Effect of *Listeria monocytogen* attenuated vaccine on apoptosis of lymphocytes cells in lab animal .

تأثير اللقاح الحي المضعف لجرثومة الليستريا على نسبة الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية في الحيوانات المختبرية.

د.ميادة فرحان درويش
كلية العلوم/جامعة الكوفة

د.وفاء صادق ألوزني
كلية العلوم/جامعة كربلاء

د.مهدي حسين محيل
كلية العلوم/جامعة الكوفة

الخلاصـــــة //

تم الحصول على عزلة واحدة فقط من جرثومة *Listeria monocytogenes* من مجموع 50 مسحة من مسحات المهبل العليا لنساء بعانين من الإجهاض المتكرر . حيث استخدمت تلك العزلة في تحضير اللقاح الحي المضعف لبيان تأثيره على نسبة الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية في الفئران المختبرية المحقونة بالجرعة القاتلة النصفية للقاح والبالغة (3.3×10^7 خلية/مليلتر) مقارنة بالجرعة القاتلة النصفية للعالق الطبيعي لتلك الجرثومة والبالغة (2.6×10^4 خلية/مليلتر) حيث أظهرت النتائج أن أوطأ نسبة لمعدلات الخلايا التي تمر بالموت الخلوي المبرمج للفئران المحقونة بالتركيز (10^7 خلية/مليلتر) من اللقاح كانت (2.33 ± 0.58) في حين كانت (8.33 ± 0.58) عند الحقن بالجرعة (10^6 خلية /مليلتر) مقارنة بالعالق الطبيعي وباستخدام الطريقة الجديدة . أما الطريقة الكلاسيكية فقد كانت نسبة الموت الخلوي المبرمج فيها (11.33 ± 1.15) و (19.33 ± 0.58) للتركيزين (10^7, 10^6 خلية/مليلتر) على التوالي.

Abstract

One isolate *L.monocytogenes* bacteria was obtained during this study that deal with 50 samples of high vaginal swabs taken from women with repeated abortion . The live attenuated vaccine prepared from this isolate and LD_{50} of the vaccine and wild type of this bacteria were determined that reach to (3.3×10^7 cell \ ml) and (2.6×10^4 cell \ml) respectively. The (10^7 and 10^6 cell \ ml) dose injected in mice to determine the apoptosis rate in new methods which reach to (2.33 and 0.58) and (8.33 ± 0.58) respectively , but when used the classical methods the apoptosis rate reach to the (11.33 ± 1.15) and ($19,33 \pm 0.58$) for (10^7 and 10^6 cell \ ml) respectively.

المقدمة Introduction //

يعرف الموت الخلوي المبرمج Programmed Cell death بأنه انتحار الخلية الفسلجي ويدعى أيضا بانتحار الخلية Cell Suicide أو الاستماتة Apoptosis وهي عملية فعالة تحدث في جميع الكائنات الحية متعددة الخلايا كجزء من عمليات التطور الطبيعية تشمل تنظيم خلايا الأنسجة البالغة وإزالة الخلايا غير المرغوبة اثناع التطور الطبيعي للجنين (1) تحدث هذه العملية نتيجة محفزات فسلجية او فسلجية مرضية حيث تبدأ الخلايا بعدد من التغيرات المظهرية مثل انكماش الخلايا وفقدان الارتباط السطحي بين الخلايا كالدسموسمات Desmosome حيث تنفصل الخلية عن الخلايا المجاورة يرافقها تكثف الكروماتين ثم تجزؤ النووية والنواة ويبدأ الغشاء الخلوي بتكوين blebs اونتوءات تحوي بداخلها السايتوبلازم والعضيات وأجزاء النواة تدعى الأجسام المستميتةApoptotic bodies ثم تقوم الخلايا المجاورة او الخلايا البلعمية Macrophages بعملية البلعمة للأجسام المستميتة دون تحرر للمواد التي بداخلها وبالتالي لايحدث التهابات نتيجة عملية الموت المبرمج (2,3). إن النقصان أو الزيادة في هذه العملية تدل على حدوث أمراض خطيرة كالسكري ،الزهايمر ، أمراض المناعة الذاتية والأورام وغيرها .

تعد بكتريا الليستريا *Listeria monocytogenes* من العصيات موجبة لصبغة غرام تكون متحركة بدرجة حرارة 25 م° وغير مكونة للابواغ وفاقدة للمحفظة تنتشر بشكل واسع في البيئة نتيجة تحملها التراكيز العالية من الملح والأس الهيدروجيني المرتفع, وبإمكانها التضاعف في درجة حرارة 4 م°, تمتاز بنموها الداخل – خلوي الذي ساعد على حمايتها من العوامل البيئية الخارج خلوية وانتقالها من خلية إلى أخرى وتسبب عدد من الإمراض الخطيرة للإنسان كالتهاب السحايا وإنتان الدم في الأطفال حديثي الولادة فضلاً عن الإجهاض المتكرر عند النساء الحوامل (4,5) .

