مجلة جامعة بابل / العلوم الصرفة والتطبيقية / العدد (١) / المجلد (٢٤) : ٢٠١٦

دراسة مناعية لتقييم كفاءة لقاح مستضد متعدد السكريد لجدار خلية الفطر *Aspergillus niger* في حيوانات ذكور الارانب

نداء شهاب حمد كلية العلوم للبنات–جامعة بابل Nidashab@yahoo.com

فريال جميل عبد كلية العلوم–جامعة بابل Frialabd@yahoo.com

غدير كاظم عبود كلية العلوم للبنات–جامعة بابل Odat9090@yahoo.com

الخلاصة

هدفت الدراسة الحالية تقييم كفاءة لقاح مستضد متعدد السكريد polysaccharide المعزول من جدار الفطر *Aspergillus niger* الذي تم عزلة من عينات القشع لمرضى مصابين بالتدرن الرئوي ومن التربة ايضا في توفير الحماية ضد الاصابة بهذا الفطر مستقبلا عند التعرض لتراكيز عالية من كونيدات نفس الفطر، فقد جرى تمنيع 6 من ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء بـــالمستضد وبوجود مجموعة اخرى (عددها6 أرانب) كمجاميع سيطرة والتمنيع تم وفقا لبرنامج تمنيعي.

فقد لوحظ على حيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر عن طريق الوريد الاذني بعد فترة من الزمن تغيرات مظهرية وسلوكية في حين مجموعة حيوانات المستضد لم يلاحظ عليها هذه التغيرات حتى موعد تشريحها ، كذلك تبين بعد التشريح أن هنالك تضخم واضح في حجم الرئة والطحال لحيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي، فظهر مؤشر وزن الطحال 2.13±14.04، 3.56±11.51 ومؤشر وزن الرئة 3.96±21.72، 2.85±19.86 لمجموعة الحيوانات المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger* المعزول من عينات القشع لمرضى التدرن والتربة وعلى التوالي

اما بالنسبة للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الفطر *A.niger* المعزول من مرضى التدرن والمحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger* مصدره مرضى التدرن ايضا كان مؤشر وزن الطحال لها 3.23±10.89 ومؤشر وزن الرئة 3.96±18.58 مقارنة مع مجموعة الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الفطر *A.niger* المعزول من التربة والمحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger* مصدره التربة كان مؤشر وزن الطحال لها 0.99± 10.39 و3.99± 13.25 مؤشر وزن الرئة لنفس الحيوانات.

ودلت نتائج المؤشر الاخر وهو زراعة هذه الاعضاء (رئة وطحال) الحيوانات التي اجري عليها اختبار التحدي بعد التشريح على وسط السابرويد دكستروز اكار لمعرفة قدرة الجسم وسرعته في القضاء على كونيدات الفطر ومنع حدوث الاصابة، بينت النتائج ظهور مستعمرات الفطر *A.niger* لرئة وطحال حيوانات السيطرة (6 أرانب) المحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* المعزول من مرضى التدرن ومن التربة وبالمقارنة مع الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد لجدار هذا الفطر التي لم يظهر فيها نمو لمستعمرات لهذا الفطر.

الكلمات المفتاحية: *Aspergillus niger* ، مستضد متعدد السكريد Polysaccharide ، جرعة التحدي، عينات القشع لمرضى التدرن ، التربة.

Abstract

This current study aimed to evaluate the efficiency of polysaccharide antigen vaccine which had been isolated from wall of *A.niger fungi* isolated from TB pateints sputum and soil, in order to provide future protection against infection with higher concentration of *A.niger* conidia. Six New Zalent white male rabbit had been immunoized with antigen in addition to another group (of 6 rabbit) as control by used the fungi conidis .

Challenge with conidia were occurred on both groups by IV A morphological and behavioral changes appeared with control animals treated with challenge dose while the immunized one have no change but the size of spleen and lung in control animals injected with challenge dose increased the spleen weight 14.04±2.13 and 11.51±3.56 the lung weight for animals Immunized with *A.niger* conidia which isolated from soil and sputum of Tuberculosis patients(TB). While for animals immunized with *A.niger* polysaccharide antigen and treated with challenge dose of *A.niger* conidia from TB patients the spleen weight 10.89±3.23 and lung weight 18.58±3.96 .Compared to that immunized with *A.niger* polysaccharides antigen from soil and treated with challenge dose of *A.niger* conidia from soil where spleen weight 10.39±0.99 and lung weight 13.25±3.99.However, the histological cuture of these organs (lung& spleen) on sabouraud Dextrose agar had been done in order to indicate the ability of body to eradicate fungi conidia and ability to prevent infection.

These result indicate presence of *A.niger* colony for spleen and lung culture of control animals (6 rabbit) treated with *A.niger* conidia isolated from soil and pateints with TB. While the absence of such colony in culture of lung and spleen of immunized animals.

Keywords: *Aspergillus niger*, Polysaccharide, chalngge defence, septum, soil.

المقدمة

ان الاصابة بالأنواع العائدة لجنس الرشاشيات *Aspergillus spp* هي من اكثر الظواهر العرضية للأخماج الفطرية المختلطة(Mixed infection) في العالم وعلى نطاق واسع واكثرها تأثيرا على الوضع الصحي فهي شائعة الانتشار في مرضى الوهن المناعي (Prescott *et al*., 2005) ، فعدد غير محدود من هذه الفطريات تنتشر وبشكل واسع في العالم وتتواجد بأشكال رمية في التربة والماء والهواء وتتمكن من النمو على أي وسط حي وتتمكن أبواغها من البقاء حية والمقاومة لأشهر أو لسنوات عديدة (شريف ، 2012) ، فهي تنتهز فرصة ضعف المناعة للجسم لتصبح ممرضة لتتسبب الاصابة بداء الرشاشيات (Aspergillosis) كما في الأمراض المزمنة كالتدرن الرئوي (Pulmonary tuberculosis) والأورام السرطانية المزمنة (Chronic Carcinoma) والعلاج المديد بالمضادات الحيوية واسعة الطيف(Broad-spectrum antibacterial) أو خلال برنامج العلاج بالكورتيكوستيرويد (Corticosteroid therapy) كحالات مرضى الربو(Asthma) ومرضى الإيدز (HIV) والاعتلالات الأيضية كمرض السكري (Diabetes Mellitus) (Olempska-Beer *et al*., 2006).

