التاثيرات المناعية الجهازية الخلطية لبعض مستضدات *Citrobacter freundii* في الارانب البيضاء *Oryctolagus cuniculus*

نور سلمان كاظم محمد
كلية العلوم / جامعة بابل

د. أزهار عمران لطيف
كلية العلوم / جامعة بابل

الخلاصة **Abstract**

حضَرت مستضدات جرثومة الـ *C. freundii* المعزولة من عينة diarrhea stool (المستضد المقتول ومتعدد السكريد الشحمي وبروتينات الغشاء الخارجي) وتم تمنيع الارانب النيوزلندية البيضاء *Oryctolagus cuniculus* باستخدام ثلاثة حيوانات لكل مستضد وبعمر 3-2 شهر بهذه المستضدات فضلا عن إستخدام المساعد المناعي فرويند الكامل Complete Freunds' Adjuvant وبعد انتهاء مدة التمنيع حددت بعض معايير الاستجابة المناعية الجهازية الخلطية للارانب الممنعة بمستضدات الجرثومة ومقارنتها مع حيوانات السيطرة الممنعة بماء الملح الطبيعي .

شملت الدراسة اجراء كلا من فحص التلازن المباشر بالانابيب والتلازن الدموي المنفعل وفحص الانتشار المناعي القطري لتحديد مستويات تركيز الكلوبيولينات المناعية (IgA وIgM و IgG) ومكونات المتمم (C3و C4) ومعدل تركيز البروتين الكلي حيث كانت نتائج معدل العيار للتلازن المباشر بالانابيب للحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول (1280)والتلازن الدموي(2560)للحيوانات الممنعة بمستضدات بروتينات الغشاء الخارجي ومتعدد السكريد الشحمي وهذه النتيجة اعلى مقارنة بحيوانات السيطرة التي بلغ معدل العيار للتلازن المباشر بالانابيب والتلازن الدموي المنفعل (10) كذلك الحال لمعدل تركيز الكلوبيولينات المناعية ومكوني المتمم ومعدل تركيز البروتين لحيوانات الاختبارفقد ازدادت فيها حيث بلغ معدل تركيز IgM (497.13،493.86، 452.03) mg/dl و كان معدل تركيز IgG (2326.9، 2212.5 ،1832.5)mg/dl اما معدل IgA فقد بلغ (524.7، 469.8، 504.4)mg/dl وبالنسبة لمكون المتمم الثالث فقد بلغ(241.0،296.6،262.2)mg/dl وبلغ معدل تركيز المكون الرابع (66.3، 64.6،69.2) mg/dl وايضا ازداد معدل تركيز البروتين الكلي حيث بلغ (10.8و10.9و10.5) gm/dl وجميع هذه القيم هي للحيوانات الممنعة بمستضدات بروتينات الغشاء الخارجي ومتعدد السكريد الشحمي والمستضد المقتول على التوالي ولقد كانت نتائج كل الاختبارات معنوية وعند مستوى احتمالية ($P< 0.05$) عند مقارنتها مع حيوانات السيطرة .

كلمات مفتاحيه: متعدد السكريد الشحمي،المستضد المقتول، المساعد المناعي، الاستجابه المناعيه الجهازيه الخلطيه، الانتشار المناعي القطري، المتمم.

Introduction المقدمة

يعد النوع *Citrobacter freundii* الذي يعود للعائلة المعوية ممرضا انتهازيا غالبا مايكون هو السبب في حدوث الاخماج الانتهازية وهذا يعني انه بصورة عامة لايسبب مرضا في الانسان الذي يتمتع بصحة جيدة .لكنه يحدث تاثيرا او يسبب مرضا في المرضى الذين يملكون جهازا مناعيا ضعيفا [47]

تمتلك جرثومة *C. freundii* عوامل امراضية أو فوعة عديدة متمثلة بالذيفان المعوي الثابت والمعطوب بالحرارة Heat stable and labile enterotoxin، وذيفان الفيرو Verotoxin، فضلاً عن إنتاجها لإنزيم اليوريز Urease. وتمتلك خلاياها الخمل Fimbriae التي تساعدها في الالتصاق على سطوح الخلايا الظهارية المبطنة للمسالك البولية والتناسلية والمعوية والتنفسية فضلاً عن امتلاك بعض السلالات لمستضد الفوعة Vi antigen [24,18,37]. وتمتلك البروتين الخارجيالمكون للثغور Pore forming outer membrane protein واستخدم احدى البروتينات الخارجية وهي بروتينات الـ Intimins الماخوذة من النمط الحياتي 4280 لجرثومة C. freundii كاللقاحات ضد الاصابة بالبكتريا المعوية Enterobathogenic E. coli واثبت دورها في زيادة انتاج الاجسام المضادة من الخلايا البائية المحفزة بواسطة الخلايا التائية +CD4 [25]. اوضحت الدراسات الحديثة أنه يوجد نوع من البروتينات السكرية للغلاف الخارجي لبعض اجناس العائلة المعوية يمتلك فعلا محفزا مناعيا ويسهم بالمناعة الخلطية وفي زيادة مستوى انتاج الاجسام المضادة وعملية البلعمة [46] .ومن

أحد عوامل الفوعة المهمة امتلاكها لعديد السكريد الشحمي Lipopolysaccharide أو الذيفان الداخلي Endotoxin وهو من المكونات الأساسية لجدران خلايا الجراثيم السالبة لملون غرام يعمل LPS على تنشيط المسار البديل للمتمم وأن C3a وC5a يسببان تحرر الهستامين (Histamine) مما يؤدي إلى توسع الأوعية الدموية وتحفز الجذب الكيمياوي (Chemotaxis) للخلايا العدلة (Neutrophils) وتجمعها في موقع الخمج مما يؤدي إلى حدوث الالتهاب (Inflammation) [45]. لذا هدفت الدراسة الى التحري عن التاثيرات المناعية الخلطية لبعض مستضدات هذا النوع البكتيري .

