الاحمرار وفرق سمك الجلد بين المجموعتين الأولى والثانية مقارنة مع المجموعة الأولى وقد أظهرت المجموعة الأولى أعلى المعدلات بعد 24 ساعة واستمرت الفروقات لحد (48) ساعة جدول (5).

جدول (5) يبين 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
الأولى(اللقاح+ المعزز الحيوي)	12.2±0.91	9.4±1.50	7.8± 1.720	6.5±0.419	5.75±0.347	4.45±0.409
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 دار ئ الفوسفات الملحي المعقم بالجرعة نفسها أسفل منطقة حقن المستضد.**

- **بـروتين مصـل الـدم الكلـي:** يوضـح الجـدول (6) معـدلات تركيـز بـروتين مصـل الـدم الكلـي ضـمن الأسـابيع المختلفة خلال فترة الدراسة حيث بدأت تراكيز البروتين بالارتفاع منذ الأسبوع الثاني في المجموعتين الأولى والثانية وسجلت أعلى التراكيز في الأسبوع السادس ولكن حملان المجموعة الأولى أعط ت تراكيز أعلى من المجموعة الثانية ولم يطرأ أي تغيير على مجموعة السيطرة. وقد أظهرت الفحوصات الإحصائية وجود فروقات معنوية بمستوى ($P<0.05$) بين المجموعة الأولى حيث تفوقت على المجموعة الثانية والسيطرة.

جدول (6) يبين نتائج قياس بروتينات مصل الدم الكلية(غم/ 100سم3)

المجاميع الأسابيع	الأولى اللقاح +المعزز الحيوي المعدل ± الخطأ القياسي	الثانية اللقاح فقط المعدل ± الخطأ القياسي	الثالثة السيطرة المعدل ± الخطأ القياسي
0	6.568±0.1326	6.3460±1014	6.14±0.05
2	8.4604±0.2701	7.5956±1.1588	6.64±0.05
6	8.9108±0.2177	8.1498±0.1194	6.568±0.132
10	8.6108±0.2605	7.564±0.1904	6.14±0.06
14	7.9042±0.214	7.1748±0.1048	6.14±0.06

المناقشة

أظهر ت 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 أعطيت المعزز الحيوي مع اللقاح كانت اقل وعادت إلى وضعها الطبيعي بمدةاقصر مقارنةً بالمجموعة التي أعطيت اللقاح لوحده، وهذا ربما يعود إلى ا ذ المعزز الحيوي قد حفز الجهاز المناعيلر فع الاستجابة المناعية وعملت على حماية الجسم من عوامل الإجهاد(3).

ان الارتفاع في درجات حرارة الجسم في الحملان الملحقة بلقاح الـRev.1 مقارنة بمجموعة السيطرة، متفقة مع ما ذكره (15). ويمكن تفسير ذلك على ان جراثيم البروسيلا هي سالبة لصبغة كرام (G^-) تحتوي على الذيفان الداخلي (Endotoxin) المسبب للحمى لذلك فأن تأثيرها في مراكز الحرارة عالي الشدة، وقد يعزى الارتفاع أيضا إلى تحفيز الخلايا الالتهابية والبلاعم الكبيرة وخلايا العدلات التي تنتج مسخنات داخلية (Endogens pyrogen) مسؤولة بصورة مباشرة على إنتاج الحمى بتأثيرها في مراكز تنظيم الحرارة تحت المهاد Hypothalmus. واتخذ ارتفاع معدلات ترددات التنفس (مرة/ دقيقة) ومعدل أعداد النبض (نبضة/ دقيقة) نفس مسار ارتفاع درجة الحرارة كما مذكور في العديد من الدراسات (7). ولم يلاحظ أي علامات سريرية على الحملان مثل الإسهال عند إعطاء المعزز الحيوي وهذا يؤكد أنها جراثيم غير مرضية وليس لها تأثير على المضيف (16).

ان حصول استجابة مناعيةاو إعطاء نتائج موجبة من قبل الحملان الملقحة بلقاح (Rev-1)لاختبار ي الروزبنكال واختبار التلازن الدو ي المنفعل (PHA) خلال مدة التجربة يؤكد فعالية اللقاح المستعمل، وبعد فحص (PHA) من الاختبارات المصلية الحساسة التي تجرى على نطاق واسع لقياس مستوى الأجسام المضادة لأنواع عديدة من المستضدات و هذه النتائج تتفق مع (7).