فداء الرشاشيات Aspergillosis هو الالتهاب الذي تسببه فطريات *A.fumigatus* بشكل اساسي في الجهاز التنفسي ويمكن للأنواع الأخرى مثل جنس *A. terreus* , *A. niger* , *A. flavus* وبقية الانواع ان تسببه ولكن بدرجة أقل(Batra *et al* .,2006) فالأنواع التابعة لهذا الجنس هي من الفطريات التي كيفت ابواغها للانتشار عبر الهواء باعتباره الوسيلة الأكفأ لانتشار وحداته التكاثرية ولخفة وزن هذه الابواغ وسهولة حملها بواسطة الرياح (Huang ,2007) . لذا فان الهواء محمل بمئات من الابواغ التي يستنشقها الانسان دون حدوث الاصابة باستثناء الاشخاص الذين يعانون من الضعف المناعيSuppressed) (Immune وبذلك فان الهواء هو المسبب الأول لظهور امراض Aspergillosis (Panda *et al*,.2009).

ان التركيز المتوسط من كونيدات الفطر *Aspergillus* والموجود في الهواء 0.2-15 كونيديا/ م^3 ووفقا لدراسات مختلفة يمكن ان يصل الى 106 كونيديا/م^3 كما في بعض البيئات الزراعية ، ونتيجة لذلك يستنشق الانسان وبشكل روتيني مئات الكونيدات (Vanden Bergh *et al* .,1999) ومن ناحية اخرى وبسبب الحجم الصغير لكونيدات الرشاشيات (2-5 مايكروميتر) مما يمكنها من الدخول وتجنب الية الدفاع والوصول الى منطقه الجهاز التنفسي ثم الرئة (Phadke *et al* .,2007)

ان الجزء الشائع في جدار الخلايا الفطرية هو متعدد السكريد Polysaccharide (اكثر من90 %) والاكثر وفرة فيه هو β-D-glucan (50-60 من متعدد السكريد لجدار الخلية) الذي يلعب دور مهما في بناء الهيكل الخارجي واعطاء الصلابة والثبات للخلية وتحديد الشكل المظهري (Schachtschabel *et al* .,2013) فقد اثبتت الدراسات ان لمتعدد السكريد القدرة على حث المناعة المتخصصة كاستجابة المضيف، ففي الفئران المصابة بداء الرشاشيات فان سلاسل β-1,3 glucan، α-1,3 glucan تحفز الاستجابة للحماية من خلال استجابة Th17 وTh1 او استجابة T reg (Bozza *et al* .,2009) فاللقاحات الفطرية تقوم بتنشيط المناعة بمعنى انها تعزز الجهاز المناعي لنوع محدد من الفطريات ضد اي هجوم من قبل هذه الفطريات، فهي توفر

الحماية ضد نوع او اكثر من مستضد الفطر المخصص (Carvalho *et al* .,2012). الهدف من الدراسة هو التحري عن كفاءة مستضد متعدد السكريد المعزول من فطر *A.niger* في الارنب.

المواد وطرائق العمل

1-جمع العينات

جمعت 50 عينة تضمنت 25 عينة سريرية في الصباح الباكر من المرضى الوافدين لمركز التدرن والأمراض الصدرية في محافظة بابل والذين يعانون من مرض التدرن الرئوي ، و25عينة تربة من مناطق بابل وضواحيها لغرض التحري عن تواجد الفطر *A.niger*

وضعت عينات القشع في قناني بلاستيكية معقمة ومحكمة الغلق ونقلت خلال فترة لا تزيد عن ساعة الى المختبر ليتم زراعتها في طبق بتري حاوي على وسط السابرويد دكستروز اكار (SDA) وحضنت لمدة 5±2 أيام بدرجة حرارة 37 مْ ،لغرض الحصول على عزلات الفطر *A.niger*.

اما عينات التربة فقد استعملت طريقة التخافيف في عزل الفطر وحسب دراسة (Abdel- Hafez,1982) حيث وُزِن 0.5 غم من التربة وعُلِّق في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، رج الخليط مدة دقيقة واحدة وترك لتستقر الابواغ الفطرية مدة 10 دقائق ، أخذ 0.5 مل من المحلول لكل عينة تربة ووضع في طبق بتري معقم وحاوي على الوسط الزرعي PDA, وحُرِكّ الطبق حركة دائرية خفيفة لانتشار الوسط في كل الاتجاهات لتجانس الوسط واللقاح ثم تركت الاطباق لتتصلب وحضنت بدرجة حرارة 28 ±2 لمدة (7) أيام

2- تشخيص الفطريات

تم تشخيص الفطريات عن طريق اخذ بصمة من حافة المستعمرة الفطرية بواسطة الشريط اللاصق الشفاف وتم تحميلها على قطرة من صبغة اللاكتوفينول ازرق القطن على شريحة زجاجية slide وفحصت على قوى التكبير مختلفة وتم تصوير الأجزاء المهمة تصنيفيا واعتمد في التشخيص على (Klich ,2002).

