معالجة إسهال روتا فايروس الأطفال باستخدام حليب اطفال مدعم بكلوبيولينات لبأ الأبقار المناعية

عبد المجيد حماد السامرائي
قسم علوم الاغذية والتقانات الاحيائية
كلية الزراعة – جامعة بغداد

رغد اكرم عزيز
قسم العلوم
كلية التربية الأساسية – الجامعة المستنصرية

يونس عبد الرضا الخفاجي
كلية طب الاسنان – جامعة بابل

المستخلص

عزل فايروس روتا من براز اطفال مصابين بالاسهال، ثم حقن تحت جلد ابقار حوامل، ومن شرش اللبأ الناتج منها رسبت بروتينات المناعة الخام (Igs) وامرر مقدار منها علـى عمـود Sephadex G - 200 لفصلها الى IgG ، IgA و IgM، واختبرت فعالية Igs والانواع المنقاة منها في معادلة الفايروس في نماذج براز الاطفال فظهر ان 1 ملغم من البروتين المناعي الخام عند خلطه مع 1 مللتر براز يخفض معيار الفايروس من1:32 – 1:256 الى صفر – 1:4 في ستة من النماذج. وعند استخدام 1 ملغم من كل نوع منقى لمعادلة الفايروس في 1 مل من نماذج البراز نفسها تمكن IgM، IgAوIgG من خفض معيار الفايروس الى الصفر في 10، 9و 7 نماذج على الترتيب. اما النماذج الباقية، سواء التي استخدم معها Igs الخام او المنقاة فكان معيارها بين 1:2 – 1:4 .استخدمت Igs الخام فقط بعد تجفيدها، كإضافات غذائيـة مـع حليـب الاطفـال لـغرض معـالجـة الإسـهـال لعشـرين طـفـلاً تنـاول نصفـهم 750 – 850 مـلـلـتر حليـب مـدعـم بمقدار 1 غم بروتينات مناعة / لتر، وتناول نـصفـهم الآخـر الحـجم نفسه مـن حـليـب مـدعـم بمقدار 1.250 غم بروتينات مناعة / لتر حليب في اليوم الواحد، فانخفض عدد نوبات الاسهال عندهم خلال 48 ساعة من المعالجة المستـمرة ، وحصل شـفاء لنسبة 60 % من الحالات في نهاية هذه المدة عـند استخدام الـتركيز الاعلى، في حين استـمر الإسهال للمدة ذاتهـا في مجموعة القياس التي تناولت حليباً غير مدعم ببروتينات المناعة.

The Iraqi Journal of Agricultural Science 39 (5) : 61-74 (2008) Al -Samarraie et al.

TREATING INFANT`S ROTAVIRUS DIARRHEA BY USING BABY FORMULA SUPPLEMENTED WITH IMMUNOGLOBULINS FROM BOVINE COLOSTRUM

Abdul majeed H. Al- Samarraie
Dept. of Food Science & Biotechnology
College of Agriculture / University of Baghdad

R. A. Azeez
Dept. of Science
College of Basic Education / University of Al-Mustansirya

Y. A. Khafaji
College of Dentistry, University of Babil

ABSTRACT

Rotavirus was isolated from infant stools suffered from diarrhea. Pregnant cows were vaccinated subcutaneously by the isolated virus. From the colostrums of such cows immunoglobulin (Igs) were precipitated and then passed through Sephadex G-200 column to obtain pure IgG, IgA, IgM. The crude and purified Igs were tested through neutralization of virus in stools of 10 infected infants. It was shown that 1mg of crude antibodies when mixed with 1ml of stool could decrease the virus titer from 1:32- 1:256 to 0- 1:4 in 6 samples. When 1mg of every purified Igs fraction was mixed with 1ml of stool, it was shown that IgM, IgA and IgG reduced virus titer to zero in 10, 9and 7 samples, respectively. The rest of samples, either those treated with crude or purified Igs, showed titers between 1:2-1:4. The crude Igs, after lyophilization, was used as a supplement in infant formula to treat 20 infants diagnosed with diarrhea. Ten of them received 750- 850 ml of milk supplemented with 1 g Igs/ l, The other ten received the same volume with 1.25 g Igs/ l . The diarrhea episodes were decreased within 48 hrs of the continuous treatment. The higher concentration at the end of treatment cured 60% of initial cases, compared to 20% cured in the lower concentration group, while the control group who received the unfortified milk continued at the same rate of diarrhea episodes.

Part of Ph.D. dissertation for the second author البحث مستل من اطروحة دكتوراه للباحث الثاني

المقدمة

يعد مرض الاسهال واحداً من اهم الامراض التي تصيب الانسان والحيوان على حد سواء لاسيما حديثي الولادة. ويقدر عدد الاطفال المصابين بالاسهال في العالم ممن هم دون الخمس سنوات من اعمارهم بالف مليون يموت منهم 3.3 مليون سنويا، تقل اعمار 80% منهم عن سنتين. وفي الولايات المتحدة الامريكية وحدها تحدث سنوياً 16.5 مليون حالة اسهال في الاطفال الذين تقل اعمارهم عن خمس سنوات وتؤدي الى وفاة 500 - 400 منهم (16).

تعددت مسببات الاسهال لدى الاطفال فمنها المسببات الطفيلية (Protozoal agents) مثل *Entamoeba histolytica* ، *Giardia crytosporidium* و *Giardia lamblia* وكذلك الخمائرية مثل *Candida albicans* والبكتيرية كالذي تسببه بكتريا *Salmonella Escherichia coli* ; spp. و *Shigella* spp. وهناك المسببات الفايروسيه مثل الفايروسات التاجية (Coronaviruses) والفايروسات الغدانية (Adenoviruses) والفايروسات الكأسية (Caliciviruses) وفايروسات البارفو (Parvoviruses)، لكن الأكثر شيوعا وحدة وخطورة على الأطفال هو فايروس روتا (Rotavirus)، (28,25,21). وقد يكون الاسهال بهذا الفايروس احياناً من النوع المزمن. اذ يستمر 6 1 - اشهر لاسيما في الاطفال المجهدين او الذين يعانون من نقص التغذية، وقد يؤدي الاسهال احياناً الى الوفاة بسبب الجفاف الحاد فضلاً عن حدوث الاختلاطات الجرثومية. ووجد ان الاطفال بأعمار اقل من سنة هم اكثر عرضة للاصابة بفايروس الروتا من الاطفال الاكبر عمرا. وقد يعزى هذا الى الاستجابة المناعية نتيجة الاصابة الاولى التي قد تقي من الاصابات الاخرى وتقل من حدتها (36,29).

