

## تأثير استخدام الليفاميزول وفيتامين E في الاستجابة المناعية لخنازير غينيا الملقحة بلقاح الـ

## Rev-1

اسعد خلف طلال\*، عفاف عبد الرحمن يوسف\*\* ومظفر نافع الصايغ\*\*

مركز بحوث السوق وحماية المستهلك/ جامعة بغداد

\*\*كلية الطب البيطري/ جامعة بغداد

## الخلاصة

صممت هذه الدراسة لمعرفة لتأثير استخدام الليفاميزول وفيتامين E (كمحفزات مناعية) على الاستجابة المناعية لخنازير غينيا الملقحة بلقاح البروسبلا المالطية Rev-1. استخدم 48 خنزير غينيا من الإناث والذكور قسمت إلى أربع مجاميع، المجموعة الأولى أعطيت اللقاح 1 مل حاوي على  $10 \times 2^9$  خلية حية تحت الجلد مع الليفاميزول (بجرعة 10 ملغم/ كغم عن طريق الفم) قبل اللقاح بأسبوع ومع الـ لقاح وبعده بأسبوع واستمر اعطاء وهد شهرياً. أما المجموعة الثانية أعطيت اللقاح بالطريقة نفسها مع فيتامين E (بجرعة 100 ملغم/كغم) فمويًا، أعطيت المجموعة الثالثة اللقاح وحده والمجموعة الرابعة مجموعة السيطرة أعطيت 1 مل من محلول الملح الفسلجي PBS تحت الجلد. درست المعايير السريرية والمناعية كل أسبوعين ولمدة 14 أسبوعياً. أظهرت نتائج هذه التجربة ومن خلال الفحوصات السريرية ارتفاع درجات الحرارة والنبض والتنفس في المجاميع الملقحة، ولم يحصل إجهاض في الإناث الملقحة، ولم يلاحظ أي تغيير في المجموعة الرابعة (السيطرة). حفز اللقاح المناعة الخلطية والخلوية في جميع الحيوانات الملقحة، حيث أعطى اختبار الـ روزينكال نتائج موجبة طويلة فترة التجربة (كل أربع أسابيع). أما اختبار التلازن الدموي غير المباشر فقد أعطى ارتفاعاً في معدل معيار الأجسام المضادة في المجموعة الأولى 1066.66، وتلتها المجموعة الثانية والثالثة 981.33، 906.66 بفارق معنوي،  $P < 0.05$  في حين سجلت مجموعة السيطرة نتائج سالبة، أما الفحوصات المناعية الخلوية فقد أعطى اختبار فحص الحساسية الجلدي المتأخر نتائج موجبة وتفاوتت المجموعة الأولى بفارق معنوي على المجاميع الأخرى وأعطت مجموعة السيطرة نتيجة سالبة في حين اظهر اختبار الزهري E-rosette تفوق المجموعة الأولى في نسبة الخلايا اللمفية الفعالة 32% والكلية 36.54% وتلتها على التوالي المجموعة الثانية والثالثة.

### Effect of administration of Levamisole and vitamin E on the immune response for vaccinated Guinea Pigs by Rev-1 vaccine

A. K.Talal\*, A. A. Yousif\*\* and M.N. Al-Saige\*\*

\*Research center of market and consumer protection\ University of Baghdad

\*\*College of Veterinary Medicine\ University of Baghdad

#### Abstract

This experiment was designed to find out the influence of levamisole and vitamin E administration as immunopotentiater for Guinea pigs vaccinated with Brucella vaccine (Rev-1). Forty eight Guinea pigs were used (male and female) which divided into four groups as follows: First group were vaccinated with Brucella vaccine Rev-1 (1 ml contain  $2 \times 10^9$  viable bacteria) subcutaneously in addition levamisole (10 mg/ kg B.W) was given orally at a week before vaccination, with vaccination then a week after vaccination, then at monthly intervals up to the end of the experimental period; Second

group was given the vaccine at the same way of the first group with vitamin E at a dose of 100 mg / kg orally each time; Third group were given the vaccine orally, Fourth group considered as control group, and was given 1 ml of (PBS) S/C at each time. Clinical and immunological parameters studied for fourteen weeks. The results of this experiment revealed that a rise in body temperature, increase respiratory and pulse rates in vaccinated groups. no abortion was noticed in all pregnant animals while no changes were noticed in clinical signs of control group. The vaccine activated the humeral immunity in all vaccinated groups; Rose Bengal Test showed a positive results in all vaccinated groups in all times of experiment (each 4 week), while the Passive Haemagglutination Test gave a significant high level of antibody titer, in the first group 1066.66 followed the second group was 981.33 and third group 906.66 respectively, while the control group showed a negative result. Also the vaccine activate cellular immunity, the Delayed Type Hypersensitivity Test gave a positive result, on the first group which was significantly higher than the other two groups, while the control group showed negative result. E Rosette Test recorded high percentage of active 32% and total 36.54% lymphocyte; the first group showed the highest values then the second group and third group respectively. The vaccinated groups revealed a high total serum protein compared with control group, and the first group was 6.58 mg/dl significantly higher than the other two groups.

