دراسة قابلية المستضد الجرثومي لجرثومة *Pasteurell multocida* على تحفيز الاستجابة المناعية لخلايا الدم اللمفاوية وإتمام الدورة التكاثرية

سراب سلمان كاظم* إسماعيل كاظم شبر*
ضحى سعد صالح** مثال عبد الكريم عبد عون*

الملخص

أجريت هذه الدراسة لتقويم الاستجابة المناعية للمستضد الكامل المقتول لجرثومة ***Pasteurella multocida*** باستخدام طرائق التحول أللمفاوي في الزجاج عن طريق تعليم جزيئة الدنا(**DNA**)بمادة البرومودي أوكسي يوردين**Brdurd**" ودراسة الدورة التكاثرية(**cell cycle progration**) لخلايا الدم اللمفية ودراسة التبادل الكروماتيدي ألشقيقي(**Sister Chromatide Exchange SCE**) لمعرفة هل إن للمستضد البكتيري المحضر قابلية في استحثاث التلف الخلوي الوراثي في الخلايا المناعية ومعرفة أي الأنواع الثلاثة من الخلايا اللمفاوية المعزوله من (الإنسان , أغنام , ماعز) أكثر تأثرا بالمستضد البكتيري المحضر .أستخدمت تراكيز مختلفة من المستضد الخام المحضرلتحفيز الخلايا اللمفية المعزولة من الانسان والاغنام والماعز.

أوضحت النتائج ان هناك فروقاً معنوية في معامل الارومة **BI**% باختلاف تركيز المستضد.وقد لوحظ ان هناك زيادة في قيم معامل الارومه**BI** % ومعامل الانقسام **MI**% ومعامل التضاعف% **RI** بانخفاض تركيز المستضد الخام المحضر. وان أكثر الخلايا تحسسا بالمستضد هي الخلايا اللمفية للماعز , إما نتائج **SCE** فقد أوضحت إن نسبة عدد الخلايا التي حدث فيها التبادل الكروماتيدي أي التلف في جزيئة الـ**DNA** مساوية للنسبة الطبيعية أي ليس للمضاد تأثير على المادة الو راثية . وان استخدام طريقة التحول اللمفاوي في الزجاج باستخدام"**Brdurd**"تعد طريقة مجدية، حساسة، ودقيقة لتقويم الاستجابه المناعية.

المقدمة

تؤدي خلايا الدم اللمفاوية دورا مهما في الاستجابة المناعية ،فأن نمو وتكاثر هذه الخلايا يتناسب طرديا مع المناعة الخلوية (**3**). لذلك شاع استعمال تقنية زراعة الخلايا اللمفية مع كميات مخفضة من اللاكتينات النباتية (**Lectins**)والتي تحفز نمو وانقسام هذه الخلايا (7).

يستخدم فحص التحول اللمفاوي في الزجاج (**Transformation assay**) لتقويم فاعلية الخلايا اللمفية من خلال تحديد تكون الارومات اللمفية(**Lymphoblast**) ،أو تحديد معامل الانقسام الخيطي (**18**) (**Mitotic index**) (**MI**) . ومن الأنظمة التشخيصية الدقيقة ضمن طرائق التحليل الوراثي الخلوي هو حساب معامل التضاعف (**Replication index)(RI**) وباستعمال مادة (**Bromodeoxyuridin(Brdurd**) يمكن تحديد قيم هذا المعامل بطريقة مفيدة ودقيقة، ويمكن تطبيقها في الكشف عن الاستجابة المناعية للحيوانات المصابة بأمراض فايروسيه،بكتيريه أو طفيليه وقياسها مع اللامراضيه، كذلك تستخدم في تقويم القدرة المناعية للقاحات والمستضدات المحضرة من المسببات المرضية،ومن أهميتها هو تطبيقها في الكشف عن الاثر السمي الوراثي لكثير من الادوية والعقاقير العلاجية قبل اعطائها للحيوان (**19**). وقد استخدمت **Brdurd** في البحث الحالي للكشف عن القدرة المناعية للمستضد الجرثومي الكامل المقتول بالفورمالين لما لهذه الجرثومة (***P.multocida***) من أهمية حيث تسبب خسائراً اقتصادية في الثروة الحيوانية (**8**، **9**، **14**)، اضافة لما تسببة من امراض عديدة للانسان والحيوان (**8**، **20**).