تسبب فايروسات الروتا التهاب المعدة والأمعاء الحاد في الأطفال (35,12,8) بكافة الاعمار والأجناس، الا ان الإصابة تكثر في الاعمار مابين 6 - 24 شهر (34,17). وقد اشارت الدراسات الى وجود اعداد هائلة من الفايروس في براز الأطفال المصابين قد تصل الى مليون او اكثر في الغرام الواحد، ويمكنها ان تبقى نشطة لعدة اشهر مالم يجف الوسط(37). تكثر الإصابة بفايروس الروتا في الأشهر الباردة الجافة من السنة، ويطلق عليه بالإسهال الشتوي، الا انه يمكن ان تظهر حالات من الإصابة على مدار السنة لاسيما في المناطق الموبوءة (38,18).

ولما لم تظهر حتى الان ادوية تقاوم الفايروسات فان هذا البحث هو محاولة لمقاومة فايروس روتا في الجسم الحي لغرض معالجة الاسهال في اطفال مصابين بهذا الفايروس باستخدام مادة غذائية فقط هي بروتينات المناعة من لبأ الابقار.

المواد وطرائق العمل

جمع العينات المرضية من الأطفال

جمعت 136عينة براز أطفال مصابين بالإسهال عن طريق التشخيص السريري، وكانت أعمارهم تتراوح بين يوم و24 شهراً، وذلك من مستشفى المنصور للأطفال ومستشفى الطفل المركزي التعليمي للأطفال، ابتداء من شهر كانون الأول من عام 2003 ولغاية شهر أيار من عام 2005، ووضعت جميع العينات في قناني بلاستيكية معقمة محكمة الغطاء ونقلت إلى المختبر تحت ظروف مبردة حيث أجريت الفحوصات المختبرية للكشف عن وجود الفايروس ، وحفظت العينات ذات النتائج الموجبة في درجة حرارة –20 م لحين الاستعمال. كما استعلم عن بعض المعلومات الطبية والمختبرية والظروف الاجتماعية الخاصة بالمرضى المصابين.

الكشف عن الفايروس في البراز

استخدمت عدة (Kit) اختبار تلازن اللاتكس المجهزة من شركة Biokit الأسبانية في اختبار تلازن اللاتكس لغرض الكشف عن فايروس الروتا في براز الاطفال المصابين بالاسهال، واتبعت الطريقة التي أرفقت بها الشركة في اجراء الاختبار.

تلقيح الابقار بالفايروس

استخلص الفايروس من براز اطفال المصابين حسب الطريقة التي أوردها Jorgensen وآخرون (20) ، وركز الفايروس في العالق الفايروسي المحضر حسب ما وصفه Al-Yousif وآخرون (2)، وقدر تركيز البروتين اعتمادا على الطريقة التي وصفها Lowry وآخرون (24)، وتم اخماد الفايروس وفق ما ذكره وآخرون (9)، وحضر بعدها مستحلب اللقاح الفايروسي حسب ما وصفه Martella وآخرون (26)، واتبعت الطريقة التي ذكرها Rahman وآخرون (30) في تلقيح الابقار قبل شهرين من موعد الولادة بجرعة مقدارها 5 مللتر من اللقاح الفايروسي تحت جلد الرقبة بأكثر من منطقة، وقد اعطيت الابقار ثلاث جرع من اللقاح فصلت بين جرعة واخرى مدة اسبوعين.

فصل بروتينات المناعة Immunoglobulins (Igs) من شرش اللبأ بطريقة الترسيب الملحي

استخدمت الطريقة التي ذكرها Goding (14) في فصل بروتينات المناعة من شرش اللبأ باضافة قطرات من محلول مشبع لكبريتات الامونيوم لحين الوصول الى تشبع 40 % مع الاستمرار بالتحريك مدة 2 ساعة على درجة حرارة 4 م، وبعد فصل الراسب بالطرد المركزي على سرعة 3000 دورة / دقيقة، مدة 30 دقيقة وعلى درجة حرارة 4 م . اذيب الراسب بالماء المقطر، واعيد ترسيبه بكبريتات الامونيوم مرة اخرى، وبنسبة تشبع 30 %، وبعد الطرد المركزي اذيب الراسب بالماء المقطر، واجريت له عملية التنافذ الغشائي (ديلزة) ضد الماء المقطر خلال 18 ساعة وبدرجة حرارة 4 م ، بعدها حفظت النماذج في درجة حرارة - 20 م° لحين الاستعمال.

تنقية البروتينات المناعية باستخدام كروماتوكرافي الترشيح الهلامي

اتبعت الطريقة التي اوردها Al-Mashikhi و Nakai (1) ،حيث امرر 2 مللتر من بروتينات المناعة المحضرة مسبقاً على عمود الـ Sephadex G -200، ثم جرى غسل العمود بمحلول الموازنة (دارئ الـ Tris بتركيز 0.1 مولار وكلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار، وبرقم هيدروجيني 8)، وبسرعة جريان 18 مللتر / ساعة، وجمعت الأجزاء المنفصلة في أنابيب إختبار وبواقع 3 مللتر / جزء، وقيست الامتصاصية للأجزاء المفصولة على موجة طولها 280 نانومتر، وحفظت النماذج في درجة حرارة - 20 م لحين الاستعمال.

اختبار الانتشار المناعي المزدوج

استخدم هذا الاختبار لقياس فعالية امصال الدم والشرش وبروتينات المناعة المنقاة من الشرش ضد فايروس الروتا كما ذكره Johnstone و Thrope (19).

الترحيل الكهربائي بهلام متعدد الاكريلامايد

اجري الترحيل الكهربائي باستخدام الطريقة التي وصفها Laemmli (22) .