المواد وطرائق العمل Materials and Methods

الحيوان المختبري:

استعملت الأرانب النيوزيلندية البيضاء بعمر (2 – 3) شهر وبوزن (1 – 1.5) كيلوغراماً.وضعت الحيوانات في أقفاص داخل البيت الحيواني مع مراعاة نظافة ماء الشرب والعلف مع تعقيم الأقفاص بين الحين والآخر. و اجري عليها قبل التجربة بعض الاختبارات للتأكد من عدم وجود أي اصابة تجعل الحيوان خارج التجربة[40].

1- تحضير مستضد بروتينات الجدار الخارجي Outer membrane proteins (OMPs) preparation

استخدمت طريقة [12] .

2- تحضير مستضد متعدد السكريد الشحمي LPS antigen preparation

2-1-استخلاص متعدد السكريد الشحمي Extraction of lipopolysaccharide (LPS)

اتبعت طريقة [22] المحورة من قبل [32] .

2-2-التنقية الجزئية متعدد السكريد الشحمي Partial purification of lipopolysaccharide (LPS)

استخدمت طريقة [39] لتنقية متعدد السكريد الشحمي المحورة من قبل [32].

2-3-الكشوفات الكيميائية اللونية على متعدد السكريد الشحمي

Color chemical tests on lipopolysaccharide(LPS)

تم الكشف عن الكربوهيدرات، البروتينات، الدهون والاحماض النووية [35].

3-تحضير المستضد السطحي للبكتريا سالبة الكرام المقتول حرارياً Heat killed bacterial Ag

استخدمت طريقة [42].

4-برنامج التمنيع Immunization program

حقنت ثلاث ارانب لكل من مستضدات بكتريا *Citrobacter freundii* المحضرة سابقا (المستضدالمقتول و بروتين الغشاء الخارجي ومستضد متعدد السكريد الشحمي) إضافة إلى المساعد المناعي[6] وتم حقن ثلاثة حيوانات بالملح الطبيعي Normal saline كسيطرة حيث حقن في الاسبوع الأول (1 مل من المستضد مع 1 مل من المساعد المناعي) وزع المستضد في مناطق مختلفة (0.25 مل في العضلة ، 0.25 مل تحت الجلد 0.25 مل تحت الرقبة في الجهة اليمنى من الأرنب و 0.25 مل في العضلة اليسرى) واستمر الحقن على هذا النحو للاسبوع الثاني والثالث على التوالي تركت الأرانب في الاسبوع الرابع دون حقن .في الاسبوع الخامس شرحت الحيوانات بعد تخديرها بثاني أثيل الايثر وأخذ الدم من القلب مباشرة ووضع في أنابيب بدون مانع للتجلط لاجل الحصول على المصل.

الاختبارات المناعية

بعد جمع الدم بالأنابيب المعقمة والخالية من مانع التجلط نقل الى المختبر ثم تركت الأنابيب ليتخثر الدم بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق بسرعة 3000 دورة/ دقيقة ثم تم فصل المصل بواسطة انابيب باستور معقمة ووضعت في انابيب حفظ العينات[15].

1- اختبار التلازن بالانابيب Tube agglutination test

استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود او عدم وجود خاصية ضدية للكلوبيولينات المناعية المصلية لمستضد البكتريا المقتول و تحديد العيار وحسب طريقة [16].

2- اختبارالتلازن الدموي غيرالمباشر (المنفعل) Indirect(Passive) heamagglutination test
استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود او عدم وجود خاصية ضدية للكلوبيولينات المناعية المصلية لمستضدي البكتريا (متعدد السكريد الدهني وب روتينات الغشاء الخارجي) وقد جرى هذا الاختبار حسب طريقة [9] .

3- الانتشار المناعي الشعاعي Radial immunodifussion (RID)

تم تحديد مستوى الكلوبيولينات المناعية IgG، IgM، IgA و المتمم C_3 ، C_4 الموجودة في المصل المفصول من الارانب المجرعة بمستضدات جرثومة *Citrobacter frundii* بطريقة الانتشار المناعي الشعاعي المنفرد حسب مبدأ Mancini وجماعته (1965) [28] التي وصفت العلاقة الخطية بين تركيز المستضد و نصف قطر حلقة الترسيب المناعي التي تتكون في الاكار المحتوي على الاضداد النوعية لذلك المستضد .

4- قياس تركيز البروتين الكلي:-

تم قياس تركيز البروتين الكلي للمصل بالاعتماد على الطريقة اللونية Colorimetric method حيث يتفاعل ايون النحاس مع الاصرة الببتيدية في الوسط القاعدي ليكون معقدا لونيا [26] .

