Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Al-Qadisiya University
College of Science
Department of Biology

Determination of the immunogenicity of *Salmonella typhi* antigen loaded on Chitosan.

A Thesis

Submitted to The Council of The College of Science /University of Al-Qadisiya as Partial Fulfillment of The Requirements for The Degree Of Master of Science in Biology / Microbiology

by

Raghda S. M. alomari

(B.Sc/ Biology/ Al-Qadisiya University (2012)

Supervised by

Assist. Prof. Dr. Ziad M. F. Alkhozai

2015 A.D *1436 A.H*

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

جامعة القادسية

كلية العلوم

قسم علوم الحياة

تحديد القابلية التمنعية لمستضد بكتريا التيفوئيد المحملة على حبيبات Chitosan

رسالة مقدمة

إلى مجلس كلية العلوم – جامعة القادسية وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم في علوم

الحياة / أحياء مجهرية

من قبل

رغدة سعد محمد العمري

بكالوريوس علوم حياة / جامعة القادسية (2012)

بإشراف

أ . م . د . زياد متعب الخزاعي

1436 هـ

2015 م

الاهداء

إلى سندي وقوتي بالحياة إلى من علمني العطاء بدون انتظار إلى من أحمل أسمه بكل فخر إلى من كلّت أناملة ليقدم لنا لحظة سعادة إلى من حصد الأشواك عن دربي ليمهد لي طريق العلم إلى القلب الكبير (والدي العزيز)

إلى من أرضعتني الحب والحنان إلى رمز الحب وبلسم الشفاء إلى القلب الناصع بالبياض إلى بسمة الحياة وسر الوجود إلى من كان دعاؤها سر نجاحي وحنانها بلسم جراحي (والدتي العزيزة)

إلى القلوب الطاهرة الرقيقة والنفوس البريئة إلى رياحين حياتي إلى سندي وعوني ورفقاء دربي (إخوتي الأعزاء)

الى توأم روحي ورفيقة دربي الى من بوجودها أكتسب قوة ومحبة لاحدود لها (اختي العزيزة)

رغدة

بِسۡمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحۡمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ قَالُواْ سُبۡحَٰنَكَ لَا عِلۡمَ لَنَآ إِلَّا مَا عَلَّمۡتَنَآۖ
إِنَّكَ أَنتَ ٱلۡعَلِيمُ ٱلۡحَكِيمُ ٣٢ ﴾

صدق الله العلي العظيم

سورة البقرة / الآية (32)

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على اشرف الأنبياء والمرسلين أبي القاسم محمد ﴿صل الله عليه واله وسلم﴾ و أهل بيته الطيبين الطاهرين.

يطيب لي وأنا انهي رسالتي هذه إن أوجه أسمى آيات الشكر والتقدير لمشرفي الفاضل **الدكتور زياد متعب الخزاعي** لاقتراحه عليّ موضوع البحث و متابعته المتواصلة لي وإرشاداته القيمة لي طيلة مدة الدراسة وتنفيذ البحث ، فله مني خالص الدعاء الذي لا ينقطع ما حييت سائلة المولى القدير أن يوفقه وان يمده بالصحة والعافية .

وأقدّم الشكر والتقدير إلى عميد كلية العلوم **أ.م.د. عبد الامير سمير سعدون** ورئيس قسم علوم الحياة **الدكتور جاسم حنون** ولكل من اسهم من تدريسي كلية العلوم في تيسير ما تعسر عليّ .

كما اخص بالشكر والتقدير أساتذة كلية الطب البيطري لما قدموا لي من مساعدة لإكمال بحثي و بالأخص **الدكتور اسعد جاسم عبد** لمساعدته لي في قياس معيارية الاضداد و **الدكتور امجد طالب محسن** لمساعدته لي في عدّ كريات الدم البيض و**الدكتور خليل كزاز جلاب** لمساعدته لي في تصوير المقاطع النسيجية وتشخيصها و**الدكتور علي محمد غازي** لمساعدته لي في عمل الاحصائيات للنتائج .

كما اخص بالشكر والتقدير **الست نوال خنطيل** / كلية العلوم / قسم علوم كيمياء لمساعدتها لي في اجراء الفحوصات الكيميائية لمستضد متعدد السكريد المحفضي (Vi Ag).

كما اخص بالشكر والتقدير **الاستاذ ليث ابراهيم عليوي** لمساعدته لي في تحضير حبيبات النانوChitosan .