تقدير تركيز البروتين

اتبعت طريقة Lowry واخرون (24) لتقدير تركيز البروتين في المصل والشرش.

اختبار التعادل المصلي

اتبعت الطريقة التي أوردها Coluchi وآخرون (11) ، اذ اخذت عينات البراز ذات التفاعل الموجب لاختبار تلازن اللاتكس من الأطفال وخلال الطور الحاد من المرض، وتم قياس معيار الفايروس في كل عينة، وذلك بعمل تخافيف مضاعفة للعينات من 2:1 إلى 256:1 باستخدام الماء المقطر ثم مزج 100 مايكرولتر من كل تخفيف مع 100 مايكرولتر من محلول البروتينات المناعية المنقاة المتخصصة ضد فايروس روتا الأطفال الخام وبتركيز 1 ملغم / مللتر، واستخدم اختبار تلازن اللاتكس للكشف عن تفاعل الفايروس مع حبيبات اللاتكس بعد عملية التعادل.

استخدام بروتينات اللبأ المناعية المتخصصة ضد فايروس الروتا في معالجة حالات الاسهال في الاطفال الرضع

اتبعت الطريقة التي ذكرها Rahman وآخرون (30) ، حيث امرر محلول بروتينات المناعة الخام المحضر مسبقاً خلال مرشح غشائي دقيق 0.22 Millipore مايكرون معقم إلى قنينة معقمة، وجففت النماذج بالتجفيد (Freez drying) وحفظت بالتجميد لحين الاستعمال. مزجت بروتينات المناعة المجفدة مع الحليب المجفف نوع ديالاك (Dialac) ليصبح تركيزها على مستويين: 1 غم / لتر من الحليب

المسترجع وكذلك 1.250 غم / لتر ، واعطيت عن طريق الفم للأطفال المصابين خلال 48 ساعة؛ وقد وجد انهم يستهلكون ما بين 750-850 ملتر حليب خلال 24 ساعة. أخذت عينات من براز الأطفال المصابين قبل العلاج وبعد 24 و 48 ساعة منه، وقدر معيار الفايروس فيها باستخدام اختبار تلازن اللاتكس.

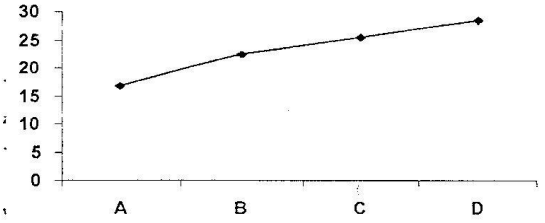
النتائج والمناقشة

محتوى مصل دم الابقار الملقحة بفايروس الروتا من بروتينات المناعة

تبين النتائج في الشكل 1 وجود زيادة تدريجية في تركيز بروتينات المناعة في مصل دم الابقار الملقحة بفايروس روتا الاطفال المخمد، اذ كان معدل تركيزها في ثلاث ابقار اخذت كعينة ممثلة قبل تلقيحها بفايروس روتا الاطفال 16.8 ملغم / مللتر ، وقد وصل معدل اعلى تركيز لهذه البروتينات بعد اسبوعين من الجرعة الثالثة والاخيرة من التلقيح الى 28.6 ملغم / مللتر في مصل دم الابقار الملقحة بفايروس الروتا.

محتوى لبأ الابقار الملقحة بفايروس الروتا من بروتينات المناعة

يلاحظ من الشكل 2 الارتفاع الواضح في تركيز بروتينات المناعة الخام في شرش اللبأ خلال الايام الخمسة الاول من الافراز مع وجود انخفاض تدريجي في كل يوم عن اليوم الذي قبله، اذ انخفض معدل تركيز بروتينات المناعة في شرش لبأ الابقار الملقحة بفايروس روتا الاطفال من 43.7 ملغم / مللتر في اليوم الاول من الافراز الى 4.4 ملغم / مللتر في اليوم الخامس، وهذا يتفق مع ما جاء به Butler (7) و Ontsouka وآخرون (27). ان معدل تركيز بروتينات المناعة في اللبأ يعتمد بشكل رئيس على نسبة ونوع هذه البروتينات في مصل الدم ولاسيما في الاسابيع الثلاثة الاخيرة قبل الولادة (23, 15,13,6,5) .

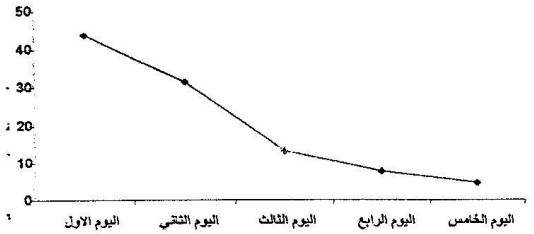


نماذج المصل خلال برنامج التلقيح

شكل1. معدل تركيز بروتينات المناعة في مصول دماء ثلاث من الابقار الملقحة بفايروس روتا الاطفال.

A مصل الدم قبل التلقيح C مصل الدم بعد اسبوعين من الحقنة الثانية

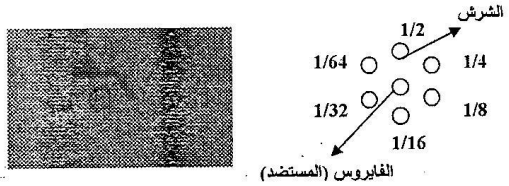
B مصل الدم بعد اسبوعين من الحقنة الاولى D مصل الدم بعد اسبوعين من الحقنة الثالثة



شكل 2. معدل تركيز بروتينات المناعة في شرش لبأ خمسة من الابقار الملقحة بفايروس روتا الاطفال خلال خمسة ايام بعد الولادة.

تقدير عيارية الاضداد في اللبأ

قدرت العيارية لشرش اللبأ في اليوم الأول من افرازه بوساطة اختبار الانتشار المناعي المزدوج، فكانت 4:1 وكما موضح في الشكل 3 .



شكل 3. اختبار الانتشار المناعي المزدوج بين فايروس روتا الاطفال وشرش اللبأ المضاد له في اليوم الأول من افراز اللبأ.

