Analysis of the immune response to *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* in experimentally and naturally infected cattle.

A thesis presented by

Gaber Saad Abdellatiffe Abdellrazeq

(B.V.Sc., 2000-Alexandria University)

(M.V.Sc., 2004-Alexandria University)

For

The Degree of Ph.D. in Veterinary Science

Microbiology

Submitted to

Alexandria University

Faculty of Veterinary Medicine

2009

TO THE MEMORY OF MY FATHER AND MY LOVING MOTHER: *WHO OVER THEIR LIFE PRAYING, SUPPORT AND LOVE WHICH HAS BEEN MUCH GREATER THAN I CAN ACKNOWLEDGE.*

TO MY WIFE: *IAM INDEPTED TO MY WIFE FOR HER DAY AND NIGHT ENCOURAGEMENT AND UNDERSTANDING TO MY WORK AND HELP ME IN MY LIFE. WITHOUT HER SUPPORT AND ENCOURAGEMENT, LIFE WOULD HAVE BEEN DIFFICULT*

TO MY CHILDREN: ABD ELRAHMAN AND RETAL *WHO ENCOURAGE ME IN MY LIFE.*

Acknowledgments

Acknowledgments

*First of all prayerful thanks to **GOD** who gave me everything I have.*

*This work was carried out at the department of **Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, USA.** I would like to express my sincere gratitude to all who contributed in any and many ways in making this work possible. I want to acknowledge:*

***Prof.Dr. Mohamed A. Akeila,** Professor and Head of Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University; for supervising, encouragement and valuable advice during the course of this research.*

***Prof.Dr. Helmy A. Torky,** Professor of Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University; for his patience, kind supervision, continuous advice and his support for all my work.*

***Professor Dr. William C. Davis,** Professor of Microbiology, Department of Veterinary Microbiology and Pathology, Washington State University, Pullman, Washington, USA; for accepting me as a PhD student in the first instance, his advice, continuous support, his skillful technical assistance. Great thanks for introducing me to the fascinating world of immunology, and for guiding me through the process of scientific writing.*

***Professor Dr. Samy A. Khaliel,** Professor of Microbiology Department, Faculty of Veterinary Medicine, Alexandria University; for his assistance and professional advice on every issue.*

***All colleagues**: at my department in Egypt and at Dr.Davis laboratory, for their positive energy and encouragement. Especial thanks to **Dr. Mahmoud El-naggar**, assistant lecturer at my department for his assistance; and for **Mary J. Hamilton,** Associate in Research at Dr.Davis laboratory for being pleasant to everybody.*

Introduction

REVIEW OF LITERATURE

Material and Methods

Results

Discussion

Summary

References

Arabic

Summary

تحليل الإستجابة المناعية للميكوباكتيريم باراتيوبركلوزس في الأقار المصابة تجريبياً وطبيعياً

رساله مقدمة من

جابر سعد عبد اللطيف عبد الرازق

بكالوريوس العلوم الطبية البيطرية – جامعة الاسكندرية ٢٠٠٠
ماجستير العلوم الطبية البيطرية- جامعة الاسكندرية ٢٠٠٤

للحصول على درجة
دكتوراة الفلسفة فى العلوم الطبية البيطرية

تخصص
(ميكروبيولوجيا)

٢٠٠٩

الملخص العربى

مرض اليونيز(الباراتيوبركلوزس) يعتبر واحد من اهم المشاكل المرضيه التى تواجه صناعة الثروة الحيوانيه فى مصر والعالم . بكتريا الميكوبكتريم باراتيوبركلوزس المسببه لهذا المرض تصيب انواع عديدة من المجترات وغير المجترات بالاضافه الى الانسان . احراز تقدم فى انتاج وتطوير لقاح فعال وذو كفاءة للوقايه من الإصابه بهذه البكتريا يواجه صعوبات بالرغم من التقدم الملموس فى دراسات ميكروبات السل الأخرى. من اهم هذه الصعوبات نقص الفهم الكامل للآليات التى تتداخل بها هذه البكتريا مع الجهاز المناعى للحيوان مسببة خلل فى الصد المناعى .

