

المناعة الخلطية الناتجة عن إعطاء لقاح *Brucella melitensis* Rev. 1 بالحقن تحت الجلد والتقطير في العين في الماعز

عماد إبراهيم الدباغ، محمد جاسم محمد و بلال محفوظ يحيى

المستشفى البيطري، الموصل، العراق

(الاستلام ٢٢ آذار ٢٠٠٩؛ القبول ١٥ نيسان ٢٠١٠)

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة إلى مقارنة الاستجابة المناعية الخلطية الناتجة عن التلقيح بالعترة الملساء للبروسيليا *B. melitensis* Rev. 1 بطريقتي الحقن تحت الجلد والتقطير في العين في الماعز وبجرعة مقدارها $1-2 \times 10^9$ جرثومة و أجري اختبار روز بنكال لتأكيد عدم إصابة الحيوانات قبل التلقيح وتم تقييم معايير الأجسام المضادة من خلال إجراء اختبار التلازن المناعي ٢- ميركيتو أيثانول وقد أظهرت النتائج أن اللقاح المعطى بالحقن تحت الجلد أعطى نتيجة موجبة بنسبة ٨٠ % بينما اللقاح المعطى بالتقطير في العين أعطى نتيجة موجبة بنسبة ٣٨.٥ % في اختبار روز بنكال وكان هناك زيادة معنوية ($P < 0.01$) في معيار الأجسام المضادة الناتجة عن لقاح الحقن تحت الجلد مقارنة بالمجموعة الملقحة بلقاح التقطير في العين.

Humoral immunity resulted from vaccination with *Brucella melitensis* Rev. 1 vaccine given subcutaneously and intraocularly in goats

I. I. Aldabagh*, M. J. Mohamed and B. M. Yahiya

Veterinary Hospital, Mosul, Iraq, *E-mail: imad_aldabagh@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to evaluate the humeral immune response induced by administration of smooth strain of *B. melitensis* Rev. 1 vaccine ($1-2 \times 10^9$ viable organism per dose) given by subcutaneous and intraocular routes in goats. Rose Bengal test was done to ensure the absence of Brucella infection in experimental animals and the 2- ME agglutination test was used to evaluate the antibody titers. The results showed that subcutaneous group showed positive results in 80% of animals whereas 38.5% of intraocular group showed positive results.

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

المقدمة

المزمن الذي قد يستمر مدى الحياة وتختلف قابلية الحيوانات للإصابة بالمرض تبعا لعوامل عديدة مثل العمر والحالة الصحية والتغذية و حالة الحمل فضلا عن عوامل أخرى مثل جرعة جراثيم البروسيليا المسببة للمرض (٤-١) وتؤدي العدوى بجراثيم البروسيليا إلى تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية على السواء بسرعة أثر العدوى الطبيعية وتكون الأجسام المضادة نوع IgM السائدة لبضعة أيام في حين تسود في المرحلة تحت الحادة الأجسام المضادة نوع IgG

يعد مرض البروسيليا من الأمراض المشتركة التي تصيب الإنسان والحيوانات المختلفة ويسبب خسائر اقتصادية مهمة من خلال تأثيره في الإنتاج الحيواني فضلا عن تأثيره في صحة الإنسان و تتمثل أهم المشاكل المتعلقة بالبروسيليا في صعوبة التشخيص والعلاج الناجمان عن كون جراثيم البروسيليا تعيش داخل الخلية والذي قد يتسبب في تحول الحالة إلى الشكل

المواد وطرائق العمل

تم إجراء التلقيح على الماعز وسحب الدم في قضاء توكيف العائد لمحافظة نينوى و تم إجراء جميع التجارب في مختبر المستشفى البيطري في نينوى مع توفير كل أشكال الدعم والمساعدة اللازمة.

المواد المستخدمة

مستضد البروسيل B. abortus strain 19 antigen من إنتاج المركز السوري لداء البروسيلات - دمشق، سوريا. لقاح العترة الملساء B. melitensis Rev. 1 المضعف للحقن تحت الجلد ١ x ٢-١ جرثومة / جرعة (من إنتاج شركة cz Veterinaria SA أسبانيا). لقاح العترة الملساء B. melitensis Rev. 1 المضعف للتقطير في العين (١-٢ x ١٠ جرثومة/جرعة) من إنتاج شركة cz Veterinaria SA أسبانيا. روز بنكال من إنتاج شركة OMIGA DIAGNOSTICS المملكة المتحدة. ٢-ميركبتوآيثانول من إنتاج شركة BDH- chemicals, England. كلوريد الصوديوم NaCl من إنتاج Germany Gerhard Buchman وتم تحضير محلول الملح الفسلجي من قبل الباحثين.

