تقييم كفاءة الاستجابة المناعية في الضأن الملقحة بالبروسيلا المالطية العترة Rev1

وسام سالم الخفاجي و **مآب إبراهيم الفروه جي**
فرع الطب الباطني والوقائي، كلية الطب البيطري، جامعة الموصل
موصل، العراق

الخلاصة

استهدفت الدراسة الحالية التعرف على كفاءة لقاح البروسيلا المالطية العترة Rev1 في انتاج الأضداد بجرع وطرائق إعطاء مختلفة إضافة الى إيجاد النسب المئوية لنوعية الاختبارات المصلية المستخدمة ، إذ شملت الدراسة 28 نعجة قسمت إلى أربع مجاميع متساوية . حيوانات المجموعتين الاولى والثانية لقحت تحت الجلد بجرعة 2×10^9 و 2×10^7 وحدة مكونة للمستعمرات على التوالي ، بينما حيوانات المجموعتين الثالثة والرابعة لقحت في الملتحمة بجرعة 2×10^9 و 2×10^7 وحدة مكونة للمستعمرات على التوالي. تم جمع عينات المصل قبل بدء التجربة (وقت الصفر) وبعد التلقيح في الأسابيع 2 ، 4، 8، 12، 16، 20، 24 ، 28 وتم تقييم استجابة الأضداد باستخدام الاختبارات التقليدية (اختبارات وردية البنكال،التلازن الانبوبي و2-المركبتوايثانول) بالمقارنة مع اختبار الاليزا التنافسي ، واستخدام اختبار البروسيلين للكشف عن الاستجابة الخلوية. أظهرت النتائج ارتفاع في معايير الأضداد وبقيت لمدة اطول في المجاميع الملقحة بطريقة تحت الجلد وبالجرعتين مقارنة بالمجاميع الملقحة عن طريق الملتحمة اظهر اختبار2-المركبتوايثانول أفضل نسبة نوعية في المجاميع الملقحة وكذلك سجل اختبار البروسيلين زيادة معنوية في سمك الجلد في المجاميع الملقحة تحت الجلد بعد مرور 12 اسبوع من التلقيح. حدوث زيادة معنوية في فعالية العدلات لاختزال صبغة النايتروبلوتترازوليم في المجاميع بين الأسبوع الثاني والثامن بعد التلقيح.

Evaluation the efficacy of immunological response in sheep vaccinated with *Brucella melitensis* strain Rev 1

W. S. AL- Khafaji and M. I. AL-Farwachi
Department of Internal and Preventive Medicine, College of Veterinary Medicine
University of Mosul, Mosul, Iraq

Summary

The present study aimed to identify the efficacy of *Brucella melitensis* vaccine strain Rev 1 in induction of antibodies by different doses and routes of administration; also to obtain the specificity of the serological tests, the study included 28 ewes divided into four equal groups . the animals of first and second groups vaccinated subcutaneously with 2×10^9 and 2×10^7 colony forming units (CFU) respectively while the animals of third and fourth groups vaccinated conjunctively with 2×10^9 and 2×10^7 CFU respectively . The sera were collected at zero time, 2, 4, 8, 16, 20, 24 and 28 weeks of the experiment and the antibodies response were evaluated using classical tests (Rose Bengal, serum agglutination and 2-mercaptoethanol tests) compared with competitive ELISA test , and brucellin test was used to detect the cellular response . The results showed that antibody titers were higher and remained for longer period in subcutaneously vaccinated groups in both doses compared with those vaccinated conjunctively and the 2-mercaptoethanol test show the best specificity in all vaccinated groups; also the subcutaneously vaccinated groups recorded significant increase in skin thickness in brucellin test after 12 week post vaccination .There was a significant increase in neutrophils activity for reduction of nitrobluetetrazolium stain in all groups between 2nd and 8th post vaccination .

المقدمة

يعد مرض الإجهاض الساري من الأمراض المنتشرة والمستوطنة في دول البحر الأبيض المتوسط والشرق الأوسط وآسيا الوسطى والدول الإفريقية وأجزاء من أمريكا اللاتينية (1) يسبب المرض خسائر أقتصادية كبيرة في الإنتاج الحيواني متمثلة بالإجهاض وظهور ولادات ضعيفة وفقدان الخصوبة وقلة إنتاج الحليب كما يسبب المرض في بعض الأحيان نفوق الإناث البالغة الناتج عن التهاب بطانة الرحم الحاد وأحتباس المشيمة فضلاً عن طبيعة المرض الذي يعد من الأمراض المشتركة التي تصيب الإنسان مسببة له مشاكل صحية عديدة (2،3،4) يحتاج تشخيص مرض الإجهاض الساري إلى عزل المسبب المرضي ، وبسبب الصعوبات التي تواجه عزل المسبب ، وفشل محاولات العزل على الرغم من

