دراسة وظيفتي البلعمة والقتل الخلوي للعدلات في النعاج المصابة بالتهاب الضرع باستخدام تقنية عينة الدم الكاملة

حارث عبد الهادي الحديثي امجد طالب محسن
كلية الطب البيطري/جامعة بغداد كلية الطب البيطري/جامعة القادسية

الخلاصة

صممت هذه الدراسة لتقييم وظائف العدلات في حالة التهاب الضرع المتسبب بجراثيم المكورات العنقودية , وتم استخدام تقنية عينة الدم الكاملة لقياس وظيفتي البلعمة والقتل الخلوي باستخدام خميرة المبيضات البيضاء , حيث جمعت عينات دم من 37 نعجة مصابة بالتهاب الضرع و 37 اخرى سليمة ,وجمعت عينات حليب من نفس الحيوانات المصابة لغرض تشخيص مسببات التهاب الضرع. وكانت المسببات هي المكورات العنقودية الموجبة والسالبة لخميرة التجلط .سببت المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط انخفاضا معنويا ($P< 0.05$) في نشاط البلعمة بنسبة 13.04 % . أما المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط سببت انخفاضا معنويا($P< 0.05$) في نشاط البلعمة بنسبة 9.1 %,اما نشاط القتل الخلوي فقد انخفضت معنويا ($P< 0.05$) وبنسبة 14.66 % في النعاج المصابة بالمكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط . ولم تؤثر المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط معنويا على وظيفة القتل الخلوي.

المقدمة

تقاوم الغدة الثديية الاخماج المختلفة من خلال عوامل دفاع مناعية وغير مناعية وان عوامل الدفاع المناعية تشتمل على المناعة الخلطية والخلوية وبعد أن يتعرف الجهاز المناعي على الممرضات الغازية يقاوم هذه الممرضات عن طريق هذه الخطوط والتي تعمل على إزالة الممرضات والتخلص منها وتقليل الأضرار الناتجة عنها وان العوامل المناعية تعمل مع بعضها بقوة لتوفير الحماية اللازمة للضرع وتعتبر الخلايا البلعمية متعددة الانوية (PMN)وأهمها العدلات هي من خطوط الاستجابة المناعية السريعة والمؤثرة في حالة التهاب الضرع الناتجة عن المسببات البكترية والفطرية (1) , وإن الاخماج البكتيرية هي من المسببات الأكثر شيوعا في حدوث التهاب الضرع (3,2) وتشمل المسببات البكتيرية لألتهاب الضرع على العديد من الأنواع الجرثومية ولكن تعتبر المكورات العنقودية هي المسبب الأكثر شيوعا في الأغنام, وتشمل المسببات البكترية الاخرى المكورات السبحية وعائلة الجراثيم المعوية والوتديات والباستوريلا الحالة للدم ولكن التهاب الضرع الناتج عن هذه الجراثيم هو الأقل حدوثا(4,5,6,7) .ان تقنية عينة الدم الكاملة (Whole blood technique) تستخدم لغرض تقييم وظيفة العدلات والتي يتم فيها تحضين عينة الدم مع خميرة المبيضات البيضاء(*Candida albicanis*) , وتعتبر هذه الطريقة من أهم الطرق المستخدمة في تقييم وظيفة العدلات والعلاقة بين المضيف والممرضات (8) . وقد صممت هذه الدراسة لتقييم وظيفتي البلعمة والقتل الخلوي للعدلات في النعاج المصابة بالتهاب الضرع .

المواد وطرق العمل

1- جمع العينات والزرع البكتيري

جمعت عينات الحليب من النعاج المصابة بالتهاب الضرع والموجبة لاختبار كاليفورنيا والبالغ عددها 37 عينة حليب من مجموع 74 عينة تم الحصول عليها من حالات سريرية للمستوصفات االبيطرية في محافظة القادسية. زرعت العينات على وسط اكار الدم والاكار المغذي وحضنت بدرجة 37 °م ولمدة 24 ساعة ، ثم درست الصفات الشكلية للمستعمرات وصبغت بصبغة غرام ، وفحصت تحت المجهر وقد استخدمت الاختبارات الكيموحيوية في تشخيص بكتريا المكورات العنقودية وحسب طريقة (9).