3-تحضير مستضد الفطري متعدد السكريد Polyssacharide من جدار خلايا الفطر *A.niger*

استخدمت طريقة(Veronica and Mackenzie, 1979 ; Chan *et al.*, 2002) في التحضير وعلى النحو الاتي :

1- تم زراعة الفطر *A.niger* النقي والمعزول من عينة التربة والعينة السريرية على وسط السابرويد اكار ولمدة 2-3 يوم وفي درجة حرارة 37 مْ للحصول على مستعمرات مفردة نقية.

2- لقح وسط المرق المغذي Potato Dextrose Broth بعد تحضيره بإحدى المستعمرات المفردة للفطر *A.niger* وحضن في حاضنة هزازة لمدة 1-5 يوم وفي درجة حرارة 37 مْ ومع الرج المستمر Shaking بحدود 50 هزة/الدقيقة للحصول على كثافة نمو>10^5/ml من الوسط.

3-تم نبذ خلايا الفطر بسرعة 3500 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق ثم اذيبت الخلايا في دارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate-buffered saline(0.27mM كلوريد البوتاسيوم،13.7mM كلوريد الصوديوم ,1mM دارى الفوسفات عند pH 7.4) مع اضافة 0.05% فينول ليتم مقارنتها مع انبوبة ماكفرلاند رقم(3) ثم اكمل الحجم لتتساوى كثافة الانبوبتان.

4- كسرت الخلايا باستعمال جهاز تكسير الخلايا ولمدة 1-2 دقيقة.

5- لاحقا نبذت الخلايا بسرعة 4000 دورة/ دقيقة ولمدة 5 دقائق لغرض فصل السايتوبلازم عن الجدار.

6- غسل الراسب الناتج بعد نبذ الخلايا بالماء الساخن بدرجة حرارة 50-60 درجة مئوية لمدة 7 مرات ففي كل غسلة تنبذ بسرعة 4000 دورة / دقيقة ، يهمل الراشح ويأخذ الراسب.

7- يفحص الراشح وذلك بوضع قطرة من صبغة اللاكتوفينول الازرق على السلايد مع قطرة من الراشح للتأكد من كون الراشح عديم اللون ورائق فإذا ظهرت كونيدات او خيوط الفطر يجب الاستمرار بالغسل الى حين التأكد من عدم وجودها ثم يخزن بعدها بالتجميد.

8- اجري اختبار مولش للتأكد من وجودالسكريات، وذلك بإضافة قطرتان من كاشف الفا نفثول الى 2 مل من محلول الاختبار (الراشح) ثم اضيف اليه 1 مل من حامض الكبريتك المركز بحذر على الحافة الجانبية للأنبوبة ليكون النتيجة الموجبة وذلك بظهور طبقتين (الخفاجي ،2010) ان هذا الاختبار استخدم للكشف عن الكاربوهيدرات في مستخلص متعدد السكريد (plummer ,1978).

9- تم حساب كمية الكلوكوز والبروتين لمعرفة الفرق بين نسبتها لكلا العينتين .

a- فحص الكلوكوز Glucose test

اضيف 32 مايكروليتر من عينة المستضد على شريط مجهز من الشركة المانية (Reflotron –glucose Roche) بعدها وضع الشريط في جهاز Reflotron لقياس نسبة الكلوكوز.

b - فحص البروتين

اضيف 20 مايكروليتر من راسب المستضد الفطري لـــ 1cc من كاشف البروتين Protein Kit والمجهز من الشركة الفرنسية LABO ، تركت بعدها الانبوبة في حمام مائي و لمدة 10 دقائق. فتغير اللون الى الاصفر دليل على وجود البروتين ، تم فحص الانبوبة بجهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وعلى طول موجي 550 نانوميتر. حيث ان مدى قياس البروتين يتراوح بين 570-550 نانو ميتر.

10- حفظ مستضد متعدد السكريد بالتجميد لحين الاستعمال في برنامج تمنيع الارانب.

4-تحضير جرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger*

استخدمت طريقة(Shreiner *et al* .,2012) في تحضير الجرعة وكالاتي :

1- ينمى الفطر *A.niger* النقي المعزول من عينة التربة والعينة السريرية لمرضى التدرن على وسط السابرويد لمدة 14 يوم وبدرجة حرارة 28 مْ لعينة التربة و37 مْ للعينة السريرية .

2- حصدت كونيدات الفطر النامية بغسل الطبق بمحلولدارئ الفوسفات الفسيولوجي Phosphate buffer salinef المعقم (PH 7.4) مع 0.1 من Tween 80.

3- رشحت الكونيدات باستعمال قطع الشاش المعقم ذات الطبقتين للتخلص من الخيوط الفطرية

4- استخدمت انبوبة ماكفرلاند لغرض تحضير التركيز المطلوب من الكونيدات وهو 10^8 سبور/ مل ، ويمكن خزنها في درجة 4 مْ ولمدة ٤أشهر .

5-الحيوانات المختبرية

استخدمت ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء بوزن 874 غرام-2 كيلوغراماً وعددها 12 ارنب، تم وضعها في اقفاص مع الانتباه لنظافة ماء الشرب والطعام واجراء التعقيم المستمر للأقفاص المقسمة لاربعة مجاميع بين الحين والاخر وتركت الحيوانات للتكيف مع البيئة الجديدة لمدة اسبوعين وكذلك للتأكد من سلامتها وخلوها من الأمراض ، علمت الاقفاص حسب نوع المستضد وتاريخ كل جرعة معطاة.