وجود الإصابة فقد بقيت الاختبارات المصلية هي الطريقة المثلى لتشخيص المرض (5). من الاختبارات التقليدية المستخدمة لتشخيص المرض مصلياً هو اختبارات وردية البنكال والتلازن الأنبوبي و2-المركابتوايثانول وتثبيت المتمم ولكن ليس باستطاعة هذه الاختبارات التمييز بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعياً (6)، كما أن هذه الاختبارات تعطي نتائج سالبة كاذبة (7) .تم تطوير الاختبارات المصلية المستخدمة في تشخيص مرض الإجهاض الساري ، ومن هذه الاختبارات اختبار الاليزا غير المباشر الذي يتميز بحساسية عالية ونوعية قليلة نسبياً نتيجة التداخل مع الأضداد الناتجة من التلقيح أو التداخل مع الجراثيم التي تتفاعل تصالبياً مع جراثيم البروسيلا في حين يمتلك اختبار الاليزا التنافسي الذي يستخدم الأضداد الأحادية النسل نسبة عالية من النوعية (8،9،10)، والتي سوف تسهم في حل بعض عيوب الاختبارات المصلية الأخرى ، إذ بإمكانها التمييز بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعياً بالمرض (11،12).
تعتمد السيطرة على مرض الإجهاض الساري في المجترات الصغيرة في العديد من دول العالم على استخدام برامج التلقيح ، واللقاح الاكثر شيوعاً في دول العالم هو لقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1 (13) ، إذ يعطي اللقاح وقاية للحيوانات ضد الإصابة بمرض الإجهاض الساري فضلاً عن أختزاله لتلوث البيئة بالمسببات المرضية ، والتقليل من مخاطر المسبب المرضي عند تعرض الحيوانات له (14). تختلف كفاءة اللقاحات المستخدمة والمصنعة من شركات عديدة في وقاية الحيوانات من الإصابة بمرض الإجهاض الساري ، فضلاً عن أن اللقاحات المستخدمة غالباً ما تؤدي إلى الإجهاض ، وانتاج الأضداد التي تتداخل مع تشخيص المرض مصليا (15). ولاهمية المرض وتأثير لقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1 في الضأن تم إجراء هذه الدراسة لتحقيق الاهداف الآتية :

1. تقييم اللقاح المستخدم Rev.1 في تلقيح الضأن في العراق حالياً بالجرع وطرائق الإعطاء المختلفة .
2. إيجاد النسبة المئوية لنوعية الاختبارات المصلية المستخدمة في الدراسة لمجموعات الحيوانات الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1 .
3. دراسة فعالية البلعمة في الضأن الملقحة بلقاح البروسيلا المالطية العترة Rev.1 .

المواد وطرائق العمل

حيوانات الدراسة وطريقة إعطاء اللقاح : شملت الدراسة 28 نعجة من الضأن الموجودة في حقل كلية الطب البيطري / جامعة الموصل ، تراوحت أعمارها بين 1-3 سنوات لغرض إجراء تجربة تقييم اللقاح عليها إذ كانت 14 نعجة منها في الأشهر مابين1-1.5 من الحمل عند تلقيحها بلقاح Rev.1 ، حيث قسمت هذه الحيوانات عشوائياً إلى اربع مجاميع بالتساوي اعتماداً على طريقة إعطاء اللقاح والجرعة ، إذ تم تخفيف اللقاح حسب تعليمات الشركة المجهزة (CZ Veterinaria ألاسبانية) وذلك بإذابة اللقاح المجفد بالمحلول المخفف الخاص به سعة(50 مل) للحصول على الجرعة القياسية الكاملة 2×10^9 وحدة مكونة للمستعمرات (CFU) وللحصول على الجرعة المخفضة 2×10^7 (CFU) , تم وضع 1 مل من المحلول السابق (ذو التخفيف2×10^9 (CFU)) في 99 مل من محلول الملح الفسلجي . إذ تم تلقيح حيوانات المجموعة الأولى بجرعة 2×10^9 (CFU) عن طريق تحت الجلد وحيوانات المجموعة الثانية بجرعة2×10^7 (CFU) عن طريق تحت الجلد والمجموعة الثالثة بجرعة 2×10^9 (CFU)عن طريق ملتحمة العين والمجموعة الرابعة بجرعة 2×10^7 (CFU) عن طريق ملتحمة العين . تم جمع عينات الدم من حيوانات الدراسة قبل إعطاء اللقاح (للتأكد من كون الحيوانات سالبة للاختبارات المصلية وردية البنكال والتلازن الأنبوبي و2-المركابتوايثانول والاليزا التنافسي) وبعده خلال الأسابيع 2 و4 و8 و12 و16 و20 و24 و28 من إعطاء اللقاح وذلك لإجراء الاختبارات المصلية (اختبار وردية البنكال , واختباري التلازن الأنبوبي و2-المركابتوايثانول واختبار الاليزا التنافسي) واختبار فعالية البلعمة للعدلات الذي تم إجراؤه حسب طريقة (16).
تم إجراء اختبار البروسيلين الذي تم تحضيره من جرثومة البروسيلا المالطية العترة اللقاحية Rev.1 المستخدمة في التلقيح حسب طريقة (17) على الحيوانات الملقحة ، حيث تم حقن 3 حيوانات من كل مجموعة بالبروسيلين بتركيز 50 مايكروغرام وبحجم 0.1 مل في الجلد في منطقة الإلية ، أما الحيوانات المتبقية من كل مجموعة فقد حقنت بالبروسيلين بتركيز 100 مايكروغرام وبحجم 0.1 مل في الجلد في منطقة الإلية (كما تم حقن جميع الحيوانات بمحلول الملح الفسلجي بحجم 0.1 مل في منطقة الإلية في الجهة المقابلة لمنطقة الحقن بالبروسيلين كسيطرة).
اجري اختبار وردية البنكال المجهز من شركة (Chemelex) الأسبانية حسب تعليمات الشركة المجهزة للمستضد .
واختبار التلازن الأنبوبي وتم إجراؤه حسب (18) واختبار 2-المركابتوايثانول وتم إجراؤه حسب (19).
اختبار الاليزا التنافسي والمجهز من شركة Svanova- السويدية وأجري حسب تعليمات الشركة المجهزة لعدة الاختبار .تم تحليل البيانات إحصائيا باستخدام اختبارات One way ANOVA test ، واختبـار t-test ، وكان مستوى الاختلاف المعنوي للاختبارات تحت مستوى احتمال ($P< 0.05$) .