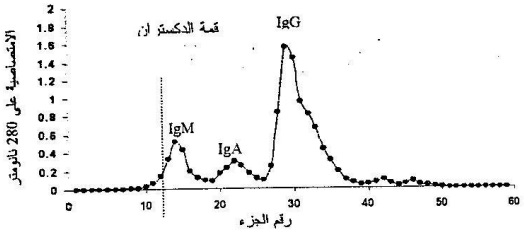
تنقية البروتينات المناعية IgG, IgA, IgM من شرش لبأ الابقار باستخدام كروماتوكرافي الترشيح الهلامي

تمتاز بروتينات المناعة الخام باوزانها الجزيئية العالية و المتباينة اذ تتراوح ما بين 150 كيلو دالتون للبروتين المناعي IgG و 950 كيلو دالتون للبروتين المناعي IgM (19,3)، لذا تم تنقية البروتينات المذكورة من شرش لبأ الابقار الملقحة بفايروس روتا الاطفال بمرحلتين، الأولى ترسيبها بوساطة كبريتات الامونيوم، والثانية فصلها بطريقة كروماتوكرافي الترشيح الهلامي على عمود Sephadex G - 200 ، فلوحظ ظهور ثلاث قمم للبروتين في الاجزاء المستردة من الهلام (الشكل 4) . تميزت القمة الاولى بموقع مماثل لموقع البروتين المناعي IgM القياسي، وكان الحجم اللازم لانزاله يعادل 1.2 مرة بقدر حجم الفراغ (void volume). وجرى اختبار الانتشار المناعي المزدوج للاجزاء الخاصة المستردة من الهلام الخاصة الاولى للتحقق من فعاليته ضد فايروس الروتا (الشكل 5) فظهر خط ترسيبي بين البروتين المناعي IgM وبين فايروس روتا الاطفال.

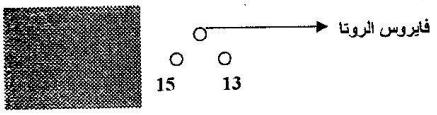
اما القمة الثالثة فأن موقعها مماثل لموقع البروتين المناعي IgG القياسي ،وكان الحجم اللازم لانزاله يعادل 2.4 مرة بقدر حجم الفراغ، وقد

أثبت الفحص فعاليته ضد فايروس روتا الاطفال (الشكل 6) . اما القمة الوسطية فتمثل بروتين كان الحجم اللازم لانزاله يعادل 1.8 مرة بقدر حجم الفراغ، أي ان وزنه الجزيئي يقع بين الوزن الجزيئي للبروتين المناعي IgM والوزن الجزيئي للـ IgG ووجد ان له فعالية مناعية عند اختباره بوساطة اختبار الانتشار المناعي المزدوج (الشكل 7) وهي صفات قد تدل على انه البروتين المناعي IgA (32,31).

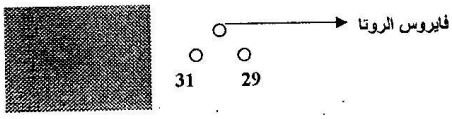
وعند اجراء اختبار الترحيل الكهربائي للقمم الرئيسة التي تم الحصول عليها في عملية الترشيح الهلامي ظهرت البروتينات IgG , IgA , IgM بشكل حزمة واحدة لكل منها مما يدل على نقاوتها كما موضح في الشكل 8 مقارنة مع الشكل 9 الذي يمثل بروتينات المناعة الكلية في شرش اللبأ خلال خمسة ايام متتالية بعد الولادة.



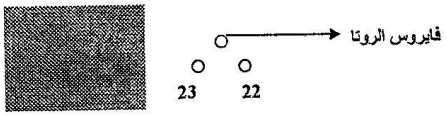
شكل 4. كروماتوكرافي الترشيح الهلامي لتنقية بروتينات المناعة Igs المضادة لفايروس روتا الاطفال باستخدام عمود Sephadex G - 200 بابعاد 1.5 x 58 سم وبسرعة جريان مقدارها 18 ملليتر / ساعة وبواقع 3 ملليتر / جزء. جرى الاسترداد بوساطة محلول دارئ الـ Tris بتركيز 0.1 مولار والمحتوي على كلوريد الصوديوم بتركيز 0.5 مولار ورقم هيدروجيني 8



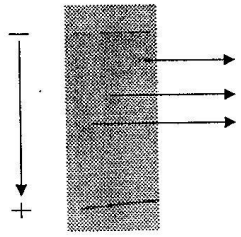
شكل 5. اختبار الانتشار المناعي المزدوج لنماذج من أجزاء الفصل بوساطة عمود Sephadex G - 200 للبروتين المناعي IgM مقابل فايروس روتا الاطفال.



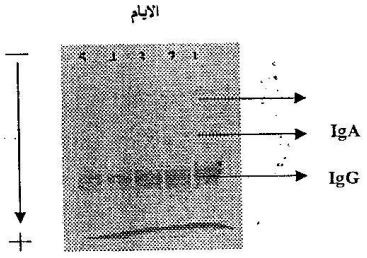
شكـل 6. اختبار الانتشار المناعي المزدوج لنماذج من أجزاء الفصل بوساطة عمود Sephadex G - 200 للبروتين المناعي IgG مقابل فايروس روتا الاطفال.



شكـل 7. اختبار الانتشار المناعي المزدوج لنماذج من أجزاء الفصل بوساطة عمود Sephadex G - 200 للبروتين المناعي IgA مقابل فايروس روتا الاطفال.



شكل 8. الترحيل الكهربائي بهلام الاكريلا مايد (SDS - PAGE) وبنسبة (5 % و 7.5 %) لبروتينات اللبأ المناعية المنقاة بعمود الترشيح الهلامي Sephadex G - 200 .



شكل 9. الترحيل الكهربائي بهلام الاكريلا مايد (SDS - PAGE) وبنسبة (5 % و 7.5 %) لبروتينات المناعة الخام المرسبة من شرش لبأ الابقار لخمسة ايام متتالية بعد الولادة.