### المقدمة

يعد داء البروسيلات Brucellosis احد أهم الأمراض البكتيرية المستوطنة والمعدية والمشاركة واسعة الانتشار في العراق والأقطار المجاورة (1، 2)، ان أهم الأعراض هو الإجهاض المفاجئ الذي يحدث غالباً في الأشهر الأخيرة من الحمل (3) وخسائر الاقتصادية الكبيرة بسبب فقدان الأجنة ونقص في كمية الحليب المنتج، إضافة إلى المشاكل التناسلية الناجمة عن احتباس المشيمة والتهاب بطانة الرحم ، وما يرافقها من مداخلات نتيجة الإصابة الثانوية بجراثيم أخرى قد تؤدي إلى ضعف الإخصاب أو العقم (4، 5). استخدم لقاح Rev-1 بشكل واسع واثبت كفاءة عالية ضد الإصابة بجراثيم البروسيلات سواء على المستوى التجاري والتطبيقي الحقل (3، 6، 7)، ومن أوجه الحماية الأخرى ولزيادة المناعة المتكونة في هذه الحيوانات وللتقليل من التأثيرات الجانبية للقاح فقد وجد ان استخدام المنشطات المناعية واستخدامها مع اللقاحات مثل فيتامين E (8) والليفاميزول وفيتامين C وغيرها لها دور كبير في زيادة الاستجابة المناعية وإعطاء المضيف القدرة على مقاومة الإصابة بالجراثيم (9). ان لفيتامين E دور مهم وأساسي في تحفيز المناعة لكونه من أفضل المضادات الطبيعية للأكسدة في الجسم مما يؤدي إلى المحافظة على أغشية الخلايا للمفاوية والخلايا البلعمية (10)، كذلك يعمل على زيادة مقاومة الجسم من الإصابة بكثير من الأمراض. كذلك وجد ان عقار الليفاميزول يستعمل كمنشط مناعي فضلاً عن فعاليته كمضاد للديدان (11) حيث يعطي الليفاميزول لتشجيع الجهاز المناعي على الاستجابة المناعية بصورة غير نوعية أو غير محددة للمستضد وظهر انه يوفر نتائج جيدة عندما يعطى مع اللقاحات الفايروسية والبكتيرية (12). صممت هذه الدراسة لمعرفة تأثير الليفاميزول وفيتامين E كمحفزات مناعية على الاستجابة المناعية الخلوية والخلوية في الحيوانات المختبرية (خنازير غينيا) الملقحة بلقاح Rev-1.

### المواد وطرائق العمل

- اللقاح: استعمل لقاح *Brucella melitensis* strain Rev-1 والمنتج من شركة CZ Veterinaria, Spain. الاسبانية تم الحصول عليه من الشركة العامة للبيطرة.

- فيتامين E: استعمل فيتامين E المنتج من شركة يوفيدكو الأردنية (UVEDCO-E<sup>R</sup>) فيتامين E بشكل الفاتوكوفيرول.

- الليفاميزول: استعمل عقار الليفاميزول المنتج من شركة يوفيدكو الأردنية.

#### - المستضدات Antigens

1. مستضد اختبار الروزينكال **Rose Bengal Antigen**: جُهِز من قبل معهد المصول واللقاحات في بغداد- وزارة الصحة إذ يتكون من عالق جرثومة البروسيل المجهضة *Brucella abortus* Wye Bridge strain 99 المقتول بواسطة الحرارة والفينول بتركيز 0.5% ومعامل بداريء حامضي ليصبح الأس الهيدروجيني pH 3.65 ومن ثم تم ربطها بصبغة الروزينكال *Rose Bengal Stain*.

2. مستضد البروسيل **Brucella antigen**: استخدمت جرثومة *Brucella melitensis* (العترة الناعمة) لتحضر مستضد البروسيل وحسب طريقة (13)، واستخدم في الاختبار الجلدي وفي اختبار فحص التلازن الدمى المنفعل *Passive Heaagglutination Test*، تم قياس محتوى البروتين بطريقة بيوريت وكانت 2.4 غم/ 100 مل، ثم خفف لنحصل على تركيز 200µg ثم حفظ العينة بدرجة حرارة 4م°.

#### - تصميم التجربة:

**الحيوانات المختبرية - خنازير غينيا** : استخدمت خنازير غينيا من كلا الجنسين والبالغ عددها 48 حيواناً كانت أوزانها بين 650-1000 غم، غذيت على العلف المركز والأعلاف الخضراء الجت والحشائش وتركت لمدة 30 يوماً قبل بدء التجربة لغرض تأقلمها مع الظروف الجديدة ، وأجريت الفحوصات المصلية اللازمة للتأكد من خلوها من مرض البروسيل وفحص البراز للتأكد من خلوها من الأمراض الطفيلية ، ثم قسمت إلى أربع مجاميع متساوية (12 في كل مجموعة):

**المجموعة الأولى** : (مجموعة اللقاح والليفاميزول) حقنت حيوانات هذه المجموعة بلقاح البروسيل الماطية Rev-1 بجرعة 1مل تحت الجلد والحاوية على  $2 \times 10^9$  خلية حية. وقد أعطيت الليفاميزول كمنشط مناعي عن طريق الفم بجرعة 10 ملغم/ كغم من وزن الجسم قبل أسبوع من إعطاء اللقاح وجرعة أخرى مع اللقاح وبعد أسبوع من إعطاء اللقاح واستمر إعطاء الليفاميزول شهرياً لحين انتهاء التجربة.

**المجموعة الثانية** : (مجموعة اللقاح وفيتامين E أعطيت لقاح البروسيل الماطية Rev-1 بنفس الجرعة بالإضافة إلى إعطائها فيتامين E عن طريق الفم بجرعة 100 ملغم/ كغم من وزن الجسم، وبعدة جرعات الأولى قبل إعطاء اللقاح بأسبوع والثانية مع اللقاح والثالثة بعد إعطاء اللقاح بأسبوع، وبعدها استمر إعطاء الفيتامين شهرياً إلى نهاية مدة التجربة.

