

جمهورية العراق
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
هيئة التعليم التقني



رئـىـعـةـ الـرـئـىـزـ الـطـبـىـ الـمـاـسـ لـلـأـسـاسـ الـنـظـمـ الـقـيـ



بغداد ٢٨ / ٣ / ٢٠٠٧

البحوث الزراعية

الاجسام المضادة للسائل المنوي في دم الأغنام المحلية⁺

د. هاشم مهدي عبود الريبيعي د. افتخار مهدي كاظم النجار ..

د. عدنان صالح الجنابي ...

المستخلص

اجري البحث على 200 عينة دم جمعت من قطعان الأغنام الاهلية في قضاء المسيب (محافظة بابل)

وشملت العينات حالات واعمر مختلفة من الأغنام بهدف الكشف عن وجود الأجسام المضادة للحيامن في عينات الدم باستعمال طريقة فرانكلين وديوك للتلازن.

تم تحضير مصل دم موجب التفاعل من نعجتين تم حقنها باربع جرع من من مستحلب السائل المنوي للكبش بفارق زمني امتد الى 14 يوم ، كما تم تحضير مصل دم سالب التفاعل وفحص بالطريقة نفسها واظهرت المصلو

الموجية نتائج ايجابية عند التخفيض (1 : 4096) .

اظهرت 89 عينة دم من مجموع 200 نتيجة موجبة للفحص بنسبة 44.5 % ، بينت العوامل المدروسة والمتمثلة بعدد الولادات وعدد النثنيات اللازمة للاصحاب والحالة المرضية والعمر نسبة حدوث موجبة بلغت 52.85 ، 57.48 ، 51.42 و 44.5 % بالتتابع وقد بينت نتائج الفحوصات المناعية اعلى نسبة حدوث للاحسام المضادة بلغت 54 ، 52 ، 46 ، 37.5 ، 30 و 25 % للنعام بعمر 2-4 سنة. للنعام بعمر 5-7 سنة والكباش كبيرة العمر والنعام الفتية والنعام الخواص والكباش الفتية على التوالي. شارت النتائج ان للحالة المرضية تاثير عالي المعنوية (> 0.01) ، في حين كان حالة الأغنام وعدد الولادات تأثير مستوى (< 0.05) مع مستوى الاحسام المناعية المضادة للحيامن .

ABSTRACT

This study is to perform on blood sample (200) have been collected from local sheep flock's Al-musaib city. Babylonian province. The sample included difference cases and ages of sheep They have been investigated to the presence of antisperm antibodies by Frnklin and Dukes agglutination test. Positive serum was prepared from immunizing 2 ewes by inoculation with suspension of semen (semen with adjuvant) 4 times every 14 days. Negative

لتحت مستخلص من رسالة الباحث الثاني
قسم تقبيلات الانتاج الحيواني - الكتبة التقنية / المسيب - هيئة التعليم التقني
قسم تقبيلات الانتاج الحيواني - الكتبة التقنية / المسيب - هيئة التعليم التقني
جامعة الهربرين

serum was prepared after investigated by same method. positive serums produced positive results after dilution 1: 4096 . The results appeared 89 Samples from 200 produced positive test results in a percent of 44.5 %, while a positive results according to factors correlated include percent of parturition, number of insemination, pathologic case and age were 52.85, 57.48, 51.42 and 44.5 % respectively.

This results of immunologic test produced major occurring presence of antisperm antibodies were 54, 52, 40, 37.5 , 30 and 25 % for ewes (2-4) years, ewes (5-7) years, old rams, young ewes, pregnant ewes and young rams respectively. The pathologic state appeared to be significant on level of ($P<0.01$). while effect for sheep state, number of parturition, number of insemination and age on the level of ($P<0.05$) with the level of antisperm antibodies.

المقدمة

تعد الاغنام من الركائز الاساسية للثروة الحيوانية في العراق ، لتنوع انتاجها من اللحوم والصوف والحليب ، وقد لوحظ انخفاض ادائها الانتاجي وتناقص اعدادها في السنوات الاخيرة لاسباب عديدة منها المشاكل التنسالية التي تؤدي الى فشل خصوبة الاناث وانعدام الحمل لاسباب مرضية واخرى تغذوية ودارية [1].

