مجلة الدراسات التربوية والعلمية - كلية التربية - الجامعة العراقية
العدد التاسع عشر - المجلد الثاني - علوم الحياة - كانون الثاني 2022 م
doi.org/10.52866/esj.2022.02.19.03

دراسة مناعية للأرانب المحقونة تجريبياً بجرثومة *Proteus mirabilis* المعزولة من اصابات الجهاز البولي للإنسان والأغنام

صالح مهدي رومي ، خالد محمود حمادي
الجامعة العراقية / قسم علوم الحياة - كلية التربية

الخلاصة :

هدفت هذه الدراسة الى تقييم الاستجابة المناعية للأرانب المصابة تجريبيا ببكتريا *Proteus mirabilis* والتي تم عزلها من اصابات الجهاز البولي للإنسان ، لذا فقد استعملت في هذه الدراسة 50 أرنباً محلياً من كلا الجنسين وبعمر تراوح بين 12–9 شهر ووزن 2000–1500 غم أخذت من السوق المحلية . وزعت هذه الحيوانات على ثلاث مجاميع المجموعة الاولى شملت 20 أرنب استعملت لتقدير الجرعة المصيبة (Infective dose) والتي بلغت CFU /ml (5×10^8) حيث امتازت هذه المجموعة بظهور علامات مرضية ولكن بدون هلاكات. والمجموعة الثانية أيضاً شملت 20 أرنب حقنت بالجرعة المصيبة (infective dose) في منطقة الصفاق (Intra peritoneal) في التجويف البطني ، أما المجموعة الثالثة فشملت 10 أرانب حقنت بمحلول دارئ الفوسفات الملحي (Phosphate buffer saline (PBS والتي عُدَّتْ كمجموعة مقارنة (سيطرة)، كما تم دراسة المعايير المناعية التي شملت الإستجابة المناعية الخلوية التي تضمنت إختبار فرط الحساسية الجلدي من النوع المتأخر (Delayed type hyper-sensitive test (DTH حيث سجلت أعلى قيمة لسمك الجلد (23.13 ± 1.63) بعد 48 ساعة، واختبار قياس مؤشر البلعمة (Phagocytic index) الذي بلغ (1.84 ± 34.36) في المجموعة المرضية والتي كانت أعلى بكثير من معدل البلعمة في مجموعة السيطرة عند مستوى ($P\leq 0.05$). واختبار الاستجابة المناعية الخلطية المتمثل باختبار قياس مستوى Immunoglobulin (IgG) Gamma إذ سجلت أعلى قيمة له (6.58 ± 0.17) في مصل الأرانب المصابة بهذه الجرثومة عند مستوى ($P\leq 0.05$)، في الاسبوع الرابع بعد الاصابة عند مقارنتها بمجموعة السيطرة .

الكلمات المفتاحية : المعايير المناعية ، الجهاز المناعي ، الجرعة المصيبة .

Immunological study of rabbits experimentally injected with *Proteus mirabilis* isolated from urinary tract infections of humans and sheep.

Saleh Mahdi Romi Khalid Mahmood Hammadi
Department of biology - College of Education - the Iraqia University

Abstract :

This study aimed to evaluate the immune response of rabbits experimentally infected with *Proteus mirabilis*, which was isolated from human urinary system infections. These animals were taken from the local market. These animals were distributed into three groups, the first group included 20 rabbits, which were used to estimate the infective dose, which amounted to (5×10^8) CFU/ml, where this group was characterized by the appearance of signs of disease but without fatalities, and the second group also included 20 Rabbit were injected with an infective dose in the intra-peritoneal area of the abdominal cavity, and the third group included 10 rabbits injected with phosphate buffer saline (PBS) which was considered as a control group. The immunological parameters were studied, which included The cellular immune response that included the Delayed type hypersensitive test (DTH test) where the highest value of skin thickness (23.13 ± 1.63) was recorded after 48 hours, and measurement The phagocytic index which reached (1.84 ±34.36) in the infected group, which was significantly higher in the infected group than the control group at the level ($P\leq0.05$). The humoral immune response test represented by measurement the level of Immunoglobulin (IgG) gamma, where the highest value (6.58 ± 0.17) was recorded in the serum of rabbits infected with this bacterium at the level ($P\leq 0.05$) in the fourth week after infection when compared to the control group.

