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

تأثير تمنيع الأرانب المختبرية المخمجة بطفيلي *Giardia lamblia* بالمستضد (O) المنقى من البكتريا *Escherichia coli* على بعض المعايير المناعية

معروف سبتي جمعة العماش[1]*، أيسر صالح محمد السامرائي [2]

1 قسم التحليلات المرضية، كلية العلوم التطبيقية، جامعة سامراء، العراق

2 قسم علوم الحياة، كلية التربية، جامعة سامراء، العراق

https://doi.org/10.54153/sjpas.2023.v5i1.447

CC BY

معلومات البحث:

تأريخ الاستلام: 2023/01/16

تأريخ القبــول: 2023/02/28

الكلمات المفتاحية:

Giardia lamblia ، *O-Antigen* ، *الاستجابة المناعية*

معلومات المؤلف

الايميل: ebnbaz87@gmail.com

الموبايل:07714234494

الخلاصة:

أجريت هذه الدراسة للمدة من بداية شهر كانون الاول 2021 ولغاية نهاية كانون الاول 2022 وقد تضمنت متابعة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي Outer Membrane Proteins (OMPs) والمنقاة من بكتريا *Escherichia coli* على الإستجابة المناعية في (45) من ذكور الارانب البيضاء المختبرية، 15 منها استحدثت فيها الاصابة بطفيلي *Giardia lamblia* واخرى لم تستحدث فيها الاصابة وانما عوملت فقط بالمستضد، وقد درست الاستجابة المناعية بالاعتماد على عدة معايير شملت التغيرات الحاصلة في معامل البلعمة، عيوشية الخلايا متعددة النوى Polymorphonuclear cells (PMNs) والخلايا اللمفاوية، التشكل الزهري التائي الفعال والكلي والبائي. بينت النتائج الحالية ان النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفاوية والخلايا PMNs، ارتفعت بدلالة معنوية بالنسبة للمجموعة المعاملة بالمستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة، اما في مجموعة التحدي لوحظ ان عيوشية الخلايا اللمفاوية والخلايا PMNs لم تتأثر بوجود الطفيلي وبقيت مرتفعة، وكما ارتفع معامل البلعمة معنوياً في المجموعتين المعاملة بالمستضد (O) ومجموعة التحدي مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة، اما في مجموعة التحدي حصل انخفاض غير معنوي بالمقارنة مع المجموعة المعاملة بالمستضد (O). اوضحت نتائج الدراسة الحالية وجود اختلافات احصائية في مجموعة الحيوانات المعاملة بمستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة، ومعنوية بالنسبة للتشكل الكلي، وكما أوضحت نتائجنا الحالية ارتفاع نسبة التشكل الزهري التائي الفعال معنوياً في مجموعة التحدي مقارنة مع السيطرة الموجبة، وغير معنوي في حالة التشكل الكلي. نستنتج من الدراسة الحالية ارتفاع نسبة كل من معامل البلعمة، التشكل الزهري التائي والبائي بعد التمنيع بالمستضد (O)، فضلا عن ارتفاع نسبة عيوشية الخلايا اللمفاوية ومتعددة اشكال النوى بعد التمنيع بالمستضد (O) واستمرار ارتفاعهم بوجود الطفيلي. وان بروتينات الغشاء الخارجي المستخلصة من بكتريا *Escherichia coli* وبالتراكيز المستعملة في الدراسة الحالية يمكن عدها معدلات مناعية غير نوعية ومركبات غير سامة في التراكيز المحددة ومحفزة للجهاز المناعي ضد الاصابة بطفيلي *G. lamblia* في الارانب المختبرية البيضاء.

المقدمة

يعد مرض الجيارديا 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* ما بين 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 الجيارديا [10]. وربما يقود استمرار الاصابة بالطفيلي الى حدوث متلازمة الاسهال وسوء الامتصاص وقصور النمو عند الاطفال [11،12].

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 [13،14]. 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[15-18]. يؤدي وجود طفيلي *G. lamblia* في القناة الهضمية الى تحفيز الاستجابة المناعية للمضيف، وربما تترافق تلك الاستجابة مع المرض بأعراضه 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 [19]، 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 [20]. 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 [22].

تلعب الحركيات الخلوية مثل IL-6 وIL-17 وغيرها دورا مهما في تنظيم المناعة الفطرية والمكتسبة ضد الإصابة بطفيلي *G. lamblia* [23]. 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 [24]. تكون بروتينات الغشاء الخارجي في البكتريا السالبة لصبغة غرام من نوع الصفيحة –بيتا (β-barrel)، واهمها بروتينات OmpA [25]، وأشار [26] 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[27]، 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، وهي عالية الثبات بين الأنواع المختلفة من البكتريا السالبة لصبغة غرام [25].

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 التغيرات في معامل البلعمة Phagocytic Index، التشكل الزهري التائي (الفعال والكلي) T-cell rosette، الشكل الزهري البائي B-cell rosette مقارنة مع السيطرة السالبة.

طرائق العمل

اجريت الدراسة للمدة من شهر كانون الثاني 2022 لغاية نهاية شهر كانون الاول 2022 في جامعة سامراء/ مختبر الدراسات العليا التابع لكلية العلوم التطبيقية، واستعمل في هذه الدراسة 45 ارنباً تم الحصول عليها من المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية في بغداد، وتراوحت اوزان الحيوانات المستعملة من (1500-1800) غم بينما تراوحت اعمارها من (10-14) شهر واعطيت الماء والغذاء على نحو مستمر طوال مدة الدراسة.

