IRAQI Academic Scientific Journals
Samarra Journal of Pure and Applied Science
SJPAS
مجلة سامراء للعلوم البحتة والتطبيقية
www.sjpas.com
p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

تأثير تمنيع الأرانب المختبرية المخمجة بطفيلي *Giardia lamblia* بالمستضد (O) المستخلص من البكتريا *Escherichia coli* على معامل انقسام نخاع العظم وبعض الكلوبيولينات المناعية

معروف سبتي جمعة العماش[1]، ايسر صالح محمد السامرائي[2]
1- قسم التحليلات المرضية، كلية العلوم التطبيقية، جامعة سامراء، العراق
2- قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة سامراء، العراق

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License

https://doi.org/10.54153/sjpas.2023.v5i2.487

معلومات البحث:

تأريخ الاستلام: 2023/03/12
تاريخ التعديل : 2023/03/27
تأريخ القبــول: 2023/04/14
تاريخ الــنشر : 2023/09/30

الكلمات المفتاحية:

Giardia lamblia، O-Antigen ، معامل انقسام نخاع العظم، الكلوبيولينات المناعية

معلومات المؤلف

الايميل: ebnbaz87@gmail.com

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للمدة من بداية شهر كانون الاول 2021 ولغاية شهر شباط 2023 وقد تضمنت متابعة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي Outer Membrane Proteins (OMPs) والمنقاة من بكتريا *Escherichia coli* في (20) من ذكور الارانب البيضاء المختبرية، 10 منها استحدثت فيها الاصابة بطفيلي *Giardia lamblia* واخرى لم تستحدث فيها الاصابة وانما عوملت فقط بالمستضد، وقد درس التغير في كل من معامل انقسام خلايا نخاع العظم والكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG). اشارت النتائج الى وجود زيادة معنوية في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم في المجاميع المعاملة بالمستضد مقارنة مع مجموعة السيطره السالبة ، اذ بلغت النسبة (60.20 و55.60) %على التوالي، اما مجموعة التحدي فقد ارتفع معامل الانقسام فيها معنوياً مقارنة مع السيطره الموجبة اذ بلغت النسبة المئوية (74.80 و61.80) % على التوالي. اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً كان غير معنوي في مستوى كل من IgM وIgG في المجموعة المعاملة بالمستضد (O) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة، حيث بلغ مستوى IgM (73.35 و66.27) بيكوغرام/ مل على التوالي، وبلغ مستوى IgG (1.38 و1.16) مايكروغرام/ مل على التوالي، واشارت نتائج هذه الدراسة كذلك الى حصول ارتفاع غير معنوي في مستوى IgM ومعنوي في مستوى IgG لدى مجموعة التحدي مقارنة مع السيطرة الموجبة، وقد بلغ مستوى IgM في المصل لكل من مجموعتي التحدي والسيطرة الموجبة (85.98 و78.69) بيكوغرام/مل على التوالي، أما IgG فقد بلغ مستواه (2.01 و1.46) مكغم/مل على التوالي.

المقدمة

يعد مرض الجياردیا Giardiasis من الامراض المشتركة Zoonosis diseases بين الانسان والحيوان [1]، وتسببه طفيليات الجنس *Giardia* spp. [2]، ويمثل النوع *Giardia lamblia* أحد الحوينات الابتدائية المسوطة Protozoan flagellates التي تصيب الامعاء الدقيقة (الاثني عشري والصائم) للانسان. ويعد هذا النوع من العوامل الممرضة التي تسبب الاسهال للإنسان واللبائن [3-5]، حيث تنتشر الاصابة بطفيليات هذا النوع في جميع انحاء العالم [6].

تتباين العلامات السريرية المرافقة للاصابة بطفيلي *G. lamblia* مابين عدم ظهور الاعراض المرضية الى ظهور حالة الاسهال الحاد او المزمن وعلامات مختلفة [7]. وتختلف عادة اعراض الاصابة تبعا لسلالة الطفيلي والاستجابة المناعية للمضيف [8،9]. ويكون كل من الاسهال الدهني والتشنج البطني والغثيان وفقدان الشهية وانخفاض الوزن من أكثر العلامات السريرية وضوحا عند الاصابة بمرض الجياردیا [10].

يعد داء الجيارديا سبباً رئيساً للاسهال في جميع انحاء العالم ويصاب به سنوياً 280 مليون شخص، ينتشر الطفيلي في مناطق مختلفة من العالم ولاسيما المناطق الاستوائية وشبه الاستوائية والمناطق الصناعية المزدحمة والبيئات الفقيرة، وعموما ينتشر الطفيلي في الدول النامية [11،12]. اكدت العديد من الدراسات التي اجريت في العراق على انتشار الاصابة بالمرض في العديد من محافظات القطر، فضلا عن كونها اشارت الى العديد من الجوانب الوبائية للاصابة بالمرض[13-16]. يؤدي وجود طفيلي *G. lamblia* في القناة الهضمية الى تحفيز الاستجابة المناعية للمضيف، وربما تترافق تلك الاستجابة مع المرض باعراضه المختلفة، وتم التوصل الى الكثير من المعلومات عن الاستجابة المناعية للمضيف عن طريق الدراسات التي اجريت على الحيوانات التجريبية (الفئران والجرذان)، حيث اوضحت تلك الدراسات امكانية حصول شفاء من الاصابة خلال مدة زمنية تتراوح بين 3– 4 أسابيع [17]، تساهم كل من المناعة الخلوية والخلطية في الاستجابة المناعية ضد الاصابة بمرض الجيارديا، ويحتمل حدوث الاستجابة المناعية الاولية في لطخ باير Peyer's Patches للامعاء الدقيقة، وقد اثبتت دراسات بواسطة المجهر الالكتروني وجود الطفيلي داخل خلايا البلعم الكبير Macrophages في لطخ باير [19]. حيث يتم ابتلاع الطور المتغذي للطفيلي بعملية الاستساغة Opsonization [21]. فضلا عن دور خلايا البلعم الكبير في القتل الخلوي غير المعتمد على وجود الاضداد. حيث انها تلتهم الاطوار المتغذية للطفيلي باقدامها الكاذبة، لتقوم بهضمها داخل الفجوة البلعمية Phagolysosomes [20].

