مقارنة الكفاءة التمنيعية للخمج التجريبي المتكرر والحقن بمستخلص الغدد اللعابية للقراد من نوع Hyalomma anatolicum

أحلام فتحي محمود الطائي و ليان ياسين خليل الحيالي

فرع الاحياء المجهرية - كلية الطب البيطري - جامعة الموصل - العراق

E- mail: <u>altaee.ahlaam@yahoo.com</u> 2013/6/11 قبل للنشر في

الخلاصة

لمقدمة

يعد القراد أحد أهم الطفيليات الخارجية المتغذية إجبارياً على الدم ، إذ يندر ج في دون صنف القراديات Subclass Acari ، رتبة الـ Parasitiformes وتحت رتبة القراد الصلب Ixodida وعائلة القراد الصلب Ixodidae وتحت عائلةHyalomminae وتشتمل عدداً من الأنواع أحدها النويع المسمى القراد زجاجي العين الأناضولي Hyalomma anatolicum إذ يعدّ من Hyalomma anatolicum القراد الصلب الأكثر تغلباً والأوسع انتشاراً من بين الأنواع السبعة الأخرى لجنسHyalomma التي تخمج قطعان الماشية والحيوانات الأخرى في العراق (1) . فضلاً عن ذلك فهي الناقل الرئيس لطفيلي Theileria hirci المسبب لداء الثايليريا الخبيث في الأغنام العراقية MOT) Malignant 2) Ovine Theileriosis (2) وتتوضح أهمية القراد فيما يخص الخسائر الاقتصادية التي يسببها لمختلف مضائفه في طبيعة تغذية القراد نفسه ، إذ إنّ القرادة البالغة تتغذى على ما يقارب 2.0-0.5 ملليتر من دم المضيف (3). وإن الطبيعة المعقدة في التداخلات المناعية بين القراد والمضيف قد جلبت اهتمام الكثير من الباحثين والدارسين لها ، خصوصاً بعد أن طور القراد آليات مقاومة للمبيدات الحشرية ، فضلاً عن كون الأخيرة ذات تأثيرات سلبية على البيئة والإنسان تتمثل في بط ء انسحابها من الجسم فتبقى مستويات في حليب ولحوم الحيوانات المعالجة بها نتيجة لذلك نشأت الحاجة إلى بدائل وقائية ضد خمج القراد تمتاز بسهولة وسلامة اعطائها من دون أن تترك أثاراً جانبية (4). ففي دراسة لـ (5) استخدم فيها لقاح Gavac TM المحضر من بروتين مستخلص من معى النوع Boophilus microplus في تمنيع 260000 رأس من الماشية في دول امريكا اللاتينية فوجد أنها أظهرت

اختزالاً بنسبة 60% لاستخدام المبيدات الحشرية بموازاة الاختزال الحاصل في نسب الخمج بالقراد وحالات الإصابة بداء الكمثريات Babesiosis . وفي محاولة أجراها (6) إذ استعمل المستخلص الخام للغدد اللعابية للقراد Hyalomma anatolicum anatolicum لتمنيع الأرانب فوجد اختزالاً في بعض معايير بايولوجية القراد. أما الباحث (7) قد سجل أربعة أجناس في محافظة نينوى وهي Hyalomma و Rhipicephalus و Boophilus وجنس sp. وتبين من الدراسة ان نويع زجاجي العين الأناضولي H. anatolicum anatolicum بشكل أعلى نسب خمج في المحافظة ، لذا فقد كان من الضروري أن تجرى المحاولات التبي أعقبت هذه الدراسة ، فقد تناولت الحالة المناعية للمضيف الخمج بالقراد وإمكانية تحضير مستخلصات من قراد النويع H. anatolicum anatolicum والتمنيع بها في محاولة للحد من سعة انتشار النويع واختزال نسب خمج حيوانات المزرعة به ، فجاءت مساهمة (8) في تمنيع الأرانب بمستخلص النسيج الكامل الخام ليرقات وحوريات الـ. H. anatolicum anatolicum فقد شاهد (8) زيادة في كل من الاستجابتين المناعيتين الخلوية والخلطية في الأرانب الممنعة بمستخلص النسيج الخام إن الهدف من هذه الدراسة إحداث خمج متكررٍ في أحد مجموعتي أغنام التجربة ، مع إعطاء المستخلص الخام للغدد اللعابية النويع H.anatolicum anatolicum anatolicum لدراسة الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية في كل من شطري التجربة (في ضأن الخمج المتكرر والضأن الممنعة بمستخلص الغدد اللعابية).

المواد وطرائق العمل

جُمعت عينات إناث القراد والممتلئه بالدم من الأغنام من مناطق مختلفة من المحافظة وشملت هذه المناطق ، الحضر وكوكجلي وبادوش وبرطلة وربيعة فضلاً عن منطقة الحاوي الموصل وكما جاء في (9) . تعرفنا على الصفات الشكلية لها اذ شخصنا النوع في مختبر البحوث الطفيلية في الكلية وكما أورد كل من (7و 10) وباستعمال كل من المجهر الضوئي والترشيحي أحاديا العدسة وأظهرت الغدد اللعابية على شكل عنقود العنب (صورة ,1) . ورُبّي القراد في المختبر وحسب ما أشا ر إليه (11).