* وزارة العلوم والتكنولوجيا- بغداد، العراق.
**كلية العلوم- جامعة بغداد- بغداد، العراق.

اكدت زراعة الخلايا اللمفية ان السموم المنتجة من قبل جرثومة ***P.multocida*** لها تاثير واضح في الخلايا اللمفية وكونها مشطرا قويا(**Potent mitogen**) (**19**) حيث لوحظ حدوث زيادة في معدل تضاعف الخلايا اللمفية **(Cell cycle progression)** لحيوانات التجارب الممنعة بسلالات مضعفة من جراثيم ***P. multocida*** المنتجة للسموم (**5**).

المواد وطرائق البحث

العترة المستخدمة في تحضير الضاد الجرثومي

تم الحصول على عترة نقية من جرثومة ***P. multocida*** معزولة محلياً (من حيوانات حقلية مصابة بالجرثومة (**10**). تم التأكد من نقاوة العزلة وكونها ***P.multocida*** بأستخدام نظام" **api E 20**" جرت ادامة العترة الجرثومية بأعادة زرعها على وسط اغار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه الدم وبواقع مرة كل **10-15** يوماً، ولادامة فوعة **(virulence)** الجرثومة جرى حقنهابجرعه مضاعفة في فئران بيض من نوع **Balb\c**وبعمر **6-8**أسابيع وبوزن**25-30** غم مرة كل(**3-4**) اسابيع واعادة استنباتها من دم القلب المسحوب عند احتضار الحيوان او موته.

تحضير المستضد الجرثومي

حضر المستضد الجرثومي لجرثومة ***P.multocida*** الكامل المقتول بالفورمالين باستخدام طريقة **Mukker** (**13**). وتم تحديد التركيز المطلوب من المستضد البكتيري المحضر بوساطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجي **600nm** وقراءة قياسها **0.25** لتعادل التركيز **$3x10^8$** خلية/مل (**2**، **13**)تم حفظ المستضد البكتيري بدرجة – **20** م لحين استخدامة مرة ثانية.

اختبارات المستضد المحضر

أ– فحص السلامة **Safety test**

حقنت **4** فئران بيضاء نوع **Balb/c** بعمر (**6–8**)أسابيع بالمستضد الجرثومي المحضر بجرعة مضاعفة في البريتون، وتمت مراقبة الفئران المحقونة مدة **7** أيام للتأكد من سلامة المستضد وصلاحه للاستعمال.

ب– فحص العقامة **Sterility test**

تم زرع عينة من المستضد البكتيري المحضر على عدد من الأوساط الزرعية،ثم حضنت الأوساط المزروعة تحت الظروف الهوائية واللاهوائية بدرجة**37**م^0 لمدة (**24-48**)ساعة، للتأكد من نقاوة المستضد، وخلوه من الجراثيم الحية، وعدم تلوثه.

ج– تقويم قدرة الضاد البكتيري المحضر بأستخدام طرائق فحص التحويل اللمفاوي استخدام الوسط ألزرعي" **RPMI-1640**" الخاص بتنمية الخلايا اللمفاوية في الزجاج (**3**). أضيفت مادة البرومودي اوكسي يوريدين بتركيز**0.001** ملغم/مل في اثناء تحضير الوسط الزرعي، وسحبت نماذج دم (الإنسان، الأغنام والماعز) بنفس يوم عمل التجربة في أنابيب حاوية على الهيبارين وكان عدد النماذج التي فحصت عشرة نماذج من كل نوع وتم فحص كل نموذج مرتين، وعمل من كل نموذج خمسة مكررات تمثلت بانبوب السيطرة السالبة والحاوية على الوسط ألزرعي ونموذج الدم فقط، أنبوب السيطرة الموجبة الحاوي على نموذج الدم والوسط ألزرعي مضافاً إليها محفز النمو الخارجي" **PHA**" بنسبة**0.5mg/ ml**، إما الأنابيب الثلاثة الثالث والرابع والخامس فأحتوت على نموذج الدم مع الوسط ألزرعي مضافاً اليه المستضد البكتيري المحضر بنسبة **0.5ml** إذ حضرت ثلاثة تخافيف متسلسلة من العالق الأصلي للمستضد والحاوي على**$3x10^8$** خلية جرثومية /مل .