2 - تقييم وظيفتي البلعمة والقتل الخلوي

استخدمت تقنية عينة الدم الكاملة الموصوفة من قبل (8,10). وذلك بتحضين عينات الدم المسحوبة من النعاج المصابة والنعاج السليمة مع خميرة المبيضات البيضاء، وحسب الخطوات الثلاثة التالية

a-تحضير عالق خميرة المبيضات البيضاء

تم الحصول على خميرة المبيضات البيضاء من حالا ت بشرية في مستشفى الديوانية التعليمي بعد تشخيصها مصليا وكيميوحيويا . زرعت على وسط السابروبد اكار ثم حضنها لمدة 24 ساعة وبدرجة 37مئوية , حيث تم اخذ جزء من الزرع باللوب ووضع في أنبوبة اختبار وأضيف له الملح الدارئ الفوسفاتي ثم وضعت الأنبوبة في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق وبسرعة 4000 دورة بالدقيقة وبعدها تم التخلص من الرائق واخذ الراسب وأضيف له 2مل من الملح الدارئ الفوسفاتي وتم رج الأنبوبة بشدة للحصول على خلايا المبيضات البيضاء المفردة وبعدها حسب عدد خلايا الخميرة باستخدام طريقة ماكفرلاند McFarland method وذلك للحصول على عدد خلايا خميرة يقارب 28× 10^7 خلية في المليلتر ويوضع العالق في الثلاجة لمنع تكاثر خلايا الخميرة

b- عد خلايا خميرة المبيضات

تم حساب عدد خميرة المبيضات البيضاء باستخدام طريقة ماكفرلاند والتي تعتمد على استخدام تراكيز مختلفة من سلفات الباريوم حيث استخدمت عدة kit مكونة من 6 انابيب تحتوي على تراكيز مختلفة من سلفات الباريوم وتاخذ هذه الانابيب الأرقام (0.5,1,2,3,4,5,6) حيث تقارن عكورة عالق الخميرة مع عكورة القناني وتطابق عكارة اي قنينة مع عكارة رائق الخميرة يدل على عدد معين وفق جدول قياسي خاص (9)، جدول رقم (1).

c - حضن خميرة المبيضات مع عينة الدم الكاملة:
مزج 2.5 مل من الدم المسحوب من النعاج المصابة والنعاج السليمة باستخدام أنابيب حاوية على مضاد التخثر EDTA مع عالق الخميرة المحضر والمحسوب بحيث تم الحصول على تخفيف نهائي هو 4خلية خميرة لكل عدلة يحضن المزيج في الحاضنة في درجة 37°م مع التحريك المستمر بأستخدام رجاج الدم لمدة ساعة واحدة وبعدها تم تحضير مسحة دموية وثبتت بالكحول المثيلي وصبغت بصبغة كيمزا وقيمت وظيفة البلعمة والقتل الخلوي حسب الطرق التالية .

d- تقييم وظيفة البلعمة
حُسب معدل أعداد خلايا الخميرة الملتهمة من قبل العدلات على الشريحة ول100 عدلة لعينة الدم المأخوذة من النعاج المصابة بالتهاب الضرع والسليمة (السيطرة) وان هذا العدد يمثل phagocytic index (PI) حيث قورن مع (PI) لعينة السيطرة وتحسب فعالية البلعمة وفق المعادلة التالية :

$$\% \text{ phagocytic activity} = \frac{\text{no.of candida phagocytosed by 100 PMNs (mastitis)}}{\text{no.of candida phagocytosed by 100 PMNs (control)}} X100$$

$$\% \text{ phagocytic activity difference} = PI(\text{mastitis}) - PI(\text{control}) / PI(\text{control})$$