النتائج والمناقشة The results & Discussion

اوضحت نتائج التلازن بالانابيب مع مصل حيوانات الاختبار الممنعة بالمستضد المقتول التي بلغ عددها ثلاثة حيوانات ولحيوانات السيطرة ثلاثة ايضا مستضدية جهازية بمعدل (1280) لحيوانات الاختبار اما حيوانات السيطرة فاعطت مستضدية جهازية بمعدل (10) (جدول1).

جدول (1) عيارات الاضداد الجهازية المتخصصة بالمستضد المقتول

الحيوانات	العيار	
	الاختبار	السيطرة
1	1280	10
2	1280	10
3	1280	10
المعدل	1280	10

بعد تغطية مصل الارنب المتخصص بمستضدات بروتينات الغشاء الخارجيOMPs ومتعدد السكريد الشحمي LPS على كريات دم الخروف المدبوغة،جرى اختبار التلازن الدموي مع مصل الدم لارانب المعاملة والسيطرة وكانت نتائج الدراسة كما تظهر في الجدول (2) إذ اعطت الحيوانات تحت المعاملة مستضدية جهازية بمستوى (2560) لكلا المستضدين ،امالحيوانات تحت السيطرة فأعطت مستضدية جهازية بمستوى(10).

جدول (2) معدل عيارات الاضداد الجهازية المتخصصة بمستضدات بروتينات الغشاء الخارجي ومتعدد السكريدالشحمي

الحيوانات	معدل عيار المستضد عند المعايرة مع ضد بروتينات الغشاء الخارجي	معدل عيار المستضد عند المعايرة مع ضد متعدد السكريد الشحمي	السيطرة
1	2560	2560	10
2	2560	2560	10
3	2560	2560	10
المعدل	2560	2560	10

واظهرت نتائج اختبار قياس تركيز البروتين الكلي في المصل ارتفاعا في معدل تركيز البروتين الكلي لحيوانات الاختبار الممنعة بمستضدات بكتريا *Citrobacter freundii* البالغة ثلاثة حيوانات لكل مستضد إذ بلغ معدل تركيز البروتين الكلي للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي (10.8) gm/dl اما للحيوانات الممنعة بالمستضد متعدد السكريد الشحمي فقد كان (10.9) gm/dl في حين كان للحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول (10.5) gm/dl وهذه النتائج اعطت فروقا معنوية وعلى مستوى احتمالية$P < 0.05$ عند المقارنة مع حيوانات السيطرة الثلاث والتي بلغ معدل تركيز البروتين الكلي لها (5.6) gm/dl وكما مبين بالجدول(3).

جدول(3) معدل تركيز البروتين الكلي في المصلgm/dl

نوع المعاملة	وسطالحسابي±الانحراف المعياري M± S.D	قيمة (P)
مجموعة بروتينات الغشاء الخارجي	10.8 ±0.35	[a]0.000
مجموعة متعددالسكريد الشحمي	10.9 ±0.36	[a]0.000
مجموعة المستضد المقتول	10.5 ±0.43	[a]0.000

مجموعة السيطرة	5.66±0.15	[b]0.000

- Standard deviation = S.D(الانحراف المعياري),
- Mean = gm/dl M (المتوسط الحسابي) غرام /ديسي لتر.
- الحروف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية .

وقد استخدمت طريقة الانتشار المناعي الشعاعي Radial immunodifussion(RID) لتقدير تركيز الكلوبيولينات المناعية lgG و lgM وIgA الموجودة في مصول الارانب الممنعة بمستضدات بكتريا *Citrobacter frundii* .

يوضح الجدول (4) حدوث زيادة في معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لجميع حيوانات الاختبار عند المقارنة مع حيوانات السيطرة حيث بلغ معدل تركيزه (497.13، 493.86، 452.03) mg/dl للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي والحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول على التوالي ووجد من خلال هذه النتائج وجود فروق معنوية وتحت مستوى احتمالية0.05 > P عند المقارنة مع نتائج حيوانات السيطرة التي بلغ معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لها (234.13) mg/dl. ويوضح الجدول حدوث زيادة في معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgG ايضا لجميع حيوانات الاختبارفقد بلغ معدل تركيزه (2326.9، 2212.5، 1832.5) mg/dl للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي والحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول وعلى التوالي ولوحظ من خلال هذه النتائج وجود فروق معنوية وتحت مستوى احتمالية0.05 > P عند المقارنة مع نتائج حيوانات السيطرة التي بلغ معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgG لها (1164.2) mg/dl.

كذلك بالنسبة لمعدل نركيز الكلوبيولين المناعي IgA فقد تبين من خلال النتائج وجو زيادة في تركيزه لحيوانات الاختبار إذ بلغ تركيزه (524.7، 469.8، 504.4) mg/dl للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي والحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول وعلى التوالي ولوحظ من خلال هذه النتائج وجود فروق معنوية وتحت مستوى احتمالية0.05 > P عند المقارنة مع نتائج حيوانات السيطرة التي بلغ معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgA لها (176.4) mg/dl .