كذلك اتقدم بالشكر والتقدير الى زملائي من طلبة الدراسات العليا لما قدموا لي من مساعدة وتشجيع و بالأخص **سرى رزاق وهند حسين** .

وأخيرا اود ان اشكر عائلتي لما قدموا لي من دعم مالي ومعنوي ...

رغـدة

اقرار المشرف

اشــهد ان رســالة الماجســتير الموســومة بـــ (تحديــد القابليــة التمنعيــة لمستضــد بكتريــا *Salmonella typhi* المحملـة علـى حبيبـات النـانو Chitosan) قد اعـدتها الطالبـة **رغدة سعد محمد العمري** بإشرافي وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير علوم / علـوم حيـاة / احياء مجهرية .

التوقيع

الاسم : أ. م. د. زياد متعب الخزاعي

اللقب العلمي : استاذ مساعد

العنوان :كلية التقانات الاحيائية ـ جامعة القادسية

التاريخ : / / 2015

توصية رئيس قسم علوم الحياة

اشارة الى التوصية المقدمة من الاستاذ المشرف احيلت هذه الرسالة الى لجنة المناقشـة وبيـان الراي فيها .

التوقيع

الاسم : م. د. جاسم حنون

اللقب العلمي : مدرس

العنوان :كلية العلوم ـ جامعة القادسية

التاريخ : / / 2015

إقرار المقوم اللغوي

أشهد إنه قد تم التقويم اللغوي لرسالة الطالبة **رغدة سعد محمد العمري** الموسومة بـ (**تحديد القابلية التمنعية لمستضد بكتريا *Salmonella typhi* المحملة على حبيبات Chitosan**) و تمت مراجعتها لغوياً وأسلوبياً، فأصبحت بذلك مؤهلة للمُناقشة على قدر تعلُّق الأمر بالسلامة اللغوية.

التوقيع:

الاسم : أ . د . مزاحم مطر حسين

اللقب العلمي : أستاذ

العنوان : كلية التربية / جامعة القادسية

التاريخ : / / 2015

الخلاصة

الخلاصة Summary:

أجريت هذه الدراسة للمدة من شهر تشرين الاول عام 2013 لغاية شهر ايلول عام 2014.حيث تم جمع عينات بكتريا الـ *Salmonella typhi* من مركز الصحة العامة المركزي لغرض تنقية مستضد متعدد السكريد المحفظي (Vi Ag) . حيث تم في هذه الدراسة الحالية أستخدام متعدد السكريد المحفظي كمستضد وتحميله على حبيبات النانو الـ Chitosan وعلى توكسيد الكزاز (Tetanus Toxoid) . أوضحت النتائج المسجلة أن معيارية الأجسام المضادة قد ازدادت في مجموعة (T1) المعاملة بـ (Vi Ag + Ch) (620.8±364.8) أكثر من المجاميع الأخرى ، والتي تتضمن مجموعة (T3) المعاملة بـ (Vi Ag + TT) (537.6±142.53) ، ومجموعة (T2) المعاملة بـ (Vi Ag) (448±117.73) ومجموعة (T4) المعاملة بـ (Vi Ag +Ch + TT) (121.6±38.4) عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) .

بينت النتائج المسجلة في عد خلايا الدم البيض الكلي والتفريقي حصول زيادة معنوية في مجموعة (T1) التي سجلت اعلى زيادة بعدد كريات الدم البيض الكلي (21020±891.85 خلية/مل) مقارنة مع مجموعة السيطرة (C) (5500±230.94 خلية/مل) والمجاميع الاخرى التي تتضمن مجموعة (T3) (10740±980.61 خلية/مل)، و مجموعة (T4) (10650±1217.78 خلية/مل) ومجموعة (T2) (9980±572.18 خلية/مل) عند مستوى احتمالية (0.05). من جانب آخر، فقد بينت نتائج العد التفريقي حدوث ارتفاع في نسبة خلايا العدّلة في مجموعة (T2) (40±1.89%) مقارنة مع مجموعة السيطرة(C) (33.3333±0.66%) والمجاميع الاخرى والتي تتضمن ، مجموعة (T3) (33.6±0.67%) ،و مجموعة (T4) (34±1.37%) ومجموعة (T1) (19.4±0.66) عند مستوى احتمالية (0.05) كذلك بينت النتائج ارتفاع في الخلايا اللمفاوية في مجموعة (T1)(79.2±2.7%) مقارنة مع مجموعة السيطرة (58.3333±1.76%) والمجاميع الاخرى ، التي تتضمن مجموعة (T4) (62±2.06%) ومجموعة (T3) (61.2±2.72%) ومجموعة (T2) (55.8±1.11%) عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) .