استعمل 24 أرنباً من النوع المحلي ومن كلا الجنسين لغرض الحصول على الجيل الثالث (النقي) من النويع . H لغرض الحصول على الجيل الثالث (النقي) من النويع . H وحسب طريقة (12) واستعمل في البحث 18 من الضان 6 منها لاجراء الخمج المتكرر و6 منها للتمنيع و6 لاحداث خمج السيطرة (الاول). استعملت 6 أغنام وبعمر من 7-11 شهر وبأوزان تراوحت من 18-25 كيلو غرام لم يسبق لها التعرض للقراد من تربيتها في قاعة الاحياء المجهرية التابعة لبيت الحيوانات في الكلية مع إجراء الفحوصات الدورية عليها للتأكد من خلوها من الإصابة بالقراد لغرض إجراء تحربة الخمج المتكرر كما جاء في (13).

الخذت إناث قراد النويع anatolicum للجيل الثالث والمتغذية لمدة 96-120 ساعة على الدم حررت بعد ذلك الغدد اللعابية من الأعضاء الأخرى وحسب طريقة (14) وحضر المستضد حسب طريقة (15) وقدرت كمية البروتين في مستخلص الغدد اللعابية وعين الوزن الجزيئي التقريبي للاجزاء البروتينية المفصولة بتقنية الترحيل الكهربائي باستعمال SDS-PAGE (15).



الصورة 1: الغدد اللعابية للنويع H. natolicum anatolicum تحت المجهر الضوئي بقوة تكبير 4X ، وتظهر مشابهة لعنقود العنب

استعملت مجموعة أخرى من الضأن عددها 6 وبأوزان تراوحت بين 19-23 كيلوغرام ، معروف عدم تعرضها السابق للخمج القرادي ، إذ حقنت بمستخلص الغدد اللعابية وبجرعة 1 مل والحاوي على 3 ملغم بروتين (3 ملغم/مل) ، مضاف إليه 1 مل من مساعد فروند الكامل (CFA) مضاف إليه 1 مل من مساعد فروند الكامل (CFA) الملون تحت الجلد في منطقة الإبط للقائمة الأمامية لليسرى ، وبعد انقضاء 4 أسابيع على الجرعة الأولية للتمنيع فقد أعيد

حقن الأغنام بالجرعة المنشطة وبواقع 0.5 مل من المستخلص + 0.5 مل من مساعد فروند غير الكامل (IFA) المستخلص + 0.5 مل من مساعد فروند غير الكامل (IFA) مل من Incomplete Freunds Adjuvant مل من PBS بالاس الهيدروجيني7.4 في منطقة الإبط من نفسها القائمة الأمامية اليمنى وتحت الجلد ثم أعطي 1 مل من الأولى لملاحظة التفاعل الجلدي في منطقه الحقن مقارنة الأولى لملاحظة التفاعل الجلدي في منطقه الحقن مقارنة بحقن جرع التمنيع (18). وفيما يخص السيطرة الموجبة (الخمج الأول) اذ استعملت ستة أغنام لهذا الغرض خمجت مرة واحدة بالقراد لغرض مقارنتها مع مجموعتي الخمج الخامس والتمنيع أجرى خمج التحدي بعد مرور اسبوعين على إعطاء الجرعة المنشطة وذلك بوضع 44 أنثى بالغة أرست المناعة غير المتخصصة لمجاميع حيوانات درست المناعة غير المتخصصة لمجاميع حيوانات الدراسة فقد قاست حسب طرية قر 10) مدرست المناعة غير المتخصصة لمجاميع حيوانات الدراسة فقد قاست حسب طرية قر 10)

دُرِست المناعة غير المتخصصة لمجاميع حيوانات الدراسة فقد قيست حسب طريقة (19). و درست الاستجابة المناعية المتمثلة بتفاعلات فرط الحساسية الجلدية (اختبار الجلد)، حسب طريقة (20). وايضا درست المناعة الخلطية باستخدام اختبار الأليزا المحور حسب طريقة (21).

النتائج والمناقشة

اظهرت نتائج تعيين الوزن الجزيئي التقريبي في الاجزاء البروتينية المفصولة بتقنية الترحيل الكهربائي (صورة, 2) باستعمال تقنية SDS-PAGE وكانت الأوزان الجزيئية التقريبية للحزم المفصول (c و b و b) هي التقريبية للحزم المفصول (c و b) هي التوالي.



الصورة (2) جهاز الترحيل الكهربائي المستخدم في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي لبروتينات الغدد اللعابية للنويع H.a.anatolicum

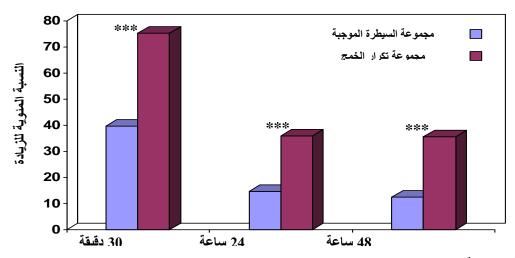
كشفت نتائج البلعمة باستعمال صبغة (Nitrobluetetrazolium (NBT) قيم معامل البلعمة في مجموعة الخمج المتكرر ومجموعة التمنيع بشكل عام عند مقارنتها بقيم معامل البلعمة في مجموعة السيطرة ، ففيما يتعلق بمجموعة الخمج المتكرر فقد كانت هذه الزيادة تناقصية بمرور الوقت وذلك ابتداءاً من كانت هذه الأول إلى الأسبوع الثامن ، إذ تراوحت بين الأسبوع الأول إلى 1294,03 و 509,58 \pm 91,90 و في مجموعة السيطرة تراوحت قيم معامل البلعمة بين (9,13 \pm 1294,03 وفي مجموعة في الأسبوع الأول و (453,35 \pm 6,85 \pm 6,85 في الاسبوع المتكرر عند مستوى معنوية المجموعة المجموعة المحموعة الخمج المتكرر عند مستوى معنوية المحموعة المحموعة الخمج المتكرر عند مستوى معنوية