جدول (4) معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM (mg/dl)

الحيوانات	IgM S.D.±M	IgG S.D.±M	IgA S.D.±M	قيمة (P)
مجموعة بروتينات الغشاء الخارجي	5.6±493.86	66.3±2326.9	15.2± 524.7	[a]0.000
مجموعة متعددالسكريد الشحمي	5.6±497.13	32.6±2212.5	8.4± 469.8	[a]0.000
مجموعة المستضد المقتول	9.4±452.03	30.1±1832.5	8.7±504.4	[b]0.000
مجموعة السيطرة	4±234.13	25.1±1164.2	5.8±176.4	[c]0.000

تم قياس تركيز مكوني المتمم C3و C4 الموجودة في مصول الارانب الممنعة بمستضدات بكتريا *Citrobacter frundii*باستخدام طريقة الانتشار المناعي الشعاعي(RID).

يتبين من خلال الجدول (5) حدوث زيادة في معدل تركيز مكون المتمم C3 فقد بلغ معدل تركيزه لحيوانات الاختبار(241.0،296.6،262.2)mg/dl للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي والممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والممنعة بالمستضد المقتول على التوالي ووجد من خلال هذه النتائج وجود فروق معنوية وتحت مستوى احتمالية$P < 0.05$ عند المقارنة مع نتائج حيوانات السيطرة التي بلغ معدل تركيزمكون المتمم لها (136.3) mg/dl . كذلك وجد ومن خلال نتائج قياس تركيز مكون المتمم C4 المبينة بالجدول (5) والتي بلغت (66.3، 64.6،69.2) mg/dl للحيوانات الممنعة بمستضد بروتينات الغشاء الخارجي والحيوانات الممنعة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والحيوانات الممنعة بالمستضد المقتول على التوالي حدوث زيادة في تركيز هذا المكون وكذلك ومن خلال الجدول ايضا نلاحظ وجود فروق معنوية تحت مستوى احتمالية$P < 0.05$ عند المقارنة مع نتائج حيوانات السيطرة التي بلغ معدل تركيز مكون المتمم C4 لها (35.9) mg/dl .

جدول (5) معدل تركيز مكون المتمم C3 (mg/dl)

الحيوانات	C3 S.D.±M	C4 S.D.±M	قيمة (P)
مجموعة بروتينات الغشاء الخارجي	3.4±262.2	0.9±66.3	[a]0.000
مجموعة متعددالسكريد الشحمي	3.6±296.6	0.9±69.2	[b]0.000
مجموعة المستضد المقتول	5.6±241.0	0.9 ±64.6	[c]0.000
مجموعة السيطرة	2.5±136.3	0.8±35.9	[d]0.000

ان اختبارات التلازن هي احدى الاختبارات المناعية للتحري عن وجود الاجسام المضادة المتخصصة في المصل والكلوبيولينات الافرازية إذ ان ارتباط المستضد مع الجسم المضاد المتخصص له يؤدي الى تكوين معقد المستضد – الضد والذي يظهر بشكل كتل كبيرة يمكن ملاحظتها بالعين المجردة ومن اختبارات التلازن الواسعة الاستخدام هي اختبارات التلازن بالانابيب الذي يستخدم للتحري عن وجود الاضداد المتولدة ضد المستضدات الدقائقية الكبيرة Particulate antigens إذ ان مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة يمثل عيار الاجسام المضادة [37] ومن اختبارات التلازن المستخدمة لتحديد عيار الاضداد المتكونة ضد المستضدات الذائبة Soluble antigens هو اختبار التلازن الدموي المنفعل Passive heamagglutination test وكما في التلازن المباشر بالانابيب فان مقلوب اعلى تخيف يعطي نتيجة موجبة يمثل عيارية الاضداد المتولدة لتلك المستضدات ففي هذا الاختبار تحمل هذه المستضدات على جزيئات اخرى تعمل حاملا لتلك المستضدات مثل كريات الدم الحمرللخراف Sheep red blood cells (SRBCs) وعند اضافة المصل او الكلوبيولينات الافرازية الحاوية على الاضداد المتخصصة لتلك المستضدات تكون النتيجة الموجبة من خلال تكون دائرة غير منتظمة الحواف في حين ان التيجة السالبة تكون بشكل دائرة منتظمة وكما في التلازن المباشر بالانابيب فان مقلوب اعلى تخيف يعطي نتيجة موجبة يمثل عيارية الاضداد المتولدة لتلك المستضدات [14,37].

ومن خلال الجدول (1) والجدول (2) نلاحظ ارتفاع في عيارية الاضداد لمصول الحيوانات الممنعة بمستضدات جرثومة *C. freundii* مقارنة مع حيوانات السيطرة وقد اتفقت هذه النتائج مع [5] التي وجدت ان عيارية الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي كانت 640:1، وكذلك استعمل [34] طريقة التلازن الدموي المنفعل لتقدير

الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة ضد جرثومة *P. aeruginosa* وعديد السكريد الشحمي المستخلص من خلاياها، ووجد من خلال ذلك أن التمنيع بكلا المستضدين أعطى العيارية نفسها للأضداد، في حين وجدت [4] إن عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة بجرثومة *Acinetobacter baumannii* هي 160:1 ووجدت [26] إن عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي المستخلص من جرثومة *Proteus mirabilis* هو 640:1 مع الإشارة إلى أن كلتا الباحثتين استعملت طريقة التلازن الدموي المنفعل في تقدير عيارية الأضداد.

