

تأثير التمنيع بمستضدات الرؤيسات الأولية للأكياس العدرية في نمو ديدان المشوكات الحبيبية في الكلاب

محمود عبد الستار محمد الجوادي* و محمد احمد نجيب الشهاري

فرع الأحياء المجهرية، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، الموصل، العراق

(الاستلام ٢٩ تشرين الأول ٢٠٠٨؛ القبول ١٣ تموز ٢٠٠٩)

الخلاصة

تمت دراسة عملية التمنيع باستخدام الأجزاء البروتينية المعزولة من البروتين الخام للرؤيسات الأولية المأخوذة من الأكياس العدرية الكبدية للأغنام على الخمج بطفيلي المشوكات الحبيبية *Echinococcus granulosus* في الكلاب. أشارت نتائج فحص التلازن الدموي غير المباشر إلى زيادة في معايير الأجسام المضادة في المجاميع الممنعة (B3, B1.5, A3, A1.5) قبل وبعده إجراء اختبار التحدي مقارنة بمجموعة التحدي. كذلك حدوث انخفاض كبير في أعداد ديدان المشوكات الحبيبية في المجاميع الممنعة ومجموعة السيطرة، كما لوحظ حدوث انخفاض متباين في أعداد هذه الديدان مابين المجاميع الممنعة نفسها، فقد سجلت المجموعة A3 نسبة اختزال للديدان وصلت إلى 83.8% ثم المجموعة A1.5 وبنسبة اختزال 81.3%، أما المجموعة B3 فكانت نسبة الاختزال 78.2% وأخيراً المجموعة B1.5 بنسبة اختزال 74.6%.

Effect of immunization with protoscolices antigens of hydatid cysts on growth of *Echinococcus granulosus* in dogs

M. A. Aljawady and M. N. Al-Shahery

Department of Microbiology, College of Veterinary Medicine, University of Mousl, Mosul, Iraq

Abstract

The study was designed to evaluate the immune response of puppies, injected by different protein fractions extracted from protoscolices, obtained from ovine hydatid cyst. Indirect hemagglutination revealed a remarkable increase in the antibody titers for the immunized groups (A1.5, A3, B1.5, and B3) before and after challenge when compared with the control. Biological variations showed decline in numbers of adult *Echinococcus granulosus* in the immunized groups when compared with the control. Other variations proved dropping in numbers of the worms within the same immunized groups. Subsequent reductions of cestodes were reported which were 83.8%, 81.3%, 78.2% and 74.6% for the groups A3, A1.5, B3, and B1.5, respectively.

Available online at <http://www.vetmedmosul.org/ijvs>

* مسئل من أطروحة الدكتوراه للباحث الأول

هنا بدأ التوجه لدراسة التغيرات المناعية المصاحبة لإصابة الكلاب بطفيلي المشوكات الحبيبية (٢،٣).

وكانت الغاية من هذه الدراسات إيجاد إستراتيجية لتطوير مقاومة مناعية فعالة ضد الديدان البالغة لطفيلي المشوكات الحبيبية وذلك لان براز الكلاب الحاوي على بيوض الطفيلي يعد المصدر الرئيس لتلويث البيئة وبالتالي إلى كسر دورة حياة

المقدمة

أن التقدم في برامج السيطرة على داء المشوكات الكيسي كان ضعيفا بسبب فشل الدراسات الوبائية للسيطرة على الطفيلي البالغ، وهذا الفشل يعود إلى التغير في الطبيعة الجغرافية والوبائية لمناطق تواجد الطفيلي من منطقة إلى أخرى (١) ومن

حيوانات بإعطائها 10000 رويس أولي حي عن طريق الفم كمجموعة سيطرة.