وحسب الطريقة المتبعة من قبل (8,10)

e- تقييم وظيفة القتل الخلوي للعدلات
حُسب معدل إعداد خلايا الخميرة المقتولة من قبل العدلات الى الملتهمة ول100 عدلة لعينة الدم المأخوذة من النعاج المصابة بالتهاب الضرع وان هذا العدد يمثل killing index(KI) حيث قورن مع (KI) لعينة النعاج السليمة سريريا(السيطرة) وتحسب فعالية القتل الخلوي وفق المعادلة التالية :

$$\% \text{ killing activity} = \frac{\text{no.of Candida killed / candida phagocytosed by 100 PMNs (mastitis)}}{\text{no.of Candida killed / candida phagocytosed by 100 PMNs (control)}} X100$$

$$\% \text{ killing activity difference} = KI/PI(\text{mastitis}) - KI/PI(\text{control}) / KI/PI(\text{control})$$

وحسب الطريقة المتبعة من قبل (8,10) .

التحليل الاحصائي
حللت البيانات احصائياً وفق البرنامج الاحصائي SPSS ، واجري اختبار T – test لمقارنة الفروقات بين المعدلات وكان الاختلاف المعنوي للاختبارات كافة عند مستوى $P < 0.05$ (11) .

النتائج والمناقشة

نتائج الزرع البكتيري
بلغ عدد الارباع الموجبة لاختبار كاليفورنيا 37 وبالاعتماد على نتائج الزرع البكتيري والفحص المجهري والاختبارات (جدول رقم 2) ، تم عزل 22 عزلة من المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط والتي اظهرت مستعمراتها تحللا دمويا ، وتم عزل 15 عزلة من المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط ولم تظهر مستعمراتها تحللا دمويا.كانت المستعمرات محدبة وبراقة وغير شفافة وكانت موجبة لصبغة غرام ومرتبة بشكل عناقيد واظهرت 37 عزلة نتائجا سلبية .تطابقت نتائج العزل مع العديد من الباحثين (4,5,6,7,12) الذين وجدوا ان المكورات العنقودية الذهبية الموجبة لخميرة التجلط تعتبر من اهم المسببات البكتيرية لالتهاب الضرع في النعاج.

تقييم وظيفة البلعمة
وجد أن المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط تسبب انخفاضا معنويا ($P<0.05$)في نشاط البلعمة وبنسبة 13.4% والمكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط انخفضت وظيفة البلعمة معنويا ($P<0.05$) وبنسبة 9.1% (جدول رقم 3 ,صورة رقم 1) .يرجع السبب في انخفاض فعالية البلعمة في النعاج المصابة بالتهاب الضرع الى تاثير البكتريا المسببة والتي تمتلك وسائل عديدة وحسب نوع البكتريا في تثبيط او منع او تظليل الخلايا البلعمية , كما ان انخفاض فعالية البلعمة في حالة جراثيم المكورات العنقودية الذهبية الموجبة والسالبة لخميرة التجلط يعزى الى المحفظة exopolysaccharide capsule التي تملكها الجرثومة والتي تتداخل مع عملية البلعمة(13) و تأثير البكتريا المسببة والتي تمتلك وسائل عديدة وحسب نوع البكتريا في تثبيط او منع او تظليل الخلايا البلعمية.

تقييم وظيفة القتل الخلوي
يوضح الجدول رقم (4) والصورة رقم (2) إن المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط تسبب خفض معنوي ($P<0.05$)في نشاط القتل الخلوي وبنسبة 14.66% مقارنة بالنعاج السليمة . ان السبب في انخفاض نشاط القتل الخلوي قد يرجع الى قدرة المكورات العنقودية الذهبية على العيش داخل الفاكولايسوسوم وإنتاج انزيم الكتاليز وسوبر بيروكسديز الذي يحطم بيروكسيد الهيدروجين المنتج من الخلايا البلعمية والمستخدم لقتل البكتريا(10) وهذا قد يكون

السبب وراء انخفاض نشاط بلعمة خميرة الاختبار في بالنعاج السليمة .
عينات دم النعاج المصابة بالمكورات الموجبة مقارنة