تضمنت الدراسة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي Outer Membrane Proteins (OMPs) المستخلصة من بكتريا *E. coli* على الاستجابة المناعية في ذكور الارانب البيضاء النيوزلندية المصابة بطفيلي *G. lamblia* المسبب لداء الجيارديا Giardiasis من خلال قياس عيوشية خلايا متعددة اشكال النوى والخلايا اللمفاوية، التشكل الزهري التائي الفعال، الكلي والبائي في البلازما. وتم عزل الطفيلي من المرضى المراجعين لمستشفى سامراء العام وفقاً للطريقة المذكورة لاحقا.

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.

1- 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 وفقاً لما جاءت به [28].

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 [29] في تحضير عالق اكياس الطفيلي والذي أصبح جاهزا لتجريع الحيوانات المختبرية واحداث الإصابة.

3-اصابة الارانب تجريبياً Experimental infection of Rabbits

تم حساب عدد الاطوار المتكيسة للطفيلي باستعمال شريحة عد خلايا الدم (Hemocytometer) لكي يتم تحديد جرعة الاصابة فموياً والتي كانت 5×10^3 كيس، بعد ان جربت عدة جرعات وملاحظة اقصر وقت في ظهور الإصابة مع مراعاة عدم هلاك الحيوانات نتيجة الجرع العالية، وتم التحري عن أكياس الطفيلي في براز الأرانب يومياً ولمدة اسبوعين بعد اعطاء جرعة الاكياس للتأكد من حدوث الإصابة بالطفيلي وتم التأكد من حدوث الاصابة عن طريق تحضير مسحة من براز الأرانب المصابة على شريحة زجاجية وفحصها تحت المجهر ومشاهدة الطفيلي واطواره المختلفة وتم استعمال 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

تمت تنمية العزلة البكتيرية (بعد التشخيص) في وسط Brain heart infusion Broth (BHIB) بدرجة حرارة (37) م° ولمدة (24) ساعة، ثم زرعت على وسط الاكار المغذي السائل Nutrient broth بظروف التنمية نفسها، حفظت بعدها بدرجة حرارة (4) م° استعملت هذه العزلات في العمل اليومي مع مراعاة تجديدها وادامتها بشكل دوري شهرياً.

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

استخلصت بروتينات الغشاء الخارجي وفقا لطريقة [30].

ثالثا: تحضير وتقدير كمية البروتين

حضر المنحنى القياسي وقدر تركيز البروتين في العينات وفقا لما جاء به [31].

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 [32]، 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.

تمنيع الارانب بالمستضد (O) (O-Antigen)

منعت (25) ارنباً 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، سحب الدم من الارانب بواسطة طعنة القلب بعد اسبوع من انتهاء التمنيع وتم استعماله في الفحوصات المناعية اللاحقة.

تصميم التجربة Experimental design

تم استعمال (45) من ذكور الارانب تراوحت اعمارها ما بين (10-14) شهراً بعد التأكد من سلامتها من الامراض الظاهرية وخلوها من الاصابات بالطفيليات المعوية تم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع رئيسة وكل مجموعة رئيسة تضم (15) ارنباً، مقسمة إلى ثلاثة مجاميع ثانوية وكالاتي:

المجموعة الرئيسة الاولى: مجموعة السيطرة السالبة Negative control

تم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع ثانوية كل مجموعة (5) ارانب وعلى النحو الاتي:

A. المجموعة الأولى تم حقنها محلول الملح الفسيولوجي (0.9%) تحت الجلد بمقدار (1) مل يومياً ولمدة اسبوعين وبعدها سحب الدم ووضع في انبوبة حاوية على مادة مانعة التخثر EDTA للحصول على البلازما الذي تم استعماله في تجربة معامل البلعمة وعيوشية PMNs.

B. المجموعة الثانية: تم حقنها محلول الملح الفسيولوجي (0.9%) تحت الجلد بمقدار (1) مل يومياً ولمدة اسبوعين وتم سحب الدم ووضعه في انبوبة مانع التخثر تم استعماله في التشكل الزهري التائي الفعال والكلي.

C. المجموعة الثالثة: تم التمنيع بطريقة مشابهة للفقرة السابقة (B) واستعمل الدم في تجربة التشكل الزهري البائي وعيوشية الخلايا اللمفاوية.

المجموعة الرئيسة الثانية: مجموعة بروتينات الغشاء الخارجي /O-Antigen

تم تمنيع (15) ارنباً بالمستضد (O) وفقاً لطريقة [36،37] ولمدة (14) يوماً بمقدار (1) مل من المستضد وكما مبين في الفقرة انفاً وبعد انتهاء التمنيع قسمت الارانب إلى ثلاثة مجاميع ثانوية كل مجموعة (5) ارانب وكما مبين في المجموعة الرئيسة الأولى.

المجموعة الرئيسة الثالثة: مجموعة السيطرة الموجبة Positive control

تم تجريع (15) ارنباً بطفيلي *G. lamblia* بجرعة فموية مقدارها 5×10^3 من الاطوار المتكيسة للطفيلي وتم فحص براز الحيوانات يومياً للتأكد من حدوث الاصابة وبعد اسبوعين من الاصابة تم تقسيم الحيوانات إلى ثلاثة مجاميع ثانوية وكما مبين في المجاميع الرئيسة الأولى.

الدراسة المناعية Immunological Study

أولا: عزل الخلايا البلعمية متعددة اشكال النوى (PMNs) من الدم المحيطي

عزلت خلايا PMNs وفقاً لطريقة [35].

ثانيا: عزل الخلايا اللمفاوية من الدم المحيطي

عزلت الخلايا اللمفاوية وفقاً لما جاء به [36].

ثالثا: تأثير O-Antigen على عيوشية الخلايا اللمفاوية وخلايا (PMNs)

اتبعت طريقة [37].

- ترك عالق الخلايا ولمدة (5) دقائق ثم تم حساب عدد الخلايا وفقاً لما جاء به [38] بوساطة شريحة عد خلايا الدم تحت المجهر حيث عدت الخلايا المصبوغة ميتة أما الخلايا التي لم تأخذ الصبغة فهي خلايا حية واحتسبت النسبة المئوية للخلايا الحية.

