مجلة الانبار للعلوم الزراعية ، المجلد : 3 العدد (1) ، 2005

كفاءة تمنيع الفئران البيض Balb / c بالمستضدات الجسمية لديدان *Toxascaris leonina* و *Toxocara cati*

عبد الوهاب بديوي حسين الكبيسي
قسم علوم الحياة – كلية العلوم / جامعة الانبار

الخلاصة

اجريت الدراسة لمعرفة تاثير حقن جرعات من المستضدات الجسمية لديدان *T. leonina* , *T. cati* في العضلات والتجويف الخلبي للفئران البيض *Balb / c* على منع او تقليل الاصابة بداء اليرقات الاحشائية المهاجرة لنفس النوع والنوع المغاير ولوحظ من خلال التجربة ان اعلى نسبة اختزال حصلت عند اعطاء بيوض كجرعة تحدي ضد نفس النوع من المستضدات الجسمية حيث بلغت في حالة *T. cat*i 80.77% عند اعطاء المستضدات عن طريق التجويف الخلبي اما في حالة *T. Leonin*a فقد بلغت اعلى نسبة وقاية 82.55% وعند اعطاء المستضدات عن طريق العضلات .

Effecinency of Vaccmuination white mice Balc / c with whole worm extract of *Toxocara cati, Toxoscaris leonina*

Summary

The study was conducted to investigaate the effect of antigen of whole worm *T. Cati*, *Toxascris Leonina* in muscle & pereton of white mice Balb / c to prevent or reducing infected with visceral larvae migrans (the homologous & heteroloqous of the challeoge dose the results of these infestigations. There was reduction in the number of larvae of *T. Cati & T. Leonina*. The highest percentage reduction of infection for *T. cati* 80.77% immunizing doses homoloqous to the challenge dose, peritoneally but in *T. leonina* the highest reduction rate in the number of larvae 82.55% when the immunizing doses homologous to the challenge dose in muscle.

المقدمة

تعتبر ديدان اسكارس القطط T. Cati & T. Leonina من الديدان الشائعة في القطط الاليفة والتي يمكن ان تخمج الانسان بيرقاتها وتسببان ما يدعى بداء اليرقات الاحشائية المهاجرة Visceral Larvae migrans (1.2) الذي ينتج عن طريق تناول البيوض الناضجة للديدان من قبل الانسان او المضائف الناقلة Paratenic hosts (القوارض ، الفئران ، الاغنام ، الطيور ، الصراصير ، ديدان الارض) حيث تفقس في الامعاء عن يرقات تخترق مخاطية الامعاء ثم تهاجر عن طريق الدم واللمف الى كافة اعضاء الجسم (الكبد ، الرئتين ، العضلات ، والكلى ، والدماغ) (3) . وبالرغم من اهمية هذه الديدان وعلاقتها بالصحة العامة فقد v;.j اغلب البحوث على انتشارها لذلك توخينا في هذه الدراسة اجراء بعض التجارب على المضائف الناقلة الفئران البيض للتعرف على امكانية تحضير مستضدات من جسم الديدان المجففة وحقنها في العضلات والتجويف الخلبي لامكانية توفير وقاية ضد الخمج ببيوض كلتا الدودتين .

المواد وطرائق العمل

تم اختيار 50 فأرة بعمر يتراوح (6–8) اسبوع ، قسمت الى (4) الاولى والثانية اعطيت مستضدات الديدان في العضلات والبريتون 2 ملغم وبعد 21 يوم اعطيت 1 ملغم وبنفس الطريقة اعلاه ثم اعطيت جرعة التحدي 1000 بيضة ناضجة بعد فترة اسبوعين من اعطاء الجرعة الثانية وقتلت وشرحت الفئران وعزلت اعضائها واستخلصت اليرقات بعد 10 ايام من اعطاء جرعة التحدي ادناه تفاصيل التجربة :

المجموعة الاولى : 20 فأرة اعطيت جرعات التمنيع فمويا وحسب الترتيب الاتي :

أ– 5 فئران اعطيت مستخلص الديدان *T. cati* في العضلات .

ب– 5 فئران اعطيت جرعات مستخلص الديدان *T. leonina* في العضلات . ثم اعطيت الفئران (أ + ب) فمويا جرعة التحدي 1000 بيضة ناضجة *T. cati*.

جـ – 5 فئران اعطيت جرعات من مستخلص الديدان *T. cati* في العضلات .

د– 5 فئران اعطيت جرعات من بيوض *T. leonina* في العضلات ثم اعطيت (جـ + د) جرعة التحدي 1000 بيضة *T.leonina* .

المجموعة الثانية :20 فارة اعطيت جرعات المتنيع عن طريق البريتون وحسب الترتيب المبين اعلاه .