النتائج

معايير الاضداد وصلت اعلى معدلاتها في الاسبوع الثاني بعد التلقيح في كل المجاميع الملقحة وبعد ذلك بدأت بالانخفاض تدريجيا الى نهاية مدة الدراسة (جدول 1 ، 2) . اظهرت نتائج مقارنة معدلات معايير الاضداد بين المجاميع بأن حيوانات المجموعة الاولى قد اعطت
معيار عالي للأضداد من الاسبوع الثاني بعد التلقيح وحتى الاسبوع 24 بالمقارنة مع المجاميع الأخرى . في حيوانات المجموعة الثالثة معيار الاضداد انخفض معنويا خلال الأسابيع 4 ، 20 ، 24 بالمقارنة مع المعايير في حيوانات المجموعة

الاولى ، اما حيوانات المجموعة الرابعة فقد أعطت أدنى معدل لمعيار الأضداد طوال مدة الدراسة مقارنة بالمعايير في المجاميع الأخرى (جدول 1 ، 2).

اظهرت النتائج ان النسب المئوية لتثبيط اختبار الاليزا التنافسي كانت عالية في المجموعتين الاولى والثانية ولايوجد اختلاف معنوي إلا بين المجموعتين الاولى والرابعة خلال مدة التجربة كانت عند مستوى معنوية (P<0.05) . أظهرت النتائج ان النسبة المئوية لنوعية اختباري 2– المركابتوايثانول والتلازن الأنبوبي وصلت 100% في الاسبوع 24 بعد التلقيح بينما بلغت النسبة 30% و 33.3% لاختباري الاليزا التنافسي ووردية البنكال على التوالي في الاسبوع 28 في المجموعة الاولى ، واظهر اختباري 2– المركابتوايثانول والتلازن الأنبوبي نسبة 100% في الاسبوع 16 واختبار الاليزا التنافسي 33.3% في الاسبوع الرابع لتستمر نفس النسبة الى نهاية التجربة اما اختبار وردية البنكال فبلغت النسبة 40% في الاسبوع 24 في المجموعة الثانية ، واظهر اختباري 2– المركابتوايثانول والتلازن الأنبوبي نسبة 100% في الاسبوع 12 والاليزا التنافسي نسبة 75% في الاسبوع 20 واختبار وردية البنكال 100% في الاسبوع 24 في المجموعة الثالثة ، اما المجموعة الرابعة فسجل اختباري 2– المركابتوايثانول والتلازن الأنبوبي نسبة 100% في الاسبوع الرابع واختبار الاليزا التنافسي نسبة 100% في الاسبوع الثامن اما اختبار وردية البنكال فسجل نسبة 100 % في الاسبوع 16 ، أظهرت نتائج اختبار البروسيلين حدوث زيادة معنوية في سمك الجلد بعد حقن البروسيلين بتركيز 100 مايكروغرام/مل في المجموعتين الأولى والثانية في الأسبوع 12 بعد التلقيح ، أظهرت نتائج فعالية البلعمة حدوث زيادة معنوية في قيم فعالية البلعمة للعدلات في مجموعات الضأن الملقحة كافة في الأسابيع 2 و 4 و 8 بعد التلقيح مقارنة مع قيم فعالية البلعمة قبل التلقيح (الأسبوع 0) عند مستوى معنوية(P<0.05) (جدول 6) .