رابعا: تأثير O-Antigen على التشكل الزهري التائي الفعال والكلي

اتبعت طريقة [39] وتم استخراج النسبة المئوية للخلايا الحية.

خامسا: تأثير O-Antigen على التشكل الزهري البائي

اعتمدت طريقة [39] لحساب التشكل الزهري البائي.

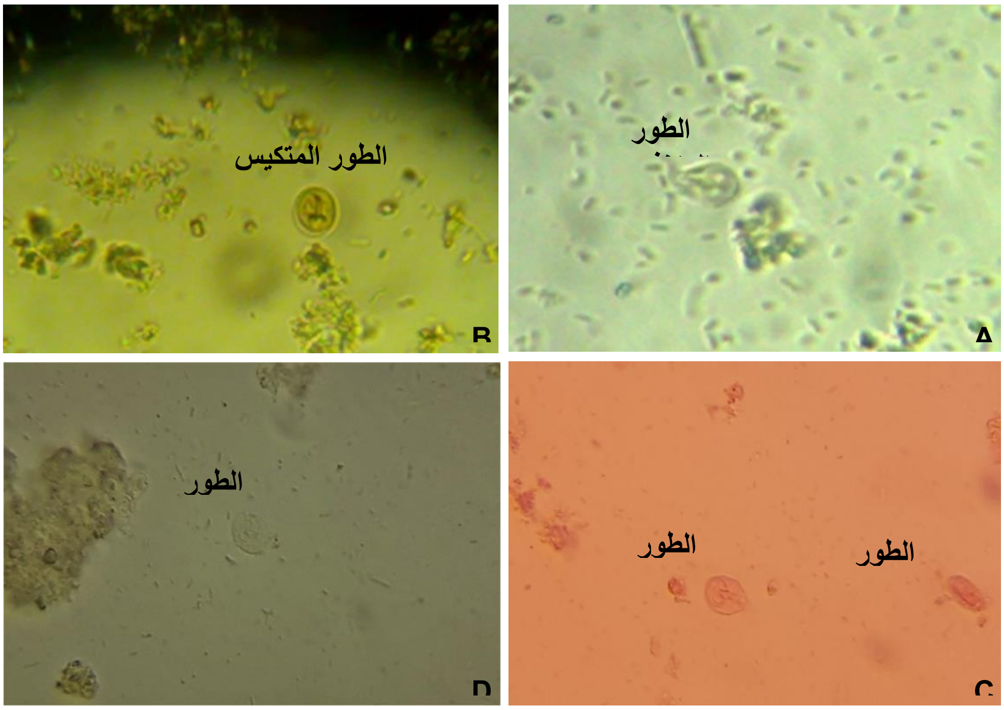
التحليل الاحصائي Statistical Analysis

حُللت 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 [40].

النتائج والمناقشة

تشخيص وعزل الطفيلي

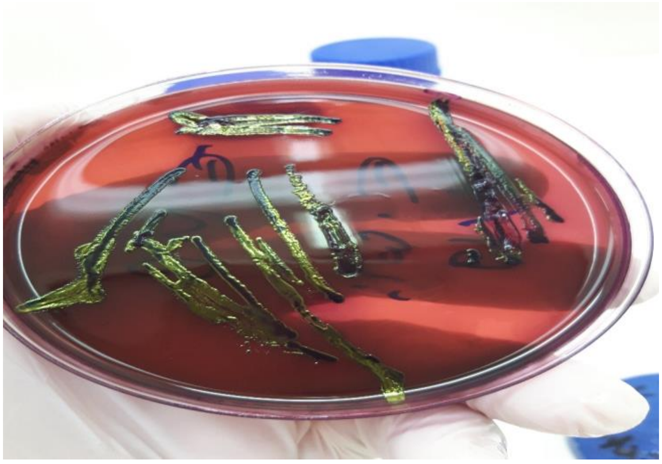
تم تشخيص طفيلي *G. lamblia* بطريقة الفحص المباشر باستخدام المحلول الملحي الفسيولوجي (0.9%) ومحلول اليود-اللوكالي وصبغة الايوسين وقد ظهرت الاطوار المتغذية والمتكيسة في مسح براز الحيوانات المفحوصة وكما مبين في الشكل (1).



الشكل (1): *G. lamblia* في مسح براز الحيوانات المفحوصة، استعمال محلول اليود-اللوكالي (A) و (B)، استعمال صبغة الايوسين (C)، استعمال المحلول الملحي الفسلجي (D)، وقوة تكبير X40.

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 [17]، وكما مبينه في الشكل (2).



الشكل (2): نمو بكتريا *E. coli* على وسط (EMB)

تقدير تركيز البروتينات في إنموذج مستخلص بروتينات الغشاء الخارجي

قدر تركيز بروتينات الغشاء الخارجي المستخلصة وفقاً لطريقة [31] 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.

تقدير سمية بروتينات الغشاء الخارجي

بينت نتائج تجربة السمية للمستضد (O) والتي أجريت وفقاً لما ذكرته [32]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.

الاختبارات المناعية

تأثير المستضد (O) على عيوشية الخلايا اللمفاوية والخلايا متعددة اشكال النوى (PMNs)

بينت النتائج الحالية (وكما مبين في جدول 1 و2) ان النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفاوية وخلايا PMNs، ارتفعت بدلالة معنوية بالنسبة للمجموعة المعاملة بالمستضد مقارنة مع السيطرة السالبة، حيث كانت النسب (93.40% ، 88.60%) و (93.40%، 87.80%) على التوالي، وتدل هذه النتائج على ان المستضد (O) يعد امناً للاستعمال لكونه لم يقتل الخلايا اللمفاوية وخلايا PMNs او يقلل من نشاطها وتوافقت هذه النتائج مع [32] حيث اعدت المستضد (O) بالتراكيز (100، 200، 400 و 800) مكغم\مل والمستخلص من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* امناً عند حقنه داخل جسم الارانب.