المجموعة الثالثة : 5 فئران اعطيت فمويا جرعة التحدي 1000 بيضة ناضجة *T. cati* .

المجموعة الرابعة : 5 فئران اعطيت فمويا جرعة التحدي 1000 بيضة ناضجة *T. leonina* .

تحضير المستضدات الجسمية من ديدان _*T. cati , T. leonina* واعتبرت المجموعتين الاخيرتين كسيطرة :

تم جمع الديدان ذكور واناث (الاناث التي استخلصت منها البيوض جففت في جهاز التجفيف البارد Lyphilizer ثم طحنت في هاون خزفي وخزنت في المجمدة لحين الحاجة اليها .

تم تحضير تركيزين من مسحوق كل دودة (8 ملغم / سم^3 ، 16 ملغم / سم^3) باذابة المسحوق في حجم معين من محلول الفوسفيت الملحي Phosphate Buffer Saline ذو رقم هيدروجيني PH= 7.2 .

تم تحضير الجرعات الاولى من المستضدات الجسمية يمزج حجم معين من محلول المستضد المعني مع مساعد فروند الكامل Freund complete – adju vant بنسبة 1 : 1 اعطيت الفئران بما يعادل 2 ملغم / بالعضلات والبريتون .

وتم تحضير الجرعة الثانية (المقوية booster من المستضدات الجسمية يمزج حجم معين من محلول المستضد المعني مع مساعد فروند غير الكامل adjuant–Freund`s incomplete بنسبة 1 : 1 اعطيت الفئران بما يعادل 1 ملغم وبنفس الطريقة اعلاه .

استخلاص وحضن البيوض :

تم استخلاص البيوض تبعا لطريقة (4) وكما يلي :

تقطع الدودة الانثى من كلتا النهايتين ، ويسحب الرحم وينقل الى اناء يحوي على محلول هيدروكسيد الصوديوم 0.5 N NaOH يوضع على جهاز الهزاز الممغنطة megnetic stirres لمدة (10) دقائق بعدها يوضع محلول البيوض في انابيب خاصة وترسب بواسطة جهاز طرد مركزي Centrifuge يدور بسرعة 3000 د / دقيقة لمدة 5 دقائق يسكب ويضاف الى الراسب ماء مقطر وتكرر عملية الترسيب والغسل عدة مرات لازالة تاثير

محلول هيدروكسيد الصوديوم وفي المرحلة الاخيرة حضنت البيوض المستخلصة في محلول حامض الكبريتيك (H_2SO_4) N 0.1 وخزنت في درجة حرارة 4 ^{o}م ، حضنت الاعداد المطلوبة من البيوض في محلول حامض الكبريتيك 0.1N في دورق زجاجي بعد ان اضيف لها كميات قليلة جدا (10 مليغرامات) من مادتي البنسلين Pencillin والنستاتين Nystatin سدت الفوهة بالقطن ووضعت في حاضنة بدرجة حرارة 27 ^{o}م لمدة 30 يوم بالنسبة لبيوض *T.cati* اما بيوض *T. leonina* فقد حضنت البيوض بدرجة حرارة 21^{o} م لمدة 30 يوم ايضا .

تم تحديد البيوض الناضجة التي تحتوي على يرقة في الطور الثاني L_2 في 1 سم ^{3} باخذ 10 عينات عشوائية 0.01 سم^3 بعد خلط محلول البيوض باستخدام مجهر مركب نوع Olympus .

صيد القطط وجمع الديدان :

تم صيد القطط بواسطة قفص مصنع محليا من مشبك حديدي من مناطق مختلفة في محافظة بغداد ونقلت الى المختبر حيث وزنت ومن ثم حقنت بالمادة المخدرة Amyloburbitone sodium بجرعة 0.25 سم 3 / كغم داخل التجويف الخلبي ثبتت على لوحة تشريح ، وعزلت القناة الهضمية وفحصت محتويات اجزائها (المعدة ، الامعاء الدقيقة والغليظة) ثم جمعت الديدان وغسلت بمحلول الملح الفسيولوجي 0.85% Nacl عزلت الاناث وميزت استنادا الى الصفات المظهرية والبيوض حفضت في قناني صغيرة في محلول الملح الفسيولوجي ووضعت في الثلاجة 4 ^{o} م لحين الحاجة اليها .

طريقة الخمج واستخلاص اليرقات وعدها :

خمجت الفئران عن طريق الفم بعد قطع الماء عنها لفترة تقرب من 20 ساعة قبل اعطاء الجرعة بواسطة محقنة ذات نهاية مدورة معقوفة .