إن قدرة الليستريا على إثارة استجابة مناعية من خلال تنشيط الخلايا التائية CD4, CD8 وكذلك تحفيز العديد من الحر كيات الخلوية مثل TNF-α، INF-β ، IL-12 ، IL-2 (6). فضلاً عن قدرتها على إثارة استجابة مناعية خلطيه كل هذا جعلها مؤهلة لتكون لقاح للعديد من الإمراض وقد طبقت على العديد من الإمراض مثل الأنفلونزا ، الايدز و الأورام .إن الإصابة بجرثومة الليستريا تسبب الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية بفعل إفرازها للذيفان Listeriolysin-O ، لذا فأن قياس نسبة Apoptosis في الخلايا اللمفاوية المحقونة بلقاح الليستريا سيبين نجاح عملية تحضير اللقاح من خلال تثبيط ألجين المسؤول عن إفراز الذيفان من ناحيـــــة والى قدرة اللقاح على خفض نسبة الموت المبرمج عند الإصابة بـداء Listeriosis (7,8) ، لذ تهدف الدراسة الى تحضير لقاح حي مضعف من بكتريا الليستريا لكفاءتها في استحثاث الجهاز المناعي ثم قياس نسبة Apoptosis في الخلايا اللمفاوية المحقونة بلقاح الليستريا سيبين نجاح عملية تحضير اللقاح من خلال تثبيط ألجين المسؤول عن إفراز الذيفان من ناحيـــــة والى قدرة اللقاح على خفض نسبة الموت المبرمج عند الإصابة بداء Listeriosis .

المواد وطرائق العمل Material &methods //

1- جمع العينات : تم جمع50 مسحة مهبل عليا High vaginal swab من نساء يعانين من الإجهاض المتكرر ، تراوحت أعمارهن 20-40 سنة . نميت المسحات على أوساط زرعيه طبيعية وانتقائية خاصة ببكتريا الليستريا وهي Listeria Selective Agar Base ; Palcam Listeria Selective Agar , Modiffied Fraser Agar

التشخيص ألمختبري : شخصت بكتريا الليستريا اعتماداً على الخصائص الزراعية والمظهرية وباستخدام الاختبارات الكيموحيوية والفسلجية باستخدام APi LISTERIA –Kit (9) .

2 - تحضير اللقاح : حضـــر لقاح جرثومـــة الليستريا الحي المضعف وفق ما جاء في (10)

3 - تحديد الجرعة القاتلة النصفية (LD_{50}) : : حضر العالق البكتيري بتركيز 1×10^9 حيث زرعت عزلة بكتريا *Listeria monocytogenes* في 100 مليلتر من وسط Brain heart infusion broth وحضنت لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ، ثم نبذ المزروع البكتيري بالمنبذة المبردة بسرعة 6000 دورة/دقيقة لمدة 30 دقيقة بدرجة 4 م° غسلت الخلايا مرتين باستخدام محلول دارئ الفوسفات المعقم ذو الأس الهيدروجيني7.2 .وأخيراً علق الراسب بكمية مناسبة من دارئ الغسل نفسة ليعطي امتصاصية قيمتها 1 بجهاز المطياف وعلى طول موجي 600 نانوميتر ، للحصول على عالق بكتيري بتركيز 1×10^9 خلية/مللتر . . ثم عملت منه سلسلة تخافيف عشرية للحصول على التراكيز البكتريا الاتية 10^2 - 10^8 خلية بكترية / مل.

تم تهيئة 7 مجاميع من الفئران بواقع 5 فئران للمجموعة وتركت مدة أسبوع تحت المراقبة قبل استخدامها في التجربة ، تم حقن مجاميع الفئران بالتراكيز البكتيرية أعلاه وبجرعة 0.1 مل /فأر في البريتون ، وحقنت مجموعة السيطرة بدارئ الفوسفات المعقم ، ثم تم حساب عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة من العالق البكتيري نسبة الى العدد الكلي الذي تم حقنه وحسبت الجرعة المهلكة لنصف عدد الفئران بأتباع طريقة (11) ، أما لقـــاح الليستريا فقد تم حساب عدد الفئران الحيـــة والميتة لكل جرعة من جرع اللقاح البكتيري نسبة إلى العدد الكلي وحسب طريقة (12) . وكما يأتي :-