اختبار فعالية بروتينات اللبأ المناعية مختبرياً في خفض معيار فايروس الروتا في براز الاطفال

استخدمت البروتينات المستحصل عليها والمنقاة من لبأ الابقار بالترشيح الهلامي في اختبار تعادل المصل للفايروس مختبرياً، اذ اظهرت النتائج

الموضحة في الجدول 1 خصوصية هذه البروتينات المناعية تجاه الفايروس في عشرة عينات من ثيراز والتي كان لها معيار فايروسي يتراوح بين 32:1 الى 256:1 ، فادت اضافة 100 مايكرولتر من البروتينات المناعية المتخصصة ضد فايروس روتا الأطفال الخام والمنقاة وبتركيز 1 ملغم / ملتر الى 100 مايكرولتر من محلول تخافيف البراز المحضرة الى انخفاض معيار الفايروس الى الصفر في عينات البراز ذات المعيار 1 : 16 الى 1 : 64، في حين اظهرت عينات البراز ذات المعيار 1 : 128 الى 1 : 256 انخفاض في المعيار يتراوح بين صفر- 2:1 مع كل من البروتين المناعي IgG والبروتين المناعي IgA وانعدام التلازن مع البروتين المناعي IgM . ويفسر ذلك استناداً الى الطبيعة التركيبية للـ IgM المتكون من خمس وحدات شبيهة بشكل البروتين المناعي IgG مما يمكنه من معادلة عدد اكبر من الفايروس بالمقارنة مع البروتين المناعي IgG . ويلي IgM بهذه الخصوصية البروتين المناعي IgA والذي يتألف من وحدتين الى ثلاث وحدات مشابهة لشكل البروتين المناعي IgG (31,3). اما البروتينات Igs الخام فكانت مشابهة الى حد ما لقدرة IgG .

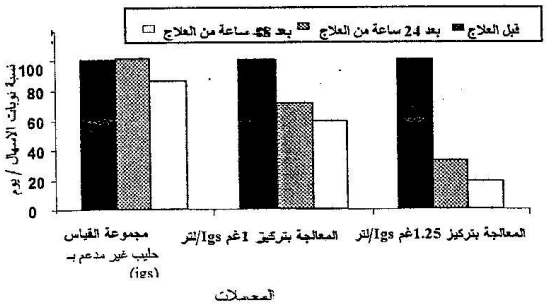
جدول 1. اختبار تعادل المصل لفايروس روتا الاطفال في عينات براز المصابين مع بروتينات المناعة المتخصصة الخام (المرسبة بكبريتات الأمونيوم) والمنقاة بالترشيح الهلامي، (نسبة المزج 1 ملغم بروتين مناعي : 1 ملتر براز).

رقم العينة	معيار الفايروس في عينات البراز قبل المعادلة	معيار الفايروس في عينات البراز بعد المعادلة مع البروتينات المناعية الخام	معيار الفايروس في عينات البراز بعد المعادلة مع		
			IgG	IgA	IgM
1	128 : 1	2 : 1	2 : 1	–	–
2	256 : 1	4 : 1	4 : 1	2 : 1	–
3	64 : 1	–	–	–	–
4	32 : 1	–	–	–	–
5	32 : 1	–	–	–	–
6	64 : 1	–	–	–	–
7	128 : 1	2 : 1	–	–	–
8	128 : 1	2 : 1	2 : 1	–	–
9	64 : 1	–	–	–	–
10	16 : 1	–	–	–	–

استخدام بروتينات اللبأ المناعية المتخصصة ضد فايروس الروتا في معالجة حالات الاسهال في الاطفال الرضع

يلخص الشكل 10 تأثير استخدام 750 – 850 ملتر من الرضاعة يومياً . بحليب يحتوي على 1 غم من بروتينات المناعة / لتر حليب (أي 750 – 850 ملغم / طفل) وحليب يحتوي على 1.25 غم / لتر (أي 938 – 1063 ملغم / طفل)، فيلاحظ انه بعد 24 ساعة من المعالجة بالحليب للتركيز الاول انخفضت نسبة نوبات الاسهال الى 71.4% مما كانت عليه قبل المعالجة، ثم انخفضت الى 32.6% بعد 48 ساعة من بداية المعالجة، اما عند اعطاء مجموعة اخرى من الاطفال 750 - 850

مائتر في اليوم من الحليب الذي يحتوي على 1.25 غم بروتينات مناعة / لتر حليب فقد لوحظ تأثير اكبر في المعالجة، فقد انخفضت نسبة نوبات الاسهال الى 59.2% بعد 24 ساعة والى 18.8% بعد 48 ساعة من بداية المعالجة.



شكل 10. فعالية بروتينات المناعة المتخصصة ضد فايروس روتا الاطفال الممزوجة بحليب الأطفال في معالجة اسهال الاطفال الرضع خلال 24 و 48 ساعة من ابتداء العلاج.

عند مقارنة هذه النتائج بمجموعة قياس تناولت حليباً بالكمية نفسها ولكنها خالية من أي اضافة لبروتينات المناعة لوحظ ارتفاع في عدد نوبات الاسهال بعد 24 ساعة عما كانت عليه في البداية مما رفع نسبة النوبات الى معدل يزيد عن 100% فأصبحت 101.5%، وبعد 24 ساعة اخرى انخفض معدل نسب تلك النوبات ولكنه انخفاض قليل جداً فكانت نسبتها 86.2% مما كانت عليه في بداية المعاملة.