تبين ان هنالك اجسام مضادة للحيوان في السوائل الرحمية والمهبلية والدم في كل من الانسان والحيوانات الحقلية والمخترية تؤدي الى فشل الاصحاب ومن ثم الى العقم المناعي [2 و 3]، وقد استخدمت طرائق تجريبية للكشف عن الاجسام المضادة في سوائل الجهاز التنسالي ومصل الدم ، وقد اثبت علمياً بان هذه الاجسام تعمل على ايقاف الفعالية الفسلجية للحيمن او البيضة المخصبة او الجنين في بداية تكوينه وحتى في مراحل متقدمة من الحمل [4 و 5]، ودرست المستضدات الموجودة في رأس الحيمن وقطعته الوسطية وذيله والتي تؤدي الى تحفيز الاجسام المضادة نحوها [5 و 6] . وللكشف عن هذه الاجسام المضادة للحيوان هنالك ثلاثة فحوصات اولها تلازن الحيامن (Sperm agglutination assay) وثانياً فحص ايقاف حركة الحيمن (Sperm immobilization assay) واخيراً فحص الكشف المباشر للاجسام المضادة [7].

شارت نتائج البحث الى ان فشل الاصحاب يحدث بسبب العوامل المناعية [8 و 9] ، اجريت هذه الدراسة ونظرًا لقلة البحوث في مجال الاجسام المناعية فعلية تم اجراء فحوصات ميدانية على بینات دم مأخوذة من حالات

طبيعية وحالات مرضية لتحديد مستوى الاجسام المناعية المضادة للحيامن فيها ودراسة التغيرات في مستوى الاجسام المناعية باختلاف العمر وعدد الولادات وعدد التلقحات.

المواد وطرق البحث

تم جمع 200 عينة دم عشوائية من قطعات الأغذام الخلية المنتشرة في قضاء المسيب محافظة بابل وكانت العينات للكباش، نعاج حومان، نعاج والدة وأخرى تعاني من فشل الأخصاب من دون سبب واضح يمكن تشخيصه بالفحص السريري، وقد عدت الأغذام التي لم تتعامل (تعنخ) بالسائل المنوي مصوّل دم سالبة التفاعل.

تم جمع عينات الدم (10 سم³) من الوريد الوداجي (Jugular vein) وترك الدم بعد جمعه لمدة ساعة وفي درجة حرارة الغرفة وبشكل مائل ثم وضعت الانابيب بحمام مائي بدرجة حرارة 37 درجة مئوية ثم وضعت في الثلاجة وبدرجة حرارة 4 درجة مئوية ولمدة 12 ساعة ، وتم فصل المصل بوساطة جهاز الطرد المركزي (Centrifuge) بسرعة 1500 دورة / دقيقة ولمدة 5 دقائق.

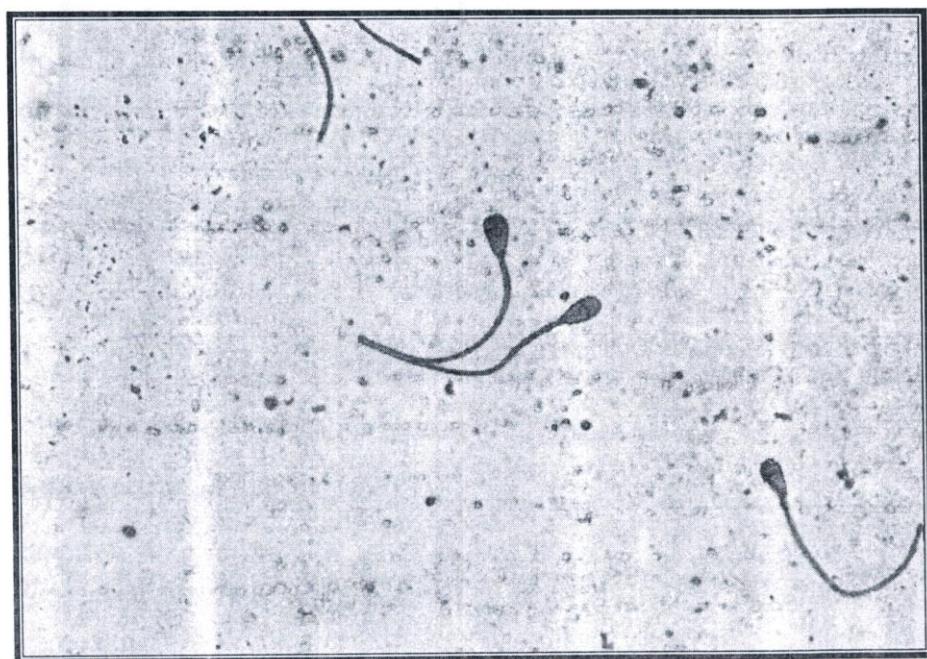
تم جمع السائل المنوي من الكباش بعمر 2 سنة الموجود في حقل الكلية التقنية في المسيب بوساطة المهبل الاصطناعي ، ومن ثم تم قياس حجم القذفة (0.5-2.0 سم³) وقياس الحركة الفردية والجماعية (70-80 %) فضلا عن تركيز الحيامن في القذفة والتي بلغت 2.5 مليار حيمين / سم³ وكان لون السائل المنوي كريمي أبيض.