الحيوانات

تم استخدام ٣٠ من ذكور الماعز المحلي بأعمار تتراوح من ٣-٨ أشهر وفي حالة صحية جيدة و التي تم إعطائها كميات وافرة من الماء والعلف. وجمعت عينات دم من الحيوانات قبل التلقيح في أنابيب زجاجية معقمة ومغمورة في الثلج المجروش ونقلت إلى جهاز الطرد المركزي حيث تم عزل المصل واستبعدت عينات الدم التي أظهرت تحلل دموي Hemolysis، وتم اختيار ١٥ عينة بشكل عشوائي لكي تجرى عليها اختبارات قبل التلقيح (مجموعة السيطرة) وتم إجراء اختبار روزبنكال كما مذكور في (٥) على جميع النماذج ثم حفظت عينات المصل في درجة حرارة -١٨ درجة مئوية لحين إجراء اختبار التلازن المناعي ٢- ميركبتوآيثانول و كما مذكور في (٩،١) خلال ٢٤ ساعة ثم قسمت الحيوانات إلى مجموعتين (أ) و (ب) تضم كل مجموعة ١٥ حيوان لقحت المجموعة (أ) بجرعة واحدة (٠.٥ مل) من لقاح البروسيل تحت الجلد و لقحت المجموعة (ب) بجرعة واحدة من لقاح البروسيل (قطرة واحدة) بالتقطير في العين، وجمعت عينات الدم من المجموعتين بعد ٢١ يوم من التلقيح وتم فصل المصل وحفظت العينات كما في أعلاه وتم إجراء جميع الاختبارات خلال ٢٤ ساعة.

وكلا النوعين من الأضداد تسبب التلازن و مثبتة للمتنمة (٣،٥) فضلا عن ذلك لا يوجد هناك اتفاق عالمي حول طبيعة وخواص المستضد المثالي لتشخيص الإصابة بالبروسيل الناجمة عن أنواع مختلفة من جراثيم البروسيل مثل B. suis و B. melitensis و B. abortus وعند الأخذ بنظر الاعتبار أن النوعين الأخيرين يتسببان في حالتين مرضيتين مختلفتين في المجترات الصغيرة والأبقار على التوالي تظهر هناك نقطة هامة مرتبطة بتشخيص B. melitensis في الأغنام و المجترات الصغيرة وهي من أي نوع من البروسيل ومن أي نمط حيوي تم إنتاج المستضد المستخدم في التشخيص (٣) وبشكل عام فإن أكثر الاختبارات المصلية شيوعا لتشخيص البروسيل في الأغنام والماعز هي روز بنكال RB واختبار تثبيت المتمم CFT واختبار التلازن المصلي 2ME وهي تستخدم معلق مستضدي Antigen suspension مصنع من Biovar 1, B. abortus، ورغم كون اختبار روز بنكال طور أساسا لتشخيص البروسيل في الأبقار (٦) غير أن دراسات حديثة عديدة تشير إلى نتائج مقبولة لتشخيص البروسيل من نوع B. melitensis Biovar 1 في الأغنام والمجترات الصغيرة باستخدام اختبار روز بنكال (٧،٦). ويلاحظ في اغلب الدراسات تركيزها على تشخيص البروسيل في الأبقار والأغنام وحيوانات أخرى مثل الكلاب وغيرها مع قلة البحوث التي تخص حيوانات أخرى مثل الماعز والجاموس. مما لاشك فيه أن أفضل السبل للتخلص من مشكلة الإصابة بالبروسيل تكون عن طريق تلقيح الحيوانات الصغيرة مع إعطاء الجرعة المنشطة لضمان نشوء جيل جديد من الحيوانات ذات المناعة العالية ضد المرض وهناك عدة أنواع من اللقاحات المصنعة من أنواع مختلفة من البروسيل مخصصة لتلقيح الأبقار والأغنام والحيوانات الأخرى وقد مر تصنيع لقاح البروسيل بمراحل عديدة حيث استخدم في البداية لقاح مصنع من B. abortus, strain 19 ثم تم تطوير لقاحات أخرى مصنعة من عتر أخرى من البروسيل ولكي يكون اللقاح المستخدم فاعلا فإنه يجب أن لا يثبط تماما بفعل المناعة الفطرية Innate immunity ولا يسبب الإصابة بالمرض أو يتداخل مع الفحوص المصلية (٨،٤). وهناك توجه حديث نحو إنتاج لقاح يعتمد DNA البروسيل كمادة مستضدية (٤). في هذه الدراسة تم استخدام الماعز كحيوان تجريبي لتقييم كفاءة نوعين من لقاح العترة الملساء B. Melitensis Rev. 1 في أحداث الاستجابة المناعية المرجوة، اللقاح الأول مخصص أساسا للإعطاء بالحقن تحت الجلد ويستخدم في تلقيح الأغنام والماعز و اللقاح الثاني مخصص أيضا لتلقيح الأغنام والماعز ولكن بالتقطير في العينocular route وتم اعتماد اختبارين لفرض إجراء التقييم الأول اختبار روز بنكال (٥-٧) لتأكيد خلو الحيوانات من المرض قبل التلقيح في حين استخدم اختبار التلازن المناعي ٢- ميركبتوآيثانول (٥،١) لغرض تقييم الاستجابة المناعية من خلال المعايرة.