اما في مجموعة التحدي لوحظ ان عيوشية الخلايا اللمفاوية والخلايا PMNs (كما مبين في الجدولين 1 و2) لم تتأثر بوجود الطفيلي وبقيت مرتفعة بنسب بلغت (94.80% و 93.80%) على التوالي، ولم نجد في الادبيات ما يشير الى التوافق او عدمه مع النتائج الحالية، وهذه النسب مقاربة لنسب المجاميع المعاملة بالمستضد (O) قبل الاصابة بالطفيلي، وهذا يدل على ان المستضد الذي استعمل كلقاح يعد من الممنعات الجيدة والامنة لكونه لم يقتل الخلايا اللمفاوية والخلايا PMNs حيث بقيت حية ولم يتأثر عددها ولا وظيفتها، ونلاحظ في تجارب البلعمة زيادة عدد الخلايا PMNs وبالتالي زيادة الفعالية البلعمية وبزيادة الخلايا اللمفاوية نلاحظ ايضاً زيادة نسب كل من التشكل الزهري التائي والبائي وجاءت هذه النتائج متوافقة مع ما توصلت اليه [32].

جدول (1): النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفاوية للارانب في مجاميع الدراسة

المجاميع	عيوشية الخلايا اللمفاوية (%)
	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	A 5.59 ± 93.40
مجموعة التحدي	A 3.11 ± 94.80
السيطرة الموجبة	AB 4.83 ± 92.40
السيطرة السالبة	B 10.67 ± 88.60

تشير الاحرف المختلفة الى وجود اختلافات معنوية بمستوى $P \le 0.05$

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

جدول (2): النسبة المئوية لعيوشية الخلايا (PMNs) للارانب في مجاميع الدراسة

المجاميع	عيوشية الخلايا PMNs (%)
	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	A 5.68 ± 93.40
مجموعة التحدي	A 2.59 ± 93.80
السيطرة الموجبة	A 6.14 ± 90.20
السيطرة السالبة	B 3.70 ± 87.80

تشير الاحرف المختلفة الى وجود اختلافات معنوية بمستوى $P \le 0.05$

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

تأثير المستضد (O) على عملية البلعمة خارج الجسم الحي

اظهرت نتائج الدراسة الحالية (جدول 3) ارتفاعاً معنوياً في معدلات معامل البلعمة لمجموعة الحيوانات المختبرية المعاملة والممنعة بالمستضد (O) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة حيث بلغت (70.20%، 64.80% و50.40%) على التوالي. توافقت النتائج الحالية مع نتائج [32]، حيث اشارت الى ان تمنيع الارانب المختبرية ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* ادى إلى زيادة معنوية في الفعالية البلعمية للخلايا PMNs مقارنة مع السيطرة السالبة، لتبلغ النسب (74.46% و60.70%) على التوالي. ربما يعزى ارتفاع معامل البلعمة لمجموعة المستضد (O) إلى ان المستضد يعد محفز جيد لوظائف الجهاز الشبكي الطلائي للخلايا الالتهامية ولا سيما البلاعم التي تمثل الجزء الاكبر من اليات الدفاع غير النوعية ضد المسببات المرضية وبالتالي يسبب زيادة في معامل البلعمة [41]. تعد عملية البلعمة الخط الدفاعي الاساس غير المتخصص للجسم، ضد الجراثيم والأجسام الغازية له، ويعد التجمع النسيجي لخلايا PMNs وزيادة اعدادها الصفة المميزة للعديد من الإصابات الطفيلية للقناة الهضمية، حيث تعمل على حماية الجسم من الممرضات من خلال اليات تشمل البلعمة للعوامل الممرضة، افراز انزيمات البروتييز المضادة للممرضات وتحرير المصائد الخارج خلوية Neutrophil extracellular traps [42]، وان قابلية البلاعم على التهام المستضدات وعرضها على سطحها هي الخطوة الاولى لتنشيط الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية للجسم [43]. تمثل بروتينات الغشاء الخارجي للبكتريا السالبة لصبغة غرام محفزات مناعية جيدة Highly Immunogenic وآمنة من خلال عملها كمحددات مستضدية Epitopes فضلاً عن انها تحمل ما يعرف بالنماذج الجزيئية المرتبطة بالممرض (PAMPs) والتي تميز بوساطة مستقبلات تمييز الممرض والموجودة على سطوح الخلايا البلعمية للمضيف مثل خلايا البلعم الكبير، الخلايا العدلة والخلايا الشجيرية أي انها محفزة جيدة للخلايا البلعمية [25].

اكد [44] ان اختزال صبغة NBT من قبل خلايا PMNs (وإنتاج حبيبات الفورمازان) وتحول اللون الأصفر الى اللون البنفسجي المزرق دليل على حصول عملية البلعمة، حيث يكشف هذا الاختبار عن تنشيط مسار Hexose monophosphate Shunt داخل خلايا PMNs مؤدياً إلى زيادة استهلاك الأوكسجين وانتاج أيونات (O_2^-) وإنتاج الانزيمات الحالة التي تعد مواد ضرورية في عملية قتل الممرضات [45].

ينشط جدار الخلية البكتيرية والاجزاء المكونة له عملية البلعمة والخلايا البلعمية، ويؤدي الى سرعة تحفيز الجهاز المناعي [46]. تحفز المستضدات البروتينية المنقاة من الغشاء الخارجي لبكتريا *E. coli* الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية المعتمدة على الخلايا التائية [47،48]، ويتم بلعمة المستضدات بوساطة الخلايا البلعمية (العارضة للمستضدات) وعرضها بشكل ببتيد محمول على MHC Class II [49].