Key words: Immunological parameters, urinary system, infective dose.

المقدمة

بكتريا المتقلبات عبارة عن عصيات قصيرة مستقيمة الشكل سالبة لصبغة كرام غير مكونة للأبواغ non spore forming، نشطة الحركة actively motile تمتلك أسواط محيطية peritrichous flagella، غالباً ما تظهر بأشكال متعددة، فقد تظهر في بعض الأحيان بأشكال عصوية مكورة coccobacilli، وتحتوي على الأهلاب Fimbriae وغير مكونة للكبسولة [1]. تكون سالبة لإختبار الأوكسيديز والأندول وموجبة لإختبار الكاتاليز واليوريز [2]. تعيش بكتيريا *P.mirabilis* بطريقة لا هوائية إختيارية facultative anaerobic والحرارة المثلى لنوها هي 37°م . يمتاز جنس *Proteus* عن معظم الأجناس الأخرى بحركته الإنثيالية swarming motility على أسطح الأوساط الزرعية الصلبة بواسطة آلاف من الأسواط المحيطي[4] [3] و [5]. تعد جرثومة *P.mirabilis* النوع الأهم في جنس المتقلبات *Proteus* من الناحية الطبية وذلك لأنها تسبب العديد من الالتهابات الجهازية والسطحية بالإضافة إلى التهابات المسالك البولية كالتهابات الجهاز التنفسي Respiratory Tract infection والتهابات الجروح Wound والتهاب الأُذن الوسطى Otitis media [6]. ولأهمية الجهاز المناعي في الدفاع عن الجسم ضد مختلف الأخماج إزداد الإعتناء مؤخراً في دراسة تأثير تمنيع الحيوانات المختبرية ببكتيريا *P.mirabilis* المقتولة بالفورمالين وخمل Mannose-resistant Proteus المنقى وبروتينات الغشاء الخارجي والكشف عن الأجسام المضادة الموجودة في المصل بغية استعمال مكونات هذه البكتريا كلقاحات تمنع حدوث إصابات المسالك البولية، إذ ترتبط البروتينات المنتجة من قبل البكتيريا مع الأجسام المضادة المتولدة في الجسم ويتم تحليلها بالأنزيمات المحللة للبروتين من قبل الخلايا البلعمية بعملية البلعمة وتساهم الخلايا التائية والبائية في الإستجابة المناعية الخلطية والخلوية [7] .

المواد وطرائق العمل:

حيوانات التجربة:

مجموع حيوانات التجربة التي استعملت في هذه الدراسة بلغت 50 أرنب ومن كلا الجنسين وبعمر تراوح بين (12–9) شهر ووزن (2000–1500) غم أخذت من السوق المحلية، مكان الإيواء عبارة عن صناديق معدنية نظيفة وكيفت درجات الحرارة بمدى (25–22 م°) وزودت بالعلف الأخضر (الجت) وكذلك العلف المركز (Pellet) بالإضافة إلى تزويدها بالماء النقي حيث تم توفير مياه الشرب لأرانب التجربة وذلك بغليها وتبريدها ، وتُركت الحيوانات لتتأقلم مع مكانها الجديد لمدة (10) أيام قبل البدء بالتجربة .

قسمت حيوانات التجربة الى قسمين :

القسم الاول: استعملت لتقدير الجرعة المصيبة (ID) لبكتريا *P. mirabilis* ، عددها 20 أرنب.

القسم الثاني: قسمت إلى مجموعتين الأولى المجموعة المصابة (Group A) 20 أرنب حقنت بالجرعة المصيبة (ID) لبكتيريا *P.mirabilis* في منطقة الصفاق (Intra peritoneal) في التجويف البطني، والثانية مجموعة السيطرة (Group B) احتوت على 10 أرانب حقنت بمحلول (PBS).