6-اختبار التحدي

جرى تمنيع 6 من ذكور الأرانب بـــ1مل من المستضد (0.25 في العضلة اليمنى، 0.25 في العضلة اليسرى، 0.5 تحت الجلد) ولمدة ثلاثة اسابيع وبواقع حقنة لكل اسبوع .اما الـــ6 الاخرى فاستعملت كحيوانات سيطرة . بعد انتهاء فترة التمنيع والتي استمرت ثلاثة اسابيع ترك الحيوان مدة اسبوع بعدها حقن بـــ 0.2 مل من جرعة التحدي المحضرة مسبقا في الوريد الاذني . يراقب الحيوان بشكل مستمر من الناحية المظهرية والسلوكية، حيث تركت الحيوانات مدة اسبوعين من اعطاء جرعة التحدي بعدها شرحت الحيوانات بعد حساب وزن الحيوان الكلي بفتح البطن طوليا لاستخراج الطحال والرئة وتم الاتي:

1- مؤشر وزن الطحال Spleen weight Index

اتبعت طريقة (Collins *et al* .,1975) لحساب مؤشر وزن الطحال كما يأتي:

1- خدرت الحيوانات بالكلوروفورم وشرحت لاستخراج الطحال.

2- رفع الطحال بعد ازالة الانسجة الرابطة ووضع في طبق بتري معقم حاوي على محلول دارئ الفوسفات (PBS) المعقم .

3- نشف الطحال على ورق نشاف ثم وزن لحساب مؤشر وزن الطحال الذي يعبر عنه بالنسبة المئوية لوزن الطحال الى وزن الجسم وعلى وفق القانون التالي :

مؤشر وزن الطحال = $\sqrt{\text{وزن الطحال/ وزن الحيوان الكلي}*100}$

اتبعت الطريقة نفسها لحساب وزن الرئة لهذه الحيوانات.

2-حساب عدد المستعمرات الفطرية الناتجة من زراعه كل من الطحال والرئة للأرانب التي اجري عليها اختبار التحدي

1- سحق طحال ورئة كل حيوان جيدا في داخل انابيب معقمة ومعلمة لضمان عدم حدوث تلوث بعد اضافة 5 مل من محلول الملح الطبيعي Normal saline solution حتى يكون المحلول متجانس وهذا هو الـــ Stock .

2- نقل 1 مل من محلول أنبوبة الطحال والرئة لكل حيوان الى انابيب اخرى حاوية على 9 مل من محلول الملح الطبيعي لعمل سلسلة تخافيف وهذا التخفيف هو 10:1.

3- نقل 1مل من الانابيب في الخطوة 2 الى سلسلة انابيب اخرى حاوية ايضا على 9 مل من محلول الملح الطبيعي وهذا التخفيف هو 100:1.

4-اضيف 1 مل من كل تخفيف الى طبق بتري معقم ومعلم ثم صب الوسط الزرعي وسط السابرويد دكستروز اكار (SDA) المعقم والمبرد الى درجة حرارة 45 مْ في الاطباق الحاوية على التخافيف اعلاه، ثم حركت الاطباق بشكل دائري لمزج المكونات مع بعضها وتركت لتتصلب.

5- وضعت الاطباق في الحاضنة وبدرجة 37 مْ ولمدة 7 أيام .

6- تم حساب عدد المستعمرات الفطرية المتكونة (ظهور مستعمرة واحدة يعني نتيجة موجبة).

7- التحليل الاحصائي

حللت النتائج إحصائيا باستخدام اختبار تحليل التباين باتجاه واحد Anova one way كما واستخدم اقل فرق معنوي Least Significant Difference (LSD) للبحث عن وجود الفروق المعنوية بين المعاملات المختلفة باستعمال البرنامج الإحصائي الشامل (SPSS) الإصدار (Version-22) عند مستوى احتمال ($P<0.05$) وثبتت النتائج بشكل (المعدل الحسابي ± الانحراف المعياري) (محمود ,2013).

النتائج والمناقشة

1-عزل الفطريات

عُزِلَ وشُخِص291 عزلة تعود الى 12 نوع فطري معزول من 25 عينة تربة حيث كان عدد عزلات الفطر *Aspergillus spp* هي الاكثر تواجدا من بين الانواع المعزولة خلال فترة الدراسة وكما هو موضح في الجدول (1). فكانت نسبة عزلات الفطر *A.niger* هي الاعلى ظهورا بين العزلات بنسبة 56 % ، تم تنقية هذه العزلات وحفظها في أنابيب زجاجية محكمة الغلق تحتوي على وسط PDA المائل وحفظت بدرجة 4 مْ.

جدول (1)الأنواع الفطرية المعزولة من التربة ونسب ظهورها

الانواع الفطرية	عدد العزلات	النسبة المئوية للظهور%
Aspergillus . niger	83	% 56
Penicillium spp	29	% 44
Aspergillus.terrus	68	%36
Aspergillus.flavus	53	% 24
Rhizopus	25	% 20
Alternaria alternata	8	% 12
Rizoctonia	2	% 8
Fusarium	6	% 8
Cladosporium spp	6	% 8
Aspergillus.versicolar	1	% 4
Trichophyton spp	2	% 4
Candida albicans	8	% 12
عدد العزلات الكلية	291	

والسبب في ان معظم هذه الأجناس تعود إلى الفطريات الناقصة Deutromycotina قد يعود السبب في ذلك إلى طاقتها التكاثرية العالية خاصة وان طريقة العزل بأسلوب تخفيف العينة توفر فرصة اكبر لاصطياد الابواغ الكونيدية ومنحها فرصة النمو والظهور (Jawtez *et al* .,1989).

اما بالنسبة للعينات السريرية والمعزولة من عينات القشع لمرضى التدرن فكانت اعلى نسبة ظهور للاخماج التي يسببها جنس *Aspergillus* spp الذي ظهر بثلاثة انواع كانت الاعلى نسبه 48 % تعود للنوع *A.niger* وكما هو موضح في الجدول (2)

جدول (2) الأنواع الفطرية المعزولة من العينات السريرية ونسب ظهورها.