حقنت الفئران جميعها عن طريق غشاء البريتون Intraperitoneal بجرعة مقدارها 1 مل/فأرة ، تم تهيئة 40 فأرة بيضاء اللون تتراوح أعمارها بين 8-10 أسبوع وأوزانها 23-27 غم وقسمت إلى أربعة مجاميع

المجموعة الأولى تضمنت 16 فأرة حقنت باللقاح الحي المضعف وقد قسمت الى مجموعتين ثانويتين:

A1 ضمت 8 فئران حقنت بتركيز 1×10^6 خلية بكتريا /مليلتر ، حقنت بالجرعة الأولى وبعد أسبوع أخذت 4 فئران لإجراء الاختبار بينما أعطيت الجرعة الثانية للفئران المتبقية .

B1 ضمت 8 فئران حقنت بتركيز 1×10^7 خلية بكتيرية/ملليلتر وكررت الخطوات المذكورة في أعلاه.

المجموعة الثانية ضمت 16 فأرة حقنت بالعالق البكتيري وقد قسمت إلى مجموعتين ثانويتين:

A1 ضمت 8 فئران حقنت بعالق بكتيري بتركيز 1×10^7 خلية/مليلتر، ثم حقنت الفئران بالجرعة الأولى وبعد أسبوع أخذت 4 فئران لإجراء الاختبار بينما أعطيت الجرعة الثانية للفئران المتبقية .

B1 ضمت 8 فئران حقنت بالعالق بتركيز 1×10^7 وتكررت الخطوات المذكورة في A1 أعلاه.

المجموعة الثالثة ضمت 8 فئران حقنت بدارئ الفوسفات الملحي المعقم ، حقنت الفئران جميعها بالجرعة الأولى من الدارئ ثم بعد أسبوع أخذت 4 فئران للفحص في حين أعطيت الفئران المتبقية الجرعة الثانية وبعد أسبوع اجري عليها الفحص.

4 - قياس الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية

Detection of Apoptosis in Lymphocyte

أولا- الطريقة التقليدية

تم قياس نسبة المـــــوت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية باستخـــــــدام مزيج صبغة Acridine orange (AO) وEthedium bromide(EB) حيث يتخلل AO الخلايا الحية معطية النواة اللون الأخضر ، أما EB فأنه يدخل فقط الخلايا التي تعاني تجزئة الغشاء السايتوبلازمي ويصبغ النواة باللون الأحمر وبذلك فأن الخلايا الحية تأخذ أنويتها اللون الأخضر أما الخلايا المستميتة فأن أنويتها تعاني تكثف وتجزئة وتأخذ اللون الأحمر . وتم أولا فصل الخلايا اللمفاوية حسب ماجاء في (13)

ثانيا- طريقة قياس الاستماتة باستخدام العدة التشخيصية

Apoptosis detection ,Mitochondria Bioassay Kit (Biosource com).

استخدمت عدة تحتوي صبغة ذات شحنة موجبة متأينة تتألق بشكل مختلف في كلا النوعين من الخلايا (الصحيحة والمستميتة) ، ففي الخلايا الصحيحة Healthy cell تتجمع الصبغة في المايتوكوندريا وتعطي لون أحمر براق متألق ، بينما في الخلايا المستميتة Apoptotic cell يحصل تجمع للصبغة في المايتوكوندريا نتيجة التغيرات الفسلجية في الغشاء لذلك تبقى الصبغة في السايتوبلازم وتتلون باللون الأخضر. تم تشخيص الإشارات المتألقة بواسطة مجهر متألق وباستخدام (Bond pass filter) . واعتمادا على الطريقة الموضحة في Mitochondria bioassay kit (Biosource .com).

5- التحليل الإحصائي

تم التحليل الإحصائي بطريقة ANOVA test (analysis of variance) وعلى مستوى معنوية o.o1 (14).