وهي على التوالي,1\10 , 1\100, 1\1000 ، لمعرفة قدرة تحفيزها على الانقسام مقارنة بمحفز النمو (PHA) ، واختيار التركيز الامثل الذي يعطي أفضل تحفيز.

– حضنت جميع الانابيب بدرجة 37م لمدة (3) ايام ، أضيف محلول الكولجسين Colchicines Solution بتركيز (100مايكروغرام/ملليتر) للانابيب جميعها قبل انتهاء مدة الحضن بساعتين لأيقاف الانقسام، واعيدت بالحاضنة لحين أنتهاء مدة الحضن. أكملت خطوات التجربة لحين الحصول على محلول رائق من راسب الخلايا حسب Gosden (3).

– مزجت الخلايا بوساطة ماصه باستور مع المحلول المثبت، وفرشت على الشريحة بشكل قطرات من مسافة تبعد 90سم عن الشريحة، تركت الشريحة الى ان تجف.

– لونت الشرائح الزجاجية المحضرة بملون كمزا (Giemsa stain) . تركت بالملون لمدة 10 دقائق ، ثم غسلت بالماء المقطر وتركت لتجف . فحصت الشرائح الزجاجية المصبوغة بالمجهر الضوئي، لغرض الدراسات الوراثية الخلوية المتضمنة قياس دليل الانقسام الخلوي Mitotic Index ، ودراسة دورة الخلية، وحساب معامل التضاعف Replicative Index (RI) بعد تلوين الشرائح بملون هوكست Hoechst stain للتفريق بين أنقسام الخلايا الاول والثاني والثالث.

وقد اعتمدت طريقة King وجماعته (6) في حساب معامل الانقسام (MI) Mitotic Index ،ومعامل الارومة (BI) Blastogenesis

أ– معامل الانقسام (MI)= $\frac{\text{عدد الخلايا المنقسمة}}{\text{عددالخلايا الكلي(المنقسمة +غير المنقسمة)}} \times 100$

ب– معامل الارومة (BI)= $\frac{\text{عدد الخلايا في طور الارومة}}{\text{عددالخلايا الكلي(المنقسمة + غير المنقسمة}} \times 100$

جـ - وحسب معامل التضاعف للخلايا (RI (Replication بطريقة Schneider (15).

$$(RI) = \frac{M3\% \ X\ 3 + M2\% \ X\ 2 + M1\% \ X\ 1}{100}$$

وحسب معدل التبادل الكروماتيدي الشقيقي(SCE) بطريقة Gundy وجماعته (4) باستخدام المجهر الضوئي وعلى العدسة الزيتية بعد تلوين الشرائح الزجاجية بملون Hoechst وحسبت معدلاتها ومدياتها الا في بعض المزارع الخلوية التي ظهرت فيها اعداد قليلة من هذه الخلايا.تم حساب اعداد(SCE)في 50 خلية مارة في الطور الاستوائي الثاني ($Metaphase(M_2$ لكل من الانسان والحيوان واستخرج الوسط الحسابي والانحراف المعياري(4).

تم تحليل النتائج باستخدام (Student *t*. test) واستخدام اختبار الفرق المعنوي الاصغر (LSD) (1).

النتائج والمناقشة

حضر المستضد وتم التاكد من سلامتة وذلك باجراء فحص السلامة ولم تظهر أية علامات مرضية تذكر على الفئران المحقونة بالمستضد ،واجري فحص العقامةSterility test ولم يظهر أي نمو بكتيري على سطح الاوساط الزرعية المزروعة بالمستضد وهي دلالة على نقاوة المستضد البكتيري المحضر،وعدم تلوثةوخلوة من الجراثيم الحية.

دراسة الانقسامات الخلوية

دراسة معامل الانقسام Mitotic index ومعامل الأرومة Blast index

توضح الجداول (1، 2، 3) ان معامل الانقسام في مجموعة السيطرة السالبة للانسان والاغنام والماعز اعطت قيما قدرها 0.26 , 0.20 , 0.25%على التوالي. ولم تكن هناك فروق معنوية بين الانواع الثلاثة ، وكانت قيم معامل الانقسام لنماذج السيطرة الموجبة 4.47 , 2.75 , 4.306 % للانسان و الاغنام والماعز على التوالي . وقد لوحظ وجود فرق معنوي في قيم معامل الانقسام بالنسبة للسيطرة الموجبة عن قيم معامل الانقسام بالنسبة لنماذج السيطرة السالبة وعلى مستوى الثقه(P<0.01) .