مجموعة (أ) للقاح تحت الجلد و ٣٨.٥ % لمجموعة (ب) للقاح التقطير في العين على التوالي وأن مجموعتي الحيوانات أظهرت ارتفاعاً معنوياً في مستوى الأضداد عند مستوى ($P < 0.01$) مع عدم وجود فروق معنوية بين المجموعتين (الجدول ١).

الجدول (١) يمثل النسبة المئوية للنتيجة الايجابية لاختبار روز بنكال في مجموعتي الماعز المعاملة بلقاح البروسيل ميليتنسس بالحقن تحت الجلد و التقطير في العين قبل وبعد ٢١ يوم من التلقيح.

| قبل التلقيح | مجموعة (أ) التلقيح | مجموعة (ب) التلقيح |
|-------------|--------------------|--------------------|
| صفر % | ٨٠ % ** | ٣٨.٥ % ** |

جميع القيم تمثل النسبة المئوية الايجابية ل ١٣ - ١٥ حيوان في كل مجموعة. ** القيمة تختلف معنوياً عن مجموعة قبل التلقيح عند مستوى ($P < 0.01$).

اختبار التلازن والمعايرة مع ٢- ميركبتوأيثانول

كانت نتائج المعايرة لجميع العينات قبل التلقيح سالبة، وسجل أعلى معيار للأجسام المضادة إذ كان ٨٠/١ بعد ٢١ يوم من التلقيح وأظهرت الحيوانات التجريبية مستوى مرتفع للأضداد و فرق معنوي مقارنة بمستوى قبل التلقيح للمجموعتين عند ($P < 0.001$) وكان معيار الأجسام المضادة الناتج عن إعطاء اللقاح تحت الجلد مرتفعاً معنوياً عند ($P < 0.01$) عن المجموعة (ب) الملقحة بالتقطير في العين (الجدول ٢).

الجدول (٢) يمثل معيار الأجسام المضادة باختبار التلازن المناعي ٢- ميركبتوأيثانول في مجموعتي الماعز الملقحة بكل من لقاحي الحقن تحت الجلد و التقطير في العين قبل وبعد ٢١ يوم من التلقيح.

| قبل التلقيح | مجموعة (أ) التلقيح | مجموعة (ب) التلقيح |
|-------------|--------------------|--------------------|
| ٠ ± ١ | ٠.١١ ± ٤.٨ *** | ٠.٣١ ± ٣.٦٩ *** |

###

جميع القيم تمثل المعدل لمراتب المعايرة ± الخطأ القياسي ل ١٣ - ١٥ حيوان في كل مجموعة. *** القيمة تختلف معنوياً عن قيمة قبل التلقيح عند مستوى ($P < 0.001$). ## القيمة تختلف معنوياً عن قيمة لقاح العين عند مستوى ($P < 0.01$)