ومن خلال هذه الدراسة لوحظ تأثير واضح للمعززات الحيوية في رفع مستوى الأجسام المضادة المتكونة مقارنة بمجموعة اللقاح فقط وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل إليه (17) الذي لاحظ ارتفاع في الأجسام المناعية في الفئران التي غذيت بغذاء يحتوي على جراثيم *L.acidophillus* مقارنة بالمجموعة التي لم تتغذى هذه الجراثيم.و اتفقت هذه الدراسة مع (18) الذي وجد أن إعطاء جراثيم *L.helveticus* كمحفز مناعي في الفئران بعد إصابتها بجرثومة الاشريكيا القولونية أد د إلى زيادة الأجسام المضادة الجهازية والموضعية مقارنة بمجاميع السيطرة.

وتضمنت الدراسة أيضا معرفة مدى تأثير المعززات الحيوية في رفع الاستجابة المناعية الخلوية باستخدام اختبار تشكل الزهرة حيث الزيادة اكبر في مجموعة اللقاح + المعزز الحيوي وقد اتفقت دراستنا مع (7) والذ ي

استخدم اختبار تشكل الزهرة كمقياس للاستجابة المناعية الخلوية المحفزة نتيجة لتلقيح الأغنام بلقاح Rev-1 ولاحظ ان الزيادة اكبر في مجموعة اللقاح+ المحفزات المناعية.

ان الزيادة الكبيرة في المجموعة الأولى يؤكد الدور الذي تلعبه المعززات في تحفيز الاستجابة الخلوية، وهذا جاء متفقا مع (19) الذي لاحظ عند إعطائه جراثيم Lactobacilus حصول زيادة معنوية بأعداد الخلايا اللمفاوية مع زيادة القابلية البلعمية للخلايا وكانت هذه الزيادة تصل أعلى مستوى لها عند الأسبوع السادس وحتى التاسع بمستوى احتمالية ($P<0.01$)، واتفقت النتيجة مع (20) الذي استعمل جراثيم *L.paracasei* ولاحظ تأثيرها على الخلايا اللمفاوية وزيادة المدورات الخلوية في الفئران. وكذلك استخدم اختبار الحساسية الجلدي المتأخر للكشف عن المناعة الخلوية في الحملان الملقحة والمعاملة بالمحفز المناعي، أظهر ت هذه الحيوانات استجابة مناعية بأنها أعط تفاعلاً جلدياً متميزاً من حيث الزيادة في فرق سمك الجلد وقطر منطقة الاحمرار مقارنة بالسيطرة ، وهذا يتفق مع (7,21).

ان مدى الاستجابة المناعية عند إعطاء المعززات الحيوية يعتمد على جنس ونوع الجراثيم المستخدمة كمعززات حيوية وكذلك قابلتها على الآلية على الالتصاق وتأثيرها المباشر على مناطق الجهاز المناعي وهذا ما أكده الباحث (22).

أما تجربة البروتين الكلي فلوحظ حصول ارتفاع بمستوى بروتين مصل الدم في المجموعتين الملقحة عن المستوى الطبيعي وهذا يعزى إلى الزيادة الحاصلة في مستوى الكلوبيولينات المناعية بسبب التحفيز المناعي كنتيجة للتلقيح واستخدام المعززات الحيوية وهذا جاء مطابقا مع (24,23).