تقدير الجرعة المصيبة (ID) لبكتريا *P.mirabilis* :

في هذه التجربة تم اختيار 20 من الأرانب السليمة بأوزان تتراوح ما بين (1500غم –2000غم) وبعمر (12–9) شهر قسمت إلى خمس مجاميع ، كل مجموعة تضمنت أربعة أفراز، وحضر محلول بكتيريا *P.mirabilis* وذلك بتلقيح 10 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل Brain Hart infusion broth بـ 5 مستعمرات

نقية من بكتيريا *P.mirabilis* وحضنت بدرجة 37م° لمدة 24 ساعة ، ثم وضعت في جهاز النبذ المركزي المبرد cold centrifuge بسرعة 8000 (rpm) لمدة 15 دقيقة، وبعدها تم غسل الراسب ثلاث مرات بمحلول PBS (PH=7.2)، وبعد ذلك تم إضافة 1 مل من محلول PBS ، وبعدها تم إجراء عشرة تخفيفات متسلسلة من (10^{-1}– 10^{-10}) باستعمال محلول PBS للتخفيف، وتم إجراء العد البكتيري لكل تخفيف باستعمال طريقة العد الفعال viable plate count بحسب ما جاء في (Miles and Misra, 1938). وتم استعمال التراكيز الآتية : (10^{11}× 5 خلية) ، (10^{10}×5 خلية)، (10^{9}×5 خلية)، (10^{8}×5 خلية) في الاصابة التجريبية لتقدير الجرعة المصيبة .

قسمت الأرانب إلى خمسة مجاميع كل مجموعة احتوت على أربعة أفراد، وتم جمع عينات البراز للتأكد من خلوها من الإصابة ببكتيريا *P. mirabilis* ، وبعدها تم حقن أربعة مجاميع بالتراكيز السابقة من البكتيريا وكل مجموعة حقنت بتركيز معين من هذه التراكيز في منطقة البريتون (IP) وبجرعة 1 مل، أما المجموعة الخامسة استعملت كمجموعة سيطرة Control وتم تجريع الأرانب فيها ب1 مل من محلول دارئ الفوسفات القياسي PBS (PH= 7.2) في منطقة البريتون (Intra-peritoneal). وتمت مراقبة كل المجاميع المذكورة يومياً ولمدة 30 يوما وتسجيل أي حالة هلاك بين الأرانب وربطها بالجرعة المصيبة المستعملة، وتم إختيار الجرعة التي لم تؤدِ إلى أي حالة وفاة ولكنها أظهرت العلامات السريرية في أرانب هذه المجموعة. تم إجراء هذه التجربة اعتماداً على ما جاء في المصدر[8] مع بعض التعديلات.

– العزل البكتيري:

تم عزل بكتريا المتقلبات من اصابات الجهاز البولي في الانسان وحسب ما ذكره [9] .

– الإختبارات المناعية Immunological tests

– اختبارات المناعة الخلوية Cellular Immunity Test

– اختبار فرط الحساسية من النوع المتأخر Delayed type hypersensitive test (DTH)

اجري هذا الفحص في الأسبوع الثالث بعد الحقن لحيوانات التجربة وبحسب ما جاء في المصدر[9]، إذ تم إزالة الشعر على جانبي الحيوان في منطقة البطن وبشكل دائري، وتم حقن محلول المستضد القابل للذوبان لبكتريا *Proteus mirabilis* الذي تم تحضيره في الفقرة بواقع 0.1 مل من المحلول في الجانب الأيمن من بطن الحيوان داخل أدمة الجلد أما الجانب الأيسر فقد تم حقنه بمحلول PBS ذو الاس الهيدروجيني (PH= 7.2) بالكمية نفسها وتم الحقن باستعمال المحقنة البلاستيكية الخاصة بحقن الأنسولين ذات سعة (1) مل، وبعدها تمت قراءة وتسجيل النتائج والمتمثلة بقياس سمك الجلد بعد (24 ، 48 ، 72) ساعة على التتابع بعد الحقن في كلا المجموعتين .