النتائج والمناقشة Result &Discussion

تم التحري عن وجود بكتريا *Listeria monocytogenes* المسببة للإجهاض في 50 عينة لمسحات مهبل عليا High vaginal swab المأخوذة من نساء بعانين من الإجهاض المتكرر ، حيث تم الحصول على عزلة واحدة فقط فقد درست الصفات الزرعية للمستعمرات بعد تنميتها على الأوساط الطبيعية والتفريقية وملاحظة شكل وحجم وخواص ولون المستعمرات وكونها محللة للاسكيولين باعتباره صفة تشخيصية مهمة حيث ظهرت المستعمرات سوداء داكنة محاطة بهالة سوداء على خلفية ذات لون احمر في وسط PALCAM agar. (9,15)
كما اظهر الفحص ألمجهري للشرائح المصبغة بصبغة غرا م بكتريا ايجابية التصبيغ ذات إشكال عصوية كروية أو عصوية بشكل حرفV أو حرف L بسبب ظاهرة تعدد الأشكال التي تتميز بها البكتريا (16) .
تم تحديد الجرعة القاتلة النصفية لعالق البكتريا والتي بلغت 2.6×10^4 خلية بكترية/مليلتر وقد كانت نتائج البحث مشابهة لما توصلت إليه الدراسات العالمية فقد وجد ليكوت وجماعتة (17) أن الجرعة المهلكة للنصف لبكتريا الليستريا كانت (1.2×10^4 خلية بكتيرية/مليلتر) وفي دراسة أخرى وجد أن عدد خلايا بكتريا الليستيريا القادرة على هلاك نصف عدد الفئران تراوحت بين 10^4-10^7 وحدة مكونة للمستعمرة /مليلتر لبعض السلالات الضارية من مجموع 13 سلالة ضارية من بكتريا الليستيريا (18،19،20)
كما أعيدت نفس التجربة لكن باستخدام لقاح الليستريا الحيٌ المضعف لغرض تحديد عدد خلايا بكتريا الليستريا القادرة على هلاك نصف عدد الفئران وكان$3.3 \times$ خلية /مليلتر . وقد بينت الدراسات قدرة الليستريا المضعفة على أثارة وتحفيز المناعة الخلوية والخلطية من خلال تنشيط الخلايا التائيةعن طريق المعلمات CD4, CD8 . كما أشارت إلى أن قيمة الجرعة القاتلة النصفية للقاح اللستريا المضعفة 4.36×10^7 والتي استطاعت منح الجرذان المصابة تجريبيا" بالسرطان مناعة ضد الأورام من خلال تنشيط المناعة التائية CTL وإنتاج INF (21).
بينما توصل باحثون آخرون إلى كون الجرعة المهلكة لنصف الفئران للقاح الليستريا الحي المضعف كانت 1×10^7 (22).
وبينت دراسات أخرى إن الجرعة القاتلة النصفية للعالق البكتيري كانت 1×10^4 CFU إما اللقاح الحي المضعف $\times 10^7$ CFU 7 قادرة على أثارة استجابة الخلايا اللمفية التائية السامة CD8 وإثارة CTL والخلطية . كما تم اختيار الجرعة القاتلة للنصف مع التركيز الأدنى لغرض المقارنة وتقييم تأثيرها على النسبة المئوية للموت الخلوي المبرمج (23).

قياس النسبة المئوية للموت الخلوي المبرمج

يعد موت الخلايا المبرمج إحدى الآليات المهمة في التخلص من الخلايا المتعرضة للضرر والخلايا التي لايحتاجها الجسم خلال مدة التطور ، ويتم في أطار منظم ودقيق ومتوازن ومسيطر عليه ، ويحدث استجابة لمحفزات داخلية وخارجية .وأن عملية الموت المبرمج تمر بمراحل متداخلة تتضمن مرحلة التحفيز بواسطة أشارات خاصة مثل الجذور الحرة والمرحلة المؤثرة التي تتم بفعل المايتوكوندريا المحيطة ثم مرحلة الالتهام والتجزئة من الخلايا(24،25).

بينت نتائج الموت الخلوي المبرمج بإتباع الطريقة ألجديدة إن الحيوانات المحقونة باللقاح الحي المضعف بتركيز 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة /مليلتر أظهرت أوطأ نسب لمعدلات الخلايا اللمفاوية التي تمر بالموت الخلوي المبرمج عند الجرعة المنشطة مقارنة بالسيطرة وهي حوالي 0.58+2.33 جدول (1) شكل (1). في حين كانت نسبة الموت 8.33+0.58 عند

حقنها بالجرعة المنشطة للقاح بتركيز 10^6 خليـــــة مكونة للمستعمرة /مليلتر ،مقارنة بالعالق الجرثومي الطبيعي والسيطرة جدول (2)،في حين وجد من خلال استخدام الطريقة الكلاسيكية وباستخـــــــــــدام مزيـــج صبغة الاكردين المتألقة والاثديم بروما يد إن الجرعة الثانية للتركيز 10^7 كانت 1.15± 11.33 جدول (3). أما جرعة التقوية للتركيز 10^6 فقد كانت 0.58 +19.33 كما موضح بالجدول(4) شكل (2).