تم دراسة الاستجابة المناعية الخلطية للمجاميع الثلاثة أسبوعياً ابتداءً من بداية الأسبوع قبل التحدي ولغاية الأسبوع الخامس بعد التحدي بواسطة اختبار التلازن الدموي غير المباشر heamagglutination antibody test IHA Indirect وذلك باستخدام كريات الدم الحمراء للأغنام المحلية و المحسسه ضد المستضدين A و B حسب طريقة (١٠) مع الأخذ بنظر الاعتبار مزج مصول حيوانات كل تجربة وكل فترة زمنية على حده. بعد فترة 40 يوماً من الخمج التجريبي بواسطة الرؤيسات الأولية الحية لحيوانات تجارب البحث (٢)، خدرت هذه الجراء بواسطة إعطائها 5% Ketamine بجرعة ١٠ ملغم / كغم من وزن الجسم و 2% xylazine بجرعة ٣ ملغم / كغم من وزن الجسم لكل حيوان عن طريق الحقن في العضلة وبعد التأكد من تخدير الحيوان تم إعدامها، وفتح التجويف البطني، وعقدت الأمعاء من المنطقة التي تلي المعدة والى المنطقة القريبة من فتحه المخرج بواسطة خيط جراحي وضعت الأمعاء في أكياس نايلون نظيفة وحفظت في المجمدة بدرجة حرارة 20 - لمدة 30 يوماً من أجل تقليل خطر العدوى ببيوض ديدان المشوكات الحبيبية (١١)، بعد ذلك تم إخراجها وجمعت محتويات كل من الأمعاء على حده في وعاء زجاجي نظيف وللتأكد من جمع كل الديدان قشطت الطبقة المخاطية المبطنة للأمعاء بواسطة مشرط جراحي وأضيفت هذه المادة المخاطية إلى الأوعية الزجاجية السابقة الذكر نفسها لجمع كل الديدان المتواجدة الأمعاء على حده (٢)، وتم حساب العدد الكلي للديدان المتوفرة في الأمعاء لكل حيوان من حيوانات التجارب.

النتائج

عند دراسة الاستجابة المناعية الخلطية باستخدام اختبار التلازن الدموي غير المباشر IHA لاحظنا انعدام معايير الأجسام المضادة للمجاميع المختلفة وفي اليوم 7 من حقن المستضدات لوحظ ظهور مستويات قليلة من الأجسام المضادة تراوحت بين 1:40 في مجموعة A3 و 1:٢٠ في B3 إلى 1:١٠ في مجموعتي A 1.5 و B 1.5 وفي اليوم 14 من الحقن وبعد إعطاء الجرعة المنشطة من الحزمتين A و B وبالتركيزين 1.5، 3 ملغم لوحظ أن مستوى الأجسام المضادة، في المجموعة A3 ارتفع إلى 1:١٦٠ بينما كان 1:٤٠ في المجموعتين A 1.5، B 3، في المجموعة B 1.5 كان منخفضاً نسبياً 1:٢٠. وفي اليوم 21 لوحظ ارتفاع حاد في معيار الأجسام المضادة في مجموعة 3 ليصل إلى 1:٣٢٠ بينما كان في المجموعة B 1.5 1:٨٠. كما يشار له في الجدول رقم (١).

الطفيلي (٤) ومن هذه الحقيقة انطلقت فكرة الدراسة الحالية باستخدام بعض الأجزاء البروتينية المعزولة من الرؤيسات الأولية للأكياس العدرية في تمنيع الكلاب بغية تثبيط تطور المرحلة البرقية للطفيلي والحيلولة دون وصولها إلى مرحلة الدودة البالغة التي تقوم بطرح بيوض الطفيلي الملوثة للبيئة.

المواد وطرائق العمل

استخدمت في التجارب الجراء المحلية من الذكور بعمر (5 - 4 أشهر والتي تعود للنوع *Canis f. familiaris* والخالية من الإصابة من خلال إجراء فحص البراز بطريقة الطفو للكشف عن بيوض الطفيلي، تركت الجراء الصغيرة تحت المراقبة لمدة شهر للتأقلم مع مراعات كافة الظروف الصحية والغذائية خلال فترة التربية. تم الحصول على الأكياس العدرية الكبدية من الأغنام المجزورة في مدينة الموصل، واتبعت طريقة (٥) للحصول على الرؤيسات الأولية، تم تقدير حيوية الرؤيسات الأولية وذلك بفحصها تحت عدسة المجهر الضوئي وبعد إضافة صيغة الايوسين المائية وبتركيز 0.1% وحسب طريقة (٦)، كما تم الحصول على مستخلص الرؤيسات الأولية باتباع الخطوات التي ذكرها (٧)، واستخدمت تقنية الترشيح الهلامي (Sephadex G-200) لعزل الأجزاء البروتينية A، B من مستخلص البروتين الخام للرؤيسات الأولية المستخدمة في عملية التمنيع (٨)، تم أخيراً تحديد الوزن الجزيئي التقريبي للأجزاء البروتينية A، B بطريقة (٩).