الجدول (1) معدلات معيار الأضداد المتكونة في الضأن بعد التلقيح بلقاح Rev 1 باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي

الأسابيع	المجموعات			
	الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)	الثانية (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)	الثالثة (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)	الرابعة (لقحت بجرعة 10^7 في الملتحمة)
0	0± 0.0 ^{c}	0± 0.0 ^{b}	0± 0.0 ^{b}	0± 0.0 ^{b}
2	0 ±160 ^{A,a}	34± 105 ^{a}	40± 80.0 ^{a}	8.8±23.3 ^{a,B}
4	27.6±10 ^{A,a}	11. 5± 80.0 ^{a}	10.2±44. ^{B,b}	2.9±15.0 ^{a,B}
8	14.9±51.1 ^{A,c}	3.5±28.9 ^{b}	9.5±36.6 ^{b}	7.5± 32.0 ^{b}
12	4.4 ±26.7 ^{c}	2.6±21.1 ^{b}	4.8±18.3 ^{b}	0±20.0
16	6.3± 25.0 ^{c}	0 ±20.0 ^{b}	0± 10 ^{b}	0± 10 ^{a}
20	8.8±23.3 ^{A,c}	2.1±13.3 ^{b}	0±10 ^{B,b}	0.6± 7.5 ^{a,B}
24	6.3± 20.0 ^{A,c}	0±10 ^{B,b}	0.2± 5.0 ^{B,b}	0± 2.5 ^{a,B}
28	0± 10 ^{c}	0±10 ^{B,b}	0± 3.3 ^{b}	0±2.5 ^{a,B}

- **القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي .**
- **المعدلات التي تحتوي على الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة عمودياً والحروف الانكليزية الكبيرة المختلفة أفقيا تدل على وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية (P<0.05) .**

الجدول (2) معدلات معيار الأضداد المتكونة في الضأن بعد التلقيح بلقاح Rev 1 باستخدام اختبار2 – المركابتوايثانول

الأسابيع	المجموعات			
	الاولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)	الثانية (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)	الثالثة (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)	الرابعة (لقحت بجرعة 10^7 في الملتحمة)
0	0± 0.0 ^{b}	0± 0.0 ^{b}	0± 0.0 ^{b}	0± 0.0 ^{b}
2	23 ± 120 ^{A,a}	25± 90 ^{A,a}	10± 80 ^{a}	8.8± 23.3 ^{a,B}
4	22.2± 96.6 ^{A,a}	22.6± 58 ^{a,b}	11± 30 ^{B,b}	3.3±16.7 ^{a,b,B}
8	25.5± 83.3 ^{A,a}	10±50 ^{a,b}	5.6± 23.3 ^{B,b}	3.3±13.3 ^{a,b,B}
12	17.6±46.7 ^{A,b}	10± 30 ^{b}	0.3±13.3 ^{b}	0±10 ^{B,b}
16	20.3± 43.3 ^{a}	3.3± 16.7 ^{b}	0± 10 ^{b}	0± 10 ^{b}
20	10± 30 ^{A,b}	3.3±13.3 ^{b}	0 ±10 ^{B,b}	0± 6.7 ^{B,b}
24	3.3±16.6 ^{A,b}	0±10 ^{B,b}	0±3.3 ^{B,b}	0±3 ^{B,b}
28	0± 7 ^{b}	0± 6 ^{b}	_	_

- **القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي .**
- **المعدلات التي تحتوي على الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة عمودياً والحروف الانكليزية الكبيرة المختلفة أفقيا تدل على وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية (P<0.05) .**

الجدول(3) معدلات النسب المئوية للتثبيط لاختبار الاليزا التنافسي في مجموعات الضأن الملقحة بلقاح Rev 1

الأسابيع	المجموعات: الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)	الثانية (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)	الثالثة (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)	الرابعة (لقحت بجرعة 10^7 في الملتحمة)
0	[b] 1.4 ±13.5	[a] 0.4 ± 12.3	[b] 1.0 ± 13.7	[a] 0.6 ±12.2
4	[A , a] 7.8± 67.6	[A , b] 15.4± 58	[A , a] 4.4± 45.8	[a, B] 5.6±27.2
8	[A , a] 9.6± 61.2	[b] 10.6± 55	[a] 9.2± 39.9	[B , b] 6.7±29.6
12	[A] 5.3± 51.8	[A, b] 11.2±45.5	6.6± 33.4	[a, B] 1.8± 25.1
16	[A] 10.0± 47.8	[b] 9± 33.0	5.1± 30	[a, B] 2.1± 18.4
20	[A , b] 8.6±39.0	[b] 1.9± 32.4	[b] 5.2± 22.8	[a, B] 2.0±16.9
24	[A , b] 2.0±33.8	[a] 1.9± 31.9	[b] 1.1± 22.6	[a, B] 1.6±15.0
28	[A , b] 2.3±33.5	[A, a] 2.1± 30.0	[b] 0.3± 21.7	[a, B] 1.3±12.4

- **القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي .**
- **المعدلات التي تحتوي على الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة عمودياً والحروف الانكليزية الكبيرة المختلفة أفقيا تدل على وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية ($P<0.05$) .**

الجدول(4) النسب المئوية(%) لنوعية الاختبارات المصلية المستخدمة في مجموعات الضأن الملقحة بلقاح Rev 1