اظهرت نتائج الدراسة الحالية بعد تمنيع الحيوانات بالمستضد (O) وتجريعها بطفيلي *G. lamblia* وكما مبين في الجدول (3) حدوث انخفاض غير معنوي في معدلات معامل البلعمة مجموعة التحدي بالمقارنة مع ما قبل التجريع به حيث بلغت النسب (70.4% و64.8%) على التوالي. ولم نجد دراسات منشورة في الادبيات تشير الى التوافق او عدمه مع النتائج الحالية، ربما يعزى سبب انخفاض معامل البلعمة في المجموعة الممنعة والمصابة بالطفيلي الى زيادة تراكيز المواد السامة والانزيمات الحالة التي تنتج من الخلايا البلعمية نفسها والذي قد يؤثر سلباً على تلك الخلايا [50]، أو قد يكون نتيجة الموت المبرمج للخلايا البلعمية او تباطؤ عملها نتيجة تعاملها مع المستضد والطفيلي في آن واحد، او ربما يكون الطفيلي من المجموعة A (Assemblage A) ويسبب اضعاف لعملية انجذاب خلايا PMNs نحو موقع الطفيلي (حيث يوجد IL-8) من خلال امتلاك الطفيلي لإنزيم Cathepsin B cysteine proteases الذي يكبح CXCL8 [51].

ارتفع معامل البلعمة في مجموعة التحدي مقارنة مع مجموعة السيطرة الموجبة وتدل النتائج الحالية على ان اللقاح ربما حفز فاعلية الخلايا البلعمية على التهام الطفيلي ولهذه العملية اهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعد عملية قتل الطفيليات عن طريق الخلايا البلعمية خطوة اساسية بوصفها خطاً دفاعياً اولياً غير متخصص ضد المسببات المرضية [52]. اكد [53] في دراسته التي اجراها في الزجاج ان الحضن لطفيلي *G. lamblia* مع خلايا PMNs المأخوذة من الانسان ومع المصل ذي المناعة المرتفعة Hyperimmunity serum يحفز استجابة خلايا PMNs وحصول عملية الاكسدة للطفيلي فيها. تتضمن الاستجابة المناعية ضد طفيلي *G. lamblia* اليات غير نوعية مثل تنشيط الخلايا البلعمية المختلفة والتي تعد عوامل أولية لتقييد الكائن الممرض [54].

جدول (3): النسبة المئوية لفعالية البلعمة لخلايا PMNs للارانب في مجاميع الدراسة

المجاميع	معامل البلعمة (%)
	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	A 8.73 ± 70.20
مجموعة التحدي	A 8.58 ± 64.80
السيطرة الموجبة	B 8.78 ± 48.20
السيطرة السالبة	B 8.26 ± 50.40

تشير الاحرف المختلفة الى وجود اختلافات معنوية بمستوى $P \le 0.05$

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

تأثير المستضد (O) على التشكل الزهري التائي

يبين الجدول (4) وجود اختلافات احصائية في مجموعة الحيوانات المعاملة بمستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث كانت غير معنوية بالنسبة للتشكل الزهري التائي الفعال (69.40% و53.60%) على التوالي، ومعنوية بالنسبة للتشكل الكلي (71.00% و58.40%)، على التوالي، وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع [32]، حيث اشارت الى ان التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* ادى إلى زيادة النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي الفعال والكلي معنوياً مقارنة مع السيطرة السالبة، حيث بلغت النسب (78.30% و70.12%) على التوالي، في حالة التشكل الزهري الفعال، و (83.50% و73.10%) على التوالي، في حالة التشكل الزهري الكلي. ربما يعود سبب قدرة بروتينات الغشاء الخارجي المنقاة من بكتريا *E. coli* على تنشيط الخلايا التائية إلى انها تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية [47،48]، وقد اكد [55] ان بروتين Intimin وهو أحد بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Citrobacter rodentium* يحفز الخلايا التائية $CD8^+$ في الفئران المختبرية، واكد [49] ان المستضدات ذات الطبيعية البروتينية تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية ويتم بلعمة المستضدات بوساطة الخلايا البلعمية (العارضة للمستضدات) وعرضها بشكل ببتيد محمول على MHC Class II الذي يتداخل مع مستقبلات الخلايا التائية (TCR) وكذلك تنشط الخلايا التائية $CD8^+$ التي تعمل على تحليل الخلايا المصابة.

أوضحت النتائج الحالية (جدول 4) ارتفاع نسبة التشكل الزهري التائي الفعال معنوياً في مجموعة التحدي مقارنة مع السيطرة الموجبة، حيث بلغت نسبة التشكل الفعال (75.20% و66.60%) على التوالي، وغير معنوي في حالة التشكل الكلي حيث بلغت النسبة (77.00% و72.40%) على التوالي، ولم نجد في الادبيات ما يشير الى التوافق او عدمه مع نتائجنا الحالية، والنتائج اعلاه تدل على قدرة المستضد على تحفيز الخلايا اللمفاوية التائية، حيث ان زيادة انتاجها والزيادة في عددها يؤدي الى زيادة مقاومة المضيف للإصابة الطفيلية [56]، وهذا يدل على ان المستضد من الممنعات الجيدة ضد الإصابة بطفيلي *G. lamblia*، وقد ذكر [46] ان المستضد البروتيني المنقى من جدار الخلية البكتيرية له القدرة على تنشيط الخلايا البلعمية والخلايا التائية، واكد الباحثان انه يؤدي الى سرعة تحفيز الجهاز المناعي. تستطيع الخلايا اللمفاوية التائية ان تميز المستضد فقط عندما يعرض المستضـــد بشكـل ببتيـدات بـــأوزان جـــزيئيـــة صغيـــرة علـــى MHC class II على سطح الخلايا العارضة للمستضدات وان قدرة المستضد لتحفيز الاستجابة المناعية تعتمد على عرض المستضد على سطح تلك الخلايا [53]. اكد كل من [57] و[58] ان الإصابة بطفيلي *G. lamblia* تحفز الاستجابة المناعية من قبل الخلايا التائية المساعدة بنوعيها (Th1 وTh2)، وقد وجد ان الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية المعتمدة على الخلايا التائية تحفز عند الإصابة بطفيلي *G. lamblia*، وان تحفيز الخلايا التائية ($CD4^+T$) يسبب تحفيز الخلايا البائية لانتاج الاضداد النوعية لمستضدات الطفيلي [23]، اما عدد الخلايا التي لم تكون الشكل الزهري ربما لانها تمتلك عدد قليل من المستقبلات على سطوحها لحصول التفاعل [59].