الانواع الفطرية	عدد العزلات	النسبة المئوية للظهور %
Aspergillus. niger	12	% 48
Aspergillus. fumigatus	4	% 16
Aspergillus. terrus	4	% 16
Aspergillus.flavus	3	% 12
Penicillium spp	2	% 8
Rhizopus oryzae	2	% 8
Cladosporium spp	1	% 4
Candida albicans	8	% 32
عدد العزلات الكلية	36	

أن النتائج أعلاه تتفق مع نتائج توصل اليها ناجي وآخرون ، (2006) من أن الفطر *A. niger* هو أكثر الانواع انتشارا يليه *A. fumigatus* وهي الاكثر شيوعاً في الاخماج الفطرية ومن ثم *A. flavus* و *A.*

terreus. وكذلك تتفق مع نتائج اخرى للعديد من الدراسات داخل العراق منها دراسة اجراتها المعموري (2011) على مرضى الجهاز التنفسي التي اظهرت ان اعلى ظهور كان للجنس *A.niger* من بين العزلات الفطرية تلاها الفطر *A.fumigatus* ثم *A.flavus* ، ثم الانواع الفطرية *Pencillium marneffei.*، *A.terrus*، *A . alternatae*، *Rhizopus oryzae*، *Mucor spp.*، *Cladosporium cladosporioides* ، *Fusarium solani* . اما بالنسبة للخمائر فقد اظهرت خميرة *C.albicans* اعلى نسبة اصابة من مجموع العزلات .

2-تحضير مستضد متعدد السكريد للفطر *A.niger*

تم تحضير مستضد متعدد السكريد المعزول من التربة ومن العينات السريرية لمرضى التدرن الرئوي وذلك لدراسة قدرته على حث الاستجابة المناعية في الحيوان المختبري واتفقت هذه الدراسة مع Tsai and Cousin (1993) بان متعدد السكريد الموجود في الخيوط الفطرية هو نشط مناعيا وان الكلوكوز والكالكتوز والمانوز هي اكثر السكريات الطبيعة شيوعا في كل المستضدات الفطرية ،لذلك فان أستجابة الضد للمستضد هو كنتيجة لوجود هذه السكريات المشتركة.

3- كفاءة مستضد جرعة التحدي في مؤشرا وزن الرئة والطحال

بعد عملية التشريح استخرج الطحال والرئة لكل حيوان ولوحظ ان هنالك تضخم واضح في حجم الرئة والطحال لحيوانات السيطرة حيث ظهر مؤشر وزن الطحال لمجموعة الحيوانات المحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* المعزول من مرضى التدرن بمعدل 14.04±2.13 ومؤشر وزن الرئة لنفس المجموعة 3.96 ±21.72 وهو اعلى من مؤشر وزن الطحال 11.51±3.56 والرئة 19.86±2.85 لمجموعة الحيوانات المحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* المعزول من التربة ، اما بالنسبة للحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الفطر *A.niger* المعزول من مرضى التدرن والمحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger* مصدره مرضى التدرن ايضا كان مؤشر وزن الطحال لها 10.89±3.23 ومؤشر وزن الرئة 18.85±3.96 مقارنة مع مجموعة الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الفطر *A.niger* المعزول من التربة والمحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger* مصدره التربة كان مؤشر وزن الطحال لها 10.39 ±0.99 ومؤشر وزن الرئة بمعدل 13.25 ±3.96 وكما هو مبين في الجدول (3)

جدول (3) معدل وزن الطحال ووزن الرئة بعد اعطاء جرعة التحدي من كونيدات الفطر *A.niger*.

المجاميع	عدد الحيوانات	مؤشر وزن الطحال في الارنب M±S.D.	مؤشر وزن الرئة في الارنب M±S.D.
الحيوانات المحقونة بكونيدات الفطر *A. niger* مصدره التربة	3	11.51±3.56	19.86±2.85
الحيوانات المحقونة بكونيدات الفطر *A. niger* مصدره مرضى التدرن	3	14.04±2.13	*21.72±3.96
مجموعة الحيوانات المعاملة مع مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار الفطر *A. niger* مصدره التربة	3	10.39±0.99	*13.25±3.99

مجموعة الحيوانات المعاملة مع مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار الفطر *A. niger* مصدره مرضى التدرن	3	10.89±3.23	18.58±3.96

* توجد فروق معنوية بين المجموعة الثانية والثالثة لمؤشر وزن الرئة

استخدم اختبار التحدي لتقييم كفاءة مستضد متعدد السكريد المعزول من جدار الفطر *A.niger* في توفير الحماية ضد الاصابة بهذا الفطر مستقبلا فقد لوحظ على حيوانات السيطرة بعد فترة من الزمن من تجريعها بجرعة التحدي من كونيدات الفطر وبتركيز 10^8 بوغ/ مل تغيرات مظهرية وسلوكية بعد فترة 5-7 ايام من تلقي الجرعة ومن هذه التغيرات انخفاض النشاط Hypoactivity وفقدان التوازن Loss of balance وقلة الشهية Anorexia وبالتالي فقدان او انخفاض الوزن مقارنة بمجموعة حيوانات السيطرة الاخرى الممنعة بمستضد متعدد السكريد والمحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* المعزول من مرضى التدرن وهذه النتيجة تتفق مع ما توصل إليه الفرطوسي (2013) من أن الجرذان المحقونة بعالق فطر *Aspergillus* spp تظهر عليها أعراض الإصابة على هيئة فقدان الشهية والوزن والخمول واحتقان العينين ، وأن التفاوت في معدلات الوزن يرجع إلى ضراوة الأنواع فكلما كان النوع ضارياً كلما ظهرت الاعراض أسرع ومن ثم نقص بالوزن بشكل أسرع يرافقه قلة في الحركة والخمول وهذا ينتج عن قلة الغذاء ونقصان المواد الضرورية لبناء الجسم (Ross *et al* .,1992)، اما مجموعة حيوانات السيطرة للأرانب المحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* المعزول من التربة اظهرت اعراضا شبيه بالأعراض السابقة ولكن ظهورها تأخر لفترة اطول بعد احداث الخمج ، في حين مجموعة حيوانات المستضد لم يلاحظ عليها هذه التغيرات حتى موعد تشريحها .