كذلك شملت الدراسة تحديد مستوى التعبير الجيني لنوعين من عناقيد التمايز وهما CD25 وCD29 بطريقة RT-qPCR ، حيث بينت النتائج التعبير الجيني لـCD25 وجود زيادة في مجموعة (T4) (5.1936±2.17) مقارنة مع مجموعة السيطرة (1±0) والمجاميع الاخرى ، التي تتضمن مجموعة (T3) (4.4739±1) ، ومجموعة (T2) (3.7032±0.54) ، و مجموعة (T1) (2.5604±0.64) عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) . وأيضا بينت نتائج التعبير

الخلاصة

الجيني لـCD29 زيادة في مجموعة (T3) (162.3256±89.52) مقارنة مع مجموعة السيطرة (1±0) والمجاميع الاخرى ،التي تتضمن مجموعة (T2) (59.6817±26.65) ، مجموعة (T4) (37.9605±3.09) و مجموعة (T1) (33.8276±16.6) عند مستوى احتمالية ($p\leq0.05$) .

شملت الدراسة أيضاً متابعة نشاط التمنيع اللمفاوي في الطحال والغدة الزعترية ، وتم ملاحظة وجود نشاط كبير في العقيدات اللمفاوية الطحالية التي ازداد حجمها وعددها بشكل كبير جداً ، وكذلك زيادة في النسيج اللمفاوي في الغدة الزعترية . ومن ذلك يمكن الأستنتاج بأن تحميل مستضد متعدد السكريد Vi Ag لبكتريا *S.typhi* ،ازدادت القابلية التمنعية بتحميله على حبيبات النانو Chitosan و توكسيد الكزاز Tetanus Toxoid.

1- المقدمة Introduction :

تعد بكتريا الـ *Salmonella typhi* العامل الاساسي في حدوث مرض حمى التيفوئيد (typhoid fever) وهو مرض مقيد حدوثه في الانسان فقط (Kaur & Jain , 2012) . حمى التيفوئيد واحد من الأمراض المهمة التي تنتقل عن طريق الأغذية والأشربة ، وهو مرض جهازي حاد يصيب تقريبا 22 مليون انسان سنويا (Maurice, 2012) .يمثل التطعيم ضد مثل هذه الامراض أكثر الوسائل كفاءة وفعالية من حيث التكلفة لمنع الأمراض المعدية ، والتطعيم ضد التيفوئيد شائع استخدامه بين المسافرين .في الآونة الاخيرة ، اصبح التوجه نحو اللقاحات الجديدة و الأكثر امانا التي تستخدم الخصائص الجيدة للمستضدات ،التي تساعد الجهاز المناعي على الاستجابة المتخصصة دون مخاطر ، ونظرا لوجود مستضدات ثانوية subunit antigens والتي عادةً تكون ضعيفة مناعيا عندما تعطى لوحدها (Holt *et al*.,2012). لذلك ، تتطلب ربطها بمساعد مناعي يحفز الاستجابة المناعية . يمثل مستضد (ViAg) متعدد السكريد المحفظي التي يوجد بشكل اساسي في بكتريا *S. typhi* و*S. paratyphi C* بالإضافة الى وجوده في سلالات قلية من *S.dublin* و*Citrobacter freundii* ، وهذا المستضد يوفر حماية ضد الاصابة بحمى التيفوئيد (Kothari *et al*., 2013; Felix &Pitt ,1936) . مستضد الـ Vi Ag يتكون من وحدات متكررة من (1–4)-2-deoxy-2-N-acetyl galacturonic acid و 60-90% من الـ O-acetylated في الموقع الثالث C-3 position ويتم تشفيره ضمن viaB locus من بكتريا *S.typhi* (Raffatellu *et al*., 2008).