تم استخدام ٢٤ جرواً في هذه الدراسة وقسمت إلى عدة مجاميع حيث تم تمنيع ٨ حيوانات بالمعلق البروتيني للحزمة A وبحجم ١مل مضافاً إليه ١مل من مساعد فروند الكلي CFA Complete Freund adjuvant وبواقع فئتين، الفئة الأولى والتي اشتملت على ٤ حيوانات تم إعطائها جرعة 3 ملغم / كغم من وزن الجسم لكل حيوان عن طريق الحقن تحت الجلد، والفئة الثانية والتي اشتملت نفس العدد من الحيوانات حيث أعطيت 1.5 ملغم / كغم من وزن الجسم لكل حيوان عن طريق الحقن تحت الجلد. في نهاية الأسبوع الثاني تم إعطاء الجرعة المنشطة وبفهم التراكيز المذكورة أعلاه ولكلا الفئتين مع استخدام مساعد فروند الجزئي Incomplete Freund adjuvant IFA، ثم تم إجراء اختبار التحدي على هذه الحيوانات في نهاية الأسبوع الثالث بإعطائها 1×10^4 رويس أولي حي عن طريق الفم وتم تحديد جرعة التحدي وذلك بأخذ ٥٠ مايكروليتر من معلق الرؤيسات الأولية مضافاً إليها نفس الحجم من الصبغة على شريحة زجاجية ثم وضع عليها غطاء الشريحة وأجريت عملية عد الرؤيسات، ثم مزجة جرعة التحدي مع كمية مناسبة من محلول الداري الفوسفاتي وأعطيت للحيوان. تم استخدام نفس الخطوات المذكورة أعلاه في التجربة السابقة وباستخدام المعلق البروتيني B. في هذه التجربة تم أحداث الخمج في ٨

بعد إجراء اختبار التحدي لاحظنا زيادة في معايير الأجسام المضادة ابتداء من الأسبوع الأول و الأسبوع الثاني في المجاميع الممنعة (B 3, A 1.5, A 3) واستمرت هذه الزيادة حتى الأسبوع الثالث في المجموعة (B 1.5)، ثم تلاها انخفاض في معايير الأجسام المضادة لدى كل المجاميع واستمر هذا الانخفاض لغاية الأسبوع الخامس. وبلغت معايير الأجسام المضادة للمجاميع (B 3, A 1.5, A 3) في الأسبوع الثاني ١: ١٢٨٠، ١: ٦٤٠، ١: ٣٢٠ على التوالي وللمجموعة B 1.5 في الأسبوع الثالث ١: ٣٢٠، أما في مجموعتي السيطرة CA و CB فقد كانت هناك زيادة قليلة في معايير الأجسام المضادة من الأسبوع الأول وحتى الأسبوع الخامس، حيث تراوحت هذه المعايير ما بين ٠ إلى ١: ٤٠ في مجموعتي CA و CB كما يشير له الجدول رقم (٢).

الجدول (١) معايير اختبار التلازن الدموي غير المباشر في المجاميع الممنعة والسيطرة قبل التحدي.

اليوم	معايير الأجسام المضادة				
	C	B1.5	B3	A1.5	A3
١	٠	٠	٠	٠	٠
٧	٠	١: ١٠	١: ٢٠	١: ١٠	١: ٤٠
١٤	٠	١: ٢٠	١: ٤٠	١: ٤٠	١: ١٦٠
٢١	٠	١: ٨٠	١: ١٦٠	١: ١٦٠	١: ٣٢٠

الجدول (٢) معايير اختبار التلازن الدموي غير المباشر في المجاميع الممنعة و السيطرة بعد التحدي.