جدول 1: معدل قيم معامل الأرومة (BI) ومعامل الانقسام (MI) ومعامل التضاعف (RI) والنسب المئوية لانقسامات الخلايا اللمفاوية (الأول والثاني والثالث) في الإنسان لن ماذج السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (PHA) و المستضد البكتيري

المجموعة		معدل معامل الأرومة ±الخطأ القياسي(%)	معدل معامل الانقسام ± الخطأ القياسي(%)	الانقسام الأول % M1	الانقسام الثاني % M2	الانقسام الثالث % M3	معدل معامل التضاعف ±الخطأ القياسي
سيطرة سالبة		3.26 ± 39.26 b	0.07 ± 0.26 d	99.00	1	0	0.005 ±1.01 c
سيطرة موجبة		8.02 ± 74.73 a	0.55 ±4.47 a	49.33	20.66	30	0.07 ± 1.80 a
تخافيف المستضد	10/1	59.0 ±6.50 b ، a	0.12 ± 0.45 d	99.66	0.33	0	0.003 ± 1.00 c
	100/1	11.17 ±61.13 b ، a	1.25±0.13 c	94.66	4.00	1.33	0.02 ± 1.06 c
	1000/1	6.46 ± 52.80 b ، a	0.45 ± 3.10 b	74.66	14.33	11	0.03 ± 1.36 b

الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية بين معدلات العمود الواحد

جدول2:معدل(Mean) قيم معامل الأرومة (BI) ومعامل الانقسام (MI) ومعامل التضاعف (RI) والنسب المئوية لانقسامات الخلايا اللمفاوية (الأول والثاني والثالث) في الماعز لنماذج السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (PHA) و المستضد البكتيري

المجموعة		معدل معامل الأرومة ±الخطأ القياسي(%)	معدل معامل الانقسام± الخطأ القياسي(%)	الانقسام الأول M1%	الانقسام الثاني M2%	الانقسام الثالث M3%	معدل معامل التضاعف ±الخطأ القياسي
سيطرة سالبة		7.75 ± 25.80 b	0.05 ± 0.25 c	99.0	1.0	0	0.0 ± 1.01 c
سيطرة موجبة		13.10 ± 66.40 a	0.45 ± 4.30 a	57.0	18.0	25	0.05 ± 1.68 a
تخافيف المستضد	10 / 1	4.55 ± 48.95 a	0.05 ± 0.76 c	87.5	9.5	3	0.05 ± 1.15 b,c
	100 / 1	5.95 ± 64.35 a	0.05 ± 1.93 c	87.0	10.0	3	0.15 ± 1.16 b,c
	1000/1	5.85 ± 65.55 a	0.60 ± 3.30 b	60.5	20.5	19	0.35 ± 1.58 b

الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية بين معدلات العمود الواحد

جدول3 :معدل(Mean) قيم معامل الأرومة (BI) ومعامل الانقسام (MI) ومعامل التضاعف (RI) والنسب المئوية لانقسامات الخلايا اللمفاوية (الأول والثاني والثالث) في الأغنام لنماذج السيطرة السالبة والسيطرة الموجبة (PHA) و المستضد البكتيري

المجموعة		معدل معامل الأرومة ±الخطأ القياسي(%)	معدل معامل الانقسام± الخطأ القياسي(%)	الانقسام الأول M1%	الانقسام الثاني M2%	الانقسام الثالث M3%	معدل معامل التضاعف ±الخطأ القياسي
سيطرة سالبة		1.1 ± 32.9 b	0.00 ± 0.20 c	100	0.0	0.0	0.00 ±1.00 c
سيطرة موجبة		0.85 ±59.55 a	0.05 ± 2.75 a	60.5	18.0	21.5	0.03 ± 1.61 a
تخافيف المستضد	10/1	5.35 ± 45.05 a,b	0.05 ± 0.25 c	99	1.0	0.0	0.01 ± 1.02 c
	100/1	6.35 ±55.05 a	0.15± 1.05 b	98	1.5	0.5	0.02 ± 1.03 c
	1000/1	5.00 ± 52.3 a	0.35 ±1.55 b	85	10	5.0	0.06 ± 1.20 b