مقارنة بمجموعة السيطرة ، أما فيما يخص مجموعة التمنيع فقد كانت قيم معامل البلعمة بين $\pm 1585,50$ عند الأسبوع الأول و (1523,39± 55,04) عند الأسبوع الثاني عشر ، وقد اختلفت اختلافاً عن تلك القيم الظاهرة في كل من مجموعة الخمج المتكرر ومجموعة السيطرة وعلى حد سواء ، وكان هذا الاختلاف بشكل زيادة واضحة عند مستوى معنوية P<0.001 ، وعادت الفوارق المعنوية بين الخمج الاول والخامس لتختفي في اواخر ايام التجربة (جدول 1) تراوحت قيم معامل البلعمة بين (211.03 ± 7.22) في الأسبوع الأول و (6.85 ± 453.35) في الأسبوع الثامن،حيث ظهرت زيادة معنوية في قيم معامل البلعمة $P \le 0.001$ لمجموعة الخمج المتكرر عند مستوى معنوية مقارنة بمجموعة السيطرة ، أما فيما يخص مجموعة التمنيع فقد كانت قيم معامل البلعمة بين ± 1585.50 عند الاسبوع الاول و من مجموعة الخمج المتكرر ومجموعة السيطرة وعلى حد سواء ، وكان هذا الاختلاف يشير الى زيادة واضحة عند مستوى معنوية $P \le 0.001$ ، وعادت الفوارق المعنوية بين الخمج الاول والخامس لتختفي في اواخر ايام التجربة (الجدول، 1).

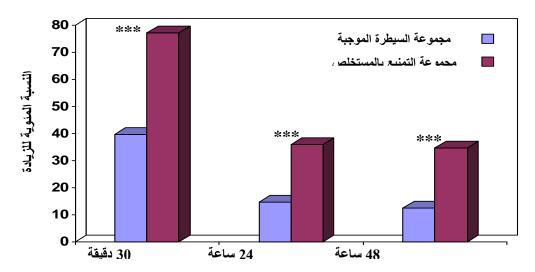
استعملت جرعة الـ 100 مايكروغرام من المستخلص التي أعطت أفضل النتائج لتفاعلات فرط الحساسية الجلدية في اجراء هذا الاختبار في مجموعتي أحداث الخمج التجريبي ألمتكرر والحقن بمستخلص الغدد اللعابية الخام للنويع H.a.anatolicum ، وبمقارنة كلّ من مجموعتى الخمج المتكرر والحقن بالمستخلص الخام للغدد اللعابية (مجموعة التمنيع) بمجموعة السيطرة (الخمج الأول) ، فقد تجلى وجود زيادة معنوية في سمك الجلد في المجموعتين أعلاه عن مجموعة السيطرة عقب مرور 30 دقيقة من الحقن داخل الجلد ، إذ كانت معدلات الزيادة والمقدرة كنسبة مئوية عند مستوى معنوية $P\leq 0.001$ ، $P\leq 0.001$ و $P\leq 0.001$ في كلّ من مجموعتي الخمج المتكرر والتمنيع على التوالي في حين لم يتجاوز معدل الزيادة (39,7%) في مجموعة السيطرة وكما أشير إليه في (الشكل ، 1 و 2) . اما بالنسبة للحقن بالـ (pbs) فلم يظهر أي تفاعل في موقع الحقن . كان هناك فرق معنوي في مجموعة التمنيع عند مقارنتها بمجموعة الخمج المتكرر (77,20%) و (75,3%) على التوالى وذلك بعد مضى 30 دقيقة على الحقن بالمستخلص الخام وعند معنوية P<0.01 ، (الشكل، 3).

الجدول ،1: معايير الأعداد المطلقة للخلايا المتبلعة للصبغة في مجاميع التجربة الثلاث (مجموعة الخمج المتكرر والتمنيع ومجموعة السيطرة).

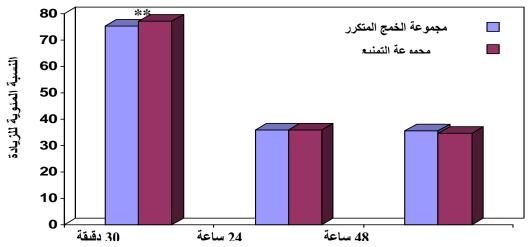
الخطأ القياسي±معدل الاعداد المطلقة للخلايا المتبلعمة للصبغة			الاسبوع
مجموعة التمنيع	مجموعة الخمج الخامس	مجموعة الخمج الاول	
6.88 ± 473.23	28.03 ± 473.05	11.74 ± 472.88	0
••• *** 41.93 ± 1585.50	*** 30.90 ± 1294.03	5.35 ± 211.03	1
••• *** 12.17 ± 1801.70	*** 11.86 ± 1308.75	7.22 ± 188.5	2
••• *** 10.43 ± 1594.48	*** 18.17 ± 852.02	6.41 ± 263.42	3
••• *** 35.14 ± 1600.30	*** 8.62 ± 764.07	5.38 ± 294.53	4
••• *** 33.32 ± 1528.43	*** 11.34 ± 704.53	6.22 ± 299.85	5
••• *** 34.73 ± 2315.95	*** 5.62 ± 633.22	10.47 ± 341.3	6
••• *** 35.94 ± 2119.37	*** 13.04 ± 571.62	10.28 ± 419.18	7
••• *** 57.90 ± 1721.25	*** 9.19 ± 509.58	6.85 ± 453.35	8
••• ***59.92 ± 1761.23	***10.01 ±519.21	9.17 ±478.32	9
••• ***62.30 ± 1822.81	*9.78 ± 486.33	10.74 ± 439.11	10
••• ***49.31 ± 1677.25	10.16 ± 432.32	8.99 ± 451.37	11
••• ***55.04 ± 1523.39	10.88 ±461.07	11.34 ± 470.81	12