الأسبوع	معايير الأجسام المضادة					
	BC	CA	B1.5	B3	A1.5	A3
الأول	٠	٠	١: ١٦٠	١: ٣٢٠	١: ٣٢٠	١: ٦٤٠
الثاني	١: ١٠	١: ١٠	١: ١٦٠	١: ٣٢٠	١: ٦٤٠	١: ١٢٨٠
الثالث	١: ١٠	١: ١٠	١: ٣٢٠	١: ١٦٠	١: ٣٢٠	١: ٦٤٠
الرابع	١: ٢٠	١: ٤٠	١: ١٦٠	١: ٨٠	١: ٣٢٠	١: ٣٢٠
الخامس	١: ٤٠	١: ٤٠	١: ٨٠	١: ٨٠	١: ١٦٠	١: ٣٢٠

الحيوانات التي خضعت لاختبارات التحدي فقط، ويمكن تفسير هذه الزيادة في معايير الأجسام المضادة لكل من المجاميع الممنعة بالأجزاء البروتينية B،A إلى التأثير الممنع لكل من هذه الأجزاء البروتينية B،A المستحصلة من الرؤيسات الأولية، كما أن استخدام مساعد فروند الكامل والجزيئي في هذه العملية يزيد من ارتفاع مستويات الأجسام المضادة في الحيوانات الممنعة بهذه الأجزاء البروتينية ومن هذا نستخلص بان التمنيع بالأجزاء البروتينية الرئيسية B،A يؤدي إلى أحداث حالة مناعية في الحيوانات عند استخدام الجرعة المناسبة في عملية التمنيع، ان استخدام العامل المساعد لفروند في عملية التمنيع يؤدي إلى زيادة في عملية التحسيس وتحفيز البلعمة و كل من المناعة الخلطية والخلوية معاً حيث يعمل مساعد فروند الكامل CFA على أطالة فترة التمنيع (١٢،١٣)، ولهذا السبب نفسر استمرار ارتفاع معايير الأجسام المضادة في المجاميع الممنعة إلى نهاية الأسبوع الخامس بعد اختبار التحدي عند المقارنة مع مجموعة السيطرة، لقد أشار (٤) إلى وجود زيادة معنوية في معيار الأجسام المضادة عند تلقح الكلاب بالبروتين الخام المستخلص من الرؤيسات الأولية للألباس العدرية الكبدية للأغنام، وهذا يتفق مع نتائج دراستنا، لقد انصب اهتمامنا في البدء على اختيار أي من الأجزاء البروتينية الفعالة في عملية التمنيع لذلك

أما من ناحية مقارنة أعداد الطفيلي في الأمعاء وبشكل كامل لاحظنا انخفاض في الأعداد الكلية لديدان المشوكات الحبيبية حسب المجاميع الممنعة بالمقارنة مع السيطرة وكان هذا الانخفاض معنوي بمستوى احتمال $P < 0.05$ ، حيث كان في مجموعة A3 182 وفي مجموعة A1.5 210 وكان في مجموعة B3 245. وفي مجموعة B1.5 286، أما في السيطرة C فكان العدد الكلي 1128، وكذلك لاحظنا فروقات معنوية ما بين المجاميع الممنعة نفسها عند مستوى احتمال $P < 0.01$ حيث كانت المجموعة A3 معنوية أكثر من المجموعة A1.5 وكذلك المجاميع B3 و B1.5، كما كانت المجموعة A1.5 معنوية وبشكل أكثر من المجاميع B3،B1.5. وأخيراً لاحظنا أن أعلى نسبة اختزال للديدان كانت في المجموعة A3 وبلغت ٨٣،٨% تلتها مجموعة A1.5 وبنسبة اختزال ٨١،٣% ثم المجموعة B3 % ٧٨،٢ و أخيراً المجموعة B1.5 بنسبة ٧٥،٦%.

المناقشة

أشارت نتائج الدراسة إلى حدوث ارتفاع في معايير الأجسام المضادة في المجاميع الممنعة A3, A1.5, B3, B1.5 عند مقارنتها مع مجموعتي السيطرة CA و CB والتي تمثل