ان الكلوبيولينات المناعية عبارة عن جزيئات بروتينية سكرية موجودة في مصل الدم وسوائل الجسم الاخرى وتسمى بالاجسام المضادة ويرمز لها Ig ويتم انتاجها من قبل الخلايا اللمفاوية البائية بعد تمايزها إلى خلية بلازمية كاستجابة للممنعات Immunogens مثل (الطفيليات، البكتريا والفايروسات ... الخ) بعد التعرف اليه من قبل مستقبل الخلية البائية B-cell receptor [21،22]. يعد الغشاء الخارجي تركيب مميز للجدار الخلوي في البكتريا السالبة لصبغة كرام ويتألف الجدار الخلوي من الغشاء الخارجي Outer membrane ومن طبقة واحدة او طبقات قليلة جداً من الببتيدوكلايكان Peptidoglycan، ويرتبط الببتيدوكلايكان تساهمياً الى بروتينات دهنية في الغشاء الخارجي والأخير يتكون من متعدد السكريد الدهني Lipopolysaccharides (LPS)، بروتينات دهنية ودهون مفسفرة [23]. تكون بروتينات الغشاء الخارجي في البكتريا السالبة لصبغة غرام من نوع الصفيحة –بيتا (β-barrel)، واهمها بروتينات OmpA [24]، وأشار [25] الى ان OMPs تعمل كمستضدات تحفز الاستجابة المناعية في الجسم، وقد وجد ان هناك تداخلاً يحدث بين بروتين OmpA لبكتريا *Klebsiella* sp. (وهي بكتريا تعود الى العائلة المعوية Enterobacteriaceae) وبين خلايا لانكرهانس Langerhans (وهي خلايا عارضة للمستضدات APC) موجود في البشرة وفي الطبقة المخاطية[26]، تعد بروتينات الغشاء الخارجي لقاحات فعالة جداً تحفز كل من المناعة الفطرية والمناعة المكتسبة طويلة الامد وذلك لكونها تمثل محددات مستضدية تعرض على سطح الخلية البكتيرية الخارجي، كما انها عالية الثبات بين الأنواع المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام [24].

استنادا لما ذكر أعلاه كان الهدف من الدراسة الحالية اختبار قدرة بروتينات الغشاء الخارجي (المستضد-O) المستخلصة من بكتريا *E. coli* على تعديل الاستجابة المناعية في الارانب المختبرية ضد الاصابة المنفعلة بداء الجيارديا من خلال قياس مستويات كل من الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG).

طرائق العمل

اجريت الدراسة للمدة من بداية شهر كانون الاول 2021 ولغاية شهر شباط 2023 في جامعة سامراء/ مختبر الدراسات العليا التابع لكلية العلوم التطبيقية، واستعمل في هذه الدراسة 60 ارنباً حصلنا عليها من المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية في بغداد، اذ تراوحت اوزانها من (1.500- 1.800) غم بينما كانت اعمارها تتراوح من (عشرة الى اربعة عشر) شهرا قدم لها الماء والغذاء طوال فترة الدراسة.

وقد تضمنت متابعة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي والمنقاة من بكتريا *Escherichia coli* في (20) من ذكور الارانب البيضاء المختبرية، 10 منها استحدثت فيها الاصابة بطفيلي *Giardia lamblia* واخرى لم تستحدث فيها الاصابة وانما عوملت فقط بالمستضد، من خلال قياس كل من معامل انقسام خلايا نخاع العظم ومستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG).

تحضير الاوساط الزرعية Preparation of media

حضرت الاوساط الزرعية (Nutrient agar، MaCconkey agar وBrain heart infusion brot) اعتماداً على التعليمات المثبتة على العلبة من قبل شركة Hi-media الهندية والمصنعة لها، وضبط الاس الهيدروجيني pH وعقمت بالمؤصدة بدرجة حرارة (121) م° تحت ضغط (15) بار ولمدة (20) دقيقة وتم حضنها بدرجة حرارة (37) م°ولمدة (24) ساعة لغرض التأكد من عدم تلوثها وللتخلص من الرطوبة الزائدة على سطح الوسط، واستعملت الاوساط لاحقا في تنمية البكتريا قيد الدراسة.

جمع العينات

أولا: جمع عينات الطفيلي Collecting of parasite samples

تم الحصول على طفيلي *G. lamblia* وبطوريه المتغذي والمتكيس من غائط الاشخاص المصابين بالطفيلي فقط والمراجعين للمستشفى العام ومراكز الرعاية الصحية الاولية في سامراء، حيث جمعت العينات في قناني بلاستيكية معقمة واستعملت عينات الاكياس في اصابة الارانب المختبرية قيد الدراسة.

فحص عينات الغائط

فحصت عينات الغائط المأخوذة من الاشخاص المصابين بطفيلي *G. lamblia* بطريقة المسحة الرطبة المباشرة Direct wet film preparation غير المصبغة والمصبغة بمحلول صبغة اليود – اللوكالي وصبغة الايوسين وفقاً لما جاءت به [27].

2-تحضير عالق اكياس الطفيلي المستعمل في تجريع الحيوانات المختبرية

عزل الطفيلي من عينات الغائط التي تم الحصول عليها من المصابين بالاسهال والذين ثبت وجود الطفيلي لديهم بواسطة الفحص المجهري المباشر. وثم اتبعت طريقة [28] في تحضير عالق اكياس الطفيلي والذي اصبح جاهزا لتجريع الحيوانات المختبرية واحداث الإصابة.