الأحرف المتشابهة تعني عدم وجود فروق معنوية بين معدلات العمود الواحد

اما النماذج المعاملة بالمستضد البكتيري المحضر بوصفه محفزا خارجيا وجد ان النماذج المعاملة بالتخفيف الأول كانت قيم معامل الانقسام (0.76 %, 0.25%,0.45% للانسان والاغنام والماعز على التوالي . تظهر النتائج ان هناك فرق معنوي بين قيم معامل الانقسام للانسان عن قيم معامل الانقسام في الحيوان (اغنام و ماعز) وعلى مستوى الثقة (P<0.01). وان قيم معامل الانقسام في الماعز كانت اعلى من قيمها في الأغنام والانسان. اما النماذج المعاملة بالتخفيف الثاني من المستضد البكتيري فقد اظهرت النتائج قيما لمعامل الانقسام مقدرها (1.05% , 1.93% 1.25%) للانسان والاغنام والماعز على التوالي، ولم تظهر النتائج فرق معنويا بين قيم معامل الانقسام للانسان والاغنام ، اما الماعز فقد اظهرت النتائج فرقاً معنوي عن قيم معامل الانقسام للانسان والاغنام وعلى مستوى الثقة (P<0.01). واخيرا نتائج قيم معامل الانقسام للنماذج المعاملة بالتخفيف الثالث اظهرت النتائج قيما لمعامل الانقسام قدرها (2.7 %, 1.55 %, 3.2%) للانسان والاغنام والماعز على التوالي وقد لوحظ ان هناك فرقاً معنوياً في قيم معامل الانقسام للانواع الثلاثة من الخلايا اللمفية بالنسبة لقيم معامل الانقسام للنماذج المعاملة بالتخفيف الاول والتخفيف الثاني من المستضد البكتيري، وان الخلايا اللمفية للماعز اظهرت ارتفاعا معنويا في قيمة معامل الانقسام عن قيمها في الاغنام والانسان وللتخافيف الثلاثة وعلى مستوى الثقة(P< 0.01).

دراسة معامل التضاعف (Replication index (RI).

تمت دراسة دالة التضاعف للتحري عن تأثير المستضد البكتيري المحضر على الخلايا اللمفية وتحفيزها ليس فقط على الانقسام وإنما إتمام دورة الخلية من خلال مرورها بالانقسام الأول ثم الانقسام الثاني والثالث قياساً بقيم معامل التضاعف لنماذج السيطرة السالبة والموجبة، وقد أظهرت النتائج ما يأتي:-

أ- نماذج السيطرة السالبة (بدون إضافة محفز خارجي) .كانت قيم معامل التضاعف للانسان والاغنام والماعز1.0 ، 1.01، 1.01%على التوالي، و لم تظهر النتائج فروقاً معنوية بين معامل التضاعف للأنواع الثلاثة .

ب–نماذج السيطرة الموجبة (بإضافة محفز النمو **PHA**).كانت قيم معامل التضاعف في الانسان والاغنام والماعز**1,80%,1.61%,1.68%**على التوالي، ولم تظهر النتائج اختلاف معنوي بين قيم معامل التضاعف للأنواع الثلاثة .

ج– النماذج المعاملة بلمستضد البكتيري المحضر

كانت قيم معامل التضاعف للانسان والاغنام والماعز**1.00** ،**1.01** ، **1.15%**على التوالي ولم تظهر النتائج اختلافا معنوياً بين الأنواع الثلاثة.

إما قيم معامل التضاعف للنماذج المعاملة بالتخفيف الثاني من المستضد البكتيري المحضركانت **1.06** ،**1.03**، **1.16%**لكل من الانسان والاغنام والماعز على التوالي،لم تظهر النتائج وجود فرق معنوي بين الانواع الثلاثة.اما قيم معامل التضاعف للنماذج المعاملة بالتخفيف الثالث من المستضد البكتيري فكانت **1.36**، **1.20**، **1.58%** لكل من الانسان والاغنام والماعز على التوالي ،أوضحت النتائج إن قيم معامل التضاعف للماعز اظهرت فرقا معنوياً عن قيم معامل التضاعف للإنسان والأغنام وعلى مستوى الثقة **(P<0.01)**.

دراسة التبادل الكروماتيدي ألشقيقي (SCE).