وتم استخلاص اليرقات من الانسجة المختلفة وذلك تبعا لطريقة (5) وكما يلي : عزلت الاعضاء المعنية وقطعت الى اجزاء صغيرة ووضعت في انابيب واضيف اليها محلول 1 % من انزيم البيسين Pepsin (ا غم مسحوق البيسين + 2 سم3 من حامض الهيدروليك HCL المخفف ويكمل الحجم الى 100 سم3 بالماء المقطر وضعت في حاضنة بدرجة حرارة 37 ^{o} م لمدة 24 ساعة فحصت بعدها باخذ 10 عينات صغيرة (0.02 سم^3) فحصت بواسطة المجهر ثم تم حساب اعداد اليرقات في الحجم الكلي الذي يحتوي العضو المعني .

النتائج

تظهر النتائج المبينة في الجدول (1) ان مستخلص الديدان *T.leonina , T. cati* بغض النظر عن طريقة اعطائها الى الفئران البيض فعال في توفير وقاية غير كاملة ضد جرعة التحدي ، افضل درجة وقاية تثيرها بيوض *T.cati* مقارنة بالسيطرة ضد جرعة التحدي المماثلة لها كانت عند اعطائها عن طريق التجويف الخلبي 80.77% ضد جرعة التحدي لنفس النوع اما في حالة افضل درجة وقاية تثيرها مستخلص ديدان *T.leonina* فكانت عند اعطائها عن طريق العضلات وضد نفس النوع من البيوض حيث بلغت 82.56% اما افضل وقاية ضد النوع الاخر فكانت عند اعطاء مستخلص ديدان *T.cati* ضد بيوض *T. leonina* وعند اعطائها عن طريق العضلات والتي بلغت 69.24% مقارنة بمجموعة السيطرة راجع الجدول (1) .

جدول (1) مقارنة معدل اعداد اليرقات المستخلصة من الاعضاء المختلفة للفئران المحقونة بجرعتين 2 ملغم + 1 ملغم من مستخلص ديدان *T.cati* و *T.leonina* عن طريق العضلات ، التجويف الخلبي ثم اعطيت جرعة تحدي challenge dose 1000 بيضة ناضجة من النوع المماثل والمغاير وقتلت بعد عشرة ايام من اعطاء الجرعة الاخيرة .

المناقشة

تشير النتائج التي تم الحصول عليها في هذه الدراسة باستخدام مستخلصات ديدان *T.cati* *T.leonina* كجرعات في العضلات والتجويف الخلبي في الفئران قبل اعطاء جرعة التحدي 1000 بيضة ناضجة لنفس النوع والنوع المغايرالى حث استجابة مناعية ادت الى اختزال في عدد اليرقات تراوحت بين 80.77% و 74.65% عندما تكون جرعة التمنيع مشابهة لجرعة التحدي لديدان *T.cati* وعند اعطاء جرع التمنيع عن طريق التجويف الخلبي والعضلات على التوالي . ان نسب الاختزال المسجلة هذه مقارنة لما حصل عليه (6) حيث حصل على نسب اختزال 33.3% – 75% عند اعطاء مستخلص الديدان المشابهة للنوع *T.cati* و 55.83 – 80.89% عند استعمال مستخلص T.leonina كما ان نسب الاختزال هذه اعلى مما سجله (7) حيث حصل على معدل نسبة اختزال بلغت 50.57 في حالة استخدام *T.cati* .

ان نتائج التمنيع باستعمال مستخلصات ديدان *T.cati* و *T. leonina* ضد جرعة التحدي لبيوض نفس النوع والنوع المغاير يدل على وجود تفاعل مشترك بين الديدان الذي انعكس بقدرة

جرعات التمنيع على اختزال عدد يرقات جرعة التحدي لنفس النوع والنوع المغاير مقارنة بمجموعة السيطرة وهذا يؤيد ما ذكره الباحثين الذين بينو وجود العديد من المكونات المستضدية المشتركة بين*T.cati* وانواع الاسكارس الاخرى مثل A- lumbricoides ، A-gulli (8 ، 9، 10 ، 11) وجود تحسس مشترك Cross – sensitization في الفئران التي منعت بمستضدات محضرة من الديدان البالغة *T.canis* ، T.cati و T.leonina وذكر (12) وجود 5 – 7 خطوط ترسيب بين مستضدات T.cati و T.leonina و A.suum مع مصل ارنب ممنع ضد الديدان البالغة (13) . ولاحظ (14) وجود تفاعل مشترك بين T.cati و T. leonina . اتضح باختزال عدد يرقات T.cati و T.leonina في اعضاء الفئران الممنعة ببيوض ويرقات (L_2) وسائل فقس البيوض والنواتج الافرازية / الابر ازية لليرقات النامية في الزجاج لاحدى الدودتين واعطيت جرعة تحدي من بيوض الدودة المغايرة لجرعات التمنيع . وبين (15) ان اليرقات في الجسم الحي تنتج مواد افرازية وابرازية قادرةعلى انتاج اجسام مضادة .