- Al-Khalidi NW. Investigation of the Immunity of Dogs to *Echinococcus granulosus* during the prepatent infection. [dissertation], Ohio State University; 1982:1-35p.
- Zhang W, Li J, McManus DP. Concepts in Immunology and Diagnosis of Hydatid Disease. Clin Microbiol Rev. 2003;16(1):18-36.
- Zhang WB, Zhang ZZ, Chi PS. Vaccination of dogs against *Echinococcus granulosus* using soluble antigens of protoscolices. Chin J Vet Sci Technol. 1999;29:21-22.
- Smyth JD. In vitro culture of *Echinococcus* spp. Proc. 13th Int Cong Hydat Madrid 1985:84-95p.
- Smyth JD, Barrett NJ. Procedures for testing the viability of Human Hydatid cysts following surgical removal especially after chemotherapy. Trans Roy Soc Trop Med Hyg. 1980;74:649-652.
- Taherkhani H, Rogan MT. General characterization of laminated layer of *Echinococcus granulosus*. Iran J Med Sci. 2000;25:3-4.
٨. الجوادي، محمود عيد الستار. دراسة مناعية لطفي المشوكات الحبيبية في الكلاب المحقونة بمستضدات الرؤيسات الأولية من أصل أغنام. أطروحة دكتوراه، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل، العراق ٢٠٠٦.
- Robyte JF, White BJ. Gel permeation chromatography. II. Organic solvent protein precipitation. in: Biochemical Techniques, Theory and practice. Wadsworth Inc., Belmont, California, USA. 1987;88-268p.
- Hudson L, Hay FC. Application of gel chromatography. In: practical immunology, 1st edition, p156. Blackwell Scientific publication Osney Mead, Oxford, London Edinburgh, U.K. North Balwyn, Victoria, Australia. 1976.
- Eckert J, Schantz PM, Gasser RB, Torgerson PR, Bessonov AS, Movses-sian SO, Thakur A, Grimm F, Nikogossian MA. Geographic distribution and prevalence, p. 100-142. In: Eckert, J. Gemmel, M. A. Meslin, F.-X. and Pawlowski Z. S. (ed.), WHO/OIE manual on echinococcosis in humans and animals: a public health problem of global concern. World Organisation for Animal Health, Paris, France. 2001.
- Alton GG. Recent development in vaccination against bovine brucellosis. Aust Vet J. 1978;54:551-557.
- Dalsgaard K. Adjuvants. Vet Immunol Immunopathol. 1987;17:145-152.
- Jones WO, Emery DL, McClure SJ, Wagland BM. Changes in inflammatory mediators and larval inhibitory activity in intestinal contents and mucus during primary and challenge infections of sheep with *Trichostrongylus colubriformis*. Int J Parasitol. 1994;24:519-525.

أشارت نتائج دراستنا الحالية إلى حدوث تفاوت في معايير الأجسام المضادة في المجاميع الممنعة حيث أعطت المجموعة الممنعة بالجزء البروتيني A معياراً أعلى من المجموعة الممنعة بالجزء البروتيني B بشكل عام، كما أن استخدام الجرعة المناسبة من هذه المستضدات يؤثر في عملية التمنيع، حيث كانت الجرعة 3 ملغم من الجزء البروتيني A أكثر فاعلية من الجرعة 1.5 ملغم، وهذا ينطبق على التمنيع بالجزء البروتيني B من ناحية الجرعة. وهذا الاختلاف نفسه بالاختلاف في الطبيعة الفيزيائية والكيميائية لهذين المستضدين.

من ناحية أخرى نلاحظ وجود اختلاف في نسبة اختزال الأعداد الكلية للديدان المشوكات الحبيبية ضمن المجاميع الممنعة A، B و حسب الجرعة المستخدمة في عملية التمنيع B1.5, B3, A1.5, A3، فقد سجلت المجموعة A3 أعلى نسبة اختزال في أعداد الديدان، تلتها المجموعة A1.5، كذلك فإن المجموعة B3 هي الأخرى سجلت اختزالاً في أعداد الديدان وكان هذا الاختزال أعلى عند المقارنة مع استخدام نصف الجرعة في المجموعة B1.5، وقد يعود السبب في زيادة نسب الاختزال إلى اختلاف في معايير الأجسام المضادة التي سجلتها كل من هذه المجاميع الممنعة.

لذا يمكننا أن نستنتج بان الهبوط في نسبة اختزال الأعداد الكلية للديدان يكون متعلقاً بوجود الأجسام المضادة والمناعة المخاطية في الأمعاء التي تؤدي إلى إعاقة في عملية التطور لهذه الديدان (١٤).

المصادر

- Andersen FL, Ouhelli H, Kachani M. Compendium on cystic echinococcosis in Africa and in Middle Eastern countries with Special Reference to Morocco. Brigham Young University print services, provo, Utah 84604,1997:54-85.