------ مجلة علوم الرافدين، المجلد16، العدد8، خاص بعلوم الحياة، ص 1-7، 2005-----

تطور المناعية الخلطية عند الإصابة بالتدرن باستخدام خنازير غينيا كحيوانات مختبرية

صبحي حسين الجبوري
كلية التمريض
جامعة الموصل

محسن أيوب العكيدي
قسم علوم الحياة
كلية العلوم
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2002/9/18 ، تاريخ القبول 2003/2/28)

الملخص

أجري هذا البحث لبيان تطور المناعة الخلطية عند الإصابة بالتدرن من خلال إصابة اصطناعية بثلاث أنواع جرثومة التدرن وباستعمال خنازير غينيا كحيوانات مختبرية. بينت النتائج ان المناعة الخلطية Humoral Immunity (مستوى الأضداد) والتي تم قياسها بطريقة الفحص المصلي ELISA (Enzym-Linked Immuno Sorbant Assay)، تنشأ تدريجياً وتتحفز بوضوح خلال الأسبوع الثالث من الإصابة ووجد ان سرعة عبور قيمة المستوى الفاصل Cut Off Level (الذي يعني إصابة موجبة بالتدرن) يعتمد على النوع المحقون من عصية التدرن وان أسرع عبور حصل في حالة العزلة المحلية Mycobacterium tuberculosis (اليوم 26) تلتها *M. bovis* (اليوم 29) ثم السلالة القياسية *M. tuberculosis*.

Development of the Humoral Immunity on Infection by Tuberculosis Using Guinea Pigs as Experimental Animals

Subhi H. Al-Juboury
College of Nursing
Mosul University

Muhsin A. Al-Ogaidy
Department of Biology
College of Science
Mosul University

ABSTRACT

This study was carried to clarify the development of the humoral immunity due to infection by Tuberculosis through artificial infection with three Mycobacterium types using Guinea Pigs as experimental animals. Results indicate that the Humoral immunity (Antibodies Level), which measured by ELISA serology technique (Enzym-Linked Immuno Sorbant Assay), arise progressively and stimulated evidently during the third week of infection, and it found that quickness of passing over the Cut-Off Level (means Tuberculiosis infection is positive by the used ELISA technique) depends on the type of

injected Tubercle bacilli and the quickest was the local isolate Mycobacterium tuberculosis (day 26) then M. bovis (day 29) and standard strain M. tuberculosis.

المقدمة

عندما تدخل جرثومة التدرن الى أي عضو من أعضاء الجسم فلابد ان تواجه الدفاعات المختلفة التي تعمل بطريقة او بأخرى لإزالتها والتخلص منها او السيطرة عليها ومنع نموها وتكاثرها وتدميرها قبل ان تؤدي إلى إحداث الإصابة وتفاقمها (Robbins, 1984).

ان عملية الاستجابة المناعية ضد جرثومة التدرن تبدأ بخط الدفاع الأول المتمثل بالبلاغم الكبيرة Macrophages التي تلتهم هذه العصيات لتحدد بعد ذلك تطور الإصابة من عدمه حيث تنتهي الإصابة عند قيام البلاعم بهضم وتكسير العصيات التي في داخلها او منعها من الانقسام والتكاصر وتثبيط نموها الا ان المشكلة عندما تحتفظ الجرثومة بقابليتها على الانقسام والتكاثر داخل سايتوبلازم هذه البلاعم ثم تفجيرها وإصابة بلاعم جديدة (Michael, 1995; Bermudez, 1991).

تستمر خطوات الاستجابة المناعية بعد عملية الالتهام لتدخل في عدة مسارات تتضمن تحفيز مجموعة من الخلايا بواسطة اطلاق وافراز العديد من العوامل والمواد الوسيطة منها (Lymphokines) تؤدي هذه المسارات الى تنشيط كل من الخلايا التائية (T. lymphocytes) المسؤولة عن المناعة الخلوية Cellular immunity ذات الدور الأساسي في المناعة تجاه جرثومة التدرن (Bermudez and Young, 1991; Barnes, 1992; Michael, et al., 1995).

اما الخلايا البائية (B. lymphocytes) التي تم تنشيطها فانها تقوم بتكوين وتحرير الاجسام المضادة (المناعة الخلطية) Humosal immunity حيث تساعد البلاعم الكبيرة في القيام بعملية البلعمة (من خلال نظام المتمم) فضلاً عن قيامها بمعادلة السموم المتكونة خلال هذه الإصابة (Michael, et al., 1995; Grange, 1990).