تم تحضير مصل دم موجب التفاعل كما يلي

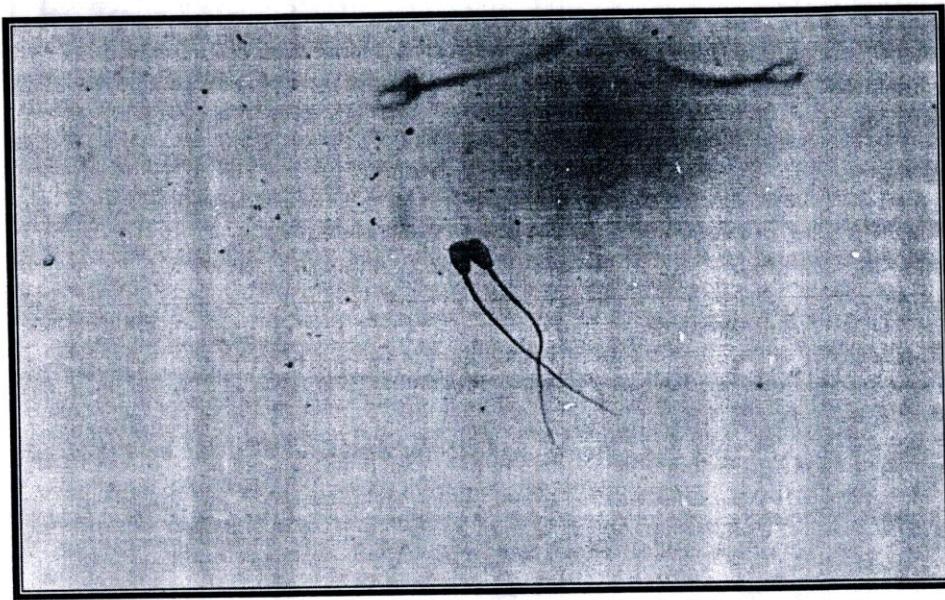
بعد جمع السائل المنوي وتقييمه ، تم تخفيفه بنسبة 95:5 حجم / حجم في محلول ملحي فسلجي ليصبح تركيز الحيامن 5% ، ومن ثم تم عمل مستحلب (Emulsion) من السائل المجمع من الكباش ومساعد فروانيد الكامل (Complete Freud's Adjuvant) اذا تم خلط 2 سم³ من السائل المنوي المخفف ثم أضيف له 4 سم³ من المساعد وتم خلطه بوساطة جهاز استحلاب كهربائي للحصول على مستحلب لا ينشر على سطح الماء (Hemogenizor) . بعد ساعة من تحضير المستحلب تم حقن 2 نعجة عوasaية 3 سم³ لكل نعجة من المستحلب في الجلد (Intradermal) في اربعة اماكن موزعة على الظهر ، على ان تعاد هذه العملية كل 14 يوم ولمدة 42 يوما وتم في النهاية اعطاء كل نعجة ما مجموعه 4 جرع من المستحلب وبعد سبعة ايام من الجرعة الاخيرة تم جمع الدم من النعاج ومن ثم فصل المصوّل الموجبة وحفظها في المجمدة عند درجة حرارة -20 درجة مئوية في عبوات سعة 5 سم³.