– الكشف عن مؤشر البلعمة Phagocytic index

تم إجراء هذا الفحص بحسب ما جاء في المصدر [10]، وفيه يتم الكشف عن مؤشر البلعمة Phago-cytosis ومدى نشاط الإبتلاع للخلايا البلعمية في دم حيوانات المجموعة المصابة ومجموعة السيطرة، إذ تم أخذ (0.25) مل من دم الأرانب المعالج بالهيبارين مع (0.25) مل من محلول هانكس المحضر مع (0.05) مل من معلق الخميرة المحضر حسب الفقرة، وتم وضع هذه الكميات في أنابيب معقمة وحضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 30 دقيقة، وبعد ذلك تم تحضير مسحة دم من الخليط على شريحة زجاجية شفافة وتركت لتجف بدرجة حرارة الغرفة، ثم ثبتت بالميثانول وبعدها صبغت بصبغة 10٪ Gimsa stain وتركت لمدة 10

دقائق وبعدها تم غسل الشريحة بماء الحنفية وتركت لتجف، وبعد ذلك تم فحصها بالمجهر الضوئي بواسطة العدسة الزيتية، إذ يتم تعداد 200 خلية على الأقل بصورة عشوائية ولحساب النتيجة يتم تطبيق المعادلة الآتية :

$$\text{مؤشر البلعمة٪} = \frac{\text{عدد الخلايا التي تبتلع الخميرة}}{\text{العدد الإجمالي للخلايا البلعمية}}$$

– **اختبار المناعة الخلطية** Humoral Immunity test

تم سحب الدم من الأرانب بطريقة طعنة القلب ولكلا المجموعتين (المجموعة المصابة ومجموعة السيطرة) وبمقدار 5 مل في وضع Zero time (قبل الحقن) وكذلك في الاسبوع (الثاني، الثالث، الرابع، السادس) بعد الحقن، وتم وضع الدم في أنابيب اختبار حاوية على الهلام Gel tube ، ومن ثم نقل الدم إلى المختبر لغرض فصله بجهاز النبذ المركزي Centrifuge للحصول على مصل الدم Serum وبعد ذلك تم حفظه في الثلاجة بدرجة (20–) م° لحين الاستعمال .

وتضمن اختبار المناعة الخلطية Humoral immunity فحص الأجسام المضادة (IgG) في مصول الأرانب التي تمت إصابتها بالجرعة المصيبة Infective dose والتي تساوي (5×10^8 CFU /ml) من بكتريا *P. mirabilis* ومقارنتها مع مجموعة السيطرة التي حقنت بمحلول PBS بإستعمال Rabbit Immunoglobulin G (IgG) ELISA KIT على وفق البروتوكول المذكور في العدة المجهزة من قبل الشركة المجهزة وكما في (الملحق 1) .

- النتائج والمناقشة

– **تقدير الجرعة المصيبة** Estimating infective dose (ID)

تم تقدير الجرعة المصيبة لحيوانات التجربة (الأرانب) المحقونة ب1مل من بكتيريا *P. mirabilis* في داخل البريتون (Intra peritoneal) والتي تساوي (5×10^8 C F U / ml خلية) عبر حساب عدد الأرانب الميتة والحية في كل مجموعة ولأربعة أسابيع بعد الإصابة، والجرعة المصيبة هي الجرعة التي أظهرت العلامات المرضية كالخمول والحمى وفقدان الشهية ونقصان وزن الجسم دون هلاك الحيوان ، الجرعة المصيبة المستعملة في هذه الدراسة هي (5×10^8 CFU / ml) ، إذ ذكر [11] أن معدل الجرعة المصيبة يتراوح ما بين (CFU / ml $10^5 - 10^{10}$) .

حقن الأرانب بالجرعة المصيبة (ID) من بكتيريا *Proteus mirabilis*

بعد الإصابة تمت مراقبة جميع الأرانب يومياً لملاحظة العلامات السريرية، وأظهرت أرانب المجموعة المصابة (والتي لم تحدث فيها هلاكات) الأعراض الآتية : خمول، فقدان الوزن، فقدان الشهية، الحمى، الإسهال والجفاف، عدم الاستجابة للمنبهات، ارتفاع درجة حرارة الجسم حيث كانت أعلى من 39.5م° في اليوم الأول والثاني بعد الإصابة ثم بدأت بالإنخفاض التدريجي، ومن العلامات السريرية الاخرى ظهور الإسهال diarrhea في البراز والذي كان مصحوبا بالمخاط، والبول المتكرر ذو مظهر ضبابي و لون حليبي، استمرت هذه الأعراض لثلاثة أيام واكتملت فترة التعافي خلال (9–7) أيام، بالإضافة إلى ضيق في التنفس dyspnea وزيادة استهلاك المياه والتي عادة ما ترتبط بالحمى والإسهال وهذه النتائج تتفق مع الدراسة التي ذكرت في المصدر [13] على الأرانب المحقونة تجريبيا ببكتيريا