**المجموعة الثالثة**: (مجموعة اللقاح) حقنت بلقاح البروسيل الماطية Rev-1 فقط بنفس الجرعة.

**المجموعة الرابعة**: (مجموعة السيطرة) أعطيت 1 مل من محلول الملح الفسليجي PBS المعقم تحت الجلد.

فحصت الحيوانات يومياً لتثبيت درجة حرارة الجسم ومعدل ترداد التنفس ومعدلات النبض قبل التلقيح ولمدة

ثمانية أيام بعد التلقيح، وسجلت الملاحظات مثل الشهية، التبرز، التبول.

- **المناعة الخلوية**: قيمت الاستجابة المناعة الخلوية في خنازير غينيا باستخدام الاختبارات، بعد جمع 2-5 مل من الدم من القلب مباشرة أنابيب بلاستيكية لا تحتوي على مانع تخثر وفي اليوم الثاني وضعت أنابيب الدم في المنبذة بسرعة 3000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق، فصل بعد ذلك المصل، وقسم كل نموذج إلى قسمين وحفظت المصول جميعها بدرجة حرارة -20 م° لحين إجراء الفحوصات عليها جمعت العينات قبل البدء بالتجربة O.time وبعد 2، 4، 6، 8، 10، 12، 14 أسبوعاً.

أ. فحص الروز بنكال **Rose Bengal Plate Test (RBPT)**: اجري الاختبار حسب طريقة (14).

ب. اختبار التلازن الدمى المنفعل **Passive Haemagglutination Test (PHT)**: اجري هذا الاختبار حسب طريقة (15).

- المناعة الخلوية: قيمت الاستجابة المناعية الخلوية باستخدام الاختبارات الآتية:

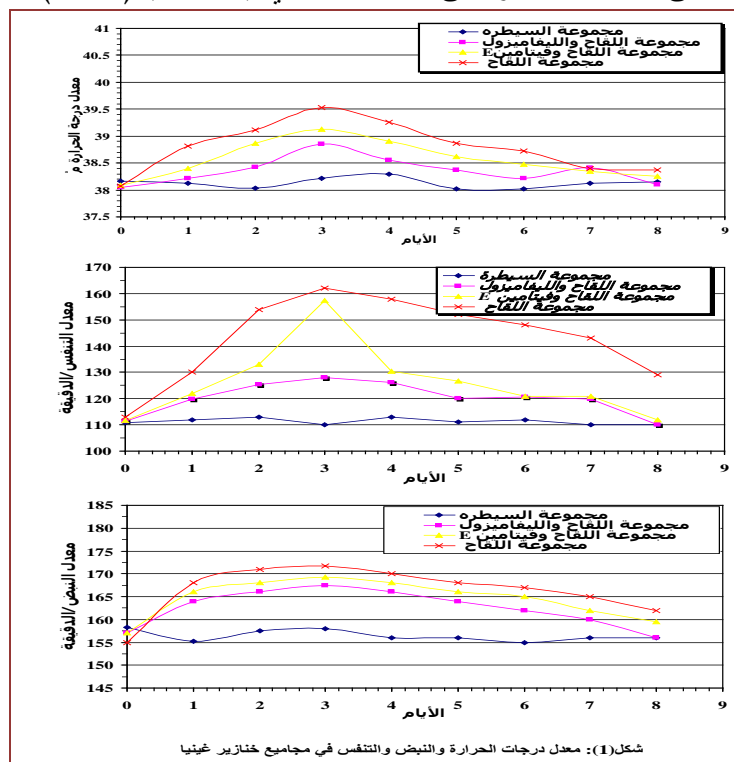
أ. الاختبار بالطريقة الزهرية **E-Rosette Test**: اجري الاختبار حسب الطريقة التي ذكرها (16).

ب. اختبار الحساسية الجلدي المتأخر **Delayed Type Hypersensitivity Test**: اجري الاختبار حسب طريقة (17) بعد ثلاثة أسابيع من إعطاء اللقاح باستعمال مستضد البروسلين المحقون في الأدمة وبتركيز  $200\mu\text{g}$ .

- قياس البروتين الكلى في مصل الدم: استعملت طريقة (18) لقياس البروتين الكلى في مصل الدم.

### النتائج

- **الفحوصات السريرية** : كانت جميع الحيوانات طبيعية، درجة الحرارة والتنفس والنبض كانت ضمن الحدود الطبيعي قبل التلقيح وأصبحت حيوانات المجاميع الملقحة كافة بعده خاملة ومتجمعة مع بعضها ، ثم رجعت تدريجياً إلى وضعها الطبيعي، ولم يلاحظ تكون أي خراج في موقع الحقن بالإضافة إلى عدم ظهور أي تضخم في الخصى ، أو البربخ عند المعاينة أو الجس اليدوي لها حتى نهاية التجربة، جميع الإناث المحقونة باللقاح المستورد ولدت بصورة طبيعي ولثنت الأجنة حية. لوحظ زيادة في درجات الحرارة في المجاميع الملقحة حيث أظهرت المجموعة الثالثة وجود اختلافات معنوية ( $P<0.05$ ) مع المجموعتين الأولى ، والثانية ومجموعة السيطرة، وحصلت زيادة في معدل ترداد التنفس في الحيوانات الملقحة حيث وصل أعلى معدل بعد مرور ثلاثة أيام في المجاميع الأولى والثانية ، والثالثة على التوالي ، وبفارق معنوي مع مجموعة السيطرة، أما معدل ترداد النبض حيث وصل أعلى معدل له بعد مرور ثلاثة أيام ولوحظ ان مجموعة اللقاح سجلت فارق معنوي على باقي المجاميع الملقحة وعلى مجموعة السيطرة على المستوى المعنوي ( $P<0.05$ ) (شكل 1).