References

1. Moreira, J. L.; Mota, R. M.; Horta, M. F.; Teixeira, S. M.; Neumann, E.; Niecoli, J. R. & Nunes, A. C. (2005). Identification to the species level of lactobacillus isolated in probiotics prospecting studies of human, animal or food organ by 165-235 rR restriction profiling, BMC. Microbiol.,1(5):5-15.
2. Meydani, S. N. & Ha, W. K. (2000). Immunological effect of yogurt. Am. J. Clinical Nutrition, 71(4): 861-872.
3. Oyetayo, V. O. & Oyetayo, F. L. (2005). Potential of probiotics as biotherapeutic agents targeting the innate immune system, Afr. J. of Biotechnol., 4(2):123-127.
4. Haller, D.; Blum, S.; Bode, C.; Hammes, W. P. & Schiffrin, E. J. (2000). Activation of Human peripheral Blood mononuclear cells by Nonpathogenic Bactria In Vitro: Evidence of NK cells as primary Targets. Infect. Immun., 68(2): 752-759.
5. Krehbiel, C. R.; Rust, S. R.; Zhang, G. & Gilliland, S. E. (2003). Bacterial direct feed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. J. Anim. Sci.; 81: 120 – 132.
6. Casey, P. G.; Gardiner, G. E.; Casey, G.; Brodshaw, B.; Lawlor, P. G.; Lynch, P. B. (2007). A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding with *Salmonella enterica serovar Typhimurium*. App. Env.Microbiol.,1858-1863.
7. طلال، اسعد خلف. (2007). تأثير استخدام الليفاميزول وفيتامين هـ في الاستجابة المناعية لخنازير غينيا والأغنام الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية وتأثيره في الكفاءة الإنتاجية والتناسلية. أطروحة دكتوراه– كلية الطب البيطري– جامعة بغداد.
8. Cornille, Y. (1995). The Rev-1 vaccination plane for sheep in the province- Alpes-Cote D' Azur (PACA) area pre request for successful eradication of *Brucella melitensis*, FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev-1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA, Alfort,1995,PP: 27-36.

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. Morgan, W. J. (1967). The serological diagnosis of bovine brucellosis .Vet. Rec. 80:612-620.
11. 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.
12. Kolar, J. (1990). The allergic skin test in diagnosis of brucellosis. Zoonotic disease seminar ,FAO/ Kuwait 12th- 24th January.
13. Braganza, C. M.; Stathopoulos, G.; Davies, A. J. S.; Elliott, E. V. & Kerbel, R. S. (1975). Lymphocyte: Erythrocyte (L.E) Rosettes Variety of Mammalian species. Cell, 4:103-106.
14. Henry, R. J.; Carnnon, D. C. & Winkelman, J. W. (1974). Clinical chemistry, principles and techniques 2nd ed. Harper and Row.
15. Juma, K. H.; Al- Kass, J. E. & Injidi, M. H. (1982). A note on Studies on heat tolerance in Hungarian and Awassi rams. Iraqi J. of Vet. Med., 6:92.
16. Conway, P. L. (1996). Selection criteria for probiotic microorganisms. Asia pacific J. Clin. Nutr., 5:10-14.
17. Takahashi, T.; Oka, T.; Iwana, H.; Kuwata, T. & Yamamoto, Y. (1993). Immune response of mice to orally administered lactic acid bacteria Biosci. Biotechnol Biochem., 57:1557-1560.
18. LeBlanc, J.; Fliss, I. & Matar, C. (2004). Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 Infection Derived from *Lactobacillus helveticus* Fermented milk. Clinical and Diagnostic laboratory Immunology,11(6):1171-1181.
19. Ying, S.; Chiang, B. L.; Wang, L. H.; Liao, C. K. & Gill, S. (2001). Systemic immunity– enhacing effects in healthy subjects following dietary consumption of lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. J. of the Amer. College of Nutrition., 20(2):149-156.
20. Weid, T. V. D.; Bulliard, C. & Schiffrin, E. J. (2001). Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4+ T cells with low prolifertive capacity that produce transforming growth factor and interleukin–10. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 8(4):695-701.
21. الزبيدي، إبراهيم عبد الحسين. (2007). تحضير وتجربة مستضد مستخلص من بعض عتر البروسيلا اللقاحية. أطروحة دكتوراه– كلية الطب البيطري– جامعة بغداد.
22. Galdeano, C. M.; De LeBlanc, A. D.; Vinderola, G.; Bibes, M. E. & Perdigon, G. (2007). Proposed model: Mechanisms of Immunomodulation induced by probiotic Bacteria. Clin.Vaccine Immonology. 14(5):485-492.
23. 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 .
24. Abas, I.; Kutay, H. C.; Kahraman, R.; Toker, N. Y.; Ozcelik, D.; Ates, F. & Kacakci, A. (2007**)**. Effects of Organic Acid and Bacterial Direct– Feed microbial on Fattening preformance of kivircik-male yearling lambs. Pakistan J. of Nutrition,6(2):149- 154.