من هذا المنطلق تم اجراء هذه الدراسه بمعمل ا.د/ ديفيز وليام بجامعة ولاية واشنطن الامريكية لتطوير واستخدام جهاز الفلوسيتوميترى متعدد الالوان فى دراسة ومتابعة الاستجابة المناعية لهذه البكتريا خلال المراحل المتدرجة لهذا المرض فى العجلى التى تم اصابتها تجريبياً او الأبقار المصابه طبيعياً .

أولاً :- ادراسة ومتابعة الأحداث الأولى للإستجابة المناعية ، تم عزل خلايا الدم أحادية النواه والتى تلعب دورا رئيسياً للصد المناعى من عدد ١٢ عجل بقرى (٧ عجول تم اصابتهم تجريبياً بحقن بكتريا الميكروبكتريم باراتيوبركلوزس مباشرة فى المعى الغليظ وتم ابقاء 0 عجلى بدون إصابه) . ادراسة ومتابعة الأحداث فى مرحلة قبل ظهور الأعراض ومرحلة ظهور الأعراض تم عزل خلايا الدم أحادية النواه من عدد ١٣ بقره (١٠ أبقار مصابين طبيعياً ، 0 منهم فى مرحلة قبل ظهور الأعراض ، و0 منهم فى مرحلة ظهور الأعراض بالإضافة إلى ٣ غير مصابين).

ثانيا :- فور عزل خلايا الدم أحادية النواه من الدم المجمع من العجول والأبقار تم صبغ جزء منها بأجسام مضاده أحادية ثم فحصها بجهاز الفلوسيتوميترى ثم تحليل النتائج بإستخدام البرمجيات المعنيه .

ثالثا :- تم تحضين خلايا الدم أحادية النواه لمدة ٦ ايام فى وسط غذائى مع إضافة بروتينات هذه البكتريا المشتملة للمناعه (ب.ب.د-س.أ.ج-م.م.ب) كلاً على حدة . بعد فترة التحضين تم جمع الخلايا وصبغها بالأجسام المضاده الأحادية ثم فحصها بجهاز الفلوسيتوميترى . لتحليل هذه النتائج قمنا بتطوير أساليب البرمجيات المعنيه بهذه التحاليل بوجه يمكننا من رصد التغيرات المناعية بوجه عام ليس فقط فى العدد ولكن على صعيد حجم الخلية الواحده .

حلقت النتائج كالاتى:

تقييم الإستجابة المناعية بوجه عام : الإستجابة المناعية لهذه البكتريا يمكن ملاحظتها عند الشهر الثالث من إصابة الحيوان تجريبياً . هذه الإستجابة ضعيفه ومتساويه للثلاثة بروتين الخاصة لهذه البكتريا ولكن يمكن استخدامها للتفرقة بين الحيوانات المصابة والغير مصابه . الإستجابة المناعية كانت قوية للثلاثة بروتين فى مرحلة قبل ظهور الإعراض ومرحلة ظهور الإعراض وإن كانت اقل حده للبروتين السطحى (م.م.ب).

الإستجابة المناعية كانت معدومة او قليلة جدا فى العجلى والأبقار الغير مصابه .

تقييم الإستجابة المناعية لخلايا الدم أحادية النواه :-

خلايا NK :- نسبة هذا النوع من الخلايا تمثل ٣-٥ % من جملة خلايا الدم أحادية النواه . أظهرت نتائج تحليل الإستجابة المناعية أن هذه الخلايا تتنشط بوجود او عدم وجود المنشطات المناعية الثلاث فقط فى العجلى والأبقار المصابة بهذه البكتريا . لم يلاحظ اى نشاط او تكاثر لهذه الخلايا فى العجول والأبقار الغير مصابة مما يجعلنا نقترح ان هذه البكتريا تؤثر على الدور الوظيفى لهذا النوع من الخلايا .