- الفحوصات المناعية:

**فحص الروز بنكال:** أظهرت نتائج فحص الروز بنكال نتائج سالبة (-ve) لجميع خنازير غينيا قبل البدء بالتجربة (0-Time)، وبعد إعطاء اللقاح للمجاميع الثلاث أعطى الفحص نتيجة موجبة طويلة فترة التجربة (كل أربع أسابيع)، أما مجموعة السيطرة فأعطت نتائج سالبة.

**فحص التلازن الدمى المنفعل:** لوحظ حصول ارتفاع في مستوى الأجسام المضادة لجميع المجاميع خلال أسابيع التجربة ماعدا مجموعة السيطرة. لم يلاحظ وجود فروقات معنوية بين المجاميع الثلاث وعلى مستوى المعنوية ( $P < 0.05$ ) في الأسبوع الثاني، ولكن في الأسبوع الثالث ظهرت وجود فروقات معنوية بين المجاميع الثلاث واستمرت حتى الأسبوع الثاني عشر جدول (1).

**جدول (1) معدل المعيار الحجمي للأجسام المضادة بفحص التلازن الدمى المنفعل لخنازير غينيا**

المجاميع	الأولى	الثانية	الثالثة	الرابعة
الأسابيع	اللقاح والريغاميرون	اللقاح وفيتامين E	اللقاح	السيطرة
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	-ve	-ve	-ve	-ve
2	618.66±91.64a	554.66±73.62a	533.33±88.19a	-ve
4	789.33±86.05a	714.66±114.28b	544.00±98.97c	-ve
6	853.33±72.77a	688.00±123.26b	629.33±107.76b	-ve
8	1066.66±147.17a	981.33±136.86b	906.66±117.29c	-ve
10	938.66±123.39a	810.66±77.18 b	768.00±76.10c	-ve
12	597.33±79.30a	565.33±128.75b	541.33±121.23c	-ve
14	554.66±69.27a	466.66±125.89b	465.33±124.89b	-ve

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير إلى وجود فروقات معنوية على مستوى  $P < 0.05$

- النسبة المئوية للخلايا اللغافية نوع (T) الفعالة في خنازير غينيا: حصلت زيادة في نسبة الخلايا اللغافية الفعالة في المجموعة الأولى حيث بلغ أعلى معدل في الأسبوع الثامن بمعدل 32%، أما في المجموعة الثانية وصل إلى 29.29% في الأسبوع الثامن، أما مجموعة اللقاح فقد سجلت أعلى معدل في الأسبوع السادس حيث وصل إلى 27.91%. لوحظ وجود فروقات معنوية بدأت في الأسبوع الثاني للتجربة بين المجاميع الأربعة واستمرت إلى نهاية التجربة جدول (2).

**جدول (2) النسب المئوية للخلايا اللغافية نوع (T) الفعالة المكونة الشكل الزهري**

المجاميع	الأولى	الثانية	الثالثة	الرابعة
الأسابيع	اللقاح والريغاميرون	اللقاح وفيتامين E	اللقاح	السيطرة
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	2.54±0.29 a	2.45±0.40 a	2.41±0.38 a	2.12±0.35 a
2	23.08±1.06 a	19.95±0.35 b	17.16±0.47c	2.33±0.30 d
4	30.33±0.19 a	27.70±0.52 b	26.83±0.47 b	2.75±0.199 c
6	31.54±0.37 a	28.95±0.64 b	27.91±0.76 b	2.79±0.18 c
8	32.00±0.52 a	29.29±0.61 b	27.41±0.77 c	2.41±0.23 d
10	31.16±0.54 a	28.54±0.71 b	25.91±0.58 c	2.12±0.29 d
12	31.58±0.65 a	28.12±0.989 b	24.91±0.67c	2.29±0.26 d
14	29.75±0.62 a	26.33±0.85	22.83±0.76 c	2.12±0.34 d

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير إلى وجود فروقات معنوية على مستوى  $P < 0.00.05$ .

- النسب المئوية للخلايا اللمفية نوع (T) الكلوية في خزائير غينيا : لوحظ وجود زيادة في نسب الخلايا اللمفية نوع (T) في المجاميع الملقحة، والمعاملة بالمنشطات عند الأسبوع الثاني سجلت المجموعة الأولى أعلى معدل في الأسبوع الرابع والعاشر حيث بلغت 36.54% وتلتها المجموعة الثانية بمعدل 31.50% في الأسبوع الثامن، أما المجموعة الثالثة سجلت أعلى معدل في الأسبوع الثامن حيث كانت 30.5%. ويلاحظ من خلال الفحوصات الإحصائية وجود فروقات معنوية ( $P<0.05$ ) بين المجاميع حيث يلاحظ تفوق المجموعة الأولى على المجاميع الأخرى خلال فترة التجربة تلتها المجموعة الثانية، جدول (3).

جدول (3) يبين النسبة المئوية (%) للخلايا اللمفاوية الكلوية نوع (T) المكونة الشكل الزهري

المجاميع	الأولى	الثانية	الثالثة	الرابعة
الأسابيع	اللقاح والليفايميزول	اللقاح وفيتامين E	اللقاح	السيطرة
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	4.58±0.29a	4.33±0.38a	4.58±0.17a	3.79±0.27a
2	26.95±0.92a	22.08±0.33b	20.16±0.24c	3.91±0.26d
4	36.54±0.38a	30.29±0.46b	29.16±0.42b	4.41±0.29c
6	35.25±0.34a	31.00±0.53b	29.87±0.74c	4.41±0.26c
8	36.12±0.49a	31.50±0.58b	30.50±0.60b	4.08±0.31d
10	35.83±0.35a	30.87±0.65b	28.33±0.47c	3.79±0.36d
12	35.50±0.23a	30.83±0.95b	27.50±0.60c	3.95±0.27d
14	33.41±0.59a	28.50±0.85b	25.12±0.79c	3.75±0.48d

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير إلى وجود فروقات معنوية على مستوى  $P<0.05$ .