السالمونيلا إذ أظهرت العلامات السريرية نفسها التي أظهرتها بكتيريا *P.mirabilis* في الأرانب المحقونة تجريبياً بهذه الجرثومة . كما تتفق نتائج العلامات السريرية مع النتائج التي ذكرت في المصدر [14] التي أجريت على الأرانب المحقونة ببكتيريا الإيشيريشيا القولونية *E.coli* والتي تعود إلى العائلة نفسها التي تعود إليها بكتيريا *P. mirabilis* ، بينما لم تظهر حيوانات مجموعة السيطرة أي تغير في السلوك أو علامات اخرى عند مقارنتها بالمجموعة المصابة .

جدول (1) تقدير الجرعة المصيبة (ID) من بكتيريا *P.mirabilis* لأرانب التجربة

المجموعة	الجرعة (خلية) C. F. U / ml	الحية	الميتة
1	5×10^{11}	0	4
2	5×10^{10}	1	3
3	5×10^{9}	2	2
4	5×10^{8}	4	0
5	PBS	4	0

- نتائج الاختبارات المناعية

- اختبارات المناعة الخلوية

- اختبار فرط الحساسية من النوع المتأخر Delayed type hypersensitive test (DTH)

تم إجراء إختبار (DTH) قبل الحقن (Zero time) ولكلا المجموعتين (السيطرة والمرضية) وكانت النتيجة متقاربة اذ بلغت (2.40 ± 0.20) و (2.50 ± 0.23) على التتابع ولم يكن هناك فرقاً معنوياً بين المجموعتين، ومن ثم سجلت المجموعة المصابة ارتفاعا معنوياً عند ($P\leq0.05$) لتصل إلى أعلى نتيجة بعد (48) ساعة من الحقن (23.13 ± 1.63)، وبعدها انخفضت إلى (20.23 ± 0.88) بعد (72) ساعة وكذلك أظهرت هذه المجموعة فروقاً معنويةً بين الفترات الزمنية للمجموعة نفسها، بينما لم تظهر مجموعة السيطرة فروقاً معنويةً طوال فترة التجربة، يستخدم هذا الاختبار لتقييم المناعة الخلوية ضد البكتيريا أو الفطريات أو مستضدات فيروسية معينة، إذ يتم تلقيح هذه المستضدات داخل الأدمة [15]. ويمكن رؤية بعض الاستجابات الالتهابية في موقع التلقيح مثل زيادة سمك الجلد واحمراره وتشكيل الحويصلة التي قد يتبعها تقرح[16] .

اعتمد اختبار DTH على قدرة وتمييز نشاط الخلايا المساعدة T-helper لمستضد معين، ونتيجة ذلك يتم إفراز IL-1 الذي يؤدي إلى تكاثر وتمايز الخلايا اللمفاوية التائية لتكون خلايا T-helper والتي بدورها تعمل على إفراز IL-2 و INF-Y . ويؤدي تراكم البلاعم والخلايا الإلتهابية الاخرى في موقع الحقن إلى زيادة سمك الجلد، ويعتمد التفاعل الجلدي على تكوين الحركيات الخلوية الناتجة والتي لها علاقة وثيقة مع نوع وفعالية المستضد المستعمل وهذا يفسر الإختلاف في شدة التفاعل الجلدي لكل مستضد وتعد عملية تثخن الجلد التفاعل الرئيسي من تفاعلات فرط الحساسية من النوع المتأخر للمستضدات [17].

وأن النتائج الحالية كانت مقاربة لما ذكر في المصدر [18] عند حقن الأرانب داخل أدمة الجلد ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتيريا *P.mirabilis* .