تمثل المساعدات المناعية جزيئات حاملة للمستضد تعزز الاستجابة المناعية وتطيل مدة بقاء المستضد وتوجد انواع متنوعة من المساعدات مثل الجزيئات الحاملة السكرية ومنها الـ Chitosan وجزيئات حاملة بروتينية مثل توكسيد الكزاز ، وتمثل حبيبات الـ Chitosan سكريات المتعددة الطبيعية التي يتم تحويلها من الكيتين chitin بواسطة عملية تدعى deacetylation و حبيبات الـ Chitosan تكون غير سامة ، و biocompatible ، وقابلة للتحلل biodegradable (Pillai *et al*.,2009). وبذلك يتكون الـ chitosan من الـ glucosamine ومن وحدات N-acetyl glucosamine التي تربط بينهما آصرة خطية β(1→4) ويتم الحصول عليه من الكيتين والسكريات المتعددة توجد بوفرة في القشريات البحرية marine crustaceans مثل سرطان البحر والروبيان (Prabaharan & Mano,2005). ويمكن ان يتحلل بواسطة lysozyme ، والمنتجات المتكونة من الـChitosan (السكريات الأمينية) هي أيضا غير سامة، و غير ممنعة

وغير مسرطنة ، ويجري امتصاصه تماما من قبل جسم الإنسان (Wilson *et al.*, 2010) . توكسيد الكزاز Tetanus toxoid هو مستحضر فاقد الفعالية من ذيفان الكزاز من بكتريا *Clostridium tetani* وذلك بعد معاملته بـ formaldehyde و يتكون كيميائيا من بروتين يحتوي على 1292 حامض اميني التي يتشكل من سلسلتين احدهما طويلة يبلغ وزنها 98 كيلو دالتون والاخرى قصيرة يبلغ وزنها 52 كيلو دالتون وتربط بينهما آصرة كبريتيدية ثنائية (Halpern & Ofthus ,1993) . بالإضافة الى كونه مستضداً مهماً في الوقاية تم استخدامه كحامل بروتيني في اللقاحات المقترنة conjugate vaccines (Astronomo & Burton,2010; Sigurdardottir *et al.*,1997) ، اضافة الى فعاليته العالية في حمل اللقاحات الكربوهيدراتية مثل من *Streptococcus pneumoniae* (Harding *et al.*,2012). تعرف عناقيد التمايز Cluster of differentiation بانها معلمات سطحية على الخلايا وان لها وظائف متعددة ومختلفة وتتمثل بالـ CD25 و الـ CD29 حيث يعرف CD25 أيضا بـ Interleukin 2 Receptor Alpha الذي يعود الى النوع الاول من البروتينات الغشائية (transmembrane protein) و الذي يكون موجوداً في تنشيط خلايا التائية T و تنشيط الخلايا البائية B و بعض thymocytes وخلايا السلائف النخاعية (myeloid precursors) والخلايا قليلة التغضن(oligodendrocytes) التي تكون مترافقة مع CD122 لتشكيل heterodimer الذي يعمل بألفة عالية لمستقبلات IL-2. بالرغم من ان CD25 استخدم كمميز Marker لتحديد الخلايا اللمفاوية regulatory T cells CD4+FoxP3+ في الفئران ، قد لوحظ بان نسبة كبيرة من خلايا الذاكرة للخلايا التائية تستمر في تعبير CD25 في البشر (Triplett *et al.* , 2012). تسمى خلايا T + CD4 + CD25 بالخلايا التائية T المنظمة (Treg) ومنذ ذلك الحين اتسمت بكثافة الخصائص بواسطة العديد من العناقيد (Maloy & Powrie, 2001; Shevach, 2002; Sakaguchi,2004). يعتبر CD29 احد عناقيد التمايز المهمة في الاستجابة المناعية ويتكون من وحيدات إنتغرين β1 (integrin beta1 subunit). و عائلة الإنتغرين هي مستقبلات غشائية تشارك في التصاق الخلايا والتمييز (recognition) في مراحل متنوعة من العمليات بما في ذلك مرحلة التطور الجنيني(embryogenesis)، وإصلاح الأنسجة والاستجابة المناعية (Wu *et al.*,2010). كذلك تعتبر الانتغرينات (Integrins) مستقبلات غشائية heterodimeric تتألف من وحيدات الفا α وبيتا β. مجموع الاشكال المعروفة منها هي 18 سلسلة الفا α و8 سلسلة بيتا β التي تميز 24 مستقبلاً و التي تتشكل بشكل واسع في تنشيط الخلايا (Askari, 2010 ; Hynes, 2002) .