3-اصابة الارانب تجريبياً Experimental infection of Rabbits

حسب عدد الاطوار المتكيسة للطفيلي باستعمال شريحة عد خلايا الدم (Hemocytometer) لكي يتم تحديد جرعة الاصابة فموياً والتي كانت $5 \text{ X } 10^3$ كيس، بعد ان جرعت عدة جرعات وملاحظة اقصر وقت في ظهور الإصابة مع مراعاة عدم هلاك الحيوانات نتيجة الجرع العالية، واجري التحري عن أكياس الطفيلي في براز الأرانب يومياًولفترة 2 اسبوع بعد اعطاء جرعة الاكياس لضمان حدوث الإصابة، تاكدنا من حدوث الإصابة في اليوم الرابع عشر من خلال تحضير مسحة من براز الأرانب المصابة على شريحة من الزجاج وفحصها بالمجهر ومشاهدة الطفيلي واطواره على اختلافها، باستعمال صبغة اليود- اللوكالي والايوسين.

عينة البكتريا Sample of Bacteria

تم الحصول على عزلة بكتريا *Escherishia coli* النقية من مختبر الاحياء المجهرية في كلية العلوم التطبيقية وتم تأكيد التشخيص باستعمال جهاز VITEK 2 فضلاً عن استعمال الوسط التفريقي Eosin Methylene Blue Agar (EMB).

اولا: حفظ العزلة البكتيرية وادامتها

نميت العزلة البكتيرية (بعد التشخيص) في وسط Brain heart infusion Broth (BHIB) وحضنت في درجة حرارة (37) م° ولمدة اربعة وعشرون ساعة، ثم زرعت على وسط المرق المغذي Nutrient broth عند نفس الظروف، ثم حفظت بعد ذلك في (4) م° استعملت العزلات في التجربة مع مراعاة تنشيطها وادامتها بشكل مستمر شهرياً.

ثانيا: استخلاص وتنقية بروتينات الغشاء الخارجي (O-Antigen)

استخلصت بروتينات الغشاء الخارجي وفقا لطريقة [29].

ثالثا: تحضير وتقدير كمية البروتين

حضر المنحني القياسي وقدر تركيز البروتين في العينات وفقا لما جاء به [30].

اختبار سمية بروتينات الغشاء الخارجي (O-Antigen)

اختبرت التراكيز المستعملة من بروتينات الغشاء الخارجي لمعاملة ارانب التجربة وهي (100، 200، 400، 800، 1000، 1200 و1400) مكغم/ مل وفقاً لما ذكرته [31]، واستعمل في هذه التجربة (40) ارنباً من الذكور بعمر 10-14 شهراً قسمت إلى ثمانية مجاميع كل مجموعة مكونة من (5) ارانب وحقنت تراكيز المستضد داخل الخلب (Intraperitoneum) وبواقع (1) مل لكل تركيز.

تأثير (O-Antigen) في معدل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في الارانب

درس معامل الانقسام لخلايا نخاع العظم وفقا لطريقة [32].

تمنيع الارانب بالمستضد (O) (O-Antigen)

منعت (10) ارانب بالمستضد **(O)** واجري التمنيع وفقاً لطريقة [33،34] واستعملت طريقة الحقن تحت الجلد (Subcutaneous) وفي العضلة (Intramuscular) في اعطاء الجرع للحيوانات وبواقع (1) مل لكل حيوان واستعملت التراكيز (100، 200، 400 و800) مكغم/مل اعتماداً على اختبار السمية، وبعد اسبوع من انتهاء التمنيع اجريت الفحوصات اللاحق ذكرها.

تصميم التجربة Experimental design

تم استعمال (20) من ذكور الارانب تراوحت اعمارها مابين (10-14) شهراً بعد التأكد من سلامتها من الامراض الظاهرية وخلوها من الاصابات بالطفيليات المعوية وتم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع وكالاتي:

المجموعة الاولى: مجموعة السيطرة السالبة Negative control

تضم 5 ارانب تم حقنها بمحلول الملح الفسلجي (0.9%) تحت الجلد بمقدار (1) مل يومياًولمدة اسبوعين وبعد ذلك سحب الدم لغرض الحصول على المصل وقياس مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG)، ثم شرحت الحيوانات للحصول على نخاع العظم والذي تم استعماله في تجربة قياس معامل انقسام خلايا نخاع العظم.

المجموعة الثانية: المجموعة الممنعة /O-Antigen

تضم (10) ارانب تم تمنيعها بالمستضد (O) وفقاً لطريقة من Griffiths *et al.* (1985) و Tomas *et al.* (1986) ولمدة (14) يوماً بمقدار (1) مل من المستضد وكما مبين في الفقرة انفاً وبعد انتهاء التمنيع سحب الدم لغرض الحصول على المصل وقياس مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG)، ثم شرحت (5) ارانب منها للحصول على نخاع العظم والذي تم استعماله في تجربة قياس معامل انقسام خلايا نخاع العظم.

جرعت الارانب الخمس الاخرى بطفيلي *G. lamblia* فمويا ًبجرعة مقدارها $5 \text{ X } 10^3$ كيس/ مل وعدت مجموعة تحدي، وتم فحص البراز يومياً للتحقق من حدوث الاصابة وبعد مرور اسبوعين على الاصابة تم اعادة قياس مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG) للمقارنة بين التمنيع بالمستضد قبل وبعد الاصابة بالطفيلي، ثم شرحت الحيوانات للحصول على نخاع العظم والذي تم استعماله في تجربة قياس معامل انقسام خلايا نخاع العظم.

المجموعة الثالثة: مجموعة السيطرة الموجبة Positive control

تضم 5 ارانب تم تجريعها بطفيلي *G. lamblia* بجرعة فموية مقدارها 5×10^3 من اكياس الطفيلي، اجري فحص براز الحيوانات بشكل يومي للتأكد من احداث الاصابة وبعد اربعة عشر يوما من الاصابة اجريت عملية سحب الدم لغرض الحصول على المصل وقياس مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG).

تم تقدير تركيز كل من IgM وIgG في مصل دم الارانب المختبرية باستعمال عدة التحاليل الخاصة والمجهزة من شركة SUNLONG الصينية.