لحين الفحص ، اذ استخدمت كمصول موجبة التفاعل لاغراض السيطرة وبعد مصل الدم موجب التفاعل اذا احدث تلازن في السائل المنوي المفحوص لاثنين او اكثر من الحيامن الظاهرة في كل حقل مجيري كما موضح بالاشكال او 2.

استعملت طريقة فرانكلين وبيوك وهي احدى طرائق التلازن المستعمل في الكشف عن الاجسام المضادة للحيامن وتعيين عياريتها في نموذج مصل الدم [10].



شكل (1) تلازن الحيامن ذيل بذيل



شكل (2) تلارن الحيامن راس براس

استعمل اختبار مربع كاي (chi-square) وفق طريقة (Contingency tables) [11] في التحليل الاحصائي لمعرفة تأثير العوامل المدروسة (حالة الحيوان ، عدد التلقحات اللازمة للاخصاب بعد اخر ولادة ، عدد الولادات والحالة الصحية للحيوان) في مستوى الاجسام المناعية المضادة للحيامن وذلك باستعمال البرنامج الاحصائي [12] SAS.

النتائج والمناقشة

اظهرت النتائج في جدول (1) ان 89 عينة من مجموع 200 عينة بيّنت ان امصالها تحتوي على مستويات مختلفة من الاجسام المضادة للحيامن .
وبيّنت النتائج ان الاغذام الكبيرة العمر كانت ذات اعلى نسبة حدوث لالجسام المضادة (54%) وهذه النسبة مثلت 10% من المجموع الكلي. اما النعاج الولادة فقد اظهرت نسبة حدوث بلغت 52.80 % وتمثلت اقصى نسبة من المجموع الكلي (18.5%)، بينما كانت نسبة حدوث الاجسام المضادة للنعاج الفتية، الكباش الكبير، الكباش الفتية والنعاج الحوامل نسبة حدوث لالجسام المضادة بلغت 37.5 ، 46 ، 25 و 30 % وبنسبة 7.5 ، 3 ، 2.5 و 3 % من المجموع الكلي على التوالي ، وقد كان تأثير حالة الاغذام في مستوى الاجسام المضادة معنويا ($P < 0.05$) . وقد يعزى

هذا الى ان اغلب هذه الحيوانات الكبيرة العمر كانت تعاني من فشل الاخصاب (زيادة عدد التلقحات اللازمة للاخصاب ، وقد اشار [13] ان ظاهرة تكرار الصرف قد تحدث لاسباب غير معروفة قد تكون بسيطة او معقدة لا يمكن تشخيصها وهذا يشير الى السبب المناعي. اما ارتفاع النسبة لدى الكباش الكبيرة مقارنة بمثيلاتها الفتية فقد يعود ربما الى ان المناعة التكاثرية قد تبدأ من الذكر وذلك قد يكون بسبب التهاب الخصية او انسداد الاقيبة التكاثرية او ازالة الاسهر وهذه الحالات غالبا ما تصيب الذكور الكبيرة [1].

يتبيّن من الجدول [2] العلاقة بين عدد الولادات ومستوى الاجسام المناعية المضادة للحيوان ويشمل 70 نعجة ولادة () لمرة واحدة ، مرتين ، ثلات مرات واربع مرات فأكثر) ، واظهرت هذه النتائج نسبة حدوث للاجسام المضادة بلغت ، % 52.85

جدول 1 تأثير حالة الاغنام في مستوى الاجسام المناعية

النسبة المئوية من المجموع الكلي للعينات	حيوانات موجبة الاختبار عدد	عدد الأغنام حسب اختبار مستوى الاجسام المناعية						حالة الأغنام (العدد)
		1024	512	256	128	64	32	
%10	(20)	7	3	3	3	4	17	نعااج كبيرة (37)
%54				•				
%7.5	(15)	1	1	9	2	2	25	نعااج فتية (40)
%37.5								
%3	(6)	0	1	1	2	2	7	كباش كبيرة (13)
%46								
%2.5	(5)	0	0	3	1	1	15	اكباش فتية (20)
%25								
%18.5	(37)	10	9	3	8	7	33	نعااج ولادة (70)
%52.8								
%3	(6)	2	2	1	1	0	14	نعااج حوامل (20)
%30								
%44.5	(89)	20	16	20	17	16	111 (55.5)	المجموع 200
%44.5								