خلايا $CD2^{+}\gamma\delta T$:- نسبة هذا النوع من الخلايا تمثل من ٥-٦ % من جملة خلايا الدم أحادية النواه فى العجلى وحوالى ٢-٣ % فى الأبقار بغض النظر عن إصابتها او عدم إصابتها بهذه البكتريا . أظهرت نتائج تحليل الإستجابة المناعية لهذا النوع انها تتنشط بوجود المنشطات المناعية فى كل من العجول والإبقار المصابة . هذا النشاط يبدأ ضعيفاً فى وجود او عدم وجود المنشطات المناعية عند الشهر الثالث من الإصابة ويزداد تدريجياً ليكون قوياً فقط فى وجود المنشطات المناعية فى مرحلة قبل ظهور الأعراض ومرحلة ظهور الأعراض .

خلايا $CD2^{-}\gamma\delta T$:- نسبة هذا النوع من الخلايا يتراوح بين ٣٠-٦٠ % من جملة خلايا الدم أحادية النواه فى العجلى ، ٦ % من جملة خلايا الدم أحادية النواه فى الإبقار . أظهرت نتائج تحليل الإستجابة المناعية أن نسبة ضئيلة من هذه الخلايا تتنشط فى العجول او الإبقار المصابة مقارنة بالعجلى او الإبقار الغير مصابه . هذه النتائج تجعلنا نقترح أن هذه البكتريا تسبب خللاً فى الدور الوظيفى لهذا النوع من الخلايا .

خلايا $CD4^{+}T$:- نسبة هذا النوع من الخلايا تتراوح بين ٦-٣٠ % فى الفحص الدورى ، و ١٠-٤٠ % عند الفحص بعد ٦ ايام من التحضين . يصاحب هذه الزيادة نشطاً وتكاثراً ملحوظ .

هذا النشاط يحدث فى وجود المنشطات المناعية الثلاث فقط ويبدأ ملاحظته عند الشهر الثالث ليزداد تدريجياً ليكون قوياً فى مرحلة قبل ظهور الأعراض ومرحلة ظهور الأعراض . ولن كان لوحظ أن نشاط هذا النوع من الخلايا يكون قوياً ابتداء من الشهر الثانى عشر من الإصابة فى حالة المنشط المناعى (ب ب دس ا ج) . لم يلاحظ أى نشاط فى هذا النوع فى الحيوانات الغير مصابه .

خلايا $CD8^{+}T$:- نسبة هذا النوع من الخلايا تتراوح بين ١٢-٢٨ % فى كل من العجلى والإبقار المصابة او الغير مصابه . أظهرت نتائج تحليل الإستجابة المناعية لهذا النوع أن نسبة قليلة تتنشط عند الشهر الثالث من الإصابة خاصة فى وجود المنشطات المناعية هذا النشاط يظل ضعيفاً حتى الشهر الثانى عشر من الإصابة ثم يزداد بقوه فى مرحلة قبل ظهور الأعراض ومرحلة ظهور الأعراض .

مما سبق ذكره نستطيع القول أن هذه الدراسة نجحت فى إظهار كفائة جهاز الفلوسيتومترى لدراسة ومتابعة الإستجابة المناعية لهذه البكتريا التى استطعنا ان نطور أسلوب تحليل نتائجه بطريقة تمكنا من التفرقة بين الحيوانات المصابة وغير المصابه فى مرحلة مبكرة (الشهر الثالث من الإصابة) . أيضاً نستطيع القول أن هذه الدراسة تعتبر نواه وقاعدة بيانات لمجال الطب البيطرى فى مصر لإستخدام جهاز الفلوسيتومترى لرصد ومتابعة الإستجابة المناعية فى الحيوانات المصابة بميكروبات السل بوجه عام وميكروب الميكوباكتريم باراتيوبركلوزس بوجه خاص .