*** فرق معنوي عند مستوى معنوية p<0.001 الشكل ،1: مقارنة النسبة المنوية للزيادة في سمك الجلد بعد الحقن بالمستخلص اللعابي بين مجموعة السيطرة الموجبة ومجموعة الخمج المتكرر عقب مرور 30 دقيقة و24 ساعة و48 ساعة



***فرق معنوي عند مستوى معنوية p<0.001 الشكل، 2: مقارنة النسبة المنوية للزيادة في سمك الجلد بعد الحقن بالمستخلص اللعابي بين مجموعة السيطرة الموجبة ومجموعة التمنيع بعد انقضاء 30 دقيقة و24 ساعة و48 ساعة.



***فرق معنوي عن مجموعة الخمج المتكرر عند مستوى معنوية p<0.01 . الشكل ، 3: مقارنة النسبة المنوية للزيادة في سمك الجلد بعد الحقن بالمستخلص اللعابي بين مجموعة الخمج المتكرر ومجموعة التمنيع بعد مرور 30 دقيقة و24 ساعة و48 ساعة

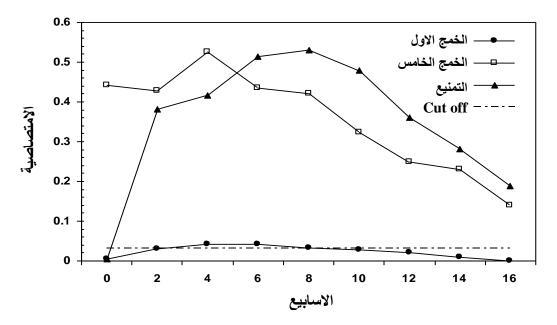
درست الاستجابة المناعية الخلطية باستعمال اختبار الاليزا المحور فلوحظ انعدام وجود الاجسام المضادة لكل من مجموعتى السيطرة والتمنيع في الأسبوع صفر قبل الحقن ، عدا مجموعة الخمج المتكرر والتي كانت الأجسام المضادة قد تكونت لديها قبل اجراء الخمج الخامس (الأسبوع صفر) ، اذ كانت هناك زيادة معنوية في معدل امتصاصية المطياف الضوئي لمجموعة الخمج المتكرر عنه في مجموعتي السيطرة والتمنيع وعند مستوى معنوية $P \le 0.001$ ، في حين أشارت قراءة المطياف الضوئي لمعدلات الامتصاصية انعداما للفروق المعنوية في الأسبوع الثاني من إجراء الخمج وحقن المستخلص بين مجموعة الخمج المتكرر ومجموعة التمنيع ، إذ كانت معدلات القراءة (0.429 ± 0.030 و 0.000 ± 0.381 على التوالى ، إلا أنَّ هاتين القراءتين أظهرتا زيادة معنوية عن القراءة في مجموعة السيطرة وعند مستوى معنوية $P \le 0.001 \pm 0.031$ ، كما كشفت معدلات قراءة الامتصاصية لمجموعة الخمج المتكرر زيادة عن مجموعة الخمج الأول ابتداءاً من الأسبوع صفر

وحتى الأسبوع السادس عشر ، (0.0442 ± 0.002) الى وحتى الأسبوع السادس عشر ، (0.014 ± 0.003) في الخمج المتكرر عن (0.001 ± 0.001) في خمج السيطرة عند مستوى احتمال $P \leq 0.001$ ، والمبينة في (الشكل ، 4) .

أتت نتائج الدراسة لتبين ظهور الفوارق المعنوية مشيرة إلى زيادة في معدل قراءات الامتصاصية لمجموعة التمنيع في الاسابيع 4 و 6 و 8 و 10 و 12 و 16 عن مجموعة الخمج المتكرر وعند مستوى معنوية 0.00 للاسابيع الخمس و 0.05 للاسبوع السادس عشر والذي كانت قيم معدلات القراءة فيه (0.18 ± 0.18) و (0.18 ± 0.18) على التوالي ، مع وجود فوارق معنوية بين مجموعة التمنيع بالمقارنة مع مجموعة السيطرة وذلك ابتدءا من الأسبوع الثاني لإعطاء جرعة المستخلص الخام للغدد اللعابية وحتى الأسبوع السادس عشر من هذه التجربة ، إذ كشف الاختبار عن ان معدلات قراءة الامتصاصية أخذت بالزيادة وذلك بعد إجراء خمج التحدي منذ الأسبوع الأول لإجراء لخمج (الأسبوع السادس من تجربة التمنيع) إلى ان وصلت الخمج (الأسبوع السادس من تجربة التمنيع) إلى ان وصلت

الى أعلى معدلاتها بعد مرور أسبوعين على اختبار التحدي (0.530 \pm 0.004 \pm 0.530) ، بدأت بعد ذلك بالانخفاض التدريجي واستمر لغاية الإسبوع السادس عشر (188 \pm 0.011 \pm 0.188) كما في (الشكل 4) . اوضحت نتائج الدراسة أنّ الخمجين الرابع والخامس بلك أنثل مسن قلم والخامس بلك أنثل مناعة مؤثرة وفعالة . كشفت هذه الدراسة عن وجود ثلاث من الحزم البروتينية لمستخلص هذه الدراسة عن وجود ثلاث من الحزم البروتينية لمستخلص