فقد لاحظ Rivera واخرون (2005) استجابة خلايا Th2 للفئران عند التعرض لكونيدات الفطر *A. fumigatus* الحية او المقتولة بالحرارة ، اما porter واخرون (2009) فقد توصل من خلال نتائج دراسته الى ان استجابة مماثلة تحصل عند التعرض لكونيدات الفطر *A.niger* الحية او المقتولة بالحرارة .ربما يعود الاختلاف في تضخم حجم الطحال والرئة لحيوان الأرنب المعرض لكونيدات نفس الفطر والمعزول من مصدرين مختلفين لطبيعة البيئة التي يعيش فيها هذا الحيوان بحكم كون كونيدات الفطر المعزول من التربة تكون موجودة في التربة وعلى النباتات التي يتغذى عليها وفي الهواء فربما يكون سبق وتعرض لهذه الكونيدات ولكن بجرعات منخفضة ، اما كونيدات الفطر المعزول من مرضى التدرن فتعتبر مصدر جديد لم يتعرض له سابقا.

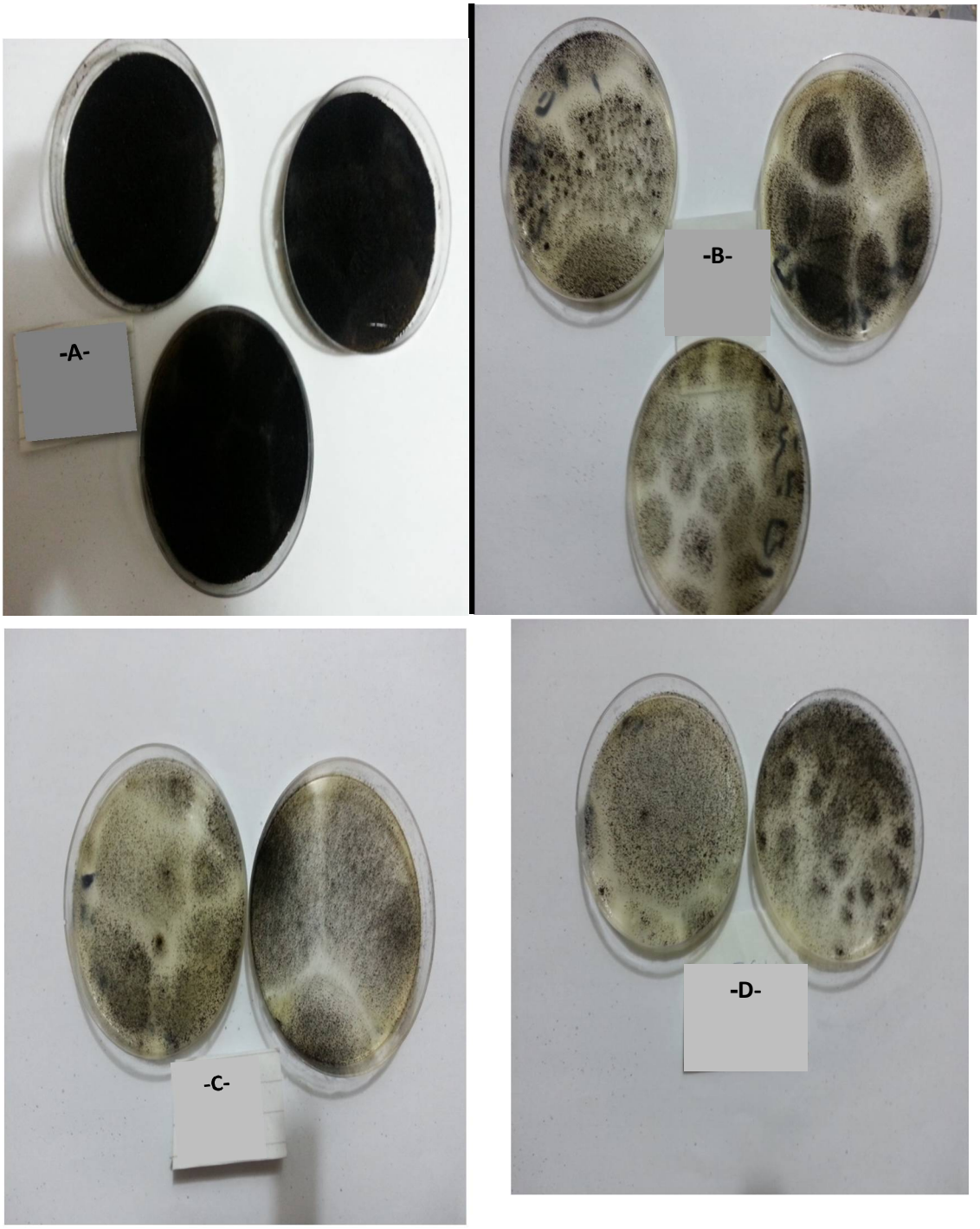
4-المستعمرات الفطرية المعزولة من طحال ورئة الحيوانات المختبرية بعد التشريح