- فحص الحساسية الجلدي المتأخر لخزائير غينيا: اظهر اختبار فحص الحساسية الجلدي المتأخر في المجاميع الأولى، الثانية والثالثة نتيجة موجبة للتفاعل ، لم تظهر مجموعة السيطرة أي تفاعل ضد مستضد البروسلين حيث أعطت نتيجة سالبة، أظهرت الفحوصات الإحصائية وجود فروقات معنوية بين المجاميع الثلاثة على مستوى المعنوية ( $P<0.05$ ) في قطر منطقة الاحمرار، وسمك الجلد (جدول (4)).

جدول (4) يبين نتائج الحساسية الجلدي في خزائير غينيا

المجاميع		قطر منطقة الاحمرار(مم)		فرق سمك الجلد (مم)
		بعد 24 ساعة	بعد 48 ساعة	بعد 24 ساعة
المجموعة الأولى اللقاح والليفايميزول		7.41±0.28a	6.37±0.30a	2.37. ±0.13b
المجموعة الثانية اللقاح وفيتامين E		6.37±0.48b	4.91±0.34b	1.75±0.17a
المجموعة الثالثة اللقاح		5.20±0.23c	3.66±0.14c	1.25±0.14c
مجموعة السيطرة		-	-	-
PBS		-	-	-

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير إلى وجود فروقات معنوية على مستوى  $P<0.05$ .

- بروتين مصد الدم الكلي: لوحظ حدوث زيادة في تركيز بروتين مصد الدم الكلي في المجاميع الملقحة حيث بلغ أعلى معدل في المجموعة الأولى عند الأسبوع العاشر حيث وصل إلى 6.58 ملغم/100سم<sup>3</sup>. ولكن في الأسبوع السادس لوحظ وجود فرق معنوي بين المعاملات الأربعة واستمر حتى نهاية التجربة بتفوق المجموعة الأولى تلتها المجموعة الثانية ثم المجموعة الثالثة والسيطرة (جدول (5)).

جدول (5) يبين نتائج قياس بروتينات مصلى الدم الكلية غم/100 سم3

المجاميع الأسابيع	الأولى اللقاح والليفاميزول	الثانية اللقاح وفيتامين E	الثالثة اللقاح	الرابعة السيطرة
	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل	الخطأ القياسي ± المعدل
0	4.92±0.13 a	4.93±0.13 a	4.77±0.11a	4.89±0.13a
2	5.45±0.11 a	5.62±0.08 a	5.04±0.09b	4.90±0.14b
4	5.73±0.12 a	5.99±0.12 a	5.16±0.10b	4.92±0.12b
6	6.48±0.10 a	5.58±0.09 b	5.26±0.10c	4.95±0.07d
8	6.40±0.08 a	5.91±0.07 b	5.39±0.10c	4.84±0.08d
10	6.58±0.08 a	6.44±0.10 a	5.45±0.09b	4.84±0.11c
12	6.36±0.10 a	5.87±0.13 b	5.40±0.10c	4.80±0.09d
14	6.37±0.08 a	5.85±0.05 b	5.44±0.08c	4.81±0.08d

الحروف المختلفة ضمن السطر الواحد تشير إلى وجود فروقات معنوية على مستوى  $P < 0.05$ .

### المناقشة

- **الفحوصات السريرية:** سريرياً لم يلاحظ علامات الإجهاد على الحيوانات التي أعطيت منشطات مناعية مقارنة مع مجموعة اللقاح وهذا ما أثار في العلامات السريرية من درجة الحرارة ومعدل التنفس والنبض حيث لوحظ حصول ارتفاع في معدل درجات الحرارة والنبض والتنفس بعد التلقيح وكانت أعلى المعدلات في مجموعة اللقاح وعادت إلى وضعها الطبيعي بعد مرور أربعة أيام، وهذا يتفق مع ما لاحظته (18). ان انخفاض معدلات المعايير السريرية في المجموعتين المعاملتين بالمنشطات المناعية مع اللقاح يعود إلى ان المنشطات المناعية أدت إلى رفع الاستجابة المناعية وعملت على حماية الجسم من عوامل الإجهاد مقارنة بالمجموعتين التي أعطيت اللقاح فقط والتي ظهرت عليها عوامل الإجهاد وهذا ما أكدته (19، 20).