الغدد اللعابية الخام للنوع H.a.anatolicum بتقنية الترحيل او الهجرة الكهربائية ، بأوزان جزيئية تقريبية 67 ، 65.604 ، 55.531 ، فقد اتفقت تماما مع ما ذكره (22) في دراسته والذي تمكن من إيجاد عدة حزم بروتينية للمستخلص أحدها كان بوزن 67 كيلو دالتون ، أما فيما يخص الحزم الأخرى في دراسة الباحث نفسه فلم تبتعد بأوزانها كثيراً عن بقية أوزان حزم تجربتنا هذه .



الشكل ، 4 : قراءات المطياف الضوئي لشدة الامتصاصية لامصال مجاميع التجربة الثلاث ، قيمة الـ Cut off

أكدت الدراسة وجود زيادة معنوية لمعدلات الأعداد المطلقة للخلايا المبتلعة في أفراد فئة التمنيع عن نظرائها في مجموعة تكرار الخمج والتي بدورها كانت مرتفعة معنويا عن مجموعة الخمج الاول والذي لوحظ فيه التدني العددي للاعداد المطلقة للخلايا المبتلعة للصبغة تدنيا كبيرا ويعزى التثبيط في هذه الأعداد عند التعرض الإول للخمج إلى تدخل احدى أليات التحوير المناعي الذي يتَّخذه القراد في التطفل على مضيفه، والناجم من التاثير المباشر والمثبط للعاب القراد على وظيفة الخلايا العدلة للمضائف الطبيعية كالكلاب (23) فحرف المناعة من الاستجابة بخلايا Th1 إلى الاستجابة بخلايا Th2، يعنى إفرازاً لبعض سايتوكينات النوع الأخير من الخلايا بما فيها الأنترلوكين 10 (IL-10) والذي يعمل على إيقاف عملية الفسفرة Phosphorylation لخلايا المسماة $\mathrm{CD28}$ المنتجة للكلوبيولين المناعى $\mathrm{IgG_1}$ ، مما T ينجم عنه تثبيط لانتاج سايتوكينات خلايا Th1 كالانترولوكين 1 (IL-1) والانتروفيرون كاما (IFN-y) وعامل تنخر الورم a و (TNF a, b) و الانترولوكين السادس المفرزة من خلايا العدلات مما يؤدي الى تثبيط عملية البلعمة لهذه الخلايا (23 و24).

كما اتفقت نتائج در استنا هذه إلى ماتوصل اليه (25) في تثبيط أعداد الخلايا المبتلعة للصبغة الناجم من التعرض الأول للقراد في المضائف الطبيعية عطفا على ما سبق فان الانخفاض الحاصل في أعداد الخلايا المبتلعة للصبغة في هذه الدراسة يقترب من نتائج (26) والذي أشار إلى انخفاض أعداد خلايا العدلات المبتلعة للصبغة عند الإصابة بالقراد

نتيجة تنافس إحدى مكونات اللعاب القرادي مع المستقبلات الموجودة على الخلايا العدلة للارتباط بالانترلوكين 8 بدل الخلايا العدلة ، ، اذ تُعَدُّ عملية البلعمة Phagocytosis من الخمليات الحيوية التي تهدف الى التخلص من الاجسام الغريبة عن الجسم بواسطة التهامها ، اذ تمثل نوعا من انواع المناعة الخلوية غير المتخصصة – Non-Specific Cell معيث تتحول صبغة الخلوية إلى أملاح الفورمازان Formazan الزرقاء الغامقة وذلك من خلال أكسدة هذه الصبغة من عوامل NADPH الموجودة في سايتوبلازم الخلية البلعمية (27).

أظهرت تفاعلات فرط الحساسية الجلدية أنّ جرعة 100 مايكروغرام هي الجرعة الأمثل لاستعمالها في التحري عن الخمج أو الحالة التمنيعية في حيوانات التجربة ، إذ كان هذا الاختبار مبنيا على أساس أنّ هذه الجرعة هي أفضل جرعة إمكن استعمالها في الحيوانات التي أحدث فيها الخمج المتكرر تجريبيا والحيوانات الممنعة للكشف عن التحسس والحيلولة دون أن يكون هنالك امكانية لإحداث زيادة لهذا التحسس ، لذلك فقد اجريت الفحوصات الجلدية وقُرئت بعد انقضاء 30 دقيقة ، 24 ساعة و 48 ساعة ، إذ إنّ هذا الاختبار في قراءة الفحوصات مبني على أساس نوع المناعة المسؤولة عن حالة الخمج وكما هو معروف فان قراءة نتيجة الاختبار الجلدي بعد الحساسية الآنية والتي تتحمل فيها الأجسام المضادة آلية هذا التفاعل ، فقد تجلت نتائج تفاعل فرط الحساسية الآني في كل التفاعل ، فقد تجلت نتائج تفاعل فرط الحساسية الآني في كل من مجموعة الخمج المتكرر (الخامس) ومجموعة التمنيع