إن ما زاد من عيارية الأضداد هو استعمال المساعدات المناعية كمساعد فروند الكامل CFA إذ وجد الباحث [20] أن تمنيع الحيوانات بخلايا جرثومة *P. mirabilis* مع استعمال مساعد فروند الكامل CFA أدى إلى زيادة عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي إلى 800:1 في حين أعطى التمنيع من دون استعمال مساعد فروند الكامل عيارية 160:1 للأضداد. واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع[41] اذ ان التمنيع باحد بروتينات الغشاء الخارجي وهو الـ Intimin للنمط الحياتي 4280 لجرثومة *C.freundii* يؤدي الى تحفيز زيادة عيارية الاجسام المضادة وكذلك اتفقت مع[3] التي وجدت عند التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* ادى الى ارتفاع في الاجسام المتولدة ضد هذه المستضدات ، واختبرت بروتينات الغشاء الخارجي المكلونة والمشتقة من omp A لبكتريا *K. pneumoniae* داخل الجسم الحي ووجد أنها ذات أهمية في تحفيز إنتاج الأجسام المضادة دون الحاجة الى المساعد المناعي adjuvant [36].

اشارت الدراسات الى ان المستضدات الجرثومية لها تاثير منشط للخلايا التائية المساعدة (Th2) في الاستجابة الاولية الخلطية و ربما يكون لها دور محفزا لانتاج الخلايا البائية الذاكرة او محفزا لنشاط هذه الخلايا في الاستجابة الثانوية وزيادة في وظيفتها في انتاج الضد[43] وهذا مطابق لنتائج الدراسة الحالية وخاصة في تمنيع المستضد المقتول لجرثومة *Citrobacter* الذي ثبت دوره في زيادة عيارية الاجسام المضادة ضد هذه الجرثومة [19] .

استخدمت الطريقة اللونية (Colorimetric method) لتقدير البروتين الكلي في مصول الحيوانات الممنعة بمستضدات جرثومة *C.freundii* و حيوانات السيطرة ومن الجدول (3) نلاحظ ارتفاعا معنويا في تركيز البروتين الكلي لمصول الحيوانات الممنعة بمستضدات الجرثومة عند مقارنتها مع حيوانات السيطرة وقد يعود سبب زيادة البروتين الكلي الى زيادة في اعداد الخلايا البائية المحفزة بمستضدات الجرثومة سواء كانت معتمدة على الخلايا التائية (مستضد بروتينات الغشاء الخارجي والمستضد المقتول) او غير المعتمدة على الخلايا التائية (مستضد متعدد السكريد الشحمي) التي تزيد من انتاج الاجسام المضادة وايضا يؤدي تحفيز متعدد السكريد الشحمي للخلايا البائية الى زيادة في تصنيع RNA وDNA والبروتين[33] وايضا ان انتاج الخلايا المحفزة للعديد من المواد الالتهابية كالسايتوكينات كنتيجة للاستجابة الخلوية ضد المستضدات الجرثومية قد يؤدي الى زيادة البروتين[37] .

اثبتت الدراسات التي اجريت على مستضدات جرثومة *Shigella sp.* ان تلك المستضدات حفزت الجهاز المناعي وادى الى زيادة في بروتينات المصل للحيوانات الممنعة بتلك المستضدات[13] .وجاءت هذه الدراسة مقاربة لنتائج الدراسة الحالية واتفقت هذه النتائج مع [1] و [2] اللذان وجدا زيادة في تركيز البروتين الكلي لمصل الارانب الممنعة بمستضدات *E.coli* مقارنة بحيوانات السيطرة.

تعتبر الكلوبيولينات المناعية (الاضداد) بروتينات كاربوهيدراتية لها القدرة على التفاعل النوعي مع المستضد الذي ينبه الجهاز المناعي على تخليق تلك الاضداد ، وتنتج الكلوبيولينات المناعية بشكل عفوي من الخلايا البائية جراء التحفيز بالمستضدات المتعددة وان الجزءالاكبر منها يقع ضمن كلوبيولين–كاما ولكنها قد توجد ضمن كلوبيولين– بيتا [10,38] . ومن الجدول (4) نلاحظ حدوث ارتفاع معنوي في معدل تركيز الكلوبيولين المناعي IgM لمصل حيوانات الاختبار الممنعة بمستضدات الجرثومة *C.freundii* عند مقارنتها مع حيوانات السيطرة وقد اتفقت هذه النتائج مع[41] الذين وجدوا ان التمنيع باحد بروتينات الغشاء الخارجي وهو الـ Intimin للنمط الحياتي 4280 لجرثومة *C.freundii* يؤدي الى تحفيز زيادة انتاج الاجسام المضادة ومنها IgM واتفقت مع [29] الذي اشار الى انه عند اصابة الفار باحد المستضدات الجرثومية او العوامل المرضية يؤدي ذلك الى تحفيز تكون النسيج اللمفي Lymphopoiesis والخلايا البائية التي تستطيع انتاج كمية كبيرة من الضد IgM . كما واتفقت هذه النتائج مع [2] الذي وجد ارتفاع للضد IgM عند تمنيع الارانب بمستضدات ال *E.coli* ومنها المستضد المقتول .كذلك فان التمنيع بمتعدد السكريد الشحمي يحفز الخلايا البائية لانتاج الاجسام المضادة كالجسم المضاد IgM دون الاعتماد على الخلايا التائية[23].