نظرا لأهمية بكتريا التيفوئيد وتوطنها في العراق فقد هدفت الدراسة الحالية الى إعداد لقاح تجريبي من *S.typhi* باستخدام بعض المساعدات المناعية مثل حبيبات النانو chitosan nanoparticle وكذلك توكسيد الكزاز وذلك من خلال المحاور التالية :

1- عزل وتنقية المستضد (ViAg).

2- تحميل المستضد على حبيبات النانو (Chitosan) وعلى توكسيد الكزاز.

3- إجراء بعض الفحوصات النوعية مثل نقاوة اللقاح وسميته للتأكد من سلامة اللقاح.

4- اعطاء اللقاح المحضر للحيوانات المختبرية (الجرذان).

5- الفحوصات المناعية للقاح للتحري عن فعالية اللقاح ومنها تحديد المعيار الكمي للأضداد ، وكذلك التغيرات الخلوية في منظومة الخلايا البيضاء وكذلك دراسة التغيرات الحاصلة في العقيدات اللمفاوية .

6- التحري عن نشاط الخلايا اللمفاوية المنظمة T-Reg من خلال تحديد مستوى التعبير الجيني لجين CD25.

7- التحري عن نشاط الخلايا المناعية من خلال تحديد مستوى التعبير الجيني لجين CD29 المهم في عملية ألتصاق الخلايا المنشطة والتميز.

2- استعراض المراجع Literature Review

2-1- بكتريا *Salmonella typhi*

2-1- 1- نبذة تاريخية عن جنس السالمونيلا *S.typhi* :-

يعد هذا الجنس من الاجناس المهمة مرضيا في العائلة المعوية ، وقد اكتشف لأول مرة في عام 1885 من قبل الجراح البيطري Doniel E. Salmon وTheobald Smith حيث قاما بعزل النوع *Salmonella cholerasuis* لأول مرة من الخنازير المصابة . قبل القرن التاسع عشر ، كان كثيرا ما يخلط بين الحمى المعوية للإنسان مع التيفوس typhus ، ومرض الركتيسيا ، وهذان المرضان تم تميزهم من قبل لويسLouis في فرنسا (1829) ووليام جينر William Jenner في الولايات المتحددة (1850). (Scherer& Miller, 2001). في عام 1850 كان العالم وليام جينر اول من ميز الخصائص المرضية الشائعة في حمى التيفوئيد typhoid fever . في عام 1869، اخترع ويلسون اسم الحمى المعوية واعطى الموقع التشريحي للإصابة . ومع ذلك ، حتى اليوم مصطلح حمى التيفوئيد typhoid fever اكثر شيوعا من الحمى المعوية enteric fever . في عام 1873، اظهر Budd ان حمى التيفوئيد تنتقل عن طريق الغذاء والماء ، وفي عام 1880، اثبت إيبرت Eberth ان حمى التيفوئيد تحدث بسبب بكتريا السالمونيلا . في عام 1884تم عزل اول عصية تيفوئيد من طحال المرضى المصابين بالتيفوئيد من قبل Gaffkey ، وفي عام 1885 استطاع الباحثان Salmon و Smith عزل اول جرثومة من مجموعة *Bacillus choleraesuis* من الخنازير سميت فيما بعد *S. choleraesuis* ، وتمكن الباحث Gartner في عام 1888 من عزل جرثومة الـ *S. enteritidis* الممرضة للقوارض من ابقار مصابة بالالتهاب المعوي وتمكن ايضا من اصابة ارانب وخنازير غينيا وفئران وماعز عند حقنها بهذه الجرثومة وتمكن DeNobel في عام 1889 من عزل اول نمط مصلي لجرثومة *S. paratyphi* وذلك في اثناء حدوث حالات متعددة سببها مواد غذائية ملوثة ، وفي سنة 1892 تمكن الباحث Loffler من عزل جرثومة *S. typhimurium* من القوارض المصابة بمرض يشبه التيفوئيد ، وفي عام 1896 تمكن العالمان فايفر Pfeiffer وكالي Kalle من اخترع اول لقاح للتيفوئيد و في نفس السنة ، اظهر ويدال Widal ورفاقه ظاهرة التراص في الكائنات المعزولة من مصل مرضى التيفوئيد و اختبار التراص يقوم على أساس تصنيف المستضدات ويعتبر حتى هذا اليوم الطريقة القياسية للتصنيف المصلي للسالمونيلا (Pegues *et al*., 2005; Selander *et al*., 1996) .