تغلب مستويات الأجسام المضادة الناتجة عن التمنيع بالمستخلص الخام للغدد اللعابية للقراد عن تلك الناجمة من أحداث الخمج المتكرر (الخامس) وبذلك فقد أتت متفقة مع ما اشار اليه (32) والذي بين أنّ مستخلصات الغدد اللعابية عند حقنها في الحيوانات تحدث تنشيطاً لتكاثر الخلايا اللمفية T و B على حد سواء إذ إنّ معاملة الخلايا اللمفية بمستخلص الغدد B اللعابية للقراد من النوع Amblyomma veriegatum أدى الى تعزيز قدرة هذه الخلايا على التكاثر من امتلاك هذا المستخلص قدرة تحفيزية على المشطرات المستحثة لعملية المستخلص قدرة تحفيزية على المشطرات المستحثة لعملية تكاثر الخلايا اللمفية ويؤكد ذلك دور الأجسام المناعيه في المقاومه المتولده للمضيف تجاه القراد من عدم قدرة الأخير على الانتصاق بالمضيف واتمام عملية التغذيه على الدم

أظهرت الدراسة أيضاً ارتفاع مستويات الأجسام المضادة لمجموعة الخمج المتكرر على نظيراتها من مجموعة السيطرة ارتفاعاً ملموساً، ويعتقد أنّ سبب ذلك يعود الى تكون الاجسام المضادة المعادلة لتاثيرات التحوير ألمناعي للعاب في الاخماج الأولى، والتي يُعمد فيها إلى حرف الاستجابة المناعية من الاستجابة بخلايا Th1 الى الاستجابة بالـ Th2 وبذلك فقد اتفقت مع ما جاء على ذكره كل من (34) في أنّ أحداث الأخماج التجريبية المتكررة تولد المصال عالية التمنيع والمسماة Hyperimmune serums للجزيئات المفرزة في لعاب القراد الى المضائف.

بدا أنّ امصال مجموعة الخمج الأول (السيطرة) لا تمتلك أجساماً مضادة واقية من القراد بدليل حصول الأخماج المتكررة الواحد تلو الاخر بل على العكس فلربما كان هناك تغييب لدور الاجسام المضادة في توليد المناعة ضد القراد ويفسر ذلك بان لعاب القراد يكون حاوي على بروتين بوزن على خلايا B جزيئي 18 كيلو دالتون ذو تاثير تثبيطي مباشر على خلايا B-Cell Inhibitory Protein or Fraction اللمفية ويسمى (BIF) في لعاب القراد من نوع Bb-Cell Inhibitory في لعاب القراد من نوع 35) ومن خلال ذلك فقد اتضح أثر عمليه التمنيع في رفع مستوى المناعه للمضيف تجاه القراد وتقليل كفاءته رفع مستوى المناعه للمضيف وخاصة بعد ظهور أجيال من القراد تقساوم مختلف المبيدات الحشريه (37).

- **4.** Wikel, S.K.; Bergman, D.K. and Ramachandra, R.N. (1996). Chapter 12 Immunological-based control of blood-feeding arthropods. The immunology of host ectoparasitic arthropod relationships, Wike 1,S.K.(ed). CAB. International Walling ford, PP: 290-315.
- 5. De lafuente, J.; Rodriquez, M.; Redondo, M.; Montero, C.; Garcia-Garcia, J.C.; Mendez, L.; Serrano, E.; Valdes, M.; Enriquez, A.; Canales, M.; Ramos, E.; Boue, O.; Machado, H.; Lieonart, R.; De armas, C.A.; Rey, S.; Rodriguez, J.L.; Artiles, M. and Garcia, L. (1998). Field studies and cost-effectiveness

على مجموعة الخمج الأول (السيطرة) نسبة مئوية للزيادة الحاصلة في سمك الجلد (75.30%و 77.20% و 39.70%) على التوالى ،التي جاءت مقاربة لما أشار إليه كل من (20) الذين بينوا حدوث تفاعل فرط الحساسية الآني عند الحقن بمستخلص الجسم الكامل للطور البالغ غير المتغذي (UAE) Udfed للنوع Adult Rhipicephalus sanguineus في الكلاب والتي تعد مضائفا طبيعية لهذا النوع من القراد ، فقد حصلا على فرط حساسية آنى ظهربنسبة مئوية للزيادة في سمك الجلد بقدر 80% ، كما أيدت نتائج (28) نتاجات هذه الدراسة فقد وصلت النسبة المئوية للزيادة في سمك الجلد الى 74.70% عند حقن العجول بمستخلص الجسم للطور اليرقى غير المتغذي ULE) Unfed Lervae Extract) للنوع Boophilus microplus اذ تعد العجول مضيفا طبيعيا لهذا النوع من القراد ويشير ذلك إلى أنّ تفاعل فرط الحساسية الاني يعد نموذجاً للاستجابة المناعية المستحثة من المضائف الحساسة او الطبيعية ضد القراد (29) في حين لا تلاحظ هذه الشدة في التفاعل الجلدي الأني لأفراد مجموعة الخمج الأول ، إذ لا تظهر إلا تفاعلاً أنياً بسيطا في المضائف الطبيعية ويفسر ذلك بأنّ هذه المضائف تميز مستضدات القراد بقوة إلأ انها غير قادرة على إبداء مقاومة كفوءة تجاهه نتيجة لفاعلية آلية التحوير المناعى الذي تمارسه طفيليات القراد على مضائفها.