- النتائج عند مستوى 32 فما دون سالبة

- قيم مربع كاي χ^2 : للنسبة المئوية إلى حالة الحيوان : 6.36 *

للسنة المئوية من المجموع الكلي : 3.90^{NS}

لعدد الأغنام حسب مستوى الأجسام المناعية : 0.90^{NS}

- * معنويا على مستوى احتمال 5%

(غير معنوي) NS -

جدول 2 تأثير عدد الولادات في مستوى الأجسام المناعية

النسبة المئوية من المجموع الكلي للعينات	حيوانات موجبة الاختبار عدد	عدد النعاج حسب اختبار مستوى الأجسام المناعية						عدد الولادات (العدد)
		1024	512	256	128	64	32	
%10	%35 (7)	1	1	1	3	1	13	والدة لمرة (20)
%8.57	(6)	0	1	1	2	2	11	والدة لمرتين (17)
%12.85	(9)	1	1	2	2	3	4	والدة لثلاث مرات (13)
%21.42	(15)	3	2	3	4	3	5	والدة أربع مرات فما فوق (20)
%52.85	(37)	5	5	7	11	9	33	المجموع (70)

- النتائج عند مستوى 32 فما دون سالبة

- قيم مربع كاي χ^2 : للنسبة المئوية إلى عدد الولادات 8.49 *

للسنة المئوية من المجموع الكلي 2.11^{NS}

لعدد الأغنام حسب مستوى الأجسام المناعية 1.67^{NS}

- * معنويا على مستوى احتمال 5%

(غير معنوي) NS -

بينت 37 نعجة نتيجة موجبة وقد كانت اقصى نسبة حدوث لدى النعاج الولادة لاربع مرات وبلغت 75% وبعيارية 64-1024 ، وتلتها النعاج الولادة ثلاثة مرات (69.6%) ، اما النعاج الولادة لمرة واحدة ومرتين فقد اظهرتا نتائج متقاربة في نسبة الحدوث للاجسام المضادة وهي 35 و 35.2% بالتتابع. وقد يعزى ارتفاع نسبة الحدوث للاجسام المضادة مع زيادة عدد مرات الولادة ربما نتيجة تعرضها الى التهابات رحم سريرية وتحت سريرية ناجمة عن عمليات الولادة والتقطيع وهذا ما يثير الجهاز المناعي وتكون الاجسام المضادة ، كما ان كثرة التعرض للحيوان (المستضد) غالباً ما يثير الذاكرة المناعية لتكون الاجسام المضادة [14].

اما بالنسبة لعدد التلقحات اللازمة للاخصاب بعد اخر ولادة وعلاقتها بمستوى الاجسام المضادة للحيوان ، فقد ثبّت ان 73 نعجة من اصل 127 نعجة سجلت نتيجة موجبة وبنسبة كلية وصلت الى 57.48% وبعيارية 64-1024 ، واتضح بان النعاج التي احتاجت 1-2 تلقيحة سجلت اعلى نسب حدوث بلغت 75% ، بينما حققت النعاج التي احتاجت الى 3-4 و 5-6 و اكثر من 6 تلقحات نسبة حدوث بلغت 42.5 و 53.3 و 58.8% على التوالي ، وكانت الفروق معنوية بين النسب (الجدول 3). ان ارتفاع النسبة لدى النعاج التي احتاجت الى 1-2 تلقيحة قد يعود الى الادارة غير الجيدة في تسفيد النعاج مباشرة بعد اخر ولادة في فترة النفاس وغالباً في الحالات المصاحبة للتهاب بطانة الرحم تحت السريري والذي لم يظهر اعراض مرضية فيؤدي الى تحفيز الاجسام المضادة ، اما زيادة عدد التلقحات ل اكثر من ستة تلقحات والتي ادت الى زيادة نسبة حدوث الاجسام المضادة فأنها ناجمة من التلقيح المتكرر الذي يدعم انتاج الاجسام المضادة وهذا يتفق مع ما توصل اليه [13]