التحليل الاحصائي Statistical Analysis

تم تحليل النتائج الحالية احصائياً بتطبيق اختبار تحليل التباين (F. test) وباستعمال البرنامج الاحصائي SPSS الإصدار 20 وقورنت المتوسطات الحسابية للمعاملات المختلفة باختبار دنكن متعدد الحدود بمستوى احتمالية 0.05 [35].

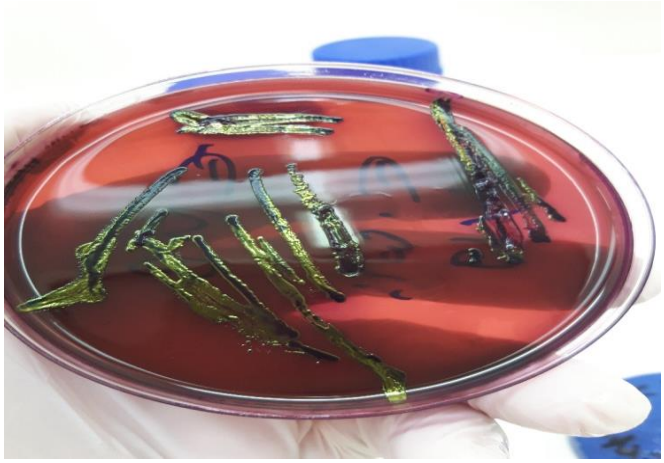
النتائج والمناقشة

تشخيص وعزل الطفيلي

تم تشخيص طفيلي *G. lamblia* بطريقة الفحص المباشر باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي (0.9%) ومحلول اليود-اللوكالي وصبغة الايوسين وقد ظهرت الاطوار المتغذية والمتكيسة في مسح براز الحيوانات المفحوصة.

تشخيص بكتريا Escherishia coli

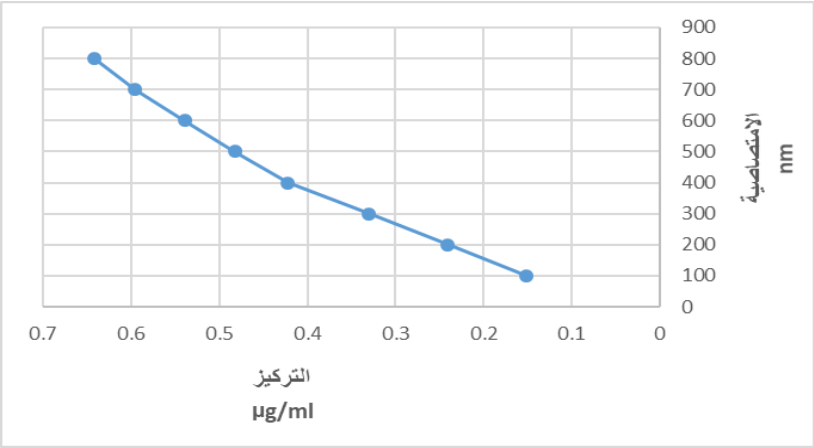
شخصت بكتريا *E. coli* باستعمال جهاز VITEK 2 فضلاً عن استعمال وسط Eosin Methylene Blue Agar (EMB) حيث يعطي مستعمرات ذات لون اخضر معدني براق Green metalic sheen [15]، وكما مبينه في الشكل 1.



الشكل 1: نمو بكتريا *E. coli* على وسط (EMB)

تقدير تركيز البروتينات في إنموذج مستخلص بروتينات الغشاء الخارجي

قدر تركيز بروتينات الغشاء الخارجي المستخلصة وفقاً لطريقة [30] وباستعمال المنحنى القياسي الذي يبين العلاقة الخطية بين الامتصاصية بطول موجي (750) نانومتر وتراكيز البروتين القياسية التي قدرت بـ (مكغم/مل) وجد ان تركيز البروتين في محلول بروتينات الغشاء الخارجي بلغ 280 مكغم/مل وكما مبين في الشكل 2.



الشكل 2: المنحنى القياسي لتقدير تركيز البروتين في المحلول البروتيني المنقى

تقدير سمية بروتينات الغشاء الخارجي

بينت نتائج تجربة السمية للمستضد (O) والتي أجريت وفقاً لما ذكرته [31]على الارانب المعاملة بالتراكيز (100، 200، 400، 800، 1000 و1400) مكغم/مل الاتي:

- ❖ عدم ملاحظة اية علامة مرضية على الحيوانات المعاملة بالتراكيز (100، 200، 400 و800) مكغم/مل مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة وتمت مراقبتها لمدة أسبوعين.
- ❖ لوحظ خمول وضعف عام على الحيوانات المعاملة بالتركيز 1000 مكغم/مل.
- ❖ لوحظ (وهن عام وتساقط للشعر من مناطق مختلفة من الجسم وضعف الحركة) على الحيوانات المعاملة بالتركيز 1200 مكغم/مل.
- ❖ حصلت هلاكات في عدد من الحيوانات المعاملة بالتركيز 1400 مكغم/مل في اليوم الخامس واستنادا الى هذه النتائج اختبرت التراكيز المستعملة (100، 200، 400 و 800) مكغم /مل قيد الدراسة.

تأثير المستضد (O) على معامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظم

اشارت نتائج الدراسة الحالية (جدول 1) الى وجود زيادة معنوية بمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نقي العظام في مجاميع الارانب المعاملة بالمستضد مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة، اذ بلغت النسبة (60.20% و55.60%) على التوالي، وقد توافقت نتائج دراستنا الحالية مع نتائج السعدي [36]، حيث أشار الى ان التمنيع بالمستضد البروتيني والمستخلص من بكتريا *P. mirabilis* اثّر وبشكل واضح مؤدياً الى ارتفاع معنوي في معامل انقسام خلايا نقي العظم مقارنة مع السيطرة، حيث بلغت النسب (18.69% و3.52%) على التوالي، وكذلك توافقت مع نتائج الرفاعي [31]، حيث اوضحت ان التمنيع بالمستضد (O) المنقى من بكتريا *K. pneumoniae* ادى إلى ارتفاع معنوي في معامل انقسام خلايا نقي العظم مقارنة مع السيطرة السالبة، حيث بلغت النسب (60.69% و53.86%) على التوالي، وتدل النتائج التي توصلنا اليها ان المستضد (O) كان محفزاً على انقسام خلايا نقي العظام فقد أثّر المستضد على الخلايا السدويه Stromal cells في نقي العظم عن طريق تحفيزها لإطلاق عدد من الوسائط الخلوية المهمة للانقسام فضلا عن تمايز الخلايا الجذعية الى انواع خلايا الدم المختلفة[37]. يمكن ان يكون المستضد هو المحفز لزيادة انقسام خلايا نقي العظم، لكي تعوض عن النقص الذي يحصل في عددها التي استهلكتها في عملية البلعمة [38].