ان الضد IgM هو اول كلوبيولين مناعي يولد في الاطفال الرضع واول كلوبيولين يمر في مجرى الدم خلال مرحلة الاصابة إذ يفرز في الاستجابة المناعية الاولية ويظهر على سطح الخلايا البائية وهو يكون بشكل خماسي

الاذرع Pentamer ويشكل 10%من الكلوبيولينات المناعية للمصل وله دور مهم في الاستجابة المناعية حيث يرتبط بقوة مع المتمم وهذا يؤدي الى قتل الجراثيم ويشترك في تفاعلات الضد –المستضد [11] ويتم تحفيز انتاجه في الاطفال الرضع ضد الالتهابات الحاصلة في القناة الهضمية نتيجة الاصابة بالجراثيم المرضية[21].

ومن الجدول(4) نلاحظ ايضا الارتفاع المعنوي للضد IgG لمصول حيوانات الاختبار مقارنة مع حيوانات السيطرة وقد اتفقت هذه النتائج مع[41] الذين وجدوا ان التمنيع باحد بروتينات الغشاء الخارجي وهو الـ Intiminللنمط الحياتي 4280 لجرثومة *C.freundii* يؤدي الى تحفيز زيادة انتاج الاجسام المضادة ومنها IgG واتفقت مع [2] الذي وجد ان تمنيع الارانب بمستضدات الجرثومة *E.coli* ومنها المستضد المقتول قد ادى الى ارتفاع في معدل تركيز الضدIgG واتفقت ايضا مع كل من [7,30] الذين اشاروا الى ان حقن الحيوان المختبري بمتعدد السكريد الشحمي للجراثيم المعوية المتعايشة يؤدي الى تحفيز الخلايا البائية لانتاج الضد IgG .

ان الضد IgG هو الوحيد الذي يتمكن من المرور عبر المشيمة وكذلك يبقى في المصل دائما في الاستجابة المناعية الثانوية ويزداد تركيزه خلال الالتهابات وله تاثير مهم في معادلة سموم الجراثيم والفايروسات وله اهمية كبيرة في تثبيت المتمم [38] .

اما تركيز الكلوبيولين المناعي IgA فنلاحظ ان تركيزه ارتفع معنويا في مصول الحيوانات الممنعة بمستضدات الجرثومة مقارنة بحيوانات السيطرة .ان هذا الكلوبيولين يوجد بشكلين مصلي IgA احادي القطعة وافرازي -S IgA ويكون ثنائي القطعة [37] .

وقد اتفقت نتائج الدراسة الحالية مع[41] الذين وجدوا ان التمنيع باحد بروتينات الغشاء الخارجي وهو الـ Intiminللنمط الحياتي 4280 لجرثومة *C.freundii* يؤدي الى تحفيز زيادة انتاج الاجسام المضادة ومنها IgA واتفقت مع [2] فقد وجد ارتفاعا في تركيز الكلوبيولين المناعي IgA عند حقن الارانب بمستضدات جرثومة *E.coli* واتفقت ايضا مع [27] الذي اشار الى ان تمنيع الحيوانات بالمستضدات الجرثومية ممزوجا مع المساعد المناعي سوف يزيد من تخصص وكمية افراز الضد IgA .

يعد نظام المتمم الوسيط الاولي لتفاعلات الاضداد والمستضدات ويتالف هذا النظام من 20 نوعا او أكثر من البروتينات المختلفة كيميائيا ومناعيا موجودة في بلازما الدم بصورة طبيعية وتشكل 15%من بروتينات البلازما تقريبا ويختلف المتمم عن الضد في الصفات الكيميائية والحيوية والمناعية ويكون عطوبا بدرجة حرارة 56مº لمدة نصف ساعة [8,38,14].

ومن خلال الجدول (5) نلاحظ ارتفاعا معنويا لتركيز جزئي المتمم الثالث والرابع في مصول حيوانات الاختبار الممنعة بمستضدات جرثومة *C.freundii* عند مقارنتها مع تركيز هذه الاجزاء في حيوانات السيطرة .

وقد جاءت هذه النتائج متوافقة مع [2] الذي وجد ان تمنيع الحيوانات بمستضدات جرثومة ال *E.coli* ادى الى ارتفاع في تركيز مكوني المتمم الثالث والرابع .

ان التمنيع بالمستضدات الجرثومية ومنها مكونات الجدار الخلوي يؤدي الى تنشيط مسار المتمم الكلاسيكي وبالتالي زيادة تركيز اجزاء المتمم C3 و C4 [17] وهذامتفق مع نتائج الدراسة الحالية .اما بالنسبة للزيادة الحاصلة لاجزاء المتمم في الحيوانات الممنعة بمتعدد السكريد الشحمي فانه يحفز المتمم من خلال طريقين حيث انه يحفز المسار التقليدي للمتمم عندما يرتبط مع الاجسام المضادة المتخصصة له [31] والطريق الثاني الذي من خلاله يتم تنشيط المسار البديل للمتمم مباشرة بواسطة متعدد السكريد الشحمي وحده اي غير مرتبط مع الاجسام المضادة[37] وهذا متفق مع نتائج الدراسة الحالية .