طريقة العمل لاختبار ٢- ميركبتوأيثانول

استخدمت الطريقة المذكورة في (١ و ٩) حضر محلول ٢- ميركبتوأيثانول من إضافة ٠.١ مول من ٢- ميركبتوأيثانول (٧.١٤ مل تقريباً) إلى لتر من محلول الملح الفسلاحي بتركيز ٨.٥ % من كلوريد الصوديوم في الماء المقطر واستخدمت ٨ أنابيب اختبار في حامل مناسب أضيف ٠.٥ مل من محلول ٢- ميركبتوأيثانول المحضر سلفاً إلى جميع الأنابيب عدا الأول ووضع في الأنبوب الأول والثاني ٠.٥ مل من المصل المخفف بنسبة ٥/١ في محلول ٢- ميركبتوأيثانول وبعد المزج تم إجراء التخفيف المتتابع وذلك بنقل ٠.٥ مل من الأنبوب الثاني إلى الثالث وبعد المزج نقل ٠.٥ مل من الأنبوب الثالث إلى الرابع وهكذا وصولاً إلى الأنبوب الثامن والذي أخذ منه ٠.٥ مل وأهمل ثم أضيف إلى جميع الأنابيب ٠.٥ مل من المستضد حيث أصبح تركيز المصل في الأنابيب ١/١٠، ١/٢٠، ١/٤٠، ١/٨٠، ١/١٦٠، ١/٣٢٠، ١/٦٤٠ و ١/١٢٨٠ على التوالي وتم وضع الأنابيب في الحاضنة بدرجة حرارة ٣٧ درجة مئوية لمدة ٢٤ ساعة وقرأت النتائج من خلال تحديد آخر أنبوب حصل فيه التلازن.

التحليل الإحصائي

تم إجراء اختبار Fisher exact probability اللا معلمي Nonparametric على نتائج اختبار الروز بنكال، أما بالنسبة لقيم المعايرة الناتجة عن عملية التلازن فهي تمثل أعلى تخفيف للمصل بسبب التلازن وهي قيم تقريبية و خالية من الوحدات يمكن تمثيلها بإعطاء درجات أو مراتب لأجل إجراء التحليل الإحصائي لالمعلمياً Non parametric حيث يستعمل الإحصاء اللا معلمي في تحليل المعلومات التي تكون قيمها رقمية تقريبية وغير مفسرة بشكل واضح حيث يستعاض عن المعلومات بإعطاء مراتب وإخضاعها للتحليل الإحصائي اللا معلمي (١٠، ١١) لمعرفة الفروق المعنوية بين المجاميع المختلفة، وقد تم إعطاء مرتبة لكل قيمة من قيم المعايرة حيث ان صفر، ١/١٠، ١/٢٠، ١/٤٠ و ٨٠/١ اعطيت ١، ٢، ٣، ٤ و ٥ على التوالي.

حلتل مراتب المعايرة لاختبار ٢- ميركبتوأيثانول و نتائج المقارنة لزمان الحقن لالمعلمياً باستخدام اختبار Multiple non parametric comparisons Steel- Dwass analysis / Tukey Equivalent وتم إجراء التحليل الإحصائي بالكومبيوتر باستخدام برنامج التحليل الإحصائي Ky-Plot.

النتائج

اختبار الروز بنكال

أظهرت النتائج أن جميع العينات أعطت نتائج سالبة للإصابة قبل التلقيح وكانت موجبة بعد التلقيح بنسبة ٨٠ %

يشكر الباحثون إدارة المستشفى البيطري في نينوى و جميع منتسبي المختبر في المستشفى على تعاونهم وتفانيهم الدائم لإنجاح هذا العمل.

المصادر

1. Badakhsh FF, Carmichael LE, Douglas J A. Improved rapid slide agglutination test for presumptive diagnosis of canine brucellosis. J Clin Microbiol. 1982;15(2):286-289 .
2. Banai M. Control of ruminant Brucellosis by use of Brucella melitensis Rev. 1 vaccine: laboratory aspects and field observations. Vet. Microbiol. 2002;20(90):497-519 .
3. Buchanan TM, Faber L. 2-Mercaptoethanol Brucella agglutination test: usefulness in predicting recovery from Brucellosis. J Clin Microbiol. 1980;11(6):691-693 .
4. Blasco JM. Existing and future vaccines against brucellosis in small ruminants. Keynote lectures of the 6th international sheep veterinary congress, Spain 2005 .
5. Díaz-Aparicio E , Marín C , Alonso-Urmeneta B, Aragón V, Pérez-Ortiz S, Pardo M, Blasco J M, Díaz R, Moriyón I. Evaluation of serological tests for diagnosis of Brucella melitensis infection of goats. J Clin Microbiol. 1994;32(5):1159-1165 .
6. FAO. Surveillance of ovine and caprine brucellosis (excluding Brucella ovis infection) in: Guidelines for coordinated human and animal brucellosis surveillance. FAO 2003 .
7. Kang S M, Compas R W. host responses from innate to adaptive immunity. Mol cells. 2009;27(1):5-14 .
8. Klein G C, Behan K A. Determination of Brucella immunoglobulin G agglutinating antibody titer with dithiothreitol. J Clin Microbiol. 1981;14(1):24-25 .
9. Ko J, Splitter G A. Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current and future approaches to vaccine development for mice and human. Clin Microbiol Rev. 2003;15(1): 95-110 .
10. Munoz PM, de Miguel MJ, Grillo MJ, Marin CM, Barberan M, Blasco JM. Immunological responses and kinetics of Brucella melitensis Rev 1 infection after subcutaneous or conjunctival vaccination in rams. Vaccine 2008;26 (21):2562-2569 .
11. OIE. Caprine and ovine brucellosis excluding Brucella ovis. OIE Terrestrial manual, 2008. pages 974-982. Available from <http://www.oie.int>
12. Ruiz-Mesa JD, Sanchez-Gonzalez J, Reguera J M, Martin L, Lopez-Palmero S, Colmenero J D. Rose Bengal test: diagnostic yield and use for the rapid diagnosis of human brucellosis in emergency departments in endemic areas. Clin Microbiol Infect. 2005;11(3):221-225 .
13. Runyon RP. Non parametric statistics: A contemporary approach. Addison Wesley publ. co. Reading Massachusetts. 1977:pp:42-87 .
14. Wikipedia, the free encyclopedia. Non parametric statistics. Online reference last modified on 20 June 2009. Available from http://en.wikipedia.org/wiki/Nonparametric_statistics .