كما لوحظ إن حقن الحيوانات بالعالق الجرثومي الطبيعي أدى إلى رفع معدل الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفاوية مقارنة بالسيطرة حيث يزداد المعدل بزيادة الجرعة فقد سجلت الجرعة الأولى من التركيز 10^7 خلية مكونة للمستعمرة /مليلتر باستخدام الطريقة الجديدة 30.67±0.55 أما الجرعة الثانية فقد وصلت إلى 44.33±2.89 جدول (1).وعند استخدام التركيز 10^6 خلية مكونة للمستعمرة /مليلتر أعطت الجرعة الأولى فيه 21.33±2.31 والثانية 47.67±3.79 جدول2 . أما عند استخدام الطريقة الكلاسيكية كانت نسبة الخلايا اللمفية التي تعاني الموت المبرمج في الفئران المحقونة بالجرعة الأولى من التركيز 10^7 وحدة مكونة للمستعمرة /مليلتر 71.33± 1.53 في حين أعطت الجرعة الثانية 82.00± 2.00 جدول 3 . بينما اظهر التركيز 10^6 خليـــــة مكونة للمستعمرة /مليلتر ارتفاع ملحوظ حيث أعطت الجرعة الأولى منة 68+2.65 إما الجرعة الثانية فقد وصل الارتفاع فيها إلى 79.67±0.54 .جاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي بينت إن الفئران المصابة بالليستيريا تتعرض خلاياها اللمفاوية إلى الموت الخلوي المبرمج بعد 48 ساعة من الإصابة (26) . كما وجد إن طريقة العلاج الوحيدة لمنع موت الخلايا اللمفاوي المبرمج هي بإصابة الفئران بسلالة لستيرية مضعفة عن طريق حـــذف ألجين المسؤول عن إنتاج Listeriolysin O (LLO) أو عن طريق الحقن باللستيريا المقتول بالحرارة Heat killed listeria (HKL) أو إضافة Anti –LLO(27،28)

كما توصل بعض الباحثين إلى أن عملية الموت المبرمج التي ترافق العديد من الإصابات يسيطر عليها بالعديد من العوامل المثبطة والمنشطة للإنزيمات المحللة للبروتينات المسؤولة عن تنظيم هذه العملية حيث أكدوا على أن استعمال العديد من الوسائل واللقاحات وغيرها تعمل على تقليل نسبة هذه العملية لتلافي الضرر الجسمي الناتج عنها في المضيف (29).

جدول(1) :معدل تأثير اللقاح الحي - المضعف لجرثومة اللسيتريا في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التي تمر بالموت الخلوي المبرمج (طريقة العدة) في إناث مجاميع السيطرة والفئران المعاملة 10^7 .

المجاميع	العدد الكلي	الجرعة الأولى		الجرعة الثانية		
		الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري
لسيطرة	3	17.67	0.58±	3	16.67	1.15±
عالق جرثومي	3	30.67	0.55± H	3	44.33	2.89± H
للقاح المضعف	3	8.33	0.59 ± H	3	2.33	0.58 ± H
لمجموع	9			9		
المقارنة المعنوية	P-value	0.01		0.01		
ANOVA (F-test)	مستوى المعنوية	H		H		

جدول(2): معدل تأثير اللقاح الحي - المضعف لجرثومة اللسيتريا في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التي تمر بالموت الخلوي المبرمج (طريقة العدة) في إناث مجاميع السيطرة والفئران المعاملة بالتركيز 10^6 .