جدول (2): معدل سمك الجلد قبل وبعد الحقن في المجموعة المصابة ومجموعة السيطرة

Group	الفترة الزمنية				
	Zero	hour 24	hour 48	hour 72	مستوى الاحتمالية©
المجموعة المرضية	0.23 ± 2.50 Ca	2.01 ± 13.53 Ba	1.63 ± 23.13 Aa	0.88 ± 20.23 Aa	0.001**
مجموعة المقارنة	0.20 ± 2.40 Aa	0.04 ± 2.23 Ab	0.02 ± 2.21 Ab	0.02 ± 2.23 Ab	0.579 غ.م
مستوى الاحتمالية¥	0.775 غ.م	0.030*	0.006**	0.002**	

استعمل اختبار T لعينتين مستقلتين للاختبار بين المجموعتين غ.م، *، ** ترمز الى غير معنوي (الاحتمالية < 0.05)، ومعنوي عند مستوى احتمال 0.05 و0.01 بالتتابع. تشير الأحرف الصغيرة المختلفة عموديًا إلى فروق ذات دلالة إحصائية بين مجموعتي الدراسة والأحرف الكبيرة أفقياً بين الفترات.

- إختبار مؤشر البلعمة Phagocytic index

إرتفعت مؤشرات البلعمة بشكل ملحوظ إذ بلغت (1.84 ± 34.36) في المجموعة المصابة عند (P≤0.05) و (P≤0.01) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة التي بلغ مؤشر البلعمة فيها (1.19 ± 11.76).

تم إستعمال الخميرة المقتولة في إختبار البلعمة إذ كان من المعروف أن النشاط المضاد للميكروبات يمكن تعزيزه ضد المستضدات الغريبة، كما يمكن تحفيز البلعمة بواسطة *P. mirabilis* وبالتالي يمكن أن يحدث تدمير البكتيريا بسبب عمل البلعمة المنشطة التي أطلقت إنزيماتها مثل البروتييز[19] .

ربما يكون مؤشر البلعمة أهم آلية دفاع ضد مسببات الأمراض، تنتج بكتيريا *P. mirabilis* متعدد السكريات الدهنية الذي يعمل على إضعاف البلعمة نتيجة إرتباط أجسام مضادة محددة ضد هذا المستضد[20] .

جدول (3): يوضح مؤشر النشاط البلعمي للمجموعة المصابة ببكتيريا P.mirabilis

	المصابة	السيطرة	P-value
Phagocytic	1.84 ± 34.36	11.76 ± 1.19	**0.001

- إختبار المناعة الخلطية المتمثل بقياس مستوى IgG

تم إجراء فحص IgG لكلا المجموعتين (السيطرة والمرضية) قبل إصابة الأرانب ببكتيريا *P.mirabilis* ولم يكن هناك فرقاً معنوياً بين المجموعتين إذ بلغت (3.42 ± 0.19) و(3.64 ± 0.22)، بينما سجلت إرتفاعاً تدريجياً في الاسبوع (الثاني، الثالث، الرابع) وكانت هناك فروقاً معنويةً عند (P≤0.05) و(P≤0.01) بالمقارنة مع مجموعة السيطرة، وبعد ذلك إنخفضت تدريجياً في الاسبوع (السادس) بعد الإصابة إذ بلغت (4.28 ± 0.32)، وكذلك سجلت فروقاً معنويةً بين الفترات الزمنية للمجموعة المرضية نفسها عند (P≤0.05) و(P≤0.01)، أما مجموعة السيطرة فكانت النتائج متقاربة ولم يكن هناك فرقاً معنوياً طوال فترة التجربة.

تتفق الدراسة الحالية مع ما ذكر في المصدر [7] إذ لوحظ أن هناك إرتفاعاً معنوياً في عيارية الكلوبيلين IgG ضد بكتيريا *Proteus mirabilis* عند تمنيع الفئران عن طريق الأنف وتحت الجلد .

كما أثبتت دراسة اخرى إرتفاع مستويات الأجسام المضادة IgG في مصول الفئران المحقونة تجريبياً ببكتيريا *P.mirabilis* وظهور IgG في البول والمثانة والصفراء [22].