اكدت نتائج الدراسة الحالية أنّ هناك زيادة في معدلات شدة الامتصاصية للأجسام المضادة في مجموعة التمنيع على تلك الأجسام في مجموعة الخمج المتكرر وقد شابهت بذلك نتائج دراسة (30) والذي أشار إلى أنّ تمنيع الكلاب بالمستخلص الخام للغدد اللعابية للنوع snguineus قد أعطى مستويات أعلى من الأضداد من تلكم التي سببها الخمج المتكرر ، وقد استمرت مستويات الأجسام المضادة في أمصال الضأن تجريبي الخمج المتكرر والتمنيع من نتائج دراسة (31) والذي أشار إلى وجود حزم موجبة تظهر عند مفاعلة أمصال الكلاب الممنعة بالخمج المتكرر مع مستخلص الغدد اللعابية النوع هموني الخمج المتكرر مع مستخلص الغدد اللعابية النوع وصولًا إلى اليوم المستخلص المنبع بالخمج ، كما وقد بينت نتائج هذه الدراسة 160 بعد التمنيع بالخمج ، كما وقد بينت نتائج هذه الدراسة

المصادر

- 1. Hawa, N.J.; Jasim, F.A. and abdul Aziz, M.O. (2000). Asurvey for the species of tick and its geographical distribution in Iraq to specify the species for transmission of heamorrhagic fever. Iraqi, J. Agri, (Special issue) 5: 87-97.
- 2. Hooshmand-Rad, P. and Hawa, N.J. (1973). Transmission of Theileria hirci in sheep by hyalomma anatolicum anatolicum. Trop. Anim. HIth. Prod., 5: 103-109.
- **3.** Soulsby, E.J. (1982). Helminths, Arthropods and protozoa in domesticated animals, 7th ed. Bailliere Tindall. London, PP: 465-474.

- **18.** Barriga, O.O.; Andujar, F. and Andrzejewski, W., (1991a). Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. J. Parasitol., 77: 703-709.
- 19. Metacalf, J.; Callin, j.; Nanseef, W. and Root, M. (1986). Transduction mechanism receptor. In: Laboratory manual of neutrophil function. Reven Press, New York, USA., PP: 87-97.
- **20.** Szabo, M.P.; Morelli, Jr. J. and Bechara, G.H. (1995). Cutaneous hypersensitivity induced in dogs and guinea pigs by extracts of the tick *Rhipicaphalus Sanguineus* (Acari: ixodidae). Exp. App. Acarol., 19: 723-730.
- 21. Szabó, M.P.; Aoki, V.L.; Sanches, F.P.; Aquino, L.P.; Garcia, M.V.; Machado, R.Z. and Bechara, G.H. (2003). Antibody and blood leukocyte response in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) tick-infested dogs and guinea pigs. Vet. parasitol. 115(1): 49-59.
- **22.** Gill, H.S.; Boid, R. and Ross, C.A. (1986). Isolation and characterization of salivary antigens from *Hyalomma anatolicum* anatolicum. Par. Immunol., 8: 11-25.
- 23. Gill, H.S., and Walker, A.R., (1984). Histological analysis of tick feeding sites during acquisition of resistance to *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Proceedings of the British Society for Parasitology Spring meeting. Parasitol., 89: 74.
- **24.** Matsumoto, K.; Inokuma, H.; Ohno, K., and Onishi, T. (2001). Effects of salivary gland extract from *Rhipicephalus sanguineus* on immunoglobulin class productivity of canine peripheral blood lymphocytes. J. Vet. Med. Sci., 63: 325-328.
- **25.** Brossard, M., and Wikel, S.K. (2004). Tick immunobiology, Parasitol., 129: S161-S176.
- **26.** Ferreira, B.R., and Silva, J.S. (1998). Saliva of *Rhipicephalus sanguineus* tick impairs T cell proliferation and IFN-□-induced macrophage microbicidal activity, Vet. Immunol., Immunopathol., 31: 279-293.
- 27. Kocakova, P.; Slavikova, M.; Hajnicka, V.; Slovak, M.; Gasperik, J.; Vancova, I.; Fuchsberger, N., and Nuttall, P.A. (2003). Effect of fast protein liquid charomatography fractionated salivary gland extracts from different ixodid tick species on interleukin-8 binding to its cell receptors. Fol. Parasitol., 50: 79-84.
- **28.** Roitt, I.; Brostoff, J., and Male, D. (1993). Defects in Phagocytosis: Immun deficiency.

- analysis of vaccination with Gavac TM against the cattle tick *Boophilus microplus*. Vacc., 16: 366-373.
- 6. طارش ، جبار هاشم(1980). تأثير التمنيع بمستضد الغدد اللعابية على الاصابة بالقراد ومن نوع هايلوما اناتولكم في الارانب . رسالة ماجستير . كلية الطب البيطري ، جامعة بغداد . 85.
- 7. المولى ، ايمان دحام هادي يونس (2001). دراسة تصنيفية لانواع القراد المتطفل على بعض اللبائن في محافظة نينوى والتغيرات النسيجية الناتجة من تطفل القراد الأناضولي Hyalomma anatolicum . رسالة ماجستير كلية العلوم ، جامعة الموصل 108.
- 8. Ochi, E.B. (2004). Contribution in immunization of rabbits with whole tissue extract of *Hyalomma anatolicum anatolicum*. Ph.D. Thesis, College of Veterinary Medicine, University of Mosul, PP: 125.
- 9. Estrada-Pena, A.; Bouattour, A.; J.-L. and Walker, A. R. (2004). Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. , 1st ed., University of Zaragoza (Spain). PP: 18, 62-66.