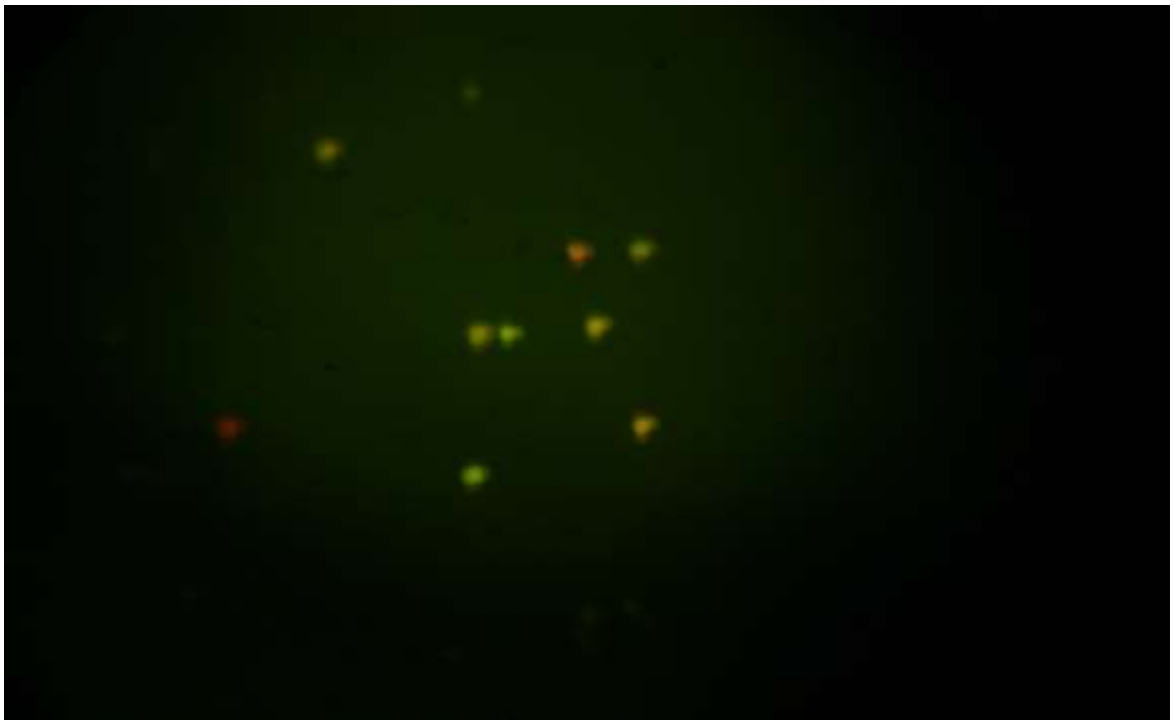
المجاميع	العدد الكلي	الجرعة الأولى		الجرعة الثانية		
		الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري
لسيطرة	3	17.67	0.58±	3	16.67	1.15±
لعالق الجرثومي	3	21.33	2.31± S	3	47.67	3.79± H
للقاح المضعف	3	12.67	0.58± H	3	8.33	0.58± H
لمجموع	9			9		
المقارنة المعنوية ANOVA (F-test)	P-value	0.01		0.01		
	مستوى المعنوية	H		H		

جدول (3): معدل تأثير اللقاح الحي - المضعف لجرثومة اللسيتريا في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التي تمر بالموت الخلوي المبرمج (الطريقة الكلاسيكية) في إناث مجاميع السيطرة والفئران المعاملة (10^7).

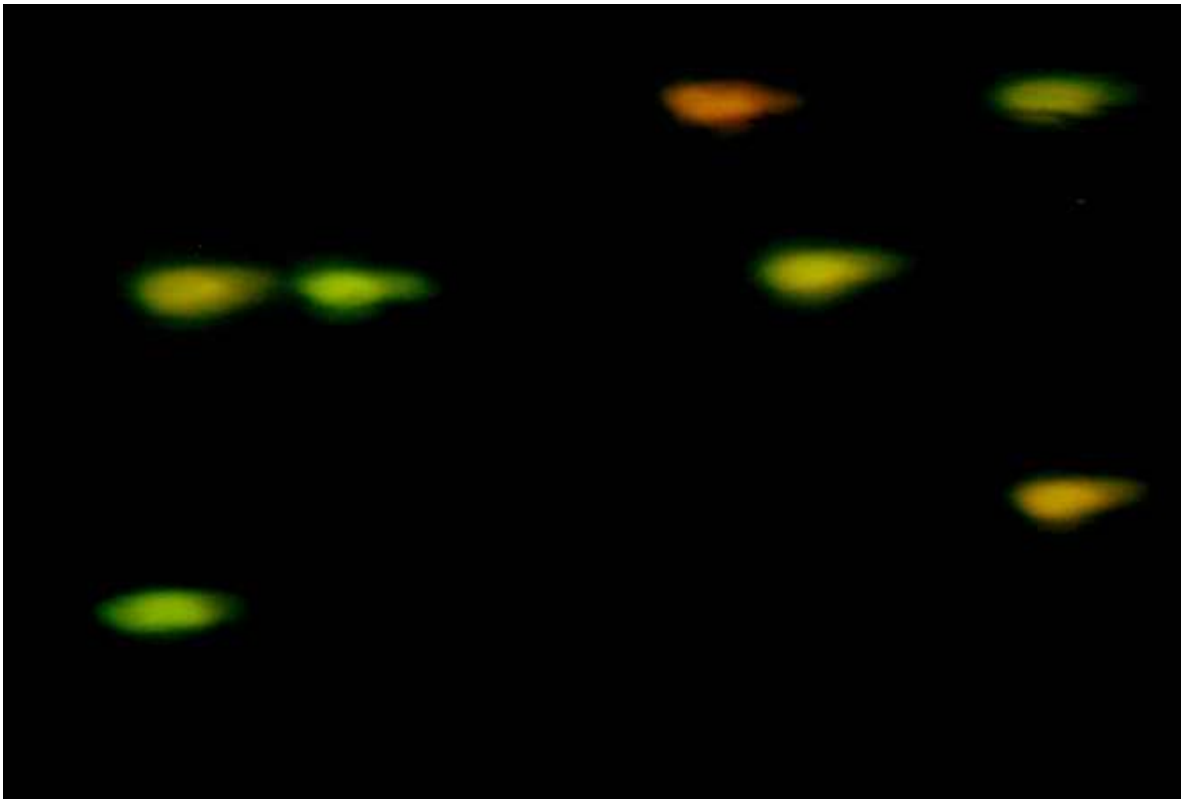
المجاميع	العدد	الجرعة الأولى		الجرعة الثانية		
		الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري
السيطرة	3	31.33	1.53±	3	30.33	0.58±
العالق الجرثومي	3	71.33	1.53± H	3	82.00	2.00±H
اللقاح المضعف	3	22.67	0.59±H	3	11.33	1.15±H
المجموع	9			12		
المقارنة المعنوية ANOVA (F-test)	P-value	0.01		0.01		
	مستوى المعنوية	H		H		