جدول رقم (1) : التراكيز المختلفة لسلفات الباريوم والخميرة

تركيز الخميرة	تركيز سلفات الباريوم		رمز الانبوب
5000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	2.40	0.5
10,000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	4.80	1
20,000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	9.60	2
30,000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	1.44	3
40,000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	1.92	4
50,000, 000 cell/ml	0.0000010 mol/l	2.40	5

جدول رقم (2) يوضح نتائج البكتريا الموجبة للزرع البكتيري

البكتريا المعزولة	العدد	الاختبارات الكيمو حيوية		
		Catalase	Oxidation/ Fermintation	Coagulase
المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط	22	+	+	+
المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط	15	+	+	–
المجموع	37			

جدول رقم (3) المعدل والخطأ القياسي لاعداد الخميرة الملتهمة في النعاج المصابة بالتهاب الضرع والنعاج السليمة مع نشاط البلعمة وفرق النشاط .

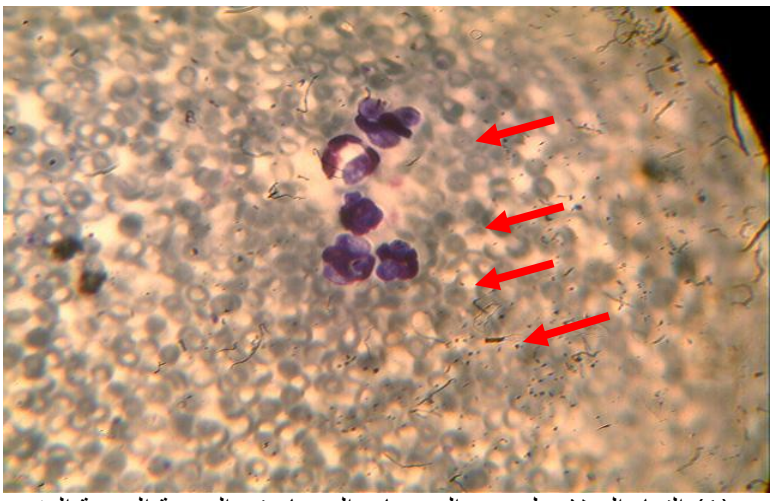
المسبب	المعدل ± الخطأ القياسي لاعداد الخميرة الملتهمة في النعاج السليمة	المعدل ± الخطأ القياسي لاعداد الخميرة الملتهمة في النعاج المصابة بالتهاب الضرع	% نشاط البلعمة للنعاج المصابة بالتهاب الضرع مقارنة بالسليمة	% فرق نشاط البلعمة بين النعاج المصابة بالتهاب الضرع والسليمة
المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط	207± 7.0	180* ± 6.6	86.96	13.04
المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط	223 ± 7.8	203* ± 6.30	90.90	9.10

* تشير الى وجود فرق معنوي($p<0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة .

جدول رقم (4) مقارنة نسبة القتل الخلوي إلى البلعمة بين النعاج المصابة بالتهاب الضرع والنعاج السليمة مع نشاط القتل الخلوي وفرق النشاط .

المسبب	معدل نسبة القتل الخلوي الى البلعمة في النعاج السليمة (السيطرة) ± الخطأ القياسي	معدل نسبة القتل الخلوي الى البلعمة في النعاج المصابة ± الخطأ القياسي	% نشاط القتل الخلوي للنعاج المصابة مقارنة بالسليمة	% فرق نشاط القتل الخلوي بين النعاج المصابة بالتهاب الضرع والنعاج السليمة
المكورات العنقودية الموجبة لخميرة التجلط	56.6 ± 3.8	48.3* ± 3.266	85.34	14.66
المكورات العنقودية السالبة لخميرة التجلط	50.4 ± 2.25	51.0 ± 1.559	101.2	1.2

* تشير إلى وجود فرق معنوي ($p<0.05$) مقارنة مع مجموعة السيطرة



صورة (1) التهام العدلات لخميرة المبيضات البيضاء في المسحة الدموية المفحوصة

صورة رقم (2) الجزء المؤشر خلية خميرة مقتولة داخل العدلة استدل عليها من خلال اللون الفاتح لخلية الخميرة الذي يدل على بداية تحللها .