وفضلاً عن الدعم التي تقدمه المناعة الخلطية تجاه جرثومة التدرن فان وجودها يعد مهماً لأهداف تشخيصية أيضاً حيث تتحرى العديد من التقنيات المناعية عن مستوى الاجسام المضادة في مصل المصابين، ولعل فحص ELISA من اكثر الفحوصات المناعية المستخدمة في هذا المجال (Sada, 1990, Cho, 1991, Verban, 1993, Bathamley, 1995) والذي يدرس إمكانية استخدامه على المستوى المحلي في دعم تشخيص التدرن (خلف ومحسن، 2002).

والهدف من هذا البحث هو التأكد من حصول هذه الاستجابة المناعية الخلطية وطريقة نشوئها وتطورها لتكون الصورة واضحة عند محاولة استخدام التقنيات المناعية لدعم تشخيص حالات التدرن.

المواد المستعملة وطريقة العمل

1. المعلق الجرثومي:

استخدمت ثلاثة أنواع من المعلقات لغرض الحقن احدهما يمثل السلالة القياسية لعصيات التدرن والاخران تمثلان عزلات محلية للأنواع *M. bovis , M. tuberculosis* على التوالي وحضر كل معلق بنقل حملة لوب من المزارع النقية لكل نوع الى قنينة زجاجية تحوي (5) سم3 من الماء المقطر المعقم.

2. طريقة العمل:

اخذت الحيوانات المختبرية التي بعمر (2-3) شهر وبمعدل وزن (350-400) غم وسحب من كل معلق (0.5) سم3 وحقن في عضلة الفخذ للحيوان باستخدام مكررين لكل حالة وبعد اربعة ايام سحب الدم من الحيوانات المحقونة بطريقة طعنة القلب وفصل المصل من الدم المسحوب واجري عليه اختبار ELISA (للتحري عن مستوى الاجسام المضادة وبشكل خاص النوع IgG)، اعيدت عملية سحب الدم واجراء هذا الاختبار كل اربعة ايام ولفترة سبعة أسابيع وكانت خطوات اجراء هذا الاختبار كما يلي:

أ ـ تثبيت المستضدات (Ostyn, et al., 1997):

* اخذت صفيحة بولي استيرين معقمة وثبت المستضد (Purified Protein Derivatives) عليها وكما يلي:

* اذيب المستضد في حجم من دارئ الكاربونيت (PH 9.6) بحيث تم الحصول على تركيز للمستضد (10) مايكرو غرام / مايكروليتر.

* اضيف ما مقداره (100) مايكروليتر من المستضد الى الحفر في الصفيحة وحفظت بدرجة (4)م لمدة ليلة واحدة.

* ازيل محلول المستضد واضيف (200) مايكروليتر من محلول مثبت المستضد (Bovin Serum Albumin) (BSA + (Phosphate Buffer Solution) PBS Containing 5% (0.05% TT) وحفظ لساعتين بدرجة (37)م.

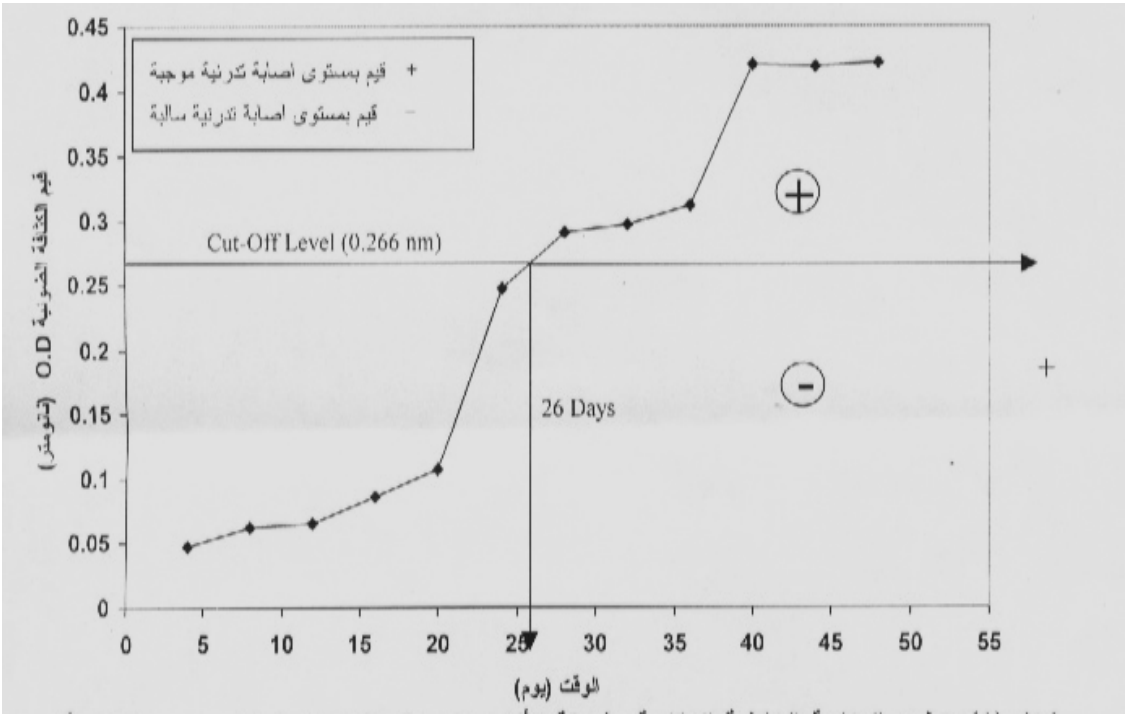
* بعد مرور الساعتين ازيل المحلول المثبت وغسل ثلاث مرات بالدارئ ولاجل تاكيد عملية التثبيت اضيف محلول تثبيت المستضد ثانية (200 مايكرولتير) وترك لمدة (18) ساعة بدرجة (4)م ثم ازيل المحلول المثبت وغسلت الصفيحة بالدارئ ثلاث مرات وتركت بدرجة (4)م لحين الاستخدام.