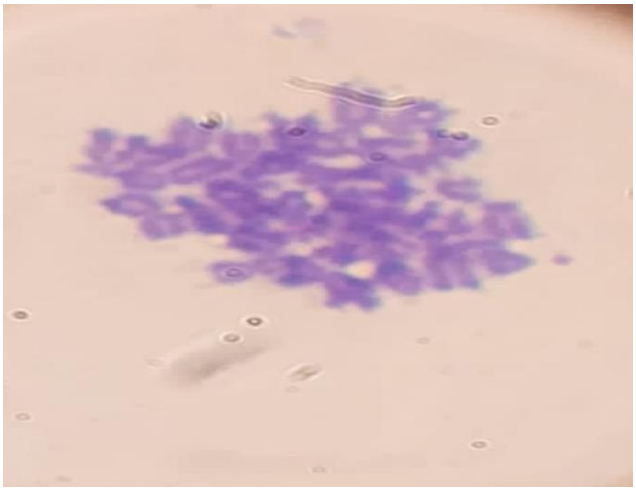
يبين الجدول 1 ارتفاع معامل الانقسام معنوياً بعد الاصابة بالطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث ارتفعت النسبة لتبلغ (74.80% و61.80%) على التوالي، ولم نجد دراسات منشورة في الادبيات تشير الى التوافق او عدمه مع النتائج الحالية. ربما يعود السبب في ارتفاع معامل انقسام نقي العظم الى دخول جسم غريب وهو الطفيلي الذي ربما استنزف عدداً كبيراً من خلايا الدم البيض لكي تقاوم الجسم الغازي وبالتالي كانت هناك زيادة في معامل الانقسام لكي تعوض عن النقص الحاصل في خلايا الدم البيض [31]، وكذلك من المعلوم ان خلايا البلعم الكبير التي تترشح الى موقع الاصابة تمتلك القدرة على انتاج عامل تحفيز المستعمرة Colony stimulating factor (CSF) الذي ينتقل عبر الدم الى نقي العظم ليحفز تكاثر وانتاج خلايا الدم البيض بجميع انواعها مسبباً زيادة في عدد خلايا الدم المحيطي [40،39]، حيث ان جميع خلايا الدم البيض تنشأ من نقي العظم [41]. وعند الاطلاع على النتائج الحالية لمعدل معامل انقسام خلايا نقي العظم نلاحظ حصول ارتفاع في معدل معامل الانقسام بعد الاصابة. لذلك ربما يكون الارتفاع ناتج من تأثير عامل تحفيز المستعمرة او بتأثير عوامل اخرى يحفز انتاجها الطفيلي [42]. يشير الشكل 3 الى الكروموسومات وهي في مرحلة الانقسام الخيطي.

جدول 1: النسبة المئوية لمعامل انقسام نخاع العظم للارانب في مجاميع الدراسة

المجاميع	معامل انقسام نخاع العظم (%) المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	B 15.30 ± 60.20
مجموعة التحدي	A 8.14 ± 74.80
السيطرة الموجبة	B 9.20 ± 61.80
السيطرة السالبة	C 9.42 ± 55.60

تشير الاحرف المختلفة الى وجود فروقات معنوية بمستوى $P \leq 0.05$

تشير الاحرف المتشابهة الى عدم وجود فروقات معنوية بمستوى $P > 0.05$



الشكل 3: الكروموسومات في مرحلة الانقسام الخيطي (X40)

تأثير المستضد (O) على مستوى الكلوبيولينات المناعية IgM وIgG في المصل

اظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً كان غير معنوي في مستوى كل من IgM وIgG في المجموعة المعاملة بالمستضد (O) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة، حيث بلغ مستوى IgM (73.35 و66.27) بيكوغرام/ مل على التوالي، وبلغ مستوى IgG (1.38 و1.16) مكغم/ مل على التوالي، وقد توافقت النتائج الحالية مع نتائج [43] فقد أشاروا الى حصول ارتفاع معنوي في مستوى كل من IgM وIgG لدى الفئران المختبرية الملقحة بلقاح بكتريا القولون *E. coli* مقارنة مع السيطرة، حيث بلغ معدل امتصاصية IgM (150.0 و50.0) نانومتر على التوالي، اما معدل امتصاصية IgG فقد بلغ (90.0 و50.0) نانومتر على التوالي.

اشارت نتائج هذه الدراسة الى حصول ارتفاع غير معنوي في مستوى IgM ومعنوي في مستوى IgG لدى مجموعة التحدي مقارنة مع مستواهما في مجموعة السيطرة الموجبة، ويبين الجدول 2 مستوى كل من IgM وIgG. وقد بلغ مستوى IgM في المصل لكل من المجموعة الممنعة بالمستضد مع وجود الطفيلي ومجموعة السيطرة الموجبة (85.98 و78.69) بيكوغرام/مل على التوالي، أما الكلوبيولين المناعي IgG فقد بلغ مستواه (2.01 و1.46) مكغم/مل على التوالي، وجاءت النتائج الحالية متوافقة مع نتائج العبادي [44]، فقد أوضحت ارتفاع تركيز كل من IgM وIgG (بشكل غير معنوي ومعنوي على التوالي) في الأشخاص المصابين بذات الطفيلي قيد الدراسة مقارنة مع الاصحاء، وقد بلغ مستوى IgM (157.7 و111.9) ملغم/ديسلتر على التوالي، اما مستوى IgG فقد بلغ (1140.5 و431.6) ملغم/ديسلتر على التوالي، وتوافقت مع نتائج سبع [45]، حيث اشارت الى ارتفاع تركيز IgM وبشكل معنوي في الأشخاص المصابين بمرض الجيارديا مقارنة مع مجموعة السيطرة، وقد بلغ تركيزه (420.1 و251.85) ملغم/ديسلتر على التوالي.