Humeral immunological effects of some *Citrobacter freundii* antigens in white rabbits *Oryctolagus cuniculus*

Noor Salman Kadhim **Dr. Azhar Ammran Al-Thahab**

Sciences' collage/Babylon university **Sciences' collage/Babylon university**

Abstract

C. freundii **antigens was prepared (outer membrane proteins , lipopolysaccharied and killed antigen) that isolated from diarrhea stool.The immunization (by these antigens in addition to use the Complete Freunds' Adjuvant) of rabbits was done by using three rabbits (2-3) months for each antigen. After the immunization period (one month) some of systemic humeral immune response parameters of tested animals were studies and compared with control animals which immunized with normal saline .**

This study included the using of direct agglutination test and passive haemagglutination test(both were used to determine antibody titer) , radialimmunodiffusion test (it was used to determine the immunoglobulins and complement part concentration) and total protein concentration test. The results of direct agglutination titer of animals immunized with killed antigen (1280) and heamagglutination tests titer of animals immunized with outer membrane proteins and LPS (2560). These results were higher compared with control group titer (10) and this true for immunoglobulin, complement and total protein concentrations. The concentration of IgM (497.13, 493.86 and 452.03)gm/dl , IgG concentration was (2326.9, 2212.5 and 1832.5) gm/dl and IgA concentration (524.7, 469.8 and 504.4) gm/dl. The concentration of C3 was (262.2, 241.0 and 296.6) gm/dl , C4 concentration was (66.3, 64.6 and 69.2) gm/dl and total protein concentration (10.8, 10.9 and 10.5) gm/dl. All these results for animals immunized with outer membrane proteins, LPS and killed antigen respectively were significant at ($P<0.05$) compared with control animals.

Keys: lipopolysaccharied, killed antigen, Adjuvant, systemic humeral immune response, radialimmunodiffusion, complement.

References **المصادر**

1-Abd , F.G.2006.Study of Some Immunological Aspect in Human and Rabbit With E.coli KI Vaginosis. Ph.D. Thesis. Babylon University.

2-Al-Alwany, S.H.2006.Study Of Antigenicity Of Enteropathogenic Escherichia coli In Local Rabbits (Oryctolagus cuniculus). M. Sc. Thesis. Babylon University.

3-Al-Kabi , S. J.2006.A study Of The Effect Of Some Antigens Of Klebsiella pneumoniae On The Immune Response. Ph.D. Thesis. Al- Mustansiriya University.

4-Al-Karkhi, M.K.2001.Study On Pathogenicity Of Acinetobacter baumanni Bacteria Locally Isolated. M. Sc. Thesis. Baghdad University.

5-Al-Muslemawi , T. A. J.(2007). Study of Some Biochemical, Biological And Pathological Properties Of Lipopolysaccharide Extracted From Citrobacter (Arabic) freundii. Ph.D. Thesis. Baghdad University.

6-AL-Thahab, A. A.(2006). Cryptic Meningitis and Some Aspects of Its Local and (Arabic) Systemic Immunity. Ph.D. Thesis. Babylon University.

7-Andrew, J.S.; Macpherson, A.L.; Gregory, R.H.; Brenard,O.; Gordon, D. and Rolf, M.Z.2001. IgA production without μ or S chain expression in developing B cells . Center for Molecular and Immunology , U.S.A. 2: 625-631.

8-Barrett, J.T.1988.Immunodeficiency Text Book of Immunology . 5th ed. Mobsy. Co.

9-Boyden, S. V. (1951). Fixation of bacterial products by erythrocyte treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by anti protein sera. J. Exp. Med. 3: 107-120.

10-Brooks, G. F.; Butel J. S.; Carroll, K.C and Morse S. A. 2007. Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 24rd ed. Lange Medical books .McGraw-Hill Companies.USA.

11-Brooks, G. F.; Butel, J. S. and Morse, S. A. 2004. Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical Microbiology. 23rd ed. Lange Medical books .McGraw-Hill Companies.USA.

12-Carlone, G. M.; Thomas , M.; Rumschlag, H.; and Sottnek, F. (1986). Rapid micro procedure for isolation detergent insoluble OMP. from Hib. Clin. Microb. J. 24(3): 330-332.

13-Charkrabarti, S. and Sinha, A.K.1996. Antibody response to outer membrane protein in Shigella dysenteriae type 1 infection with special refrence to appearance of murine antibodies. Indian .J. Med. Res.104: 127-142.

14-Coering, R.V.; Dockrell, H.M.; Mims, C .; Zuckerman, M.;Wakelin, D.; Roitt, I.M. and Chiodini, P.L.2008. Mims, Medical Microbiology.4th ed.mosby Elsevier .

15-Frei, J.; Heuck, C.; Riesen, W.and Laug; IT.(1995). Production of basic diagnostic laboratory reagents. WHO regional publication, Eastern Mealitterranean series.

16-Garvey, J.S.; Cremev, N.E. and Sussdrof, DH.(1977). Method In Immunology. 3th. ed. PP53-267. Addison-Wesley publishing company.

17-Glauser, M.; Zanetti, G.; Baumgartner, J. and Cohen, J. 1991. Septic shock pathogenesis . Lancet. 338: 732-736.

18-Hess, P.; Daryab, N.; Michaelis, K.; Reisenaure, A. and Oelschlaeger, T.A. (2000). Type 1 pili of Citrobacter freundii mediate invasion into host cells. Adv. Exp. Med. Biol. 48: 5225-35.

19-Higgins, L. M.; Frankel, G.; Douce, G.; Dougan, G. and MacDonald, T. T.1999. Citrobacter rodentium infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. Infect. Immunol. 67:3031-3039.