الأسابيع	المجموعة الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد)				المجموعة الثانية (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد)				المجموعة الثالثة (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة)				المجموعة الرابعة (لقحت بجرعة 10^7 في الملتحمة)			
	2-مركابتوإيثانول %	التلازن الأنبوبي %	الاليزا التنافسي %	وردية البنكال %	2-مركابتوإيثانول %	التلازن الأنبوبي %	الاليزا التنافسي %	وردية البنكال %	2-مركابتوإيثانول %	التلازن الأنبوبي %	الاليزا التنافسي %	وردية البنكال %	2-مركابتوإيثانول %	التلازن الأنبوبي %	الاليزا التنافسي %	وردية البنكال %
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	20	0	0	0	40	0	33.3	0	66.7	40	0	28.5	100	100	66	20
8	20	33.3	0	0	40	55.5	33.3	0	66.7	40	50	42.9	100	100	100	50
12	20	55.5	0	0	40	88.8	33.3	0	100	100	50	50	100	100	100	50
16	20	60	0	0	100	100	33.3	0	100	100	50	50	100	100	100	100
20	20	80	25	0	100	100	33.3	11.1	100	100	75	83.3	100	100	100	100
24	100	100	25	20	100	100	33.3	40	100	100	75	100	100	100	100	100
28	100	100	30	33.3	100	100	33.3	40	100	100	75	100	100	100	100	100

•النوعية: نسبة الحيوانات الملقحة التي أعطت نتائج سالبة للاختبار المصلي.

الجدول (5) نتائج اختبار البروسيلين بتركيز 100 مايكروغرام / مل (حساسية الجلد المتأخر) للضأن الملقحة بلقاح Rev 1 (سمك الجلد بالملم)

المجموعات	الأسبوع 12 بعد التلقيح: سمك الجلد قبل الحقن (بالملم)	الأسبوع 12 بعد التلقيح: سمك الجلد بعد 72 ساعة من الحقن (بالملم)	الأسبوع 24 بعد التلقيح: سمك الجلد قبل الحقن (بالملم)	الأسبوع 24 بعد التلقيح: سمك الجلد بعد 72 ساعة من الحقن (بالملم)
الأولى	0.1 ± 2.5	* 0.1 ± 5.5	0.1 ± 2.7	0.2 ± 3
الثانية	0.3 ± 2	* 0.5 ± 4.2	0.1± 2.1	0.7 ± 2.3
الثالثة	0.7 ± 3.5	0.2 ± 5	0.2 ± 3.4	0.5 ± 3.6
الرابعة	0.1 ± 2.4	0.2 ± 3.5	0.1 ± 2.5	0.3 ± 2.8

- **القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي. * وجود اختلاف معنوي عند مستوى معنوية ($P<0.05$)**

الجدول(6) فعالية البلعمة % (اختزال صبغة النايتروبلوتترازوليم) للعدلات في مجموعات الضأن الملقحة بلقاح Rev. 1

الأسابيع	المجموعات			
	الأولى (لقحت بجرعة 10^9 تحت الجلد) **%**	**الثانية** (لقحت بجرعة 10^7 تحت الجلد) **%**	**الثالثة** (لقحت بجرعة 10^9 في الملتحمة) **%**	**الرابعة** (لقحت بجرعة 10^7 في الملتحمة) **%**
0	[a] 0.5± 7	[a] 0.2± 8	[a] 0.3±7.7	[a] 0.1±6.4
2	[b] 0.8± 18	[b] 0.9± 20	[b] 0.8± 20	[b] 0.7± 17
4	[b] 0.7±15.3	[b] 0.8±14.7	[b] 0.7± 15.1	[b] 0.6± 14.4
8	[b] 0.5± 16.2	[b] 0.5 ± 15.5	[b] 0.4 ± 16	[b] 0.5±15.4
12	[a] 0.6± 6.6	[a] 0.7± 6	[a] 0.6± 6.3	[a] 0.4± 5.8
16	[a] 0.4± 7.1	[a] 0.6± 6.2	[a] 0.6± 6.5	[a] 0.4 ± 6
20	[a] 0.5± 7.2	[a] 0.4± 7.1	[a] 0.7± 6.3	[a] 0.6± 6.4
24	[a] 0.4±7.7	[a] 0.5 ± 7.3	[a] 0.5± 6.1	[a] 0.4± 6.6

- **القيم تمثل المعدل ± الخطأ القياسي.**
- **المعدلات التي تحتوي على الحروف الانكليزية الصغيرة المختلفة عمودياً تدل على وجود اختلافات معنوية عند مستوى معنوية ($P<0.05$) .**