يتبيّن من الجدول [4] ان تأثير حالة الحيوان الصحية مع وجود الاجسام المضادة للحيوان بانها معنوية ($P<0.01$) ، اذ اظهرت النعاج التي تعاني من امراض ولادية سابقة نتائج موجبة وبنسبة 80% ، اما النعاج التي لم تعاني من امراض ولادية سابقة فقد بلغت النسبة فيها 40% ، وكانت نسبة الحدوث الكلية 51.42% اذ بلغت 28.57% بالنسبة للنعاج السليمة والمصابة على التوالي. ان اصابة الجهاز التناسلي والتي ترافق عادة الامراض الولادية وخاصة اذا كانت متباعدة بانواع البكتيرية مثل الكلاميديا التي تسبب العقم تكون الاجسام المناعية المضادة للحيوان [4].

جدول 3 تأثير عدد التلقيمات من اخر ولادة في مستوى الاجسام المضادة للحيوان

النسبة المئوية من المجموع الكلي للعينات	حيوانات موجبة الاختبار عدد	عدد الاغنام حسب مستوى الاجسام المناعية						عدد التلقيمات
		1024	512	256	128	64	32 سالب	
%23.62	(30)	2	6	4	12	6	10	نقيحة (2-1) (40)
	%75							
%13.38	(17)	2	2	2	6	5	23	نقيحة (4-3) (40)
	%42.5							
%12.59	(16)	4	8	1	1	2	14	نقيحة (6-5) (30)
	%53.3							
%7.87	(10)	2	1	3	2	2	7	اكثر من 6 تلقيمات (17)
	%58.8							
%57.48	(73)	10	17	10	21	15	54	المجموع 127

- النتائج عند مستوى 32 فما دون سالبة

- قيم مربع كاي² : للنسبة المئوية لعدد التلقيمات *7.40

للنسبة المئوية من المجموع الكلي 2.59^{NS}

لعدد الاغنام حسب مستوى الاجسام المناعية 3.13^{NS}

- * معنويا على مستوى احتمال 5%

- NS (غير معنوي)

جدول 4 تأثير بين الحالة المرضية في مستوى الأجسام المناعية

النسبة المئوية من المجموع الكلي للعينات	حيوانات موجبة الاختبار عدد	عدد النعاج حسب مستوى الأجسام المناعية						الحالة المرضية (العدد)
		1024	512	256	128	64	32	
%22.85	(16) %80	2	4	3	5	2	4	نعاج تعاني من امراض ولادية سابقة (20)
%28.57	(20) %40	0	0	4	8	8	30	نعاج لم تعاني من امراض ولادية سابقة (50)
%51.42	(36)	2	4	7	13	10	34	المجموع 70

- النتائج عند مستوى 32 فما دون سالبة

- قيم مربع كاي χ^2 : للنسبة المئوية الى الحالة المرضية *20.00

للنسبة المئوية من المجموع الكلي 2.85^{NS}

لعدد الاغنام حسب مستوى الأجسام المناعية 1.68^{NS}

- * معنويا على مستوى احتمال 5%

- NS (غير معنوي)

جدول 5 العلاقة بين العمر ومستوى الاجسام المضادة للحيوان

العمر	عدد الاغنام حسب مستوى الاجسام المناعية						
		1024	512	256	128	64	32
العينات	الاختبار عدد	حيوانات موجبة	الاخبار	المجموع الكلي	النسبة المئوية من		
%17.5	(35)	2	3	3	10	17	45
	%43.75						
%1.5	(3)	1	0	1	1	0	10
	%23						
%3	(6)	1	3	2	0	0	10
	%33.75						
%3	(6)	2	4	0	0	0	15
	28.75						
%19.5	(39)	8	12	9	5	5	31
	%57.14						
44.5	(89)	14	22	15	16	22	111
							المجموع (200)

* النتائج عند مستوى 32 فما دون سالبة

قيمة مربع كاي سكوير χ^2 : للفariance المئوية لعمر الحيوان * 8.14

للفariance المئوية من المجموع الكلي * 7.005

للفariance المئوية لمستوى الاجسام المناعية 2.116 NS

- * معنويا على مستوى احتمال 5%

- NS (غير معنوي)