يوضح الجدول (4)نتائج حساب(SCE) وقد أظهرت عدم وجود فرق معنوي في قيم (SCE)بين نماذج السيطرة الموجبة (إضافة محفز النمو **PHA**) والنماذج المعاملة بالضاد البكتيري المحضر وللأنواع الثلاثة من الخلايا اللمفاوية، ولكن وجدت فروقاً معنوية بين الأنواع الثلاثة(الإنسان والماعز والأغنام)، وان قيم **SCE** في الماعز انخفضت عن القيم في كل من الإنسان والأغنام بالنسبة لنماذج السيطرة الموجبة والنماذج المعاملة بالضاد البكتيري المحضر وعلى مستوى الثقه**P<0.01**.

جدول4: نتائج قيم التبادل الكروماتيدي ألشقيقي (**SCE**) للمقارنة بين الخلايا اللمفاوية للإنسان والماعز والأغنام لنماذج السيطرة الموجبة (إضافة محفز **DHA**) والنماذج المعاملة بالمستضد البكتيري

		الإنسان معدل التبادل الكروماتيدي / خلية ± الانحراف القياسي	الماعز معدل التبادل الكروماتيدي / خلية ± الانحراف القياسي	الأغنام معدل التبادل الكروماتيدي / خلية ± الانحراف القياسي
إضافة المحفز **PHA**		**1.13 ± 5.25**	**0.93 ± 3.75**	**0.01 ± 6.9**
المستضد تخافيف	**10/1**	عدم وجود خلايا في الانقسام الثاني	**0.0 ± 3.77**	***1**
	100/1	****1.08 ± 4.6**	**0.50 ± 4.2 0**	***1**
	1000/1	**1.10 ± 4.3**	**0.84 ± 2.80**	**1.08 ± 6.2**

* تم احتسب **SCE** في خلية واحدة ؛** تم احتسب **SCE** في ثلاثة خلايا فقط .

أوضحت النتائج ارتفاع قيم معامل الانقسام للنماذج المعاملة بالمستضد البكتيري عن قيم معامل الانقسام لنماذج السيطرة السالبة فأنه يدل على إن الضاد حفز الخلايا اللمفاوية وهذا ما أكده الباحثون **Kadhum** (**5**) و **Ryu,** و **Kim** (**15**).بأن التمنع بالضاد الجرثومي لجرثومة ***P.multocida*** يولد مناعة خلوية. وأوضحت النتائج أيضا إن أفضل تركيز يوفر استجابة مناعية هو التركيز الثالث من الضاد البكتيري المحضر والحاوي على**10x3**^{5} خلية /مل.

أما بالنسبة لنتائج قيم معامل التضاعف فأن ارتفاع قيم معامل التضاعف في نماذج السيطرة الموجبة للإنسان والحيوان عن قيمتها في نماذج السيطرة السالبة والنماذج المعاملة بالضاد البكتيري، نتيجة تحفيز الخلايا لنماذج السيطرة الموجبة بمحفز النمو **(PHA)** ووصولها إلى الانقسام الثاني والثالث(**7**).

أما بالنسبة للنماذج المعاملة بالضاد البكتيري فقد اظهر التركيز الثالث من الضاد البكتيري والحاوي على$10x3^5$ خلية /مل قد ارتفع معنوياً في قيم معامل التضاعف بالنسبة لنماذج السيطرة السالبة، أي إن الضاد البكتيري حفز الخلايا اللمفاوية للإنسان والأغنام والماعز على الانقسام واتمام دورة الخلية. وقد ذكر الباحثون **Kadhum** (**5**) و **Staddon** (**16**) إن هناك تأثيراً واضحاً للضاد الجرثومي لجرثومة ***P.multocida*** ، وكونه مشطرا قوياً **(Potent mitogen)** للخلايا اللمفاوية، وقد أظهرت الخلايا اللمفاوية للماعز ارتفاعاً في قيم معامل التضاعف عن قيمته للأغنام، وهذا يمكن تفسيره كون الإصابة في الأغنام تكون حادة، وتسبب هلاكات مفاجئة وان الإصابة في الماعز تكون اقل حدة وتصيب الأعمار الصغيرة بنسبة اكبر(**18**)، كذلك الحال بالنسبة للخلايا اللمفاوية للإنسان فقد اظهر معامل التضاعف **(RI)** انخفاضاً عن قيم معامل التضاعف للماعز، ولعل السبب يعود كون الماعز والأغنام هما المضيف الأصلي الذي عزلت منه الجرثومة حيث اكد عدد من الباحثين عدم وجود حماية تصالبيه بين الانواع المختلفة من***P.multocida*** (**11**).