ربما يعزى السبب في ارتفاع مستوى الكلوبيولينات المناعية في مجموعة التحدي هو ان المستضد يعد ذيفاناً خارجياً يعزز تكوين الاضداد والتي قد تكون من النوع الذي يتفاعل تصالبياً مع المستضدات الخاصة بالطفيلي ربما بسبب وجود التشابه بين المحددات المستضدية بين المستضد وطفيلي *G. lamblia* قيد الدراسة، وعندما يتم التجريع بالطفيلي فانه يعد مستضداً آخر دخل الجسم فيحدث فعالية التحفيز المناعي والذي يمكن ان يشاهد على شكل مقاومة غير متخصصة تجاه الاصابة وذلك من خلال تحفيزه للخلايا البائية على الانقسام المتكرر وتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا بلازمية والتي تستجيب بتحرير كميات كبيرة من الاضداد وتحول بعضها الى خلايا الذاكرة [46]، وربما يعزى السبب في ذلك إلى تزامن الاستجابة المناعية الخلوية من خلال الزيادة في اعداد الارومات اللمفاوية مع الانتاج العالي للخلايا البلازمية التي تعمل على تكوين الاضداد التي تهاجم الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية اذ تقضي عليه [31]. أشار [47] الى حصول غزو كثيف جداً من قبل طفيلي *G. lamblia* للمضيف الذي يعاني من نقص الضد IgG، واكد [48] ان الإصابة بطفيلي *G. lamblia* تحفز الاستجابة المناعية من قبل الخلايا التائية المساعدة بنوعيها (Th1 وTh2)، وبما ان الخلايا التائية (Th2) تنتج العديد من الحركيات الخلوية عند تنشيطها وتشمل الانترلوكينات (4، 5، 10 و13) حيث يعد IL-4 الحركي الخلوي الرئيس الذي تنتجه Th2 المنشطة اثناء الإصابة بمرض الجيارديا والذي يحفز تمايز الخلايا البائية لانتاج الاضداد النوعية لمستضدات الطفيلي [41،49]، لذا ربما يمكن ان يعزى سبب ارتفاع مستوى كل من IgM وIgG الى ذلك.

جدول 2: مستوى الكلوبيولينات المناعية (IgM وIgG) للارانب في مجاميع الدراسة

المجاميع	IgM (pg/ml)	IgG (µg/ml)
	المعدل ± الانحراف القياسي	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	AB 11.90 ± 73.35	CD 0.11 ± 1.38
مجموعة التحدي	A 25.57 ± 85.98	A 0.62 ± 2.01
السيطرة الموجبة	AB 13.65 ± 78.69	BC 0.23 ± 1.46
السيطرة السالبة	B 10.22 ± 66.27	D 0.20 ± 1.16

تشير الاحرف المختلفة الى وجود فروقات معنوية بمستوى $P \leq 0.05$

تشير الاحرف المتشابهة الى عدم وجود فروقات معنوية بمستوى $P > 0.05$

الاستنتاجات

ارتفع معامل انقسام نخاع العظم بعد التمنيع بالمستضد (O) واستمر ارتفاعه بوجود الطفيلي، وكما ارتفع مستوى كل من IgM وIgG في مصل الارانب المعاملة بالمستضد (O) والذي يمثل تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية في المجاميع المعاملة والممنعة بالمستضد (O) فضلاً عن ارتفاعها في مجموعة السيطرة الموجبة.

References

1. Park, Y., Cho, H., Jang, D., Park, J. and Choi, K., (2023). Multilocus genotyping of *Giardia duodenalis* in pre-weaned calves with diarrhea in the Republic of Korea. *PLoS ONE, 18*(1): 1-16.
2. Davoodi, J. and Abbasi-Maleki, S. (2018). Effect of *Origanum vulgare* Hydroalcoholic Extract on *Giardia lamblia* Cysts Compared with Metronidazole in Vitro. *Iran J. Parasitol: 13*(3):486-492.
3. Sterling, C.R.,(2018). Foodborne *Giardia duodenalis* and *Trypanosoma cruzi*. *In*: Ortega, Y.R., Sterling, C.R. (eds.), Foodborne Parasites, *Springer, Cham,* pp. 17–40. Second edition.
4. Ryan, U.M., Feng, Y., Fayer, R., Xiao, L., (2021). Taxonomy and molecular epidemiology of Cryptosporidium and Giardia–a 50-year perspective (1971–2021). *Int. J. Parasitol. 51*(13–14): 1099–1119.
5. 5. Trelis, M., S´aez-Dur´an, S., Puchades, P., Castro, N., Miquel, A., Gozalbo, M. and Fuentes, M.V. (2022). Survey of the occurrence of Giardia duodenalis cysts and Cryptosporidium spp. oocysts in green leafy vegetables marketed in the city of Valencia (Spain). *International Journal of Food Microbiology 379*: 1-7.
6. 6. Meng, X., Kang, C., Wei, J., Ma, H., Liu, G., Zhao, J., Zhang, H., Yang, X., Wang, X., Yang, L., Geng, H,. and Cao, H. (2023). Meta-Analysis of the Prevalence of *Giardia duodenalis* in Cattle in China*. Foodborne Pathogens and Disease*, *20*(1): 17-31.
7. 7. El-Gendy, A.M.L., Mohammed, M.A.A. Ghallab, M.M.I., Abdel Aziz, M.O., Ibrahim, S.M. (2021). Therapeutic Effect of Chitosan Nanoparticles and Metronidazole in Treatment of Experimentally Giardiasis Infected Hamsters. *Iran J. Parasitol.,16*(1): 32-42.
8. Aggarwal, A. and Nash, T. E. (1987). Comparison of two antigenically distinct *Giardia lamblia* isolates in gerbils. *Am. J. Trop. Med. Hyg., 36*: 325–332.
9. Nash, T.E., Herrington, D.A., Losonsky, G.A. and Levine, M.M. (1987). Experimental human infections with *Giardia lamblia. J. Infect. Dis., 156*(6): 974–984.
10. Farthing, M.J.G. (1994). Giardiasis as a disease. *In*: *Giardia:* from molecules to disease. Thompson, R.C.A. Reynoldson, J.A. and Lymbery, A.J. (eds.). *Wallingford, Oxon, CAB Int., England*, 394pp.
11. Squire, S.A. and Ryan, U. (2017). Cryptosporidium and Giardia in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors, 10*(195): 1-32.
12. Meningher, T., Boleslavsky, D., Barshack, I., Tabibian-Keissar, H., Kohen, R., Gur-Wahnon, D., Ben-Dov, I. Z., Sidi, Y., Avni, D., & Schwartz, E. (2019). *Giardia lamblia* miRNAs as a new diagnostic tool for human giardiasis*. PLoS negl. trop. dis., 13*(6): 1-16.
13. Al-Ammash, M.S.J. (2015). Study on prevalences of *Entameoba histolytica & Giardia lamblia* in Samarra city. *Kufa Journal for Veterinary Medical Sciences. 6*(2): 194-204.
14. Bazzaz, A.A., Shaker, O.M. and Alabbasy, R.H. (2017). Prevalence of Two Gastrointestinal Parasites *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* within Samarra City, Iraq, *Advances in Bioscience and Biotechnology, 8*: 399-410.