ان الغرض زراعة كل من الرئة والطحال على اوساط زرعية بعد التشريح لمعرفة قدرة الجسم وسرعته في القضاء على كونيدات الفطر ومنع انباتها وبالتالي منع نمو وتكوين الخيوط الفطرية وحصول الاصابة ، فقد بينت النتائج ظهور مستعمرات الفطر *A.niger* المعزولة من الرئة والطحال لمجموعتي حيوانات السيطرة (6 أرانب) المحقونة بكونيدات الفطر *A.niger*، وان مستعمرات الفطر المعزول من رئة وطحال حيوانات السيطرة والمحقونة بكونيدات الفطر *A.niger* مصدره مرضى التدرن قد ملأت الطبق ونمت بشكل اكبر من مستعمرات الفطر لحيوانات السيطرة المعاملة بكونيدات نفس الفطر والمعزولة من التربة التي نمت فيها المستعمرات بحجم وعدد اقل وبالمقارنة مع الحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد لجدار هذا الفطر التي لم يظهر فيها نمو لمستعمرات لهذا الفطر مع ظهور مستعمرات تعود لأجناس فطرية اخرى او لخمائر مثل خميرة *Candida spp* ، ان عدم ظهور المستعمرات الفطرية في رئة وطحال الحيوانات الممنعة والمعرضة لجرعة التحدي ربما يعود السبب الى ان المناعة المكتسبة نتيجة التمنيع بهذا اللقاح الفطري قد مكنت الجهاز المناعي للحيوان من التخلص

ومنع الاصابة بهذه الكونيدات وبالتالي منع انباتها لتكوين مستعمرات فطرية ،في حين استطاعت انواع فطرية اخرى من النمو لان هذا الحيوان اكتسب مناعة ضد جنس *Aspergillus* فقط . وتبين ان نمو فطر *Aspergillus* في حيوانات السيطرة يعود الى كون بعض الفطريات ومنها جنس *Aspergillus* تتخذ أساليب وراثية وفسلجية متعددة لتجنب دفاعات المضيف مسببة بذلك المرض (Ghannoum ,2000) وتوصل الموسوي (2009) إلى أن الآفات المرضية الرئوية للفطر *A. fumigatus* في الأرانب البرية تظهر عيانياً كعقيدات بيضاء مختلفة الاحجام منتشرة على سطح الرئة ، يعزى سبب ذلك إلى حصول احتقان الاوعية الدموية بفعل محتوى العالق الجرثومي من الافرازات الفطرية والتي تسببت في حصول زيادة ضغط الدم لـــ (Microcirculation) وبالتالي إلى زيادة نفاذية الاوعية الشعرية والهيموغلوبين المتحرر من كريات الدم الحمر (Intravascular hemolysis)

اما Hohl and Feldmesser, (2007) فقد بين بأن مكونات جدار الخلية الفطرية تحفز كلا من الاستجابة المناعية الذاتية والتكيفية للمضيف. فقد تبين ان متعدد السكريد مثل (b–glucan & α–glucan) يمكن ان تعدل من الاستجابة المناعية للإنسان حيث انها تلعب دورا وقائيا ضد الاصابة بعدوى الرشاشيات Fontaine *et al* .(.,2011)

وتبين من خلال دراسة اجراها Rivera وجماعته (2005) على الفئران ان التمنيع وبجرعات مختلفة من المستضد يؤدي الى تطور خلايا Th1 , Th2 مما يوفر حماية لهذه الحيوانات عند التعرض لجرعة التحدي من الكونيدات الحية او المقتولة بالحرارة، وان هذه الكونيدات يمكن ان تؤدي الى تفعيل الاستجابة الالتهابية الفطرية لتفعيل المناعة التكيفية من خلال مسار خلايا Th1 Th2 .



شكل (1) يوضح نمو العزلات الفطرية في رئة وطحال حيوانات السيطرة

A- المستعمرات النامية من زراعة الطحال لحيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر المعزولة من مرضى التدرن.

B- المستعمرات النامية من زراعة الرئة لحيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر المعزولة من مرضى التدرن.

C- المستعمرات النامية من زراعة الطحال لحيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر المعزولة من التربة .

D- المستعمرات النامية من زراعة الرئة لحيوانات السيطرة المحقونة بجرعة التحدي من كونيدات الفطر المعزولة من التربة.

المصادر

الخفاجي، نور سلمان كاظم (2010). دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Citrobacter freundi* في الأرانب . رسالة ماجستير، كلية العلوم–جامعة بابل.

شريف ، فياض محمد شريف (2012) . الفطريات الطبية . الذاكرة للطباعة والنشر (468صفحة).

الفرطوسي ، خالد كاطع ، محمد عجة ، هدى عيسى (2013) . تأثير معلق الفطر *Aspergillus niger* في وزن الجسم لذكور وإناث الفئران المختبرية Mus musculus . مجلة القادسية لعلوم الطب البيطري ــ ملحق خاص ببحوث المؤتمر العلمي الثالث .

محمود ، إيهاب عبد السلام محمود (2013) . تحليل البرنامج الإحصائي SPSS . الطبعة الأولى ، دار صفاء للنشر والتوزيع . جامعة بابل . ص:249–205 .

المعموري، اشراق عبد الأمير (2011). دراسة مايكروبايلوجية ومناعية لمرضى اصابات الجهاز التنفسي . رسالة ماجستير، كلية العلوم–جامعة بابل.

الموسوي ، منى تركي (2009) . دراسة مرضية لعفن *Aspergillus fumigatus* في الأرانب البرية والمختبرية في مدينة بغداد . مجلة بغداد للعلوم ، المجلد (6) ، العدد (4) .