يفصل الجدول 2 ما أجمله الشكل 10 السابق من حيث عدد نوبات الاسهال لكل طفل من مجموعتي الاطفال الذين عولجوا ببروتينات المناعة بالمقارنة مع اطفال مجموعة القياس، فيلاحظ ان المجموعة الاولى المكونة من عشرة اطفال كان عدد نوبات الاسهال فيها يتراوح بين 9 - 6 نوبات قبل المعالجة انخفضت الى 4 - 7 نوبات بعد 24 ساعة من اعطاء 750 - 850 مللتر من حليب يحتوي على 1 غم ببروتينات مناعة / لتر، ثم انخفضت الى 2 - 3 نوبات بعد 48 ساعة من تناول كمية مماثلة من الحليب نفسه. ومع ان عدد نوبات التبرز مؤشرعن حالة الاسهال والشفاء فان اثبات الشفاء الحقيقي هو في الوصول الى معيار مصلي في البراز مساوي للصفر، لذا تمت متابعة عيارية الفايروس في براز هذه المجموعة من الاطفال بوساطة اختبار تلازن اللاتكس (جدول 3) فوجد انه كان يتراوح بين 1 : 23 الى 1 : 256 قبل المعالجة فأنخفض الى 1 : 8 الى 1 : 32 بعد 24 ساعة ثم تابع انخفاضه بعد 48 ساعة بحيث حققت حالتان منها شفاءً تاماً فكانت العيارية مساوية الى الصفر، وهما الحالتان التي انخفض فيهما عدد نوبات الاسهال الى 2.كما انخفض اعلى معيار لحالتين من : 256 1 قبل المعالجة الى 1 : 8 و 1 : 16 بعد 48 من العلاج.

اما تأثير استخدام حليب مدعم ببروتينات المناعة بنسبة 1.25 غم / لتر حليب فقد كان اكبر من تأثير الحليب السابق بشكل ملحوظ، فقد ادى تناول 750 - 850 مللتر منه الى انخفاض عدد نوبات الاسهال من 6 - 10 نوبات الى 4 -5 نوبات بعد 24 ساعة، ثم اصبحت 1 - 2 نوبات بعد 48 ساعة، وقد عززت نتائج اختبار تلازن اللاتكس هذه النتائج، فتثبتت حالة الشفاء في 60% من الحالات حيث انخفضت عيارية الفايروس الى الصفر عند 6 اطفال وانخفضت في الاربعة الباقية الى 1 : 2 حتى في حالة الاطفال الذين كان معيار الفايروس لديهم 1 : 256.

يبرز دور بروتينات المناعة المماثلة في علاج حالات الاسهال بوضوح اكثر عند مقارنة تلك النتائج بنتائج

مجموعة القياس فقد استمرت نوبات الاسهال، واحياناً ارتفعت عند بعض الاطفال بعد 24 ساعة من تناولها الحليب غير المدعم ببروتينات المناعة ولم يحدث سوى انخفاض بسيط بعد 48 ساعة من بدء التجربة. ولدى متابعة الحالات لايام لاحقة كانت اعراض الاسهال قد استمرت من 7 – 10 ايام. وقد رافق مراقبة الحالات خلال الساعات الثمان والاربعين الاولى من التجربة تقدير عيارية الفايروس في البراز فوجد انها كانت بين 1 : 32 و 1 : 256 في المجموعة الاولى عند ابتداء التجربة فأصبح بين 1 : 2 و 1 : 16 بعد 24 ساعة و 1 : 2 بعد 48 ساعة، كما يبين ذلك في الجدول 4 .

كانت التجربة التي قامت بها Tawfeek (33) قد اثبتت الفعالية الايجابية لبروتينات لبا الابقار المناعية في تقليل الاصابة بالاسهال لدى الاطفال، ولكن تجربتها كانت لغرض الوقاية في حين كانت الدراسة الحالية لغرض العلاج. وقد اعطت النتائج الحالية دلالة واضحة على فعالية بروتينات اللبأ المناعية في تحقيق الهدف لاسيما عند استخدام التركيز 1.25غم/لتر حليب. ومن المحتمل ان استمرار اعطاء الاطفال هذا الحليب المدعم ليوم ثالث يمكنه ان يزيل اعراض المرض عند كل المجموعة.

جدول 2. فعالية بروتينات المناعة المتخصصة ضد فايروس روتا الاطفال الممزوجة مع الحليب السائل في معالجة اسهال الاطفال الرضع خلال 24 ساعة، و48 ساعة.

تركيز بروتينات المناعة	رقم الطفل	العمر	الجنس	عدد ونسب (%) نوبات الاسهال		
				قبل العلاج	بعد 24 ساعة من العلاج	بعد 48 ساعة من العلاج
1 غم / لتر	1	شهر و 18 يوم	ذكر	6	(%66.6) 4	(%33.3) 2
	2	3 شهر و 26 يوم	ذكر	7	(%71.4) 5	(%42.8) 3
	3	5 شهر و 4 يوم	انثى	6	(%83.3) 5	(%33.3) 2
	4	6 شهر و 3 يوم	انثى	8	(%75) 6	(%25) 2
	5	6 شهر و 25 يوم	ذكر	9	(%77.7) 7	(%33.3) 3
	6	7 شهر و 4 يوم	انثى	9	(%77.7) 7	(%33.3) 3
	7	7 شهر و 18 يوم	انثى	7	(%57.1) 4	(%28.5) 2
	8	8 شهر و 19 يوم	ذكر	8	(%62.5) 5	(%25) 2
	9	9 شهر و 26 يوم	ذكر	7	(%57.1) 4	(%28.5) 2
	10	10 شهر و15 يوم	ذكر	7	(%85.7) 6	(%42.8) 3
	المعدل			(7.4)	(%71.6) 5.3	(%32.6) 2.4
1.25 غم / لتر	1	شهر و 9 يوم	انثى	6	(%66.6) 4	(%16.6) 1
	2	2 شهر و 3 يوم	ذكر	8	(%50) 4	(%25) 2
	3	4 شهر و 12 يوم	ذكر	9	(%55.5) 5	(%22.2) 2
	4	5 شهر و 27 يوم	ذكر	6	(%66.6) 4	(%16.6) 1
	5	6 شهر و 28 يوم	انثى	7	(%57.1) 4	(%14.2) 1
	6	7 شهر و 13 يوم	انثى	10	(%50) 5	(%10) 1
	7	8 شهر و 9 يوم	انثى	8	(%50) 4	(%25) 2
	8	8 شهر و 24 يوم	ذكر	7	(%57.1) 4	(%14.2) 1
	9	9 شهر و 5 يوم	انثى	9	(%55.5) 5	(%11.1) 1
	10	10 شهر و 4 يوم	ذكر	6	(%83.3) 5	(%33.3) 2
	المعدل			(7.6)	(%58) 4.4	(%18.8) 1.4
مجموعة القياس	1	شهر و 1 يوم	ذكر	7	(%114.2) 8	(%85.7) 6
	2	2 شهر و 25 يوم	ذكر	8	(%112.5) 9	(%100) 8
	3	3 شهر و 19 يوم	انثى	10	(%90) 9	(%60) 6
	4	4 شهر و 26 يوم	انثى	10	(%90) 9	(%80) 8
	5	5 شهر و 16 يوم	انثى	9	(%88.8) 8	(%88.8) 8
	6	6 شهر و 12 يوم	ذكر	8	(%112.5) 9	(%100) 8
	7	7 شهر و 19 يوم	انثى	10	(%90) 9	(%70) 7
	8	8 شهر و 11 يوم	ذكر	7	(%114.2) 8	(%114.2) 8
	9	10 شهر و25 يوم	ذكر	7	(%114.2) 8	(%85.7) 6
	10	11 شهر و 3 يوم	ذكر	9	(%88.8) 8	(%77.7) 7
	المعدل			(8.5)	(%100) 8.5	(%86.2) 7.2