وفي سنة 1896 تمكن كل من Bensand , Archard من عزل جرثومة *S. paratyhpi B* من حالات الحمى المعوية في الانسان . وتمكن Gwan سنة 1898 من عزل جرثومة *S. paratyphiA* من حالات الحمى المعوية في الانسان وفي سنة 1900 سميت هذه المجموعة بالسالمونيلا تخليدا لذكرى العالم سالمون . ومع التطور الذي حصل في الطرائق المتبعة في الكشف عن المستضدات وتشخيصها مصليا وتطبيق هذه الطرائق على مجموعات من الجراثيم فقد سجلت اعداد كثيرة من الانماط المصلية ولا تزال انماط مصلية من السالمونيلا توصف باستمرار ، ولقد وصف حتى الان اكثر من 2500 نمط مصلي مختلف والسالمونيلا واسعة الانتشار فقد عزلت من الماشية والقطط والدجاج والقوارض والزواحف والسلاحف والطيور والبقر والسحالي والثعابين والخنازير (Prescott *et al*., 1996 ; Keusch *et al*. 1998 ; Koneman *et al*., 1997; Hornick,1977)

2-1-2- تصنيف وشكل السالمونيلا Classification and morphology of *S. typhi* :-

2-1-2-1- التصنيف Classification:-

ينتمي جنس السالمونيلا الى العائلة المعوية ، ويصنف الى اكثر من 2500 نوع مصلي حسب مخطط Kauffmann-White . يتم تحديد الانواع المصلية للفرد على اساس المستضدات الموجودة في جدار خلايا السالمونيلا وهي المستضدات الجسمية (O) somatic ، السوطية (H) flagellar و المحفظة (Vi) capsular (Rementeria *et al*., 2009) . يمتلك جنس السالمونيلا نظامين للتسمية . النظام الاول اقترح من قبل Popoff و LeMinor في عام 1980 و الذي يمتلك قبولاً واسعاً على الرغم من انه لا يتفق مع قواعد الشفرة البكتريولوجية . ويستخدم النظام الآخر الذي يتفق مع الشفرة البكتريولوجية من قبل الاقلية . المشكلة الحالية هي أن نظامين من التسميات تستخدم لأعداد من جنس السالمونيلا (Tindall *et al*., 2005) . ويقسم جنس السالمونيلا إلى نوعين ، هما *S.enterica* و *S.bongori* (JCICSP, 2005; Reeves & Stevenson, 1989; Ewing, 1986). وتم تقسم جنس *S. enterica* الى ست subspecies التي تم تصنيفها من قبل (Tindall *et al*., 2005) كما يلي :

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (subsp. I).
- *Salmonella enterica* subsp. *salamae* (subsp. II).
- *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* (subsp. IIIa).
- *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* (subsp. IIIb).
- *Salmonella enterica* subsp. *houtenae* (subsp. IV).
- *Salmonella enterica* subsp. *indica* (subsp. VI).

هذهِ الانواع من Subspecies تعود الى *S. enterica* ،و بالإضافة الى *S. bongor*i ، التي وجدت في المقام الأول في مضائف غير بشرية وتسبب الأمراض في بعض الأحيان فقط في البشر(Popoff *et al*., 2004).

وتصنف البكتريا بشكل عام كما يلي :

Kingdom: Bacteria

Phylum: Proteobacteria

Class: Gamma Proteobacteria

Order: Enterobacteriales

Family: *Enterobacteriaceae*

Genus: *Salmonella*

Species: S. enterica

***Serovar: S. typhi* (**Ezaki *et al*., 2000**)**

2-1-2-2- الشكل Morphology :-

بكتيريا السالمونيلا هي عبارة عن عصيات قصيرة بشكل مملى ، لا تكون سبورات ، كائنات هوائية واختيارية لاهوائية ، متحركة ، و تكون حساسة لمختلف المضادات الحيوية. حاليا، تم عزل 107 سلالة من الكائنات ، وتحتوي على العديد من خصائص التمثيل الغذائي المختلفة، ومستويات

الضـراوة ، والجينـات المقاومـة للأدويـة المتعـددة التـي تتعقـد فـي المعاملـة فـي المجـالات وتكـون مقاومـة (Pealver *et al.*,2004). وتكـون السـالمونيلا غيـر مخمـرة للاكتـوز و سـالبة لليـوريز urease negative وacetylemethyle carbinol negative (Gillespie & Hawkey, 2006).