المصادر

1- Gillespie, S. H. (1993). The Clinical spectrum of human Toxocariasis, in Toxocara and Toxocariasis: Epidemiological, Clinical and molecular perspeotives ed, Lewis, J. W. & Maizels, R. M., PP. 55 - 61. Institute of Biology, London.

2- Glickman, L. T. (1993). The epidemiology of human Toxocariasis. In Toxocara and Toxocariasis: epidemiological, Clinical and molecular perspectives.

3- Lloyd, S. (1993). Toxocara Cains: The dogs in Toxocara and Toxocariasis: Epidemiological Clinical and molecular perspectives.

4- Fairbarin, D. (1957). Physiological hatching of *A. lombricoids*. Experiment and technigues in Parasitology free man and Co., san francisco pp. 20 – 23.

5- Sprent, J. F. A. (1952). On the migrotory behavior of the larvae of various ascaris species in white mice 1- Distribution of larvae in tissues J. inf. Dis. 90, 165 - 176.

6- Al-Gumaily, S. K. (1990), study of the efficiency of Voccination with different antigens from *Toxocars cati Toxascaris leonina* Thesis, university of Baghdad.

7- AL-Azzawi, S. S. M. (1989). Biological studes on *Toxocare cati* M. Sc Thesis, university of Baghdad.

8- Kegan, I. G., Norman, L. and Allais, D. (1959). Studies on the serology of visceral larvae migrans *Haemagqlu tination* and Flocculation tests with purified Ascaris antigen, journal immunlogy, 83, 297 – 301.

9- Jeska, E. L. (1967). Antigenic analysis of ametazoon parasite *Toxocare canis* II. purification and analysis of two antigenic components, Journal of immunnology, 98, 1290 - 1299.

10- Olson, L .J. (1962). Organ distribution of *T. conis* in normal mice and mice previously infected with Toxocara, Ascaris or Trichinella. Texas Report, Biology medicine, 27: 651 - 656.

11- Spernt, J. F. A. (1950). On the toxic and allergic manifestation caused by the tissues and fluids of Ascaris II. Effect of different chemical fractions on worm – free, infected and sensitized guinea pigs. J. infect Dis, 84, 146 – 158.

الوقاية% مقارنة بالسيطرة	مجموع اليرقات	الجسد	القلب	الدماغ	الطحال	الكلى	الرئتين	الكبد	جدار المعدة والامعاء	جرعة التحدي	جرعات التمنيع الاولية 2 + 1 ملغم	طريقة التمنيع	المجموعة
74.65	91	78	–	–	–	–	5	1	7	T.Cati	T.Cati	العضلات	1
69.24	127	98	–	–	–	–	3	2	24	T.Leonina	T.Cati		
82.56	72	52	–	–	–	–	2	4	14	T.Leonina	T. Leonina		
40.66	213	196	–	2	–	–	6	5	4	T.Cati	T.Leonina		
80.77	69	56	–	-	–	–	3	6	4	T.Cati	T.Cati	التجويف الخلبي	2
67.55	134	112	–	–	–	–	6	2	14	T.Leonina	T.Cati		
69.49	126	98	–	–	–	–	4	2	22	T.Leonina	T.Leonina		
47.35	189	172	–	–	–	–	7	10	–	T.Cati	T.Leonina		
–	359	348	–	3	–	–	–	8	–	T.Cati	–	السيطرة	3
–	413	84	–	–	–	4	18	65	242	T.Leonina	–	السيطرة	3
											–		

12- Al-zzubaidy, B. A. (1980). Studes on the biology of the accarid parasites of dogs and Cats, ph. D. Thesis university of North wales, Brugor. U. K.
13- Alkubaissi A. B. (2004). Study of efficiency vaccination with different antigens of *T. cati* and *T. leonina* in immunizing white mice (Balc / c) Al - Anbar J. of Agric 2: (20).
14- Al-kubassi A. B. (1992). The study of Rosistance of white mice (Babl / c) with *Toxocars cati* & *Toxascuris leonina* infection M. Sc. Thesis, university of Baghdad.
15- Maizeis, R. M., Gems, D, H. & Pace A. P. (1993). Synthesis and Secretion of TES antigens from examination by means of enzyme -; inked immunosorbeut assay of human sera for antibodies to excretory – secretory antigens of the second – stage larvae of *Toxocara canis*. Zeitschrift fur parasitentunde 69, 113 – 118.