المناقشة

أظهرت نتائج الدراسة بأن التلقيح بلقاح Rev1 أدى إلى ظهور الأضداد باعلى معيار لها في أمصال الحيوانات الملقحة بعد مرور أسبوعين من التلقيح باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي ثم بدأت المعايير بالأنخفاض في الأسابيع التالية من الدراسة , ولم يلاحظ وجود فروقات معنوية مابين مستويات الأضداد إلا بين حيوانـات المجموعتين الأولى والرابعـة وأن هذه الفروقات قد تعزى الى الاختلاف في كل من جرعة , وطريقة إعطاء اللقاح مابين المجموعتين , إذ أشار كل من (20،21، 22) إلى أن التلقيح عن طريق ملتحمة العين أعطى معايير أضداد أقل ولمدة زمنية أقصر من معايير الأضداد المتكونة في الحيوانات الملقحة تحت الجلد ، وأن معايير الأضداد في الحيوانات الملقحة تعتمد على جرعة اللقاح وطرائق إعطاءه (23،24) . وهذا ما حدث في دراستنا, إذ أعطت الحيوانات الملقحة عن طريق الملتحمة معايير أضداد أقل ولمدة زمنية أقصر من معايير الأضداد المتكونة في الحيوانات الملقحة عن طريق تحت الجلد وبكلتا الجرعتين 10^7 و10^9 وحدة مكونة للمستعمرات باستخدام اختباري التلازن الأنبوبي و2-المركابتوايثانول . اظهرت نتائج الدراسة عند استخدام اختبار 2-المركابتوايثانول لإيجاد معايير الأضداد في الحيوانات الملقحة , إن معايير الأضداد كانت اقل من تلك المعايير التي تم الكشف عنها باستخدام اختبار التلازن الأنبوبي ,وطيلة مدة الدراسة , وهذا يعني أن معظم الكلوبيولينات المناعية من نوع IgM قد أختفت , لتظهر الكلوبيولينات المناعية من نوع IgG وهذا يشير إلى أن عملية التلقيح قد تمت بنجاح (25) , وكما ذكر سابقا بان اختبار2-المركابتوايثانول يكون حساس للكشف عن الأضداد من نوع IgG فقط ، وذلك لكون محلول2-المركابتوايثانول يعمل على تحطيم الكلوبيولينات المناعية من نوع IgM وتبقى الكلوبيولينات المناعية من نوع IgG موجودة في المصل(26). ذكر كل من (22،27) أن استخدام التلقيح عن طريق ملتحمة العين يؤدي الى وقاية الحيوانات عند الإصابة التجريبية بجراثيم البروسيلا ، ولايختلف عن التلقيح عن طريق الحقن تحت الجلد .

لوحظ في دراستنا من خلال نتائج اختبار الاليزا التنافسي أن نسبة التثبيط توافقت بصورة تامة مع مستويات معايير الأضداد التي تم ملاحظتها في الاختبارين السابقين ، إذ أتخذت نفس المنحى وعكست الارتفاع والانخفاض في معايير الأضداد , هذه النتيجة اتفقت مع النتيجة التي توصل إليها (28)إذ أشار بأن هناك علاقة قوية مابين شدة الكثافة الضوئية التي أعطاها اختبار الاليزا غير المباشر, ومعايير الأضداد التي تم الكشف عنها باستخدام اختبار تثبيت المتمم , حيث زادت الكثافة الضوئية , ومعايير الأضداد في الضأن الملقحة بالجرعة الكاملة القياسية من لقاح Rev.1 , وعن طريق الحقن تحت الجلد بعد خمسة عشر يوما بعد التلقيح , لتصل أعلى معيار لها بعد ثلاثين يوما , ثم عادت لتنخفض تدريجيا لتصل الى اقل قيمها بعد 270 يوما بعد التلقيح .

أظهرت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية لنوعية الاختبارات المصلية قد اختلفت حسب جرعة , وطريقة إعطاء اللقاح ، إذ كانت نوعية اختباري 2-المركابتوايثانول , والتلازن الأنبوبي 100% في الأسبوعين 24 و16 بعد التلقيح في حيوانات المجموعتين الأولى والثانية على التوالي إذ يمتاز اختبار2-المركابتوايثانول بكونه يفرق في التشخيص بين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة طبيعيا بالمرض(25، 29، 30) . في حين أن اختبار التلازن الأنبوبي غير حساس للكشف عن

الإصابة في المراحل المبكرة وبعض الحالات المزمنة , وعندما يكون مستوى الأضداد من مستوى نمطي ضـــعيف للتلازن (31) . ذكر (32) بأن نوعية اختباري 2-المركابتوايثانول والتلازن الأنبوبي كانت 100 % بعد مرور ستة أشهر على التلقيح عن طريق الحقن تحت الجلد بالجرعة القياسية الكاملة من لقاح Rev1.