جدول(4): جدول معدل تأثير اللقاح الحي - المضعف لجرثومة اللسيتريا في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية التي تمر بالموت الخلوي المبرمج (الطريقة الكلاسيكية) في إناث مجاميع السيطرة والفئران المعاملة 10^6 .

مجاميع الدراسة	العدد	الجرعة الأولى		الجرعة الثانية		
		الوسط الحسابي	الانحراف المعياري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعياري
السيطرة	3	31.33	1.53±	3	30.33	0.58±
العالق جرثومي	3	68	2.65± H	3	79.67	0.54± H
اللقاح المضعف	3	24.33	0.58± H	3	19.33	0.59± H
المجموع	9			9		
المقارنه المعنويه ANOVA (F-test)	P-value	0.01		0.01		
	مستوى المعنويه	H		H		



شكل (1) توضح عملية الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفية للفئران المحقونة بالتركيز 10^{7} وبالطريقة الجديدة.



شكل (2) توضح عملية الموت الخلوي المبرمج للخلايا اللمفية للفئران المحقونة بالتركيز 10^{7} وبالطريقة الكلاسيكية

Reference

1.Cohen ,G.M. ; Sun ,X.M. ; Snowden, R.T. ; Ormerod , M.G. ; Dinsdal,D.(1993) : Identification of a transitional preapoptotic population of thymocyte . Immunology , 151(2) : 566-576 .

2.Savill , J.S ; Wyille , A .H. ; Henson ,J.E. , and Haslett, C. (1989) : Macrophage phagocytosis of aging cells . Programmed cell death in neutrophils leading to their recognition by macrophage. Journal of Clinical Investigation 83: 865-867 .

3.Ellis ,R.E. ; Jacobson , D.M. ; and Horvitz ,H.R. (1991) : Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in caenorhabditis elegans . Genetics , 129 : 79-94 .

4.Quinn ,P.J.; Carter ,M.E.; Markey ,B.K.;and Carter ,G.R.(2005) :Vet. Microbiology and Microbiol Disease.73-74.

5.Mahmood , M. ; Ahmed, A. and Hussain , I (2003) : Prevalence of *Listeria monocytogenes* in poultry meat products and other related in animates of Faisalabad . Pakistan J.Nutra.2 :346-349.

6.Liau, L. M.; Eric, R. J.; Thomas, j. k .; Syliva, K. O.; Steven, N.S. and Jeff, M. B. (2002).Tumor immunity within the central nervous system stimulated by recombinant *Listeria monocytogenes* vaccination A. A. Cen.Res.57: 251-258.

7.Zhao , X.; Zhogxia , L.; Baiyan , G. and Frankel , F.R. (2005) : Pathogenicity and Immunogenicity of a vaccine strain of *Listeria monocytogenes* that relies on a suicide plasmid to suplly an essential gene product . Infec. And Immuno. 73(9): 5789-5798 .

8.Yoshimura ,K.;Jain ,A.;Allen ,H.; Laird ,L.;Chia ,C.;Ravi ,S.; Brockstedt ,D.; Giedlin ,M.;Cook ,D.; Leong ,M. and Schulick ,R.(2006) :Selective targeting of antitumor immune responses with engineered live-attenuated *Listeria monocytogenes.* Cancer Research.66:1096-1104 .