جدول (4): معدل الكلوبيلين المناعي IgG في المجموعة المصابة ومجموعة السيطرة .

IgG

الأسبوع	المجموعة المرضية (A) Mean ± SE	مجموعة المقارنة (B) Mean ± SE	مستوى الاحتمالية
0	Ca 0.22 ± 3.64	Aa 0.19 ± 3.42	0.465 غ.م
الثاني	B a 0.13 ± 5.00	A b 0.11 ± 3.40	0.001 **
الثالث	A a 0.25 ± 6.46	A b 0.13 ± 3.44	0.001 **
الرابع	Aa 0.17 ± 6.58	Ab 0.12 ± 3.38	0.001 **
السادس	Ca 0.32 ± 4.28	Ab 0.09 ± 3.36	0.049 *
مستوى الاحتمالية	0.001 **	0.993غ.م	

استعمل اختبار T لعينتين مستقلتين للاختبار بين المجموعتين غ.م ، * ، ** ترمز الى غير معنوي (الاحتمالية < 0.05)، ومعنوي عند مستوى احتمال 0.05 و0.01 بالتتابع. تشير الأحرف الصغيرة المختلفة عموديًا إلى فروق ذات دلالة إحصائية بين مجموعتي الدراسة والأحرف الكبيرة أفقياً بين الفترات.

المصادر

[1] Barrow , G.I. and Felthan , R.K.A.(2003). Cowan and Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria . 3rd ed. Cambridge University press. Cambridge UK., pp:351-353 .

[2]Younis, K. M.;Usup, G. and Ahmad, A. (2016). Secondary metabolites produced by marine Streptomyces as antibiofilm and quorum-sensing inhibitor of uropathogen Proteus mirabilis . Environmental Science and pollution Research , 23(5): 4756-4767 .

[3]Brenner, D.J.; Noel, R. ; Krieng, J. T.; Staley, G. M.; Garrity, S. D.; David R. B.; Paul, D.; Michael, G.; Fred, A. R. and Karl-Heinz, S. (2005). Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 2 the Proteobacteria Part B the Gammabroteobacteria. Publisher Springer, USA.

[4]Jiang, S., Lin, T., Wang, W., Liu, M., Hsueh, P. and Liwa, S. (2010). Characterization of UDP- Glucose dehydro-genaseand UDP-Glucose pyrophosphorylase mutants of *Proteus mirabilis* : Defectiveness in polymyxin B resistance, swarming, and virulence . Antimicrob . Agents and Chemother, 54(5):2000-2009 .

[5]Cestari , S.E,; et al .(2013) . Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis. Curr. Microbiol.*,Vol. 67, pp: 703-707 .

(2008). Measurement of varicella-zoster virus (VZV)-specific cell-mediated immunity: Ii comparison between VZV skin test and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay. J. Infect. Dis. 198, 1327-1333.

[16]Turk JL.(1980) . In: Delayed hypersensitivity, 3rd Edition edn. Amsterdam: Elsevier. 1980. Amsterdam: Elsevier.

[17] Roy, L.k.; Watson, D.L. and Ian, G. (2011). Inflammatory and immunological Response in Skin and peripheral lymph of sheep following intrcutaneous injection of Staph. aureus. Inflammation, Vol. 11 (2) p:175-188 .

[18]Williams, M.E. and Kauffman, C.A. (1980). Transfer factor: a murine model. Infect. Immun., 27: 187- 191.

[19]Magnusson, U. (1999). Longitudinal study of lymphocyte subsets and major histocompatibility complex-class II expressing cells in mammary glands of sows.Am. *J. Vet. Res*.; 60: 546-548.

[20]Nordhaug, M. L.; Nesse, L. L.; Norcross, N. L. and Gudding, R.(1994). A field trial with an experimental vaccine against *Staphylococcus aureus* mastitis in cattle. Clinical parameters. *J.Dairy Sci*.;77:1267-1275.

[21] Xin,L.; David, E.; Chelsea, M.; John, W. and Harry,L.(2004) .Development of an Intranasal Vaccine To Prevent Urinary Tract Infection by *Proteus mirabilis. J. Infection and immunity*.; Vol.(72):No1 .