أظهرت نتائج الدراسة أن النسبة المئوية لنوعية أختبار الاليزا التنافسي كانت منخفضة في حيوانات المجموعتين الأولى والثانية ، ولكنها تحسنت في حيوانات المجموعتين الثالثة والرابعة في الأسبوعين العشرين والثامن على التوالي ، إذ يمتاز اختبار الاليزا التنافسي بالنوعية العالية لاحتوائه على الأضداد الأحادية النسل التي لاترتبط مع الأضداد ذات الآلفة الضعيفة (Lower affinity) الموجودة في أمصال الحيوانات الملقحة(23) ، والأضداد الناتجة عن التفاعل التصالبي مع الجراثيم الأخرى (9) . إذ أن اختبار الاليزا التنافسي يمتلك نوعية عالية ويمكن استخدامه كاختبار بديل عن اختبار تثبيت المتمم لتشخيص مرض الإجهاض الساري في المجترات الصغيرة (33).أظهرت نتائج دراستنا أن النسب المئوية لنوعية اختبار وردية البنكال في الأسبوع 28 بعد التلقيح كانت 33.3% و40% و100% في حيوانات المجموعات الملقحة الأولى والثانية والثالثة على التوالي , و لكنها كانت 100% في حيوانات المجموعة الرابعة في الأسبوع السادس عشر بعد التلقيح ، أي أن نوعية الاختبار كانت أعلى في الحيوانات الملقحة بالجرعة المخفضة وعن طريق إعطاءه بالملتحمة مقارنة بالحيوانات الملقحة بالجرعة القياسية الكاملة وعن طريق الحقن تحت الجلد, وأن هذه الفروقات في نوعية الاختبار قد تعزى الى قلة نوعية الاختبار , وعدم قدرته على التفريق مابين الحيوانات الملقحة والحيوانات المصابة بصورة طبيعية ، مما أدى الى ظهور نتائج موجبة كاذبة في الحـيوانات الملقحـة (34 ،35). أشـار الباحثون (36) الى أن نوعية اختبارات وردية البنكال , وتثبيت المتمم , والريفانول كانت 100 % بعد مرور تسعة أشهر على التلقيح بلقاح Rev.1 عن طريق الحقن تحت الجلد بالجرعة المخفضة من اللقاح . في حين لوحظت نوعية 100 % لاختباري وردية البنكال , وتثبيت المتمم بعد مرور40 أسبوعا على التلقيح بجرعة 10^8 وحدة مكونة للمستعمرات (37) . فضلا عن دراسات أخرى اتفقت مع نتائج دراستنا , إذ ذكر كل من (22،27) أن معظم الحيوانات الملقحة بلقاحRev.1 تصبح سالبة لاختباري وردية البنكال , وتثبيت المتمم بعد مرور 4 - 6 أشهر من التلقيح بالجرعتين الكاملة القياسية والمخفضة وبالطريقتين الحقن تحت الجلد وفي ملتحمة العين على التوالي، ولوحظ وجود الاستجابة المناعية الخلوية (اختبار البروسيلين) التي ظهرت بشكل زيادة معنوية في سمك الجلد للحيوانات الملقحة في المجموعتين الأولى والثانية إذ أن المناعة الواقية ضد الجراثيم التي تعيش داخل الخلايا يتم تحفيزها فقط عند إعطاء اللقاحات الحية المضعفة ولاتحفز باللقاحات الميتة (38). وأظهرت النتائج حدوث زيادة معنوية في قيم فعالية البلعمة في المجموعات الملقحة كافة التي قد تعزى إلى تأثير اللقاح الذي أدى إلى تحفيز زيادة فعالية البلعمة .

المصادر

1.Songer JG and Post KW (2005). Veterinary Microbiology. Bacterial and Fungal Agents of Animal Disease. Elsevier Saunders, Missouri, pp. 200-206.

2. Radostits OM Gay CC Hinchcliff KW and Constable PD (2007).Veterinary Medicine: A textbook of the diseases of cattle,horses,sheep,pigs and goats. 10th ed., Saunders Elsevier, London, pp. 966-994.

3. Chand P Rajpurohit BS Malhotra AK and Poonia JS (2005). Comparison of milk-ELISA and serum-ELISA for the diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Vet. Microbiol. 108: 305-311.

4. Memish Z Mah MW AlMahmoud S AlShaalan M and Khan MY (2002). *Brucella* bacteremia: clinical and laboratory observations in 160 patients. J Infect 40: 59-63.

5. Garrido F Duran M Macmillan A Minas A Nicoletti P and Vecchi G (2001). Brucellosis in sheep and goats (*Br. melitensis*). European Commission, Report of Scientific committee on animal health and animal welfare.

6. Omer MK Skjerve E MacMillan AP and Woldehiwet Z (2001). Comparison of the three serological tests in the diagnosis of brucella infection in unvaccinated cattle in Eritrea. Prev Vet Med 48: 215-222.

7. Kolar J (1987). Control of brucellosis in developing countries. Annales de l'Institute Pasteur Microbiol 138: 122-126.

8. Nielsen K Smith P Yu WL Elmgren C Nicoletti P Perez B Bermudez R and Renteria T (2007). Second generation competitive enzyme immunoassay for detection of bovine antibody to *Brucella abortus*. Vet Microbiol 124: 173-177.

9. Portanti O Tittarelli M Di-Febo T Luciani M Mercante MT Conte A and Lelli R (2006). Development and validation of a competitive ELISA kit for the serological diagnosis of ovine, caprine and bovine brucellosis. J Vet Med 53: 494-498.