يتضح من الجدول (5) العلاقة بين العمر ومستوى الاجسام المضادة للحيوان ، اذ اظهرت الفئة العمرية 5 سنوات فاكثر نتائج موجبة باعلى نسبة ضئلية 57.14 % وبنسبة كلية من المجموع الكلي بلغت 19.5 % وبعيارية 1024-64 في حين اظهر 31 حيوان من الفئة العمرية نفسها نتائج سالبة وبعيارية 32 فما دون ، في حين جاءت النتائج التي بعمر 2 سنة بادنى نسبة حدوث (23 %). يمكن تفسير ذلك بان مع تقدم العمر يتعرض الحيوان لتنوع عدّة من المستضدات الناتجة من التسفيقات والحمل والولادات والعلاجات ، وهذه المستضدات قد تثير او تحفز المناعة او الاجسام المناعية المضادة [1 و 2].

من خلال ما تقدم يمكن ان نستنتج سيادة السبب المناعي في حالة تكرار الصراف ويتضح ذلك من خلال زيادة عيارية الاجسام المضادة للحيوان في امصال الدم المفحوصة الى مستويات قصوى ، وهنالك علاقة واضحة بين نسبة الاجسام المناعية للحيوان في مصل الدم وكل من حالة الاغnam وعدد التلقحات والحالة المرضية وعدد الولادات والعمur ، وان المعابير الواطنة للاجسام المضادة لا تؤثر في خصوبة الحيوان.

المصادر

1. Dale, M.G. and Alan R.D. (1996). Reproductive problems in ram.Pp, 1-4.
2. Karen, P.B. and Donald, J.D. (2001). Reproduction ad immune system. Medical immunology 10th edition. 41: 548-557.
3. Gandini, I., Lenzi , A., Culass, F., Lambardo, F., Paoli, D. and Donodero, F. (1995). Study of antisperm antibodies bound to the serum cell surface and their relationship to circulating AsA. Am. J. Reprod. Immunol. 34: 375-380.
4. Traviencek, M.D., Kovacova, M.R., Bhide, P. and Zubricky, L. (2003). Deletion of IgG antibodies against chlamydophila aborts I sheep with reproductive disorders. Acta. Vet. Bron. 72: 95-99.
5. Zhang, Z., Richetts, S.W. and Tanner, S.I. (1999). Antisperm antibodies in the semen of stallion following testicular traum Equin Vet. J. 22: 138-141.
6. Zraly, Z., Canderle,J. Diblikova, I. Svecova, D. Maskova, I. and Kummer, V. (2003). Antisperm antibodies cows in relation to their reproduction and health. Acta. Vet.Brno. 72: 27-32.
7. Rajesh, K.N. and Xiaolong , Z. (1998). Recombinant fertilization antigen-1 cause a contraceptive effect in actively immunized mice. Biology of reproduction. 59: 1095-1100.

8. Mandelbaum, S.L., Diamond, M.P. and Decherney, A.H. (1989). Relationship of antibodies to sperm head to etiology of infertile in patients undergoing *invitro* fertilization embryo transfer. Am. J. Reprod. Immunol. 19:3-5.
9. London, S.N., Heney, A.F. and Brice, W.G. (1985). Macrophage and infertility: Enhancement of human macrophage- mediated sperm killing by antisperm antibodies, fertility and sterility.43: 274-277.
10. Franklin, R.R. and Dukes, C.D. (1964). Antispermatozoal Antibody and Unexplained Infertility. Am. J. Obstet. Gyneco. 8916.
11. Steel, R.G. and Torri, J.H. (1990). Principles and procedures of statistics. 2nd. McGraw-Hill Book company. Newyork.
12. SAS. (2001). SAS/ State users Guide for Personal Computer. Release. 6.12 SAS Inst. Inc. Cary, NC. USA..
13. Bruyas, J.F., Fieni, F. and Tainturier, D. (1993). Le syndrome (Repeat Breeding Analysis-Biliographique. Diagnostic Treatment) Revue Med-vet. 6: 503-513. France.
14. Setu, M.D. and Adam, S. (1998). Atisperm antibodies etiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. Fertility and sterility, 5: 799-810.