9.USFDA/ Center for Food safety and Applied Nutrition ,USDA /Food safety and inspection service centers for Disease control and prevention .January (2003) .Detection and Enumeration of *listeria monocytogenes*.

10.McCarthy ,S.A.(1995) : Pathogenicity of non stressed , heat stressed , and resuscitated *Listeria monocytogenes* 1A1 cells .Appl.Envir.Microbiol.57:2389-2391.

11.Beaglehole, R.; Bonita, R. and Jjellstorm, T. (2000) : Basic epidemiology WHO library cataloguing – in publication data .

12.Stark , H. ; Kevin , W. ; Hao , S. ; Ronald , A. ; Thomas , W. ; Dirk , B. ; David , J. ; Darren , E. ; Jeffrey , F. and Bouwer , H. (2004) : *Listeria monocytogenes* as a vaccine vector : virulence attenuation or existing antivector immunity dosenot diminish therapeutic efficacy . J. of .Immun. 173 : 420-427.

13.**Shellman ,Y.G**.(2005) : Asimple technique for quantifying apoptosis in 96-well plates . BMC Biotechnology 5(12) :1-7.

14.Leclercq , A.(2004) :Atypical colonial morphology and low recovery of *listeria monocytogenes* strains on Oxford ,Palcam ,rapid *listeria monocytogenes* and alone solid media .J . Micro. Methods .57 :251-258.

15.Axelsson , F. And sorin ,M.L. (1998) : *Transia listeria* . technical handbook . www.diffchamb.com.

16. الـراوي، خاشـع محمـود (2000) مـدخل إلـى الإحصـاء. الطبعـة الثالثـة. كليـة الزراعـة والغابـات ، جامعـة الموصـل.

17.Lecuit , M . ; Drami , S. ; Fedorchaiken , M. ; gumbiner ,B and Cossart ,P .(1999) : A single amino acid in E-cadherin responsible for host specifity toward the human pathogene *listeria monocytogenes* .EMBO.J. 18(15) : 3956-3963.

18. Roche , S.M. ; Gracieux , P. ; Albert , I. ; Gouali , M. ; Jacquit , C. ; Martin , P.M. and Velge , P.(2003) : Experimental validation of low virulence in field strains of *Listeria monocytogenes* .Infec.Immuno.71(6):3429-3436.

19. **Utermohlen, O**.; Karow, U.; Lohler, J.; and Kron, M.(2003) :Severe impairment in early host defenes against *listeria monocytogenes* in mice deficient in acid sphingomyelinase. J.Immun.170 :2621-2628.

20.Shen , Y.; Naujo ,M. ; Park ,M. ; and Ireton , K. (2000) : In B-dependent internalization of Listeria is mediated by the met receptor tyrosine Kinase. Cell. 103(27) : 501-510.

21. Bakaidjiev, A.I.;Stacy , B.A.; Fisher , S.J.and Portnoy , D.A.(2004). Listeriosis in the pregnant guinea pig : a model of vertical transmission .Infect& Immune 72 (1) :489-497.

22. Brockstedt ,D.G ; marten ,A.G. ; Meredith,L.L. ; keith ,S.B. ;William ,L. And Daniel ,A.P. (2004) : Listeria- based cancer vaccines that segregrate immunogenicity from toxicity .PANS 10(38) :13832-13837.

23. Rayevskaye , M.V. and Frankel , F.R. (2000) : Systemic Immunity and Mucosal immunity are induced against human immunodeficiency virus Gag Protein in Mice a new hyper attenuated strain of *listeria monocytogenes*. Infec.Immuno.71(6):3429-3436.

24. Kerr, S. F. R., Wyllie, A.A. and Currie, A.R.(1972):Apoptosis : a basic biological phenomenon with .wide –ranging implications in tissue kienetics .Br .J. Cancer. 26:239-257.

25.Wyllie, A. H., Kerr, J.F. and Curries ,A. R. (1980). Cell death :the significance of apoptosis .Int. Rev.Cytol.,68:251-306.

26. Merrick, J.C.; Edelsom, B.T. ; Bhardwaj, v. and Unanue, E.R. (1997).Lymphocyte apoptosis during early phase of infection. Am. J. Pathol. 151:785-792.

27. Edelson, B.T. and Unanne ,E.R. (2000) : Intracellular antibody neutralizes Listeria growth . Immunity . 14:503-512 .

28. Carrero ,J.A.;Calderon ,B.C. ;Unanne ,E.R.(2004) : Type 1 interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to listeria infection .J.E.M. ,200(4) :535-540 .

29. **Zecconi**,A. and Piccinini , R. (2000) . The modulation of mammary Gland immune defenses . an update . J. Dairy Science.82(12):2101-2107.