 العدم محمد ، كاظم محمد (1996) ، دراسة حياتية تصنيفية على القراد الصلب لبعض الحيوانات الاليفة والبرية من العراق. رسالة دكتوراه ، كلية العلوم ، جامعة بغداد , 114
- **11.** Banks, C.W.; Oliver, J.R.; Hopla, C.E. and Doston, E.M. (1988). Laboratory life cycle of *Ixodes woodi* (Acari: Ixoididae). J. Med. Entomol., 35: 177-179.
- 12. Srivastava, P.S. and Sharma, N.N. (1976). On the rearing of *Hyalomma (Hyalomma) antolicum anatolicum* koch , 1844 and their infection with *Theileria annulata* (Dshunowsky and Luhs , 1904) in the laboratory. Ind. J. Anim. Res. , 10 : 21-26.
- **13.** Bennett, G.F. (1969). *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae): experimental infest at on cattle restrained from grooming . Exp. Parasitol., 26: 323-328.
- **14.** Purnell, R.E. and Joyner, L.P. (1968). The development of *Theileria parva* in the salivary glands of the tick, *Rhipicephalus appendiculatus*. Parasitol., 58: 725-732.
- **15.** Barriga, O.O.; Andujar, F. and Andrzejewski, W. (1991b). Manifestations of immunity in sheep repeatedly infested with *Amblyomma americanum* ticks. J. Parasitol., 77: 703-709.
- **16.** Schacterle, G.R. and Pollack, R.L. (1973). A simplified method for the quantitative assay of small amounts of protein in biological material. Anal. Biochem., 51: 654-655.
- **17.** Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227: 680 685.

Vet. J., 31(1):9-16.

- **34.** Rolnikova, T.; Kazimirova, M. and Buc, M. (2003). Modulation of human lymphocyte proliferation by salivary gland extracts of ixodid tick (Acari: Ixodidae): Effect of feeding stage and sex, Fol. Parasitol., 50: 305-312.
- **35.** Ramachandra, R.N. and Wikel, S.K. (1992). Modulation of host-immune responses by ticks (Acari: Ixodidae): Effect of salivary gland extracts on host macrophages and lymphocyte cytokine production. J. Med. Entomol., 29: 819-826.
- **36.** Ramachandra, R.N. and Wikel, S.K. (1995). Effect of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts on *Bos indicus* and *Bos taurus* lymphocytes and macrophages: in vitro cytokine elaboration and lymphocyte blastogenesis. J. Med. Entomol., 32: 338-345.
- 37. Leschnik, M.; Feilered, A.; Duscher, G. and Joachim A. (2013). Effect of owner-controlled acaricidal treatment on tick infestation and immune response to tick-borne pathogens in naturally infested dogs from Eastern Austria. Par.Vec. 6:62

- In: Immunology. PP: 1-8 3rd ed., Mosby International Ltd., U.K.
- **29.** Bechara, G.H.; Mordli, Jr. J. and Szabo, M.P.J. (2000). Skin test and tick immune status in susceptible and resistant cattle in Brazil. Ann., N.Y. Acad. Sci., 916: 570-575.
- **30.** Szabo, M.P.J.; Castagnolli, K.C.; Santana, D.A.; De castro, M.B. and Romano, M.A. (2004). *Amblyomma cajennense* ticks induce immediate hypersensitivity in horses and donkeys. Exp. App. Acarol., 33: 109-117.
- **31.** Jittapalapong, S.; Stich, R.W.; Gordon, J.C.; Bremer, C.A. and Barriga, OO. (2000). Humoral immune response of dogs previously immunized with salivary gland, midgut, or repeated infestations with *Rhipicephalus sanguineus*., Ann N.Y. Acad. Sci, 916: 283-288.
- **32.** Inokuma, H.; Mukai, M.; Ohno, K.; Yamamoto, Y.; Takahashi, S. and Onishi, T. (1999). Duration of antibodies against 24 kd protein of *Rhipicephalus sanguineus* Extract in dogs infested with adult ticks. J. Vet. Med. Sci., 61: 179-181.
- **33.** Akhtar, M.; Muhammad, F.; Lodhi, L.A.; Hussain, I. and Anwar, M. I. (2011). Immunity against Ticks-A Review. Pakis.

Comparative immunizing status between repeated experimental infestation and injection of salivary glands extract of *Hyalomma anatolicum anatolicum* in sheep

A.F.M.AL-Taee and L.Y.K.AL-Hyali

Department of Parasitology, College of Veterinary Medicine, Mosul University, Iraq

Summary

This study have been clarified the role of the repeated infestation with hard tick *Hyalomma* anatolican anatolicun and the use of native tick salivary glands extract in triggering the immunization of sheep. The study of native salivary glands using sodium dodocide sulphate polyacrilamide gel electrophoresis revealed that it consist of three bands (a, b and c) with molecular weight 67000, 65604, and 55531 Dalton respectively. For evaluation of immunization responses in sheep against hard tick including the nonspecific immunity which showed superiority in the absolute number phagositic cells in immunized group over that of the fifth group when determined from the first week till the end of the experiment 1294.03 ± 30.90 ; 461.07 ± 10.88 and 1585.50 ± 41.93 ; 1523.39 ± 55.04 respectively. In the same order were the results of immunity which represented as hypersensitivity skin reactions, using skin there was higher intensive immediate type of it in the immunized group than that of the fifth infestation one after 30 minutes of injection with native salivary glands extract and were (77.2%,75.3%) respectively. Modified ELISA test was used for evaluation for measuring of humeral immunity that showed a significant elevation of absorbance intensity of the antibodies against salivary glands extract in the immunized group than the fifth infestation one 0.188, 0.139 respectively.

Keywords: Immunization, Salivary Glands, Hyalomma anatolicum anatolicum, Sheep.