جدول (4): النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي الفعال والكلي في مجاميع الدراسة

المجموعة	التشكل الزهري الفعال (%)	الشكل الزهري الكلي (%)
	المعدل ± الانحراف القياسي	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد(O)	AB 6.84 ± 69.40	A 5.48 ± 71.00
مجموعة التحدي	A 14.80 ± 75.20	A 17.40 ± 77.00
السيطرة الموجبة	B 8.02 ± 66.60	A 13.00 ± 72.40
السيطرة السالبة	B 7.44 ± 53.60	B 10.90 ± 58.40

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

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

تأثير المستضد (O) على التشكل الزهري البائي

بينت النتائج الحالية (جدول 5) ارتفاع نسبة التشكل الزهري البائي معنوياً بالنسبة للمستضد (O) مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة بحيث كانت (74.60% و60.60%) على التوالي، وجاءت متوافقة مع [32]، حيث اشارت الى ان التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* ادى إلى زيادة معنوية في نسبة التشكل الزهري البائي مقارنة مع السيطرة السالبة، حيث بلغت النسب (69.68% و56.72%) على التوالي.

أكد [49] ان المستضدات ذات الطبيعية البروتينية تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية حيث يتم بلعمة المستضدات بوساطة الخلايا البلعمية (العارضة للمستضدات) ويعرض بشكل ببتيد محمول على MHC Class II ويتم تنشيط الخلايا التائية ($CD8^{+}T$) ومن ثم الخلايا البائية ومساهمتها في انتاج الكلوبيولينات المناعية المتخصصة.

يعد اختبار التشكل الزهري البائي احدى وسائل قياس المناعة الخلطية المعتمدة على الخلايا البائية وتمتلك هذه الخلايا مستقبلات للمتممة، مستقبل لجزء FC للكلوبيولين IgG، الكلوبيولينات المناعية السطحية ومستضدات سطحية ويعد الاول مستقبلاً لمكونات المتمم وتساعد هذه الصفة في تمييز الخلايا اللمفاوية البائية عن طريق ربط كريات الدم الحمراء للخروف والمعاملة بالضد IgG والعامل المتمم بالخلايا اللمفاوية البائية وتؤدي الى تكوين الشكل الزهري [60].

أوضحت النتائج الحالية والمبينة في الجدول (5) ارتفاع نسبة التشكل الزهري البائي في مجموعة التحدي مقارنة مع السيطرة الموجبة بدلالة معنوية، حيث بلغت (75.80 و 68.20%) على التوالي، ولم نجد دراسات منشورة في الادبيات تشير الى التوافق او عدمه مع النتائج الحالية. وربما يعود السبب في ارتفاع الخلايا اللمفاوية البائية مع وجود الطفيلي هو ان الطفيلي يعد مستضداً غريباً يحفز الاستجابة المناعية بشكل عام والتي تشاهد على شكل مقاومة غير متخصصة تجاه الطفيلي، حيث يعمل الطفيلي على تحفيز الخلايا البائية وهذا ما تم ملاحظته من خلال زيادة التشكل الزهري البائي، وتتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا بلازمية والتي تحرر كميات كبيرة من الاضداد النوعية [61]، وقد بين [23] ان الخلايا اللمفاوية البائية تساهم في التخلص من الاصابة بطفيلي *G. lamblia* فضلاً عن كونها خلايا ضرورية لتطوير مناعة مكتسبة ضد الإصابة، حيث اكد الباحث ان الاستجابة المناعية الخلوية والخلطية المعتمدة على الخلايا التائية تحفز عند الإصابة بطفيلي *G. lamblia*، وان تحفيز الخلايا التائية ($CD4^{+}T$) يسبب تحفيز الخلايا البائية لانتاج الاضداد النوعية لمستضدات الطفيلي. قد تزداد اعداد الخلايا البائية المنتجة للضد IgM بسرعة عند الاصابة لتصل الى اعلى مستوى لها عند نهاية مرحلة الكمون، بينما تزداد الخلايا البائية المنتجة للضد IgA بعد ذلك لتصل الى اعلى مستوى لهـا خـلال الطـور الحـاد Acute phase للاصابة [22، 62، 63]، فضلاً عن دور الاضداد IgM وIgG في تحليل Lysis وتحطيم الطور المتغذي للطفيلي بوجود نظام المتمم [22]، وهذا ما اكدته النتائج المبينة في الجداول اللاحقة بزيادة مستوى الاضداد وتعمل هذه الاضداد على مهاجمة الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية اذ تقضي عليه وهذا ما اكدته نتائجنا من ارتفاع معامل البلعمة عند وجود الطفيلي.