ناجي ، وداد ناجي ، محمد صبري وحسنين خليل (2006) . دراسة لبعض التغيرات النسيجية للفئران المصابة تجريبياً ببعض الفطريات المعزولة من مرضى التدرن الرئوي البشري . مجلة جامعة بابل للعلوم الصرفة والتطبيقية . المجلد (12) ، العدد (3) .

المصادر الاجنبية

Abdel-Hafez, S.I. (1982) . Thermophilic and thermotolerant fungi in the desert soil in Saudi Arabia .*Mycopathologia* . 80: 15-20.

Batra, V.; Asmar,B. and Ang, J.Y. (2006). Aspergillosis. EMedicine D:/Medical Mycology/eMedicine-Aspergillosis Article by Vandana Batra MD.htm.

Bozza, S.; Clavaud, C.; Giovannini, G.; Fontaine, T.; Beauvais, A. et al. (2009) Immune sensing of *Aspergillus fumigatus* proteins, glycolipids, and polysaccharides and the impact on Th immunity and vaccination. *J. Immunol* 183: 2407–2414.

Carvalho, A.; Cunha, C.; Bistoni, F. and Romani, L.(2012). Immunotherpy aspergillosis. *Clin.Microbiol. Infect*.18:120-125.

Chan,C; Woo,P.Y; Leung, A.P; Lau, S.P; Che, X.; Cao, L. and Yuen, K . (2002) Detection of Antibodies Specific to an Antigenic Cell Wall Galactomannoprotein for Serodiagnosis of Aspergillus fumigatus Aspergillosis . *American. J. clin.Microb*.P: 2041-2045.

Collins, F.M.; Congdon, C.C. and Morrison, N.E.(1975).Groth of *Mycobacterium bovis* (BCG) in T-lymphocyte depleted mice. Infect. Immun.11:57.

Fontaine, T.; Delangle, A.; Simenel, C.; Coddeville, B.; Vliet, V.S.J. *et al.(*2011). Galactos aminogalactan aNew Immuno suppressive Polysaccharide of *Aspergillus fumigatus*. *Plos. Pathog*.7(110). e1002372.

Ghannoum ,M.A.(2000) Potential Role of phospholipase in virulence and Fungal Pathogenesis. *Clin. Micro. Rev*. 13:122-143.

Hohl, T.M and Feldmesser, M.(2007). *Aspergillus fumigatus* principle of pathogenesis and host defence. *Eukaryotic .cell*. 6(11):1953-1963.

Huang , S.W. (2007) . Mold allergy . eMedicine .

Jawtez, E.; Melnick J. L.; Adelbeurg E. A.; Brooks G. F.; Butel J. S. and Ornston L. N. (1989). Medical Microbiology 18th ed . *Appleton and Lange. Norwalk*. P:300-11.

Klich, M.A. (2002). Identification of Common *Aspergillus* Species. Utrecht: Centraalbureau voor Schimmel cultures.

Olempska-Beer , Z.S.; Merker , R.I.; Ditto , M.D. and Dinovi, M.J. (2006) . Food – processing enzymes from recombinant microorganisms- a review . Regul. Toxicol. Pharmacol. 45, 144-158.

Panda , T.; Panda, P. and Mishra , N.(2009). Seasonal incidence of airborne fungi in coastal belt of Orissa .*J.Hum. Ecol.,* Journal of Medicinal plants Research. 26(30), 205-207 .

Phadke, A. P., G. Akangire, S. J. Park, S. A. Lira, and B. Mehrad. (2007).The role of CC chemokine receptor 6 in host defense in a model of invasive pulmonary aspergillosis. Am. *J. Respir. Crit. Care. Med*. 175: 1165–1172.

Plummer, D. T. (1978). An Introduction to Practical Biochemistry. McGraw-Hill Book Company Limited.

Porter, P.; Susarla, S. C.; Polikepahadet, S.(2009). Link between allergic asthema and airway mucosal infection suggested by proteinase secreting house hold fungi.*J. Mucos. Immun*.2(6):504-517.

Prescott, C.M.; Harley, J.P. and Klein ,D.A.(2005). Micobiology . 6th edn ., Mcgraw-Hill Companies., U.S.A. 924p.

Rivera, A.; Van Epps, H. L.; Hohl, T. M.; Rizzuto, G. and Pamer, E. G.(2005). Distinct CD4+-T-cell responses to live and heat-inactivated *Aspergillus fumigatus* conidia. *Infect. Immun*. 73 (11) 7170–7179.

Ross R; Yuan J.M. and Y U. M. (1992). urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatoculllarur carcinoma lancet. 339: 943-6.

Schevchenko, M. A.; Bolkhovitina, E. L. .; Servuil, E. A. and Sapozhnikov, A.M.(2013). Elimination of *Aspergillus fumigatus* conidia from the airways of mice with allergic airway inflammation. *Resp. Res*. 14:78.

Shreiner, A.B.; Murdock,B.J.; Sdighi Akha, A.A; Falkowski, N.R; hristensen, P.J ; White, E.S; Hogaboam, C.M. and Huffnagle ,G.B.(2012).Repeated Exposure to *Aspergillus fumigatus* Conidia Results in CD4+ in a Mixid Th1/Th2 /Th17 Microenvironment That Requires Interleukin-4 (IL-4) and IL-10. American Society for Microbiology . *Infect. .Immun*.pp.388-397.

Tsai, G.J. and Cousin, M.A. (1993).Partial purification and haracterization of mold antigens commonly found in foods.*Applied and Environmental Microbiology*.59 (8):2563-2571.

Vanden Bergh, M. F.; Verweij, P. E. and Voss. A. (1999). pidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 34:221–227.

Veronica, M.H. and Mackenzie,D.W.R .(1979). The preparation and chemical composition of fractions from Aspergillus fumigatus wall and protoplasts possessing antigenic activity.General. Microb.112:35-44.