20-Ivanova, E.; Kenarova, B. and Gumpert, J.1993. Adjuvant activity of the E. coli WF+ stable L-form cytoplasmic membrane. Acta. Microbiol. Bul. 29: 154-160. (Cited by: Malic,2006).

21-Krebber, A.1997. Reliable cloning of functional antibody variable domains from hybirdomas and spleen cell repertoires embloying areengineered phage disblay system . J.Immunol.Methods.201:35-55.

22-Learen, D. B.; Brestel, E. P. and Seetharama, S.(1987). Hypochlorite scavengings by Pseudomonas aeruginosa. Infect. Immun. 55: 1813-1818.

23-Levinson, W. 2008. Review of Medical Microbiology and Immunology. 10th ed. McGraw-Hill comp. Inc, USA.

24-MacFaddin, J.F.(2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, USA.

25-Maghami, M.; Simmons, C. P.; Daniell, S.; Pizza, M.; Lewis, D.; Frankel, G. and Dougan, G. (2001). Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen Citrobacter rodentium. Infect. Immunol. 69:5597-5605.

26-Malic, S.N.2006. Study on Lipopolysaccharied Activity of Proteus mirabilis in Protective from Urinary Tract Infection in Animal . M. Sc. Thesis. Baghdad University . (Arabic)

27-Malin, M.; Suomalainen, H.; Saxelin, M.; and Isolauri, E.1996. Promotion of IgA immune response in patient with Crohn,sdisease by oral bacteriotheraby with Lactobacillus GG. Ann. Nutr. Metab.40:137-145.

28-Mancini, G.; Carbonaro, A.O.; Heremans, J.F.(1965). Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodifution. Immunochemistry, 2:235-254.

29-Melamed, D.; Miri, E.; Leider, N.; and Nemazee, D.2000. Unexpected auto antibody production in membrane IgM deficient/Ipr mice.J. Immunol. 165:4353-4358.

30-Michinaga, O.; Kensuke, S.; Koji, N.; Masakeshi, T.; Hamabata, T.; and Shinji, T.2001. Protective effect of Lactobacillus casei strain shirota on shiga toxin-producing Escherichia coli O157:117 infection in infant rabbit . Infect and ImmunIty .69: 1101-1108.

31-Morrison, D. and Ulevitch, R.1978. The effects of of bacterial endotoxin on host mediation systems. Areview . Am. J.Path. 93: 527.

32-Nuaman, I. T.(2002). Modulation of immune response in BALB/c mice against infection with hydatid disease by polysaccharide extracted from Pseudomonas (Arabic) aeruginosa. M. Sc. Thesis. Mosul University.

33-Peavy, D.; Shands, J.; Adler, W. and Smith, R.1973. Selective effects of bacterial endotoxin on various subpopulations of lymphoreticular cells. J. Infect . Dis. 128:83.

34-Pier, G.B.; Sidberry, H.F. and Sadoff, J.C. 1981. High molecular weight polysaccharide antigen from Pseudomonas aeruginosa, Immunotype 2. Infect. Immun. 34: 461-468.

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

36-Rauly, I.; Goetsch, L.; Haeuw, J. F. ; Tardieux, C. ; Baussant, T.; Bonnefoy, J. Y. and Corvaia, N.1999.Carrier properties of a protein derived from outer membrane protein A of Klebsiella pneumoniae Infect. Immun. 67: 5547-5551.

37-Reddy, K.R.(2010). Microbiology and Parasitology .4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.

38-Roitt, I.; Brostoff. J.; and Male, D.2001. Immunology. 6th ed . Harcourt publisher limited. Mosby. London.

39-Sandford, P. A. (1979). Advances in carbohydrate chemistry and biochemistry. Exocellular Microbiol. Polysaccharide. 36:266-333.

40-Schnider, E. ; Volecker, G.; and Hsude, W.(1990). Age and set dependent on phospholipids concentration in human erythrocyte. I.Z. Med. Labo. Diag. 31: 86-89.

41-Simmons, C. P.; Clare, S.; Ghaem-Maghami, M.; Uren, T. K.; Rankin, J.; Huett, A.; Goldin, R.; Lewis, D. J.; MacDonald, T. T.; Strugnell, R. A. ; Frankel, G. and Dougan, G. 2003. Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen Citrobacter rodentium. Infect. Immunol. 71:5077.

42-Svanborg-Eden, C.; Kulhary, R.; Martid, S.(1985). Urinary immunoglobulin in healthy individuals and children with acute pyelonephritis. Scand. J. Immunol. 21: 305-313.

43-Thomas, J.K.; Goldsby, R.A.; and Osborne.2000. Immunology .4th ed . W.H. Freeman and Combany.New York.

44-Tietz, N. W.; Burtis, C. A.; Ashwood, E.R. and Saunders, W.B.(1999). Text Book of Clinical Chemistry .3rd Ed. 477-530.

45-Todar, K.(2002). Bacteriology home page: mechanisms of bacterial pathogenicity: Endotoxins.

46-Weber, F. S.; Ramos, V. V. and Barajas, C. A.(2001). Evoluacion de la eficacia de glucoproteinas de Klebsiella pneumoniae en infeccions recurrentes , Alerg. Asma. Immunol. Pediatr.10:33-39.

47-Whalen, J.G.; Mully, T.W.; and Enlgish, J.C.(2007). Spontaneous *Citrobacter freundii* infection in an immunocompetent patient. Archives of dermatology. Infect & Immunity. 143: 124-5.