2-1- 3- إمراضية حمى التيفوئيد Pathogenesis of typhoid fever :-

التيفوئيـد هـو مـرض جهـازي يختلـف فـي شـدته. تعتبـر حمـى التيفوئيـد مـرض متـوطن رئيسـي تسـببه بكتريـا الـ *S. typhi* ، وهـي بكتيريـا تنتقـل بـين الأفـراد مـن طريـق البـراز إلـى الفـم عـن طريـق الطعـام والميـاه الملوثـة ، و ذلـك يعـود الـى الظـروف الصـحية الشـائعة الغيـر كافيـة ، ولا سـيما الوصـول إلـى الميـاه النظيفـة التـي تكـون محـدودة ويقـدر حـدوث المـرض أن يكـون حـوالي33-6 مليـون حالـة سـنويا، ممـا أدى إلـى وفـاة 216,000 فـي المنـاطق الموبـوءة (Jones , 2005).كـذلك تعـرف حمـى التيفوئيـد بأنهـا ارتفـاع فـي درجـة حـرارة جسـم المـريض نتيجـة الاصـابة ببكتريـا *S. typhi* ويترافـق معهـا حـدوث أعـراض حـادة فـي الجهـاز الهضـمي فـي المرحلـة الثانيـة مـن الاصـابة وكـذلك تصـنف حمـى التيفوئيـد بأنهـا أحـد الأمـراض الخطـرة التـي تهـدد حيـاة الانسـان اذا أهمـل علاجهـا وتبـدأ بعـدها ظهـور الحمـى بشـكل مفـاجئ يرافقهـا صـداع وغثيان مع فقدان حاد للشهية اتجاه الطعام وقد يكون مصحوب بسعال حاد وامساك (Constipation) أو اسهال (Diarrhea) (Birkhead *et al.*,1993) .

ان الاصابة بـ حمى التيفوئيد Typhoid fever تمر بطورين:

- الطـور الأول phase 1^{st}: وفيـه ترتفـع درجـة حـرارة المـريض بشـكل تـدريجي الـى 40 ^{o}م مـع أعـراض فقـدان الشـهية و طفـح جلـدي وصـداع مـع امسـاك وفـي الأطفـال تحـدث حالـة تقيـؤ (Vomiting).
- الطـور الثـاني phase 2^{nd}: فـي الاسـبوع الثـاني والثالـث مـن الاصـابة تظهـر أعـراض اصـابة الأمعـاء مـع بقـاء الحـرارة مرتفعـة ويكـون النـبض ضـعيف وسـريع، وفـي الاسـبوع الثالـث يتحـول الامسـاك الى اسهال (severe pea-soup like diarrhea) ويكون الخروج حـاوي علـى دم.

نـوع الأعـراض السـريرية وشـدتها تختلـف ولكـن يمكـن أن تشـمل الحمـى أعـراض تشـبه الأنفلـونزا والصـداع بالإضـافة الـى مخـاطر المضـاعفات المختلفـة الخطيـرة مثـل النـزف

المعوي، تقرح الأمعاء والالتهاب الرئوي بسبب العدوى البكتيرية الثانوية والتهاب الدماغ . في هذه المرحلة الموت يحدث عادة نتيجة لهذهِ المضاعفات أو غيرها . في غياب العلاج ، تستمر الحمى لمدة 2-3 أسابيع، وتتضاءل على مدى الأسابيع التالية 2-3. في نسبة صغيرة من الأفراد غير المعالجين (تقريبا 2-5%)، يمكن أن تؤدي العدوى الحادة إلى حالة الناقل مدى الحياة حيث تستمر البكتيريا في المرارة. في غياب العلامات السريرية ، والتخلص من تلك الناقلات التي تصل إلى 109 كائنات في كل غرام من البراز ويرجح لها ان تلعب دورا هاما في انتشار العدوى (NIAID, 2002) . وقد يضيف إلى المشاكل الصحية العامة التي تشكلها حمى التيفوئيد ظهور وانتشارها المقاومة للمضادات الحيوية ، بما في ذلك مقاومة الـ *S. typhi* للأدوية المتعددة ، كذلك مقاومتها للخط الأول من المضادات الحيوية ، الكلورامفينيكول chloramphenicol ، الأمبيسلين ampicillin وكوتريموكسازول co-trimoxazole (Parry & Threlfall, 2008).

2-2- الاستجابة المناعية عند الاصابة بحمى التيفوئيد :-

تتضمن الاستجابة المناعية