جدول (5): النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي للارانب في مجاميع الدراسة

المجموعة	التشكل الزهري البائي (%)
	المعدل ± الانحراف القياسي
المستضد (O)	A 7.33 ± 74.60
مجموعة التحدي	A 12.20 ± 75.80
السيطرة الموجبة	B 7.26 ± 68.20

C 14.40 ± 60.60	السيطرة السالبة

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

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

الاستنتاجات

ارتفعت نسبة كل من معامل البلعمة، التشكل الزهري التائي والبائي بعد التمنيع بالمستضد (O)، فضلا عن ارتفاع نسبة عيوشية الخلايا اللمفاوية ومتعددة اشكال النوى بعد التمنيع بالمستضد (O) واستمرار ارتفاعهم بوجود الطفيلي. وان بروتينات الغشاء الخارجي المستخلصة من بكتريا *Escherichia coli* وبالتراكيز المستعملة في الدراسة الحالية يمكن عدها معدلات مناعية غير نوعية ومركبات غير سامة في التراكيز المحددة ومحفزة للجهاز المناعي ضد الاصابة بطفيلي *Giardia lamblia* في الارانب المختبرية البيضاء.

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. Seconde 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. 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. 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. 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. Gardner, T.B. and Hill, D.R. (2001). Treatment of Giardiasis. *Clin. Microbiol. Rev., 14*(1): 114–128.

12. Olivares, J.L., Fernandez, R., Fleta, J. Ruiz, M.Y. and Clavel, A. (2002). Vitamin B12 and folic acid in children with intestinal parasitic infection*. J. Am. Coll. Nutr., 21*(2):109–113.

13. Squire, S.A. and Ryan, U. (2017). Cryptosporidium and Giardia in Africa: current and future challenges. *Parasites & Vectors, 10*(195): 1-32.

14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
22. Faubert, G. (2000). Immuno response to *Giardia duodenalis. Clin. Microbiol. Rev., 13*(1):35–54.
23. Lopez-Romero, G., Quintero, J., Astlazarán-Garcia, H. and Velazquez, C. (2015). Host defences against *Giardia lamblia*. *Parasite Immunology, 37*(8): 394–406.
24. Tortora, G.J., Funke, B.R. and Case, C.L. (2018). Microbiology An Introduction. *Pearson*., 960pp. Thirteen edition.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. WHO. (1991). Basic laboratory methods in medical parasitology. *World Health Organ*., Geneva, 114pp.
29. 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.
30. 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.
31. 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.

32. 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.

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. Cech, P. and Lahrer, R.I. (1984). Heterogenicity of Human Neutrophil Phagolysosomes: Functional Consequences for Candidacidal Activity, *Blood, 64*(1): 147-151.

36. KNOTEK, Z., VOJTÍŠEK, P., MLÀDKOVÀ, P., HORÍN, P., KOVÀRÜ, F., MÀDR, P. and DRÀBEK, J. (1991). A simple and efficient variant of the E rosette test for the detection of T lymphocytes in Piges. *ACTA. VET. BRNO., 80*: 231-236.

37. Nonoyama, S., Kojo, H., Mine, Y., Nishida, M., Goto, S. and Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *Pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing activity of Rabbit polymorphonuclear leukocytes: mechanism of action of a Polymorphonuclear leukocyte inhibitor. *Infect. Immun., 24*(2): 399-403.

38. Hudson, L. and Hay, F.C. (1980). Practical Immunology. *Blackwell Scientific Publications*, *Oxford*, 117pp. second edition.

39. Mendes, N.F., Tolnai, M.E., Silveira, N.P., Gilbertsen, R.B. and Metzgar, R.S. (1973). Technical aspects of the rosette tests used to detect human complement receptor (B) and sheep erythrocyte-binding (T) lymphocytes. *J. Immunol., 111*(3): 860-867.

40. Cleophas, T.J. and Zwinderman, A.H. (2016). SPSS for starters and 2nd levelers. *Springer Cham Heidelberg, New York,* 375pp.Second edition.

41. Masihi, K.N. and Lange, W. (1988). Immunomodulators and nonspecific host defense mechanisms against microbial infection. Pergamon Press, *Oxford. New York*. 462pp. first edition.

42. Amulic, B., Cazalet, C., Hayes, G.L., Metzler, K.D. and Zychlinsky, A. (2012). Neutrophil function: From mechanisms to disease. *Annu. Rev. Immunol., 30*: 459–489.

43. Fox, E.S., Thomas, P. and Broitman, S.A. (1988). Comparative studies of endotoxin uptake by isolated rat Kupffer and peritoneal cells. *Infect. Immun., 55*(21): 2962-2966.

44. Ali A.A. and Abdulla I.T. (2003). Immunomodulation in BALB/C mic against infection with hydatid disease by the lipopohysaccharide extracted from *Pseudomonas aeruginosa* III. delyed type hypersensitivity and phagocytosis, *Rivista Parasitologia, XX* (LXIV)-1: 17-24.

45. Peakman, M. and Vergani, D. 2010. Basic and Clinical Immunology. *Churchill Livingstone, Elsevier Ltd., London*, 365pp. Second edition.

46. Schuffler, C. and Campbell, P.A. 1976. Listeria cell wall fraction characterization of *in vitro* adjuvant activity. Immunology, 31: 323-329.

47. Guan, Q., Wang, X., Wang, X., Teng, D., Mao, R., Zhang, Y. and Wang, J. (2015). Recombinant outer membrane protein A induces a protective immune response against *Escherichia coli* infection in mice. *Appl. Microbiol. Biotechnol., 99*, 5451–5460.

48. Pen, G., Yang, N., Teng, D., Hao, Y., Ruoyu Mao, R. and Wang, J. (2022). The Outer Membrane Proteins and Their Synergy Triggered the Protective Effects against Pathogenic *Escherichia coli. Microorganisms*, *10*(982): 1-15.