References

1- Radostits, O.M.; Gay, C.C.; Hinchcliff, K.W. & Constable, P.D.(2007). Veterinary medicine , textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs and goats. 10th edition , Philadelphia ,Saunders Elsevier.

2- Bergonier, D., Berthelot, X., (2003). New advances in epizootiology and control of ewe mastitis. Livest. Prod. Sci. 79, 1–16.

3- Berriatua, E., Ziluaga, I., Miguel-Virto, C., Uribarren, P., Juste, R.,Laevens, S., Vandamme, P., Govan, J.R., (2001). Outbreak of subclinical mastitis in a flock of dairy sheep associated with *Burkholderia cepacia* complex infection. J. Clin. Microbiol. 39, 990–994.

4- Mork, T. ; Waage, S.; Tollersrud, T; Kvitte, B; Sviland, S (2007). Clinical mastitis in ewes , bacteriology, epidemiology and clinical features. Acta. Vet. Scand. , Sep. 24, 49:23.

5- يوسف ، عفاف عبد الرحمن (1982) . دراسة بعض جوانب التهاب الضرع في الاغنام . رسالة ماجستير، جامعة بغداد ، كلية الطب البيطري ، فرع الطب والعلاج البيطري.

6- Arsenault, J; Dubrenit, P ; Higgins, R; Belanger , D (2008).Risk factors and impact of clinical and subclinical in commercial meat producing sheep flocks in Quebec, Canada. Prv. Vet. Med. Nov., 17 , 877 : 373 – 393.

7- Lafi , S.Q; Al – Majali, A.M; Rousan, M.D; Alawneh, J.M (1998). Epidemiological studies of clinical and subclinical ovine mastitis in Awassi sheep in northern Jordan. Prv. Vet. Med. Jan. 33(1 – 4) : 171 – 181 .

8- AL-Hadithy ,H. , Addison, I. E. and Goldston A.H. (1981b). A rapid whole–blood technique for assessment of neutrophil phagocytosis and killing .Clin.lab.Haematol.,3:85-88.

9- Quinn, P.J.; Carter, M.G.; markey, B.& Carter, G.R.(2002) . Clinical Veterinary Microbiology, M. Wlofe, London.

10- Weir, DM(1979)."Application of immunological method " hand book of experimental immunology ,3rd ,Vol.3,London,Blackwell scientific publications.

11- SPSS. Program files , General Social Survey, (2007). Vol 16. Microsoft Inc. USA.

12- Schukken, Y. H., K. E. Leslie, M. G. J. T. Lam and J. Sol, (1993). *Staphylococcus aureus*: incidence, prevalence and risk factors of intramammary infection. In: Proc. 32nd Ann. Mtg. Natl. Mastitis Counc. Columbus, OH. Natl. Mastitis Counc., Inc., Arlington, USA, pp: 19-

13- Rainard, P. andC. Riollet, (2006). Innate immunity of the bovine mammary gland. Vet Res 37: 369-400.

Study of phagocytosis and killing functions in ewes affected with mastitis by using Whole blood technique.

Al-Hadithy, H. , AH. Muhsen, A. T.

Abstract

The current study was conducted to evaluate the neutrophil function in mastitic ewes. Whole blood technique was developed for measuring uptake and killing of candida on small volumes of blood. Blood samples from thirty seven ewes affected with mastitis caused by *Staphylococcus* spp and 37 normal were taken for evaluation of neutrophil phagocytosis and killing functions, while milk samples used to diagnose the causal agents of mastitis.The phagocytic activity was reduced by 13.04% for coagulase positive *staphylococcus* , 9.1% for coagulase negative *staphylococcus*.The killing activity was significantly decreased ($P<0.05$) 14.66 % in coagulase positive *Staphylococcus* infection, while the coagulase negative *staphylococcus* showed no significant difference in killing activity compared with normals.