### - الاختبارات المناعية

**المناعة الخلوية:** يمتاز اختبار الروزينكال الذي يستخدم للاستدلال على الأجسام المضادة المتكونة بعد الإصابة، أو التلقيح بجراثيم البروسيليا بسرعة إجرا (14، 22). كانت نتائج فحص مصول خنازير غينيا في المجاميع الثلاث جميعها موجبة، وهذا يدل على تكوين الأجسام المضادة بعد إعطاء اللقاح، حيث ان هذا الاختبار يكشف عن وجود الكلوبولينات المناعية ولاسيما النوع Igm المتغلبة بعد التلقيح بلقاح Rev-1، فضلاً عن ان الداريء الحامضي لمستضد الروزينكال يزيد من فعالية الأجسام المضادة الخاصة بالبروسيليا ويقال من حساسية الأجسام غير الخاصة، جاءت نتائج هذا الاختبار متفقة مع العديد من الدراسات (23، 24). واستمرت نتيجة الاختبار الموجبة طوال مدة الدراسة البالغة 14 أسبوعاً وهذا يتفق مع ما أشار إليه (24) على ان فحص الروزينكال قد يعطي نتائج موجبة لمدة 5 أشهر بعد تلقيح الحيوانات. كما اظهر اختبار التلازن الدمى المنفعل PHT على مصول الحيوانات في المجاميع الثلاث الملقحة نتائج موجبة وكان الاختلاف في المجاميع التي أعطيت المنشطات المناعية (فيتامين E والليفاميزول) عنه في المجموعتين الملقحة والسيطرة. إن مادة الليفاميزول المستخدمة في هذه الدراسة أدت إلى تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية وأظهرت معياراً عالياً من الأضداد، فقد جاءت النتائج متفقة مع الجاف (26) حول استخدام مادة اللفاميزول مع لقاح ضد السل BCG في خنازير غينيا والذي أدى إلى ازدياد المناعة الخلوية، واتفقت أيضاً مع فعل (27) الذي لاحظ ارتفاع معيار الأجسام المضادة في الأرناب الممنعة بلقاح جراثيم الباستريولا مالتوسيدا مضافاً إلى ذلك إعطاء مادة التتراميزول. كما وجاءت النتائج متفقة مع ما أشار إليه (28) من ان لفيتامين E القدرة على رفع مستوى الأضداد بالدم من خلال عمله كمنظم للمدورات الخلوية Lymphokinas مما يؤدي إلى تحفيز ونضوج خلايا (B) اللمفية في الدم. ومع ما أشار إلي هـ (29) من ان

فيتامين E يعمل على زيادة الاستجابة المناعية الخلوية. أما (30) فقد أكد ان زيادة الأضداد تكون من خلال زيادة عدد خلايا (B) اللمفية، وزيادة تكاثر خلايا البلازما، وأكد (31) من ان فيتامين E يعمل مادة محفزة غير نوعية عند خلطة مع اللقاحات.

**المناعة الخلوية:** الملاحظ ان المجاميع الثلاث لخنازير غينيا الملقحة بلقاح Rev-1 قد أعطت تفاعلاً جلدياً مميزاً في حين لم تظهر مجموعة السيطرة أي تفاعل جلدي. ان النتيجة الموجبة لهذا الاختبار جاءت كنتيجة لتحفيز المناعة الخلوية في الحيوانات الملقحة، وهذا يتطابق مع الدراسات التي استخدم فيها لقاح Rev-1 وأعطت نتائج موجبة لاختبار الحساسية الجلدي المتأخر (32، 33) مضافاً إلى ذلك ان العترة المستخدمة التي استخلص منها هذا المستضد هي عترة ملساء ومن المعروف ان العترة الملساء تعطي استجابة مناعية قوية نسبياً عند استخدامها في الفحص الجلدي مقارنة مع العترة الخشنة وهذا يتفق مع ما أشار إليه (34، 35) وباستخدام هذا الاختبار لوحظ تفوق في سمك الجلد، وقطر منطقة الاحمرار في المجموعة التي أعطيت اللقاح مع الليفاميزول حيث بلغ سمك الجلد  $2.37 \pm 0.13$  و قطر الاحمرار  $7.41 \pm 0.28$  بعد 24 ساعة من حقن المستضد حيث تطابقت النتائج مع (36)، حيث ان مادة الليفاميزول قد زادت من تفاعلات الحساسية الجلدية من خلال تحفيزها اكبر عدد من الخلايا اللمفاوية نوع (T) التي تلعب دوراً مهماً بأفراز المدورات اللمفية Lymphokine المختلفة، حيث ان المدورات اللمفية المفرزة تجذب الخلايا وحيدة النواة وخلايا البلاعم الكبيرة للمنطقة وان وجود الخلايا اللمفية في المنطقة، مما يؤدي إلى زيادة في سمك الجلد، أما التفاعل الجلدي الموجب الذي ظهر في حيوانات المجموعة الثانية فقد يدل على كون تلك المادة محور غير نوعي للجهاز المناعي قادرة على جعل الاستجابة المناعية الخلوية في هذا الاختبار اشد وأسرع وهذا يتفق مع ما وجده (28).

من النتائج التي تم التوصل إليها في هذه الدراسة بان لهادة الليفاميزول وفيتامين E تأثير ملحوظ على مستوى الخلايا اللمفية نوع T الفعالة والكلية، حيث كانت النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية نوع T الفعالة والكلية المكونة للشكل الزهري مرتفعة في دم خن ازير غينيا حيث أعلى ارتفاع في المجموعة الأولى والثانية  $32.00 \pm 0.52$ ،  $29.29 \pm 0.61$  (الفعالة في الأسبوع الرابع) على التوالي وبلغ أعلى ارتفاع في المجموعة الأولى والثانية  $36.54 \pm 0.38$   $31.50 \pm 0.58$  (الكلية في الأسبوع الثامن) على التوالي، واستمر الارتفاع حتى الأسبوع الثامن، ولكن المجموعة الأولى أظهرت تفوق معنوي وقد لوحظ ازدياد النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية نوع T الفعالة والكلية باستخدام مادة الليفاميزول أكثر مما هي علي هفي المجاميع الأخرى تلتها المجموعة الثانية، حيث ان مادة الليفاميزول تشبه في طريقة تأثيرها على الاستجابة المناعية لهرمون الغدة الزعترية Thymic hormone مسببة زيادة في تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية. جاءت النتائج متفقة مع (8، 16، 37، 38، 39). وجاءت النتائج متفقة مع (40) في دراسته حيث لاحظ ان إعطاء مادة التتراميزول مع العلاج للمرضى المصابين بالترن الرئوي يسبب ارتفاع في النسبة المئوية للخلايا اللمفاوية نوع (T) الفعالة، والكلية لمدة شهرين بعد إيقاف العلاج بالتتراميزول على حين كانت هذه النسبة منخفضة في مرضى الترن الرئوي الذين اخذوا العلاج المتعدد من دون التتراميزول، ومع كل ما لاحظته (27، 41).