49. Punt, J., Stranford, S.A., Jones, P.P. and Owen, J.A. (2019). Kuby immunology. W.*H. freeman, New York*, 1904pp. Eighth edition.
50. Lock, R., Dahlgren, C., Linden, M., Stendahl, O., Svensbergh, A. and Ohman, L. (1990). Neutrophil killing of two type 1 Fimbrio-Bearing *Escherichia coli* strain dependence on respiratory burst activation. *Infect. Immun., 58*: 37-42.
51. Cotton, J.A., Motta, J., Schenck, L.P. Hirota, S.A., Beck, P.L. and Buret, A.G. (2015). Giardia duodenalis Infection Reduces Granulocyte, Infiltration in an In Vivo Model of Bacterial Toxin-Induced Colitis and Attenuates Inflammation in Human Intestinal Tissue. *PLOS ONE, 9*(10): 1-15.
52. Macatonia, S.E., Hosken, N.A. and Litton, M. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immun., 154*: 5071–5079.
53. Arbo, A., Pavia-Ruz, N. and Santos, J.I. (2006). Opsonic requirements for the respiratory burst of neutrophils against *Giardia lamblia* trophozoites. *Arch. Med. Res., 37*: 465–473.
54. Brune, M.W., França, E.L., Moraes, L.C.A., Ribeiro, V.P., Gomes, M.A. and Honorio-França, A.C.H. (2021). Effects of Cytokines IFN-γ and TGF-β on the Functional Activity of Blood Mononuclear Cells against *Giardia lamblia*. *Iran J. Parasitol., 16*(2): 209-218.
55. Simmons, C.P., Clare, S., Ghaem-Maghami, M., Uren, T.K., Rankin, J., Huett, A., Goldin, R., Lewis, D.J., MacDonald, T.T., Strugnell, R.A., Frankel, G. and Dougan, G. (2003). Central role for B lymphocytes and $CD4^{+}$ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun. 71*(9): 5077-5086.
56. Scott, D., Pearce, E. Natovitz, P. and Sher, A. (1987). Vaccination against cutaneous leishmaniasis in a murine model. II. Immunologic properties of protective and nonprotective subfractions of soluble promastigote extract*. J. Immunol. 39*(9): 3118-3125.
57. Berger, A. (2000). “Th1 and Th2 responses: what are they?,” *BMJ., 321*(7258); 424.
58. 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.
59. Birkeland, S.A. (1975). Rosette formation tests for T and B lymphocytes using frozen-store D cells. *Acta path. microbiol. scand. Sect. C., 83*: 298-302.
60. Ross, G.D., Rabellino, E.M., Polley, M.J. and Grey, H.M. (1973). Combined Studies of Complement Receptor and Surface Immunoglobulin-Bearing Cells and Sheep Erythrocyte Rosette-Forming Cells in Normal and Leukemic Human Lymphocytes. *The Journal of Clinical Investigation. 52*: 377-385.
61. 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.
62. Bienz, M., Dai, W.J., Welle, M., Gottstein, B. and Müller, N. (2003). Interleukin–6–deficient mice are highly susceptible to *Giardia lamblia* infection but exhibit normal intestinal immunoglobulin a responses against the parasite. *Infect. Immun., 71*(3): 1569–1573.
63. Zhou, P., Li, E., Zhu, N., Robertson, J., Nash, T. & Singer, S. M. (2003). Role of interleukin-6 in the control of acute and chronic *Giardia lamblia* infections in mice. *Infect. Immun., 71*(3): 1566–1568.

IRAQI Academic Scientific Journals

Samarra Journal of Pure and Applied Science

SJPAS

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 some immunological parameters

Maroof Sabti Juma Al-Ammash[1] and Aysir Salih Mohammed Al-Samarrai[2]

1 Department of Pathological Analysis, College of Applied Sciences, University of Samarra

2 Department of Biology, College of Education, University of Samarra

Article Information

Received: 16/01/2023
Accepted: 28/02/2023

Keywords:

Giardia lamblia, O- antigen, Immune response,

Corresponding Author

E-mail: ebnbaz87@gmail.com

Abstract

This study was take placed for the period from December 2021 until January 2022, and it included a follow-up of the effect of Outer Membrane Proteins (OMPs) or the so-called (O-antigen) purified from *Escherichia coli* bacteria on the immune response in (45) male laboratory white rabbits, 15 of them infected with *Giardia lamblia* and others did not provoke infection, but were treated with O-antigen only. The immune response was studied based on several criteria including changes in phagocytic index, viability of polymorphonuclear cells (PMNs) and Lymphocytes, active and total of T-rosette and B-rosett. The present results showed that the percentage of viability of lymphocytes and PMNs significantly increased for the antigen-treated group compared with the negative control, but in challenge group, it was noted that the viability of lymphocytes and PMNs cells was not affected by the presence of the parasite and remained high. As the current study showed, the phagocytic index was significantly increased in the two groups (treated with O-antigen, and challenge group) compared with the negative control group, as there was a non-significant decrease in challenge group compared with treated with O-antigen group. The results of the current study showed that there were statistical differences in the group of animals treated with O-antigen compared with the negative control, which were not significant for the active T-rosette and significant for the total T-rosette, and as our current results showed, the percentage of active T-rosette significantly increased in challenge group compared with the positive control, and not significant in the case of the total T-rosette. We conclude from the current study the percentage increase of each of the phagocytic index, T-rosette and B-rosette after immunization with antigen (O), as well as the percentage of viability of lymphocytes and PMNs cells after immunization with antigen (O) and their persistence in the presence of *G. lamblia*. The outer membrane proteins extracted from *E. coli* and the concentrations used in the current study can be considered as non-specific immunomodulators and non-toxic compounds at the specified concentrations and as stimulators of the immune system against *G. lamblia* infection in white laboratory rabbits.