15. Sabry, N.N., Owaied, Y.H. and Mahmoud, A.J. (2021). Epidemiological Study of Common Bacterial and Parasitic Infections in Some Areas of Salah Al-Din Governorate, Iraq. *IOP Conf. Ser.: Earth Environ. Sci., 923*:1-9.
16. Zaki, D.M. (2022). Prevalence of *Entamoeba histolytica* and *Giardia Lamblia* Associated with Diarrhea in Children referring to lbn Al-Atheer Hospital in Mosul, Iraq. *Archives of Razi Institute, 77*(1): 63-69 64.
17. Roberts-Thomson, I. C., Stevens, D. P., Mahmoud, A. A. F. & Warren, K. S. (1976b). Giardiasis in the mouse: *an animal model. Gastroenterology, 71*: 57–61.
18. Owen, R.L., Allen, C.L. and Stevens, D.P. (1981). Phagocytosis of *Giardia muris* by macrophages in peyer's patch epithelium in mice. *Infect. Immun., 33*(2): 591–601.
19. Hill, D. R. (2001). *Giardia lamblia*. *In*: Principles and practice of clinical parasitology. Gillespie, S. H. and Pearson, R. D. (eds.). *John Wiley & Sons, Ltd., Chichester.* Pp: 219–241.
20. Faubert, G. (2000). Immuno response to *Giardia duodenalis. Clin. Microbiol. Rev., 13*(1):35–54.
21. نجرس، اسامة ناظم. (2013). الوافي في المناعة. *مطبعة دار الرسالة، سامراء، العراق*، 237ص.
22. Justiz Vaillant, A.A., Jamal, Z. and Ramphul, K. (2020). Immunoglobulin. StatPearls
23. Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. (2018). Microbiology An Introduction. *Pearson*., 960pp. Thirteen edition.
24. Maiti, B., Dubey, S., Munang'andu, H.M., Karunasagar, I., Karunasagar, I. and Evensen, Ø. (2020). Application of Outer Membrane Protein-Based Vaccines Against Major Bacterial Fish Pathogens in India. *Frontiers in Immunology, 11*(1362): 1-12.
25. Anwar, M., Muhammad, F., Akhtar, B., Anwar, M.I., Raza, A. and Aleem, A. (2021). Outer Membrane Protein-Coated Nanoparticles as Antibacterial Vaccine Candidates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 27*:1689–1697.
26. Godefroy, S.,Corvain, N., Schmitt, D., Aubry, J.P., Bonnefoy, J.Y., Jeannin, P. and Staquet, M.J. (2003). Outer membrane protein A (OmpA) activates human epidermal Langerhans cells, *Eur. J. Cell. Biol., 82*(4): 193-200.
27. WHO. (1991). Basic laboratory methods in medical parasitology. *World Health Organ*., Geneva, 114pp.
28. Clark, C.G. and Diamond, L.S. (2002). Methods of Cultivation of huminal parasitic protists of Clinical importance. *Clin. Microbiol. Rev., 15*(3): 329-341.
29. Murphy, T.F., Dudas, K.C., Mylotte, J.M. and Apicella, M.A. (1983). A subtyping system for nontypable *Haemophilus influenza* based on outer membrane proteins, *J. Infect. Dis.,147*(5): 838-846.
30. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951). protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem. 193*(1): 265 - 275.
31. الرفاعي، عهود مزاحم شاكر محمود. (2016). تأثير بعض مستضدات بكتريا *Klebsiella pneumonia* كمحفز مناعي للأرانب المختبرية ضد الاصابة بطفيلي الاميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*. أطروحة دكتوراه، *كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة تكريت*. 172ص.
32. Allen, J.W., Shuller, C.F., Mendes, R.W. and Lah, S.A. (1977). Asimplified technique for *in vivo* analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxy - uridine tablets. *Cytogent. cell. Genet. 18*: 231-237.
33. Griffiths, E., Stevenson, P., Thorpe, R. and Chart, H. (1985). Naturally occuring antibodies in human sera that react with the iron-regulated outer membrane protein of *Escherichia coli*, *Infect. Immun., 47*(3): 808-813.