**البروتين الكلي:** أما بالنسبة لمستوى البروتين فقد أعطت النتائج ارتفاع في جميع المجاميع الملقحة مع تفوق المجموعة الأولى وتلتها الثانية، ويلاحظ ان التوافق في الزيادة بمستوى البروتين الكلي مع الزيادة بمعيار الأضداد قد يعزى إلى الزيادة بمستوى الأضداد بالدم بعد التحفيز المناعي وهذا ما أكدته (42) الذي لاحظ زيادة بمستوى البروتين في دم الحيوانات المعاملة بالليفاميزول وهذه الزيادة قد تكون نتيجة زيادة الكلوبولينات المناعية فضلاً عن زيادة امتصاص المواد الغذائية من الأمعاء.

## References

1. FAO. (2003). International Research conference including the 56<sup>th</sup> Brucellosis Research conference. September 15-17, University of Navarra, Pamplona (Spain).
2. Seleem, M. N.; Boyle, S. M. & Sriranganathan, N. (2009). Brucellosis: a re-emerging zoonosis. *Vet. Microbiol.*, 140(3-4):392-398.
3. Samadi, A.; Ababneh, M. M.; Giadinis, N. D. & Lafi, S. Q. (2010). Ovine and Caprine Brucellosis (*Brucella melitensis*) in Aborted Animals in Jordanian Sheep and Goat Flocks. *Vet Med Int.*, 28:458-695.
4. Garrido, F.; Duran, M.; MacMillan, A.; Minas, A.; Nicoletti, P. & Vecchi, G. (2001). Brucellosis in sheep and goats (*Br. Melitensis*). European commission, Report of Scientific committee on animal health and animal welfare.
5. Bunn, C. (2003). Eradication of bovine Brucellosis in Australia. *Vet. Sci. Edu. Au. Avhs. Milestone*, P. 17.
6. Cornille, Y. (1995). The Rev-1 vaccination plane for sheep in the province- Alpes-Cote D'Azur (PACA) area pre request for successful eradication of *Brucella melitensis*, FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev-1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA, Alfort, PP: 27-36.
7. Galindo, R. C.; Muñoz, P. M.; de Miguel, M. J.; Marin, C. M.; Blasco, J. M.; Gortazar, C.; Kocan, K. M. & de la Fuente, J. (2009). Characterization of possible correlates of protective response against *Brucella ovis* infection in rams immunized with the *B. melitensis* Rev 1 vaccine. *Vaccine (jou)*. May 18;27(23):3039-3044.
8. Mahalingam, D.; Radhakrishnan, A.; Amom, K.; Ibrahim, Z. & Nesaretnam, N. (2011). Effects of supplementation with tocotrienol-rich fraction on immune response to tetanus toxoid immunization in normal healthy volunteers. *Eur. J. Clin. Nutr.*, 65 (1): 63-69.
9. Morigochi, S. & Muraga, M. (2000). Vitamin E and Immunity. *Vitamins and hormones.*, 59:305-336.
10. Zubary, G. (2001). Lipid soluble vitamin in biochemistry. 3<sup>rd</sup> ed., W. M. Cbrown Pub oxford England 1:301.
11. Demicrt, F.; Ziya, B.; Murat, K.; Yavuz, C. & Lkay, K. (2005). Immunomodulatory effects of HBs Ag vaccine and Levamisole in chronic hepatitis B and hepatitis B carrier children. *Turk. J. Gastroenterol.*, 16(4):188-193.
12. Laurence, D. R. & Bennett, P. N. (1991). *Clinical pharmacology*. 7<sup>th</sup> ed. Churchill Invingstone. P. 628.
13. Bercovich, Z.; Eger, A.; Dekker, T. & Haagsma, J. (1995). Production of *Brucella* allergens and evaluation of their biological activity in a Guinea pigs Bio assay. *J. Vet. Med. B.*, 42:19-27.
14. Morgan, W. J. (1967). The serological diagnosis of bovine brucellosis. *Vet. Rec.*, 80: 612-620.
15. Boyden, S. V. (1951). Fixation of bacterial products by erythrocytes treated with tannic acid and subsequent heamagglutination by anti-protein sera. *J. Exp. Med.*, 93-107.
16. Braganza, C. M.; Stathopoulos, G.; Davis, A. J. S.; Elliott, E. V. & Kerbel, R. S. (1975). Lymphocyte erthrocyte rosettes as indicators of the hetrogeneity of lymphocytes in a variety of mamilan species cell., 4:103-106.
17. Bacharach, G.; Banai, M.; Bardenstein, S.; Hoida, G.; Genizi, A. & Bercovier, H. (1994). The Bearing of delayed- type hypersensitivity in *Brucella melitensis*- Sensitized Guinea pigs. *Infect. Immun.*, 62 (12): 5361-5366.
18. Henry, R. J.; Carnnon, D. C. & Winkelman, J. W. (1974). *Clinical chemistry, principles and techniques*. 2<sup>nd</sup> ed. Harper and Row com.
19. الصوفي، ليث عبد المجيد عبد الخالق. (2001). التغيرات المرضية المصاحبة لخمج البروسيلة المجهضة في خنازير غينيا الممنعة بلقاح اريف Rev1 المنتج محليا. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
20. Haden, J. W. (1994). T. cell adjuvant. *J. Immunopharmacol.*, 16: 705-710.
21. Politis, I.; Hidiroglon, M.; Batra, T. R.; Gilmore, J. A.; Gorewit, R. C. & Soherf, H. (1995). Effects of vitamin E on immune function of dairy cows. *Am. J. Vet. Res.*, 56 (2): 179-184.
22. Killer, J.; Marra, R. & Mortin, W. (1976). Brucellosis on Ontario, a case control study, *Cand. J. Comp. Med.*, 40: 119-129.