ب ـ العمل:

بعد الحصول على مصل الدم اجريت خطوات الاختبار والعمل واستخرجت قيمة Cut Off Level استناداً الى (خلف ومحسن، 2002).

النتائج والمناقشة

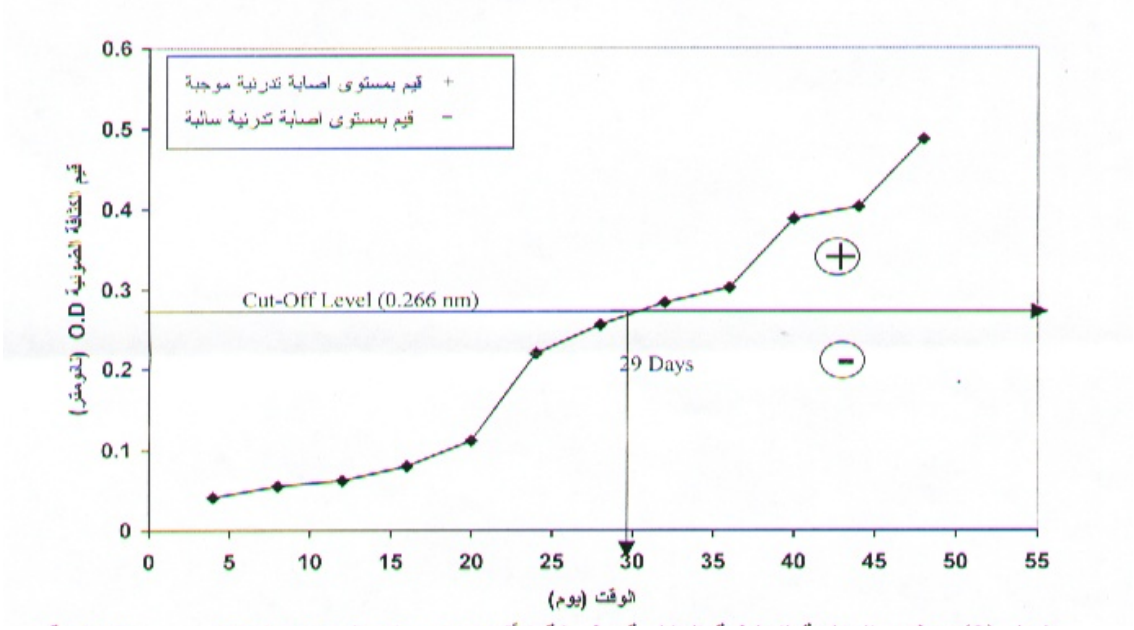
توضح الاشكال (3,2,1) نتائج هذه الدراسة والتي اعتمد فيها على طريقة ELISA من اجل التحري الدقيق عن الأضداد المتكونة حيث يلاحظ ان تحفيز هذا النوع من المناعة قد حصل من خلال حقن الثلاثة انواع من عصيات التدرن وان التحفيز بدأ بطيئاً واستمر كذلك خلال الاسبوع الاول والثاني من الحقن ويبدو ان الجهاز المناعي للمضيف خلال هذا الوقت يجري تنظيماً واستعداداً بواسطة مختلف العوامل الداخلة ضمن نطاق عمله وبالتالي حصول الاستجابة المناعية بما فيها النوع الخلطي التي تكون فيها الخلايا اللمفية نوع (B) صاحبة الدور المباشر (Grange, 1990; Michael, et al., 1995).