34. Tomas, J.M., Benedi, V.J., Ciurana, B. and Jofre, J. (1986). Role of Capsule and O Antigen in Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Serum Bactericidal Activity. *Infect. Immun., 54*(1): 85-89.
35. Cleophas, T.J. and Zwinderman, A.H. (2016). SPSS for starters and 2nd levelers. *Springer Cham Heidelberg, New York,* 375pp.Second edition.
36. السعدي، حسن علي حسين. (2005). دراسة بكتيرية ومناعية للأنزيم الحال للبروتين نوع - أ - المستخلص من بكتريا *Proteus mirabilis* المعزولة من خمج السل البولية. أطروحة دكتوراه، *كلية العلوم، الجامعة المستنصرية*. 129ص.
37. Knupp, C., Pekala, I.H. and Cornelius, P.(1988). Extrensive bone marrow necrosis in patients with cancer and tumor necrosis factor activity in plasma. *Am. J. Hematol., 29*(4): 215-221.
38. Rabson, A. Roitt, I.M. and Delves, P.J. (2005). Really essential medical immunology Blackwell, 220pp. Second edition.
39. Guyton, A.C. and Hall, J.E. (2011). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology. 12th edn. *Saunders*, 1091pp. Twelfth edition.
40. Delves, P.J., Martin, S.J., Burton, D.R. and Roitt, I.M. (2017). Roitt's Essential Immunology. *John Wiley and Sons, Ltd*., 556pp. Thirteenth edition.
41. Penman, I.D., Ralston, S.H., Strachan, M.W.J. and Hobson, R.P. (2022). Davidson's Principles and Practice of Medicine. *Elsevier*. 1357pp. Twenty fourth edition.
42. الناصري، فاطمة شهاب. (2006). دراسة بعض الجوانب الحياتية للاصابة بالاكياس المائية، وبعض الجوانب الدمية والمناعية المرافقة لكل من الاصابة والانظمة التمنيعية والعلاجية في الفئران البيض. أطروحة دكتوراه، *كلية التربية ابن الهيثم، جامعة بغداد*.
43. Schaut, R.G., Boggiatto, P.M., Loving, C.L. and Sharma, V.K. (2019). Cellular and Mucosal Immune Responses Following Vaccination with Inactivated Mutant of *Escherichia coli* O157:H7. *Scientific Reports*, 9:1-11.
44. العبادي، أريج عطية حسين. (2005). دراسة طفيلية ومناعية للاوالي المعوية *Giardia lamblia* و *Entamoeba histolytica* في بغداد. رسالة ماجستير، *كلية العلوم، جامعة بغداد*. 139ص.
45. سبع، طيبه عبد الكريم عريبي.(2021). مقارنة بعض التأثيرات الحياتية والمناعية المرافقة لخمج الأميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica* والجيارديا لامبليا *Giardia lamblia* للأشخاص المصابين بداء السكري. رسالة ماجستير، *كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة تكريت*. 131ص.
46. Levinson, W. Chin-Hong, P., Joyce, E.A., Nussbaum, J. and Schwartz, B. (2018). Review of Medical Microbiology and Immunology. *McGraw-Hill education, Inc., New York*, 820pp. Fifteen edition.
47. Matowicka-Karna, J., Dymicka-Piekarska, V. and Kemona, H. (2009). IFN-gamma, IL-5, IL-6 and IgE in patients infected with *Giardia intestinalis. Folia Histochem. Cytobiol*., *47*(1): 93-97.
48. Jiménez, J.C., Fontaine, J., Creusy, C., Fleurisse, L., Grzych, J., Capron, M. and Dei-Cas, E. (2014). Antibody and cytokine responses to *Giardia* excretory/secretory proteins in *Giardia intestinalis*-infected BALB/c mice. *Parasitol. Res., 113*: 2709-2718.
49. Lopez-Romero, G., Quintero, J., Astlazarán-Garcia, H. and Velazquez, C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology, 37*(8): 394–406.

IRAQI Academic Scientific Journals

Samarra Journal of Pure and Applied Science

SJPAS

مجلة سامراء للعلوم الصرفة والتطبيقية

www.sjpas.com

p ISSN: 2663-7405
e ISSN: 2789-6838

The effect of immunizing laboratory rabbits infected with *Giardia lamblia* with antigen (O) purified from *Escherichia coli* on Mitotic index and some Immunoglobulins

Maroof Sabti Juma Al-Ammash[1], Aysir Salih Mohammed Al-Samarrai[2]
1- Department of Pathological Analysis, Faculty of Applied Science, University of Samarra, Iraq
2- Department of Biology, Faculty of Education, University of Samarra, Iraq

Article Information
Received: 12/03/2023
Accepted: 14/04/2023

Keywords:
Giardia lamblia, O-antigen, Mitotic index, Immunoglobulins

Corresponding Author

E-mail:
ebnbaz87@gmail.com

Abstract

This study was conducted for the period from the beginning of December 2021 to February 2023, and it included a follow-up of the effect of outer membrane proteins (OMPs) purified from *Escherichia coli* bacteria in (20) male laboratory white rabbits, 10 of which developed infection with the *Giardia lamblia* parasite. And another in which the infection did not develop, but was only treated with O-antigen, and the change in each of mitotic index and immunoglobulins (IgM and IgG) was studied. The current results indicated that there was a significant increase in the mitotic index of bone marrow cells in groups of animals treated with the antigen compared with the negative control group, where the ratio was (60.20 and 55.60%), respectively, while the challenge group had a significant increase in the mitotic index compared to the positive control. The percentage was (74.80 and 61.80%), respectively. The current results showed a non-significant increase in the level of both IgM and IgG in the (O) antigen-treated group compared with the negative control group, where the IgM level was (73.35 and 66.27) pg/ml, respectively, and the IgG level was (1.38 and 1. (16) µg/ ml, respectively, and it also indicated to a non-significant increase in the level of IgM and a significant increase in the level of IgG in the challenge group compared with the positive control, and the level of IgM in the serum for both the challenge and positive control groups reached (85.98 and 78.69) pg/ml, respectively, while IgG levels were (2.01 and 1.46) µg/ml, respectively.