أما بالنسبة لنتائج دراسة التبادل الكروماتيدي ألشقيقي **SCE** فلم يكن بالامكان دراسته بالنسبة للنماذج المعاملة بالتخفيف الاول والثاني من المستضد المحضرلعدم وجود عدد كافٍ من الخلايا في الطور الثاني من الانقسام وقد تفسر هذه الحالة بانه قد يكون تركيز المستضد عالي في هذين التخفيفين ويكون ساماً بحيث لم تستطع الخلايا اتمام الدورة والوصول الى الطورين الثاني والثالث، اما النماذج المعاملة بالتخفيف الثالث من المستضد المحضر فأن الانخفاض أو النقص في معدل التبادل الكروماتيدي ألشقيقي (كما في الماعز) يعني إن هناك مستوى عالياً ودقيقاً في عملية إصلاح جزيئة الدنا(**DNA**) والذي يشار اليه في زيادة في معدلات الانقسام ونسب الخلايا في الانقسام الثاني **M2** فيها، إما الارتفاع في معدلات **SCE** (كما في الأغنام) يعزى إلى عدم قابلية الخلية على إصلاح جزيئة الـ **DNA** وظهور المعدل العالي له والمدى يعكس ذلك. مثلما إن هناك حالة في نقص معدلات الـ **SCE** تعني موت الخلايا الحاملة للتلف الكبير في جزئية الدنا والانقسام ودورة الخلية والمدى يعكس الاستدلال التأثير الشديد للمادة المراد فحصها (**17**).

إن دراسة اختبار التحول اللمفاوي وتطبيق فحص **SCE** و **RI** و **MI** و**BI** أوضحت إن الماعز هو الأكثر تحسساً لهذا النوع من الضادات وربما يفسر مقاومتها للمرض من خلال التحسس، وان الطريقة مجدية في فحص قدرة الضاد البكتيري وكونها سهلة، اقتصادية، وسريعة مقارنة بالطرائق الاخرى المستخدمة في تقويم اللقاحات كطريقة اختبار التحدي **"challenge test"**والتي تحتاج لاجرائها تهيئة حيوانات مختبرية او حقليه،قياس الجرعة القاتلة لنصف العدد (**Lethal dose 50 LD_{50}**)،ويحتاج اختبار التحدي كذلك الى مدة (**6-8**)اسابيع لاجرائه، لذا نقترح التوسع في تطبيق طريقة فحص التحول اللمفاوي**Lymphocyte Transformation Assay** .

المصادر

1- المشهداني ، محمود حسن (**1981**). اصول الاحصاء والطرق الاحصائية ، مطبعة الوطن ، بيروت.

2- **Chandrasekaran; S. and A. Karuppiah (1996). Antibody response in cattle vaccinated with Hemorrhagic Septicemia vaccine. The EighthAssociation Malaysia Scientific Congress.158-160.**

3- **Gosden, C.M.; C. Davidson and M. Robertson (1992). Lymphocyte culture in Human cytogenetics, 1:31-54 Edited by Ronkey, D.E and czepulkowski, B.H. Oxford University press Oxford Newyork – Tokyo.**

4- **Gundy, S.; L. Vorga and M. A. Bender (1984). Sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes exposed to ionizing radiation invivo and Invitro. Radit. Res., 100:47-54**

5- **Kadhum, S. S. (2005). Isolation and identification of *pasteurella multocida* and study some of there immunogenic feature. Athesis submitted to College of Sci./ Univ. of Baghdad**

6- **King M. T.; E. Gockand; K. Eckhardt (1982). 5-Brd Urd tablests with improved depot effect, for analysis in vitro of SCE in bone marrow.J.Immuno.116:668-675**

7- **Lipsky, P.E.; J. J. Ellner and A. S. Rosenthal (1976). Phytoheamagglutinin induced proliferation of guinea pig thymus derived lymphocytes. Accessory cell dependence. J. Immunal., 116:868-875.**

8- **Lafeber, T.; J. R. Cantey; L. Lutwick,; F. Talavera; A. Glatt; E. Mylonakis and B. A. Cunha (2002). *Pasterella multocida* Infection. Medicine. 2-14 (internet report).**