23. Alton, G. G.; Jones, L. R.; Angus, A. C. & Verger, L. (1988). Techniques for the Brucellosis Laboratory Institute National del Research Agronawigue 147, Rue de I: Universite, 7500 Paris. P. 190.
24. سليلس، سفيان صالح سلمان . (1998). تقييم كفاءة الاختبارات المصلية المستخدمة للكشف عن داء البروسيلات في الحيوان. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
25. Herr, S.; Basman, P. P.; Ehred, W. J. & Pielerson, P. M. (1986). Brucellosis serology, Reduced dose (S19) Vaccination of Yearling heifers Versus the use of in a dairy herd. J. South Africa. Vet. Assoc., 30: 215 – 219.
26. الجاف، ماجد حسن محمود . (1988). دراسة الاستجابة المناعية لجراثيم *Mycobacterium bovis*. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
27. فعل، طارق جعفر . (1985). دراسة تأثير التتراميزول على الاستجابة المناعية لجراثيم *Pasteurella mutocida*. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
28. Watson, R. R. (2000). Vitamin E and the immune system in Encyclopedia of immunology (Delves, P. J. and Raitt, I. M., Eds.), 2<sup>nd</sup> ed. Academic Press Comp. USA., 4: 2500-2501.
29. Daniels, J. T.; Hatfield, P. G.; Bargess, D. E.; Kott, R. W. & Bowman, J. G. P. (2000). Evaluation ewe and lamb immune response when ewes were supplemented with vitamin E. J. Anim. Sci., 78:2731-2736.
30. Grdinis, N.; Koptopouds, G.; Roubies, N.; Siarkau, V. & Papasteriades, A. (2000). Selenium and vitamin E effect on antibody production of sheep vaccinated against enzootic abortion (*Chlamydia psittaci*). Comp. Immunol. Microbiol. and Infect. Dis., 23(2): 129-137.
31. Tengerdy, R. P. & Lacetera, N. (1991). Vitamin E adjuvant formulation in mice. Vaccine, 9: 204-206.
32. Bercovich, Z.; Haagsma, J.; Vanlipzig, J. & Taaijre, R. (1993). Specificity of the skin delayed type hypersensitivity test in Brucellosis free cattle tested with Brucella allergen. J. Vet. Med., 40:582-588.
33. Plommet, M. (1995). Live vaccines: virulence immunogenicity protection and safety: Historical the oretical and practical considerations applied to the *Bruceella melitensis* Rev-1 vaccine. FAO/WHO/OIE round table on the use of Rev-1 vaccine in small ruminants and cattle. CNEVA-ALfort, France (1995). PP. 7-18.
34. الزبيدي، إبراهيم عبد الحسين . (2007). تحضير وتجربة مستضد مستخلص من بعض عثر البروسيلات اللقاحية أطروحة دكتوراه - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
35. Bercovich, Z.; Guler, L.; Baysal, T.; Schreuder, B. E. C. & Zijderveld, F. G. V. (1998). Evaluation of the currently used diagnostic procedure for the detection of *Br. Melitensis* in Sheep. Small Rum. Res., 31:1-6.
36. حمزة، أسيل محمد. (2002). دراسة مقارنة لكفاءة البروسيلينات المحضرة محلياً في الكشف عن مرض البروسيلوسيز . رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
37. الفتلي، فيصل سامي. (1997). عزل العامل الناقل ودراسة المناعة الخلوية ضد جراثيم البروسيلات المالطية في خنازير غينيا. رسالة ماجستير - كلية الطب البيطري - جامعة بغداد.
38. Grewal, H. S.; Rouse, B. T. & Babiuk, I. A. (1976). Erythrocyte Rosette. A marker for Bovine T cells. Cand. J. Comp. Med., 40(3): 298-305.
39. Noboro, T.; Miyawaki, T.; Moriya, N.; Nagaoki, T.; Kato, E. & Okuda, N. (1977). Mitogenic responsiveness and monocyte-lymphocyte interaction of early and Late rosette forming cell population of human peripheral lymphocytes. J. Immunol., 118 (1): 193-197.
40. Yasseen, N. Y. (1979). Trial of immunopotentiality by levamisole in patients with pulmonary Tuberculosis. M. Sc. Thesis, Baghdad University. The College of Medicine.
41. Verhaegen, H.; Decree, J. & Decock, W. (1977). Restoration by levamisole of low E. rosette forming cells in patients suffering from various diseases. Indian. Vet. J., 64: 456-462.
42. Sanjaya, K.; Catherin, E.; Dewey, A.; Robert, A. G.; Mand, A. & Sandi, A. A. (1999). Improved Weight gain in pigs using Levamisol as Immunomodulator. J. Swine Health Prod., 30:738-740. (Abst.).