تعد السيطرة على مرض البروسيلات من أهم المشاكل التي تعترض تطوير وزيادة إنتاجية الثروة الحيوانية وقد أفتتح التلقيح (١٢) وسيلة ناجعة للتخلص من المرض نظرا للكلفة العالية للعلاج فضلا عن إمكانية فشل العلاج مما يجعل الحيوان ناقل للمرض فضلا عن كون العديد من الحالات تحت السريرية غير المشخصة فاعلة في نشر المرض (٣). وقد استخدمت عدة لقاحات ضد البروسيلات في الأغنام والماعز وعلى الرغم من إجراء دراسات تقييم شبه سنوية في مختبرات الشركة العامة للبيطرة في العراق غير أنه لم تجرى مقارنة بين أنواع اللقاح المستخدم من ناحية ولم تجرى دراسات مستقلة تغطي هذا الجانب في الماعز، وقد نجحت هذه الدراسة في تسليط الضوء على أحدث اللقاحات استخداماً في العراق فضلا عن تأكيدها لنجاح نوعي اللقاح المستخدم في تحفيز الجهاز المناعي في الماعز. كان إجراء اختبار روز بنكال ضروري من أجل تأكيد خلو حيوانات التجربة من الإصابة بالبروسيلات (٩٠٧،٥) وكان إجراء اختبار ٢-ميركبتوأيثانول ناجحا في تقييم الاستجابة المناعية الحاصلة نتيجة التلقيح وتشابه النتائج ما ذكره آخرون (١٣،٤) ويمكن أن يعزى الانخفاض المعنوي في مجموعة اللقاح العيني إلى اختلاف طريقة الإعطاء حيث يمكن ربطها مع المناعة الفطرية Innate immunity في العين من ناحية (٨،٣) ومن ناحية أخرى أن العين ذات التغذية الدموية العالية مقارنة بالأنسجة تحت الجلدية تمتلك قابلية أعلى على الامتصاص ونظرا لكون الاستجابة المناعية للتلقيح مرتبطة بفترة التعرض للمستضد حيث تتناسب الاستجابة المناعية طرديا مع الزيادة في زمن التعرض للمستضد (٥) تكون طريقة الإعطاء تحت الجلد أعلى كفاءة في تحفيز الاستجابة المناعية وتطابق هذه النتائج ما ذكره (١٤) عند مقارنة لقاحي الحقن تحت الجلد والتقطير في العين في الأغنام حيث ذكر أن التلقيح بالقطرات في العين يتسبب في تفاعل موضعي في العقد اللمفية القحفية والطحال بينما ينسب لقاح الحقن تحت الجلد في تفاعل جهازية يشمل جميع العقد اللمفية الجهازية والطحال (١٤) وقد نجح التحليل الإحصائي المعتمد في الدراسة في تحديد الفروق المعنوية بين المجاميع والمعاملات المختلفة فضلا عن تأكيد نجاح اعتماد الطرق غير المعلمية Non parametric في تمثيل المعايير الرقمية لنتائج المعايرة للمصل مما يؤكد أهمية اعتماد التحليل الإحصائي في تقييم النتائج للبحوث الإحيائية كما هو الحال في الفروع العلمية الأخرى.