9- **Liu, W.; R. F. Chemaly ; M. J. Tuohy; M. M. Lasalvia and G.W. Procop (2003). Pasteurella multocida urinary tract infection with molecular 10.evidence of zoonotic transmission. Clin. Infect. Dis. 36(4):58-60.**

10- **Mukkur, T. K. S. (1979). Immunogenisty of chatropically extract protection antigens (s) origin against experimental Pasteurllosis in mice.J.General Microb. 113: 37-43.**

11- **Mrtrenchar, A. and P. M. Njanpop (1994). First case of an outer break of hemorrhagic septicemia caused by Pasteurella multocida serotype B,in northernCameroon.Rev.Elev.Med.Vet.Pays.Trop.47(1):19-20.**

12- **Oros, J.; A. Fernandez; J. L. Rodriguez; F. Rodriguez and J. B. Poveda (1997). Bacteria associated with enzootic pneumonia in goats. 1Zentralbl. Veterinaries. B. 44(2): 99- 104.**

13- **Rusvai, M. and L. Fodor (1998). Occurrence of Some viruses and bacteria involved in respiratory diseases of ruminants in Hungary. Acta. Vet. Hung. 46(4):405-414 [Abstract]**

14- **Rimler, R. B. (2000). Restriction endonuclease analysis using H-hal and H-pall to discriminate among group B *Pasteurella multocida* associated with haemorrhagic septicaemia. J. Med. Microbiol. 49(1): 81-87.**

15- **Ryu, H. and C. J. Kim (2000). characterization of a lipopolysacchari-protein complex of type A *Pasteurella multocida* . korean J. Vet. Res. 4 72-80.**

16- **Staddon, J. M.; N. Chanter; A. J. Lax; T. E. Higgins and E. Rozengurt (1990). *Pasteurella multocida*_Toxin, a potent mitogen, stimulates protein kinase C- dependent and- independent protein phosphorylation in swiss 3T3 cells. J. Biol. Chem. 265:11841-11848.**

17- **Shubber, E. K.; K. Al taif; Al; khateed, G. A. Sultan; A. khaleed M. Salman; B. Al- Anak; S. Salman; M. Al-Zuhairy, and H. Mahdi (1992). Cytogenetic studies on blood lymphocytes from sheep infected with *Fasciola gigantica* and treated with Al-bendazole.The Iraqi J. Vet.Med.15:10-23.**

18- **Schneider, E.L. and J. Lewis (1981). Comparison of invivo and invitro SCE induction. Mutant. Res.106:85-90.**

19- **Shubber, E. K.; M.G. Shahin; S. S. Kadhum; A. H. Kadhum; A. A. Alyas and K. Zwany (1998). Genotoxic effect of zinc phosphide on rodents. Arab Agricultural Research Journal.Vol.2.No.2:219-236.**

20- Wilson, B.A.; L. R. Aminova; V. G. Ponferrada, and M. Ho (2000). Differential Modulation and sub sequent blockade of mitogenic signaling and cell cycle progression by *Pasteurella multocida* Toxin. Inf. Immu. 68(8):4531-4538.

ANTIGEN TO STUDY THE ABILITY of *Pasteurell multocida* STIMULATE THE IMMUNO RESPONSE OF BLOOD LYMPHOCYTES CELLS AND QUITE THE CELL CYCLE PROGRESSION

S. S. Kadhum* **E.K. Shubber***
D. S . Saleh** **M.A. AbdAon***

ABSTRACT

This study was carried out to characterize the immunity of whole cell killed antigen of *P. multocida* by using blood lymphocyte transformation assay through DNA-Labeling with bromodeoxy uridine for measuring cell division and sister chromatide exchange (SCE) formation. Different concentrations of the crud antigen were used to stimulate cells isolated from human, sheep and goats.

The results show that there is a significant variation in blood lymphocyte blastegnesis as a function of concentration of antigens. There was increasing in blood lymphocyte blastegnesis BI%, mitotic activities MI% (replication activityRI %) with decrease of antigens concentration.

The blood lymphocytes from goats were expressed as a highest response to antigen than that cells from human and sheep, however these antigens have not effective on the spontaneous level of sister chromatide exchange in either cell types. These results indicate that blood cell transformation method "Brdurd" more practical, accurate and effective method for evaluation of antigenesity.

---

* Ministry of Science and Technology, Baghdad, Iraq.
** College of Science ., -Baghdad Univ.- Baghdad, Iraq.