جـدول 3. معيار الفايروس (Titer) في براز الاطفال المصابين بفايروس الروتا قبل المعالجة بحليب ديالاك مدعم ببروتينـات المناعة المتخصصة ضد فايروس الروتا (1 غم / لتر)، وبعد 24 و 48 ساعة من بدء العلاج.

رقم الطفل	العمر	الجنس	معيار الفايروس		
			قبل العلاج	بعد 24 ساعة من العلاج	بعد 48 ساعة من العلاج
1	شهر و 18 يوم	ذكر	256:1	32:1	8:1
2	3 شهر و 26 يوم	ذكر	64:1	32:1	4:1
3	5 شهر و 4 يوم	انثى	128:1	32:1	8:1
4	6 شهر و 3 يوم	انثى	64:1	16:1	–
5	6 شهر و 25 يوم	ذكر	32:1	16:1	4:1
6	7 شهر و 4 يوم	انثى	64:1	16:1	4:1
7	7 شهر و 18 يوم	انثى	32:1	8:1	–
8	8 شهر و 19 يوم	ذكر	128:1	32:1	8:1
9	9 شهر و 26 يوم	ذكر	32:1	16:1	2:1
10	10 شهر و 15 يوم	ذكر	256:1	32:1	16:1

جـدول 4. معيار الفايروس (Titer) في براز الاطفال المصابين بفايروس الروتا قبل المعالجـة بحليـب ديـالاك مدعـم ببـروتيـنات المـناعة المـتخصصة ضد فايروس الروتا (1.25 غم / لتر)، وبعد 24 و 48 ساعة من بدء العلاج.

رقم الطفل	العمر	الجنس	معيار الفايروس		
			قبل العلاج	بعد 24 ساعة من العلاج	بعد 48 ساعة من العلاج
1	شهر و 9 يوم	انثى	64:1	2:1	–
2	2 شهر و 3 يوم	ذكر	128:1	8:1	2:1
3	4 شهر و 12 يوم	ذكر	256:1	16:1	2:1
4	5 شهر و 27 يوم	ذكر	64:1	4:1	–
5	6 شهر و 28 يوم	انثى	128:1	8:1	–
6	7 شهر و 13 يوم	انثى	256:1	16:1	2:1
7	8 شهر و 9 يوم	انثى	32:1	2:1	–
8	8 شهر و 24 يوم	ذكر	32:1	2:1	–
9	9 شهر و 5 يوم	انثى	128:1	4:1	–
10	10 شهر و 4 يوم	ذكر	128:1	8:1	2:1

المصادر

1- Al-Mashikhi, S.A.and S. Nakai, 1987. Isolation of bovine immunoglobulins and lactoferrin from whey proteins by gel filtration techniques. J. Dairy Sci. 70 (12): 2486 - 2492.

2- Al-Yousif,Y., F.Al-Majhdi, C.Bergstrom, J.Anderson and S.Kapil, 2000. Development, characterization, and diagnostic applications of monoclonal antibodies against bovine rotavirus. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology. 7 (2): 288 - 292.

3- Barrett, J. T. 1988. Textbook of Immunology. 3rd. edn.. C. V. Mosby Company. USA.pp409

4- Bigland, C. H., M. W. Warenycia,and M. Denson.1979. Specific immune gammaglobulin in the control of Mycoplasma meleagridis. Poultry Sci. 58: 319-324

5- Bittler, U., H. Hammon, C. Morel, C. Philipona, A.Rauprich, and V. Rome. 2001.

15- Hammarstrom, L. 1999. Passive immunity against rotavirus in infants. Acta Paediatr. Suppl. 430: 127 - 132.

16- Herrmann, J., S. Chen, D. Jones, A. Bown, E. Fynan, H. Greenberg and G. Farrar, 1999. Immune responses and protection obtained by oral immunization with rotavirus VP4 and VP7 DNA vaccines encapsulated in microparticles. Virology. 259: 148 - 153.

17- Hilpert, H., H. Brussow, C. Mietens, J. Sidoti, L. Lerner, and H. Werchau. 1987. Use of bovine milk concentrate containing antibody to rotavirus to treat rotavirus gastroenteritis in infants. J. Infectious Diseases. 156 (1): 158 - 166.

18- Jaimes , M., O. Rojas , A. J. Gonzalez, I. Cajiao , A. Charpilienne , P. Pothier , E. Kohli , H. Greenberg , M. Franco and J. Angel. 2002. Frequencies of virus-specific CD4+ and CD8+ T lymphocytes secreting gamma interferon after acute natural rotavirus infection in children and adults. J. Virology. 76 (10): 4741 – 4749.

19- Johnstone, A. P. and R. Thorpe, 1982. Immunochemistry in Practice. Blackwell Scientific Publications. USA.pp.295

20- Jorgensen, M., F. Scheutz, and B. Strandbygaard. 1996. *Escherichia coli* and virus isolated from " Sticky Kits ". Acta Vet. Scand. 37(2): 163 - 169.

21- Kamalaratnam, C. G. Kang, C. Kirubakaran, D. Rajan, D. Daniel, M. Mathan and V. Mathan (2001). A prospective study of nosocomial enteric pathogen acquisition in hospitalized children in south India. J. Tropical Pediatrics. 47(1): 46 - 49.

22- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227: 680 - 285.

23- Logan, E. F., D. J. Meneely and A. Lindsay. 1981 Colostrum and serum immunoglobulin levels in jersy cattle. Br. Vet. J. 137: 279.

24- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265 - 275.

Feeding colostrum, its composition and feeding duration variably modify proliferation and morphology of the intestine and digestive enzyme activities of neonatal calves. J. Nutrition. 131: 1256 - 1263.

6- Blum, J. and C. Baumrucker. 2002. Colostral and milk insulin - like growth factors and related substances: mammary gland and neonatal. National Library of Medicine. 23 (1-2): 101 - 110.

7- Butler, J. E. 1983. Bovine immunoglobulins: an augmented review. Vet. Immunol. And Immunopath. 4: 43- 49.

8- Caballero, S. F. Xavier, F. Loisy, F. Guyader, J. Cohen, and R. Pint. 2004. Rotavirus - like particles surrogates in environmental as persistence and inactivation studies.Applied and Environmental Microbiology. 70 (7): 3904 - 3909.

9- Castrucci, G., M. Ferrari, V. Angelillo, F. Rigonat, and L. Capodicasa, 1993. Field evaluation of the efficacy of romovac - 50, a new inactivated adjuvated bovine rotavirus vaccine. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 16 (3): 235 - 239.

10- Clark, M. F. and A. N. Adams. 1977. Characteristic of the microplate methods of enzme -linked immuno sorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34: 475 - 483.

11- Coluchi , N.,V. Munford , C. Mazquez , M. Escobar , E. Weber , P. Marmol and M. Racz , 2002. Detection subgroup specificity and genotype diversity of rotavirus strains in in children with acute diarrhea in paraguay. J. Clinical Microbiology. 40 (5) : 1709 – 1714.

12- Enouf, V., S.Chwetzoff. G. Trugnan and J.Cohen. 2003. Interactions of rotavirus VP4 spike protein with the endosomal protein rab5 and the prenylated rab acceptor PRA1. J. Virology. 77(12): 7041 - 7047.

13- Garvey, J. S., N. E.Cremer, and D. H. Sussdorf. 1977. Methods in Immunology. 3rd. edn.W.A., Banjamin, Inc., London,U.K, pp. 45.

14- Goding, J. E. 1986. Monoclonal Antibodies: Principle and Practice.. 2nd. edn. Academic press Harcourt Brace Jovanovich, Publishers. PP 108.

25- Malik, R., S. Bukhari, M. Arshad and M Sajid. 1996. Prevalence of rota virus infectior Mother and Child. 34 (1): 19 - 21.

26- Martella, V., V.Terio, G.D.;Gaudio, M Gentile, P. Fiorente, S. Barbuti, and C Buonavoglia, 2003. Detection of the emergin rotavirus G9 serotype at high frequency i Italy. J. Clinical Microbiology. 41(8): 3960 - 3963.

27- Ontsouka, C., R. Bruckmaier and J. Blum 2003. Fractionized milk composition durin removal of colostrum and mature milk. J Dairy Science. 86: 2005 - 2011.

28- Orlandi, P., T. Silva, G. Magalhaes, F Alves, R. Cunha, R. Durlacher and L. Silva 2001. Enteropathogens associated witl diarrheal disease in infants of poor urban area of portr velho rondonia: a preliminary study Mem. Inst. Oswaldo. Cruz., Rio. De Janeiro 96 (5): 621 - 625.

29- Qaudri, M. H., M. H. Al-Ghamdi and M Imadulhaq. 1990. Acute diarrheal disease ir children under five years of age in the eastern province of Saudi Arabia. Annal. Saud. Med 10 (3): 280 - 284.

30- Rahman, M., K. De Leener, T. Goegebuer, E. Wollants, L. Hoovels and M.V. Ranst 2003. Genetic characterization of a novel, naturally occurring recombinant human G6P(6) rotavirus. J. Clinical Microbiology. 41(5): 2088 – 2095.

31- Shimazaki, K. I. 2000. Lactoferrin : A marvelous protein in milk. Animal Science J. . 71 (4): 329 - 347.

32- Shimazaki, K.I. and K. Kuroda, 1989. Fractionation of whey proteins in cheese whey by ultrafilteration. Japanes. J. Dairy and Food Science. 38 (3): 95 - 102.

33- Tawfeek, H. I. 1999. Fortifcation of Infant Formula With Some Anti - Enteropathogenic Escherichia coli Colostral Antibodies. PhD. Thesis. Dept of puplic Health, College of Veterinary Medicine, University of Baghdad,pp.137

34- Unicomb, L., G. Podder, J. Gentsch, P. Woods, K. Hasan, A. Faruque, M. Albert and R. Glass. 1999. Evidence of high - frequency genomic reassortment of group A rotavirus strains in bangladesh: emergence of type G9 in 1995. J. Clinical Microbiology. 37 (6): 1885 - 1891.

35- Vesikari, T. A. Karvonen, T. Korhonen, M. Espo, E. Lebacq, J. Forster, F. Zepp, A. Delem, B. De Vos. 2004. Safety and immunogenicity of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in adults, toddlers and previously uninfected infants. Vaccine. 22: 2836 - 2842.

36- Vesikari, T., A. Karvonen, L. Puustinen, S. Zeng, E. Szakal, A. Delem and B. De Vos. 2004 b. Efficacy of RIX4414 live attenuated human rotavirus vaccine in finnish infants. Pediatr. Infect. Dis. J. 23: 937 - 943.

7- Villarreal, L. Y., G. Uliana, C. Valenzuela and A. P. Ferreira. 2006. Rotavirus detection and isolation from chickens with or without symptoms. Brazilian J. of Poultry Science . 8 (3): 187 - 191.

38- Zvizdic , S., S. Telalbasic , E. Beslagic , S. Cavaljuga , J. Maglajlic , A. Zvizdic and S. Hamzic. 2004. Clinical characteristics of rotavirus disease. Bosnian J. of Basic Medical Sciences. 4 (2) : 22 – 24.