10. Cloeckaert A Baucheron S Vizcaino N and Zybmunt MS (2001). Use of

recombinant BP26 protein in serological diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep. Clinic Diag Lab Immunol 8: 772-775.
11. McGiven JA Tucker JD Perrett LL Stack JA Brew AP and MacMillan AP (2003). Validation of FPA and cELISA for the detection of antibodies to *Brucella abortus* in cattle sera and comparison to SAT,CFT and iELISA. J of Immunological Methods. 278: 171-178.
12. Aguirre NP Vanzini VR Torioni de Echaide S Valentini BS De Lucca G Aufranc C Canal A Vigliocco A and Nielsen K (2002). Antibody dynamics in holestein friesian heifers vaccinated with *Brucella abortus* strain 19 using seven serological tests. J Immunoassay Immunochem. 23: 471-478.
13. Minas A (2006). Control and eradication of brucellosis in small ruminants. Small Rum Res 62: 101-107.
14. Nicoletti P (1993). The eradication of brucellosis in Animals. Saudi Med J 14(4): 288-292.
15. Blasco JM (1997). A review of the use of *Br. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev Vet Med 31: 275-283.
16. Gasper R Preat V Opperdes FR and Roland M(1992). Macrophage activation by poly-merienanoparticles of polyalkly cyanoacrylates activity against intracellular *Leishmania donovani*. J Parasitol 2: 401-405.
17. De-Massis F Giovannini A Di-Emidio B Ronchi GF Tittarelli, M Di-Ventura M Nannini D and Caporale V(2005). Use of the complement fixation and brucellin skin tests to identify cattle vaccinated with *Brucella abortus* strain RB51. Vet Ital 41(4):291-299.
18. Alton GG Jones LM Angus RD and Verger JM(1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris.
19. Alton GG Jones LM and Pietz DE (1975). Laboratory Techniques. 2nd ed., World Health Organization, Geneva.
20. Delgado S Fernandez M and Carmenes P (1996). Influence of age and stage of gestation on serological response to subcutaneous or conjunctival *Brucella melitensis* strain Rev.1 vaccination in ewes. Small Rum Res 19: 63-68.
21. Jimenez de Bagues MP Marin C Blasco JM Moriyon I and Gamazo C(1992). An ELISA with *Brucella* lipopolysaccharide antigen for the diagnosis of *Br. melitensis* infection in sheep and for the evaluation of serological responses following subcutaneous or conjuntival *Br. melitensis* strain. Rev. 1 vaccination. Vet Microbiol 30: 233-241.
22. Fensterbank R Verger JM and Maggy G(1987). Conjunctival vaccination of young goats with *Brucella melitensis* strain Rev.1. Ann Rech Vet 18: 397-403.
23. Marin CM Moreno E Moriyon I Diaz R and Blasco JM (1999). Performance of competitive and indirect enzyme-linked immunosorbent assays gel immuno precipitation with native hapten polysaccharide and standard serological tests in diagnosis sheep brucellosis. Clinic Diag Lab Immunol 6: 269-272.
24. Diaz-Aparicio E Marin C Alonso B Aragon V Perez S Pardo M Blasco JM Diaz R and Moriyon I (1994). Evaluation of serological tests for diagnosis of *Br. melitensis* infection of goats. J Clinic Microbiol 32: 1159-1165.
25. Gershwin LJ Krakowka S and Olsen RG (1995). Immunology and Immunopathology of Domestic Animals. 2nd ed., Mosby, Missouri, pp. 161-162.
26. Saravi MA Wright PF Gregoret RJ and Gall DJ(1995). Comparative performance of the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and conventional assays in the diagnosis of bovine brucellosis in Argentina. Vet Immunol and Immunopath 47: 93-99.
27. Fensterbank R Pardon P and Marly J (1985). Vaccination of ewes by a single conjunctival administration of *Brucella melitensis* Rev.1 vaccine. Ann Rech Vet 16: 351-356.
28. Delgado S Fernandez M and Carmenes P (1995). Evaluation of an enzyme-linked

immunosorbent assay for the detection of sheep infected and vaccinated with *Brucella melitensis*. J Vet Diag Invest. 7: 206-209.
29. FAO/OIE/ WHO (1998). 1995 Animal Health Yearbook, FAO Animal production and Health Series. FAO, Rome, Italy.
30. Chappel RJ Mcnaught DJ Bourke JA and Allan GS (1978). The diagnostic efficiency of some serological tests for bovine brucellosis. J Hyg 80: 373-384.
31. Lucero NE Foglia L Ayala SM Gall D and Nielsen K (1999). Competitive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. J Clinic Microbiol 37(10): 3245-3248.
32. Alavi-Shoushtari SM and Zeinali A (1995). Responses of female lambs to Rev.1 (brucellosis) vaccination. Prev Vet Med 21: 289-297.
33. Minas A Stournara A Christodoulopoulos G and Katsoulos PD (2007). Validation of a competitive ELISA for diagnosis of *Brucella melitensis* infection in sheep and goats. The Vet. J.
34. Samartino L Gall D Gregoret R and Nielsen K (1999). Validation of enzyme-linked immuno-sorbent assays for the diagnosis of bovine brucellosis. Vet Microbiol 70: 193-200.
35. Garin-Bastuji B Blasco JM Grayon M and Verger JM (1998). *Brucella melitensis* infection in sheep: present and future. Vet Res 29: 255-274.
36. Scharp DW Sultan Al-Khalaf SA Al-Muhanna MW Cheema RA and Godana W (1999). Use of mass vaccination with a reduced dose of Rev.1 vaccine for *Brucella melitensis* control in a population of small ruminants. Trop Anim Health Prod 31: 135-141.
37. El-Idrissi AH Benkirane A El-Maadoudi M Bouslikhane M Berrada J and Zerouali A (2001). Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev.1 live vaccines against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. Rev Sci Tech Off Int Epiz 20(3):741-747.
38. Tizard IR (2000). Veterinary Immunology, an Introduction. 6th ed., Saunders, Philadelphia, pp. 260.