[6] Shwu- Jen, L; Lai, Ho, S.W.; Luh, K.T.; Wang, W.B. (2000). Inhibition of virulence factor expression and swarming differentiation in *Proteus mirabilis* by P- nitrophenylglycerol. *J.Med- Microbiol*.49: 723-731.

[7]Li, X.; Lockatel, C.V.; Johnson, D.E.; Lane, M.C.; Warren, J.W.&Mobley, H.L.T.(2004). Development of intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis. Infect. Immun. Jan*.Vol 72(1): 66-75.

[8]Freter, R. (1956). ''Experimental enteric *Shigella* and *Vibrio* infection in mice and guinea pigs''. *J. Exp. Med*.; 104: 411-418.

[9]Hudson, L. and Hay, F.C. (1980). ''Practical Immunology'' . 3rd ed. Black-Well Scientific Publications, Oxford London.

[10]Weber,B;Nickol,M.;Jaggar,K.S. and Saelinger, C. B .(1982). Interaction of *pseudomonas* exoproducts with phagocytic cell .*Can.J.Microbiol*.,28:679-685.

[11]Blaser, M. J. and Newman, L. S. (1982). A review of human salmonellosis: Infective dose. *Reviews of Infectious Diseases*.; 4: 1096-1106.

[12]Hung, C.S., Dodson, K.W. and Hultgren, S.J. (2009). A murine model of urinary tract infection. Nat. Protoc ., 4(8), 1230-1243.

[13] Harab AA (2010). Bacteriological study of *salmonella* hadar isolated from children: study of serum Biochemical and Hematological changes in rabbits. Veterinary Medicin\ Zoonoses. Infections among fulton county children associated with chitterling preparation. Georgia Epidemiology Report; February,volume 17 number 02.

[14] Ann, S. (2005). Novel mechanism of P - fimbriated *E. coli* virulence in pyelo-nephritis. *J. Am. Soc. Nephrol*.;16: 3458-3460.

[15] Sadaoka,K., Okamoto,S., Gomi,Y., Tanimoto,T., Ishikawa,T., Yoshikawa, T., Asano,Y., Yamanishi,K., and Mori,Y.

- الملاحق : Appendix

– البروتوكول الخاص بحساب تركيز Rabbit Immunoglobulin G (IgG) باستعمال ELISA KIT وحسب الشركة المجهزه:

1– تم تحضير جميع الكواشف قبل البدء بإجراء الفحص ، وعمل نسختين لكل من المعايير القياسية والعينات .

2– إضافة المعيار القياسي : حددت حفر المعايير القياسية وأضيف 50 µl من المحلول القياسي إلى الحفر القياسية .

3– إضافة العينات : اضيف 10 µl من عينات الإختبار ، ثم نضيف 40 µl من المحلول المخفف إلى عينات الإختبار .

4– تم إضافة 100 µl من كاشف HRP-conjugate reagent لكل الحفر (القياسية والعينات) ومن ثم تم تغطية الحفر بواسطة غطاء الحفر Cover plate ، وبعدها حضنت بدرجة حرارة 37م° لمدة 60 دقيقة .

5– غسل الحفر بواسطة 400 µl من محلول الغسل Wash solution وتكرار عملية الغسل خمس مرات بإستعمال زجاجة بخاخة مع مراعاة إزالة سائل الغسل بصورة جيدة في كل مرة ، وبعد الغسل الأخير تم قلب اللوحة وتنشيفها جيدا بمناشف ورقية نظيفة .

6– اضيف 50 µl من محلول Chromogen A و 50 µl من محلول Chromogen B لجميع الحفر ومن ثم مزج المحلولين بهدوء ، وبعدها حضن بدرجة 37م° لمدة 15 دقيقة ، بعيداً عن الضوء .

7– تم إضافة 50 µl من محلول التوقف Stop solution لجميع الحفر Well ، يتم تغير لون الحفر من اللون الأزرق إلى اللون الأصفر.

8– بعدها تم قراءة الكثافة البصرية Optical Density عند 450 نانوميتر بإستخدام لوحة قارئ الإليزا في غضون 15 دقيقة .