الشكل 1: تطور المناعة الخلطية المقاسة بطريقة الأليزا عند حقن الحيوان المختبـري بالعزلـة المحليـة *M. tuberculosis*.

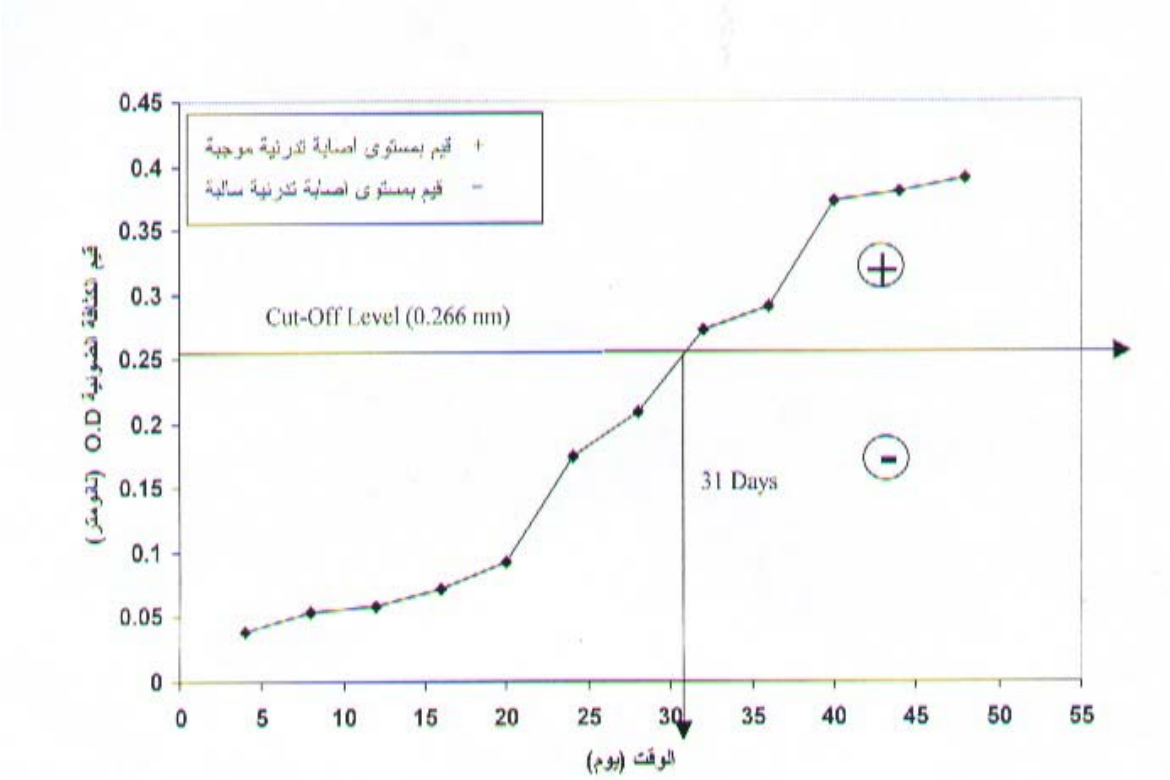
وبغض النظر عن العزلة المحقونة فان التحفيز السريع للمناعة قد حصل خلال الاسبوع الثالث من الحقن وبعده ويلاحظ ان العزلة المحلية لعصيات التدرن M. tuberculosis كانت الاسرع في قدرة التحفيز (شكل1) حيث اجتازت المناعة الخلطية قيمة المستوى الفاصل Cut Off Level (الذي يعتبر إشارة إلى إصابة موجبة بالتدرن بطريقة ELISA المستخدمة) خلال اليوم السادس والعشرون من الحقن مقارنة بالنوع البقري (اليوم 29) والسلالة القياسية (اليوم 31) وان القدرة المتميزة في التحفيز لعصيات التدرن المحلية قد يعود الى كونها معزولة مباشرة من الحالات المرضية وبالتالي احتفاظها بصفاتها الامراضية ومن ثم قابلية التحفيز المناعي مقارنة بالسلالة القياسية التي اعيد زراعتها مرات عديدة قبل عملية الحقن

(Lennette et al., 1985 Robbins et al., 1984). اما التذبذب الذي يلاحظ في المنحني الذي يمثل استجابة المناعة الخلطية لكل عزلة فقد يفسر من خلال المراحل المختلفة التي تمر بها الإصابة ومحاولة المضيف السيطرة عليها (Robbins et al., 1984) وبملاحظة اخر القيم التي تم الحصول عليها (للايام 48,44,40) يبدو ان هناك نوعاً من السيطرة على الإصابة بدأ يتحقق في حالة العزلة المحلية والقياسية M. tuberculosis بينما استمر المنحني في الصعود في حالة العزلة البقرية المعروفة بشدة اصابتها لهذا النوع من الحيوانات (Lennette et al., 1985).



الشكل 2: تطور المناعة الخلطية بطريقة الأليزا عند حقن الحيوان المختبري بالعزلة المحلية M.bovis.

وبالرجوع للأشكال (3,2,1) نجد ان معدل الاستجابة المناعية التي يمكن من خلالها اعتبار الاصابة بالتدرن موجبة بطريقة العمل المستخدمة تحصل خلال الاسبوع الرابع الى الخامس من الاصابة وان تراكم المناعة الخلطية الملاحظ في هذه الاشكال ممكن ان يشابه ما يحصل في الاصابة البشرية خاصة وان خنازير غينيا عادة ما تستخدم لاجراء تجارب مناعية وغير مناعية تعمم نتائجها على مستوى الانسان (Cruicshank, and Marmion, 1975). كما تؤكد نتائج هذه الدراسة إمكانية استخدام الطرق المناعية التي تتحرى عن الاجسام المضادة بشكل دقيق في مجال تشخيص التدرن حيث ان المناعة الخلطية وبرغم دورها الثانوي في الحماية والدفاع تجاه الإصابة بجرثومة التدرن (Grange, 1990) (خلف ومحسن ، 2002). الا انها مناعة موجودة وبحدود يمكن التحري عنها ومن ثم استخدامها وسيلة لأغراض التشخيص مع الاخذ بنظر الاعتبار ان سرعة الاستجابة المناعية وخاصة الخلطية مرتبطة بخصوصية كل مضيف وقابليته المناعية (Michael, et al., 1995).



الشكل 3: تطور المناعة الخلطية المقاسة بطريقة الأليزا عند حقن الحيوان المختبري بالـسلالة القياسـية *M. tuberculosis*.

المصادر العربية

خلف، صبحي حسين ومحسن أيوب، 2002. استخدام اختبار الاليزا للتشخيص المصلي للتدرن الرئوي، مجلة علوم الرافدين، المجلد 14، العدد 4.

المصادر الاجنبية

Barnes, P.F., 1992. Cytokin production induced by M. tuberculosis. J. Immun., Vol.149, pp.541-544.

Bathamley, G.H., 1995. Serological diagnosis of tuberculosis. Eur. Resp. J., Vol.20, pp.676-688.

Bermudez, L.E. and Young, L.S., 1991. Natural killer cell-dependent and Mycobacteriocidal activity in human macrophages. J. Immun., Vol.146, 265 p..

Cho, S.N., 1991. Contemporary approaches to the serology of tuberculosis. Bull. Tuber. Union Tuber. Ling Dis., Vol.66, pp.59-61.

Cruicshank, J.P. and Marmion, R.H., 1975. Medical Microbiology 12th ed. Vol.2 Published by Living Stone, Edenbergh London and New York.

Grange, J.M., 1990. The humoral immunorespomse in tuberculosis: Its nature, biological role and diagnostic usefulness. Advan. Tuber. Resea., Vol.21, pp.1-78.

Lennette, E.H., Balows, A., Hansler, W.J. and Shadomy, H.J., 1985. Manual of clinical microbiology 4th ed. American Socity for Microbiology, Washington D.C., U.S.A.

Michael, M.F., Frank, K.A., Hemry, N.C. and Emil, R.V., 1995. Samter's Immunologic Diseases Vol. II, 5th Edi. Little, Brown Com. Boston, New York, London.

Ostyn, A., Lanedle, M.A. and Tnovel, M.F., 1997. Glycolipid antigen for use in diagnostic assays for tuberculosis. Res Microbiol., Vol.148, pp.491-500.

Robbins, S.L., Cotran, R.S. and Kumar, V., 1984. Pathologic basis of diseases 3th ed. Soindres W. B. Co. Toronto, Tokyo and London.

Sada, E., Ferguson, L.E. and Daniel, T.M., 1990. An EILSA for the serodiagnosis of tuberculosis using new antigens. J. Infect. Dis., Vol.162, pp.928-931.

Verban, A., Weverling, G.J. and Jansen, H.M., 1993. Evaluation of different test for the serodiagnosis of tuberculosis and the use of likelihood ratio in serology. Am. Rev. Resp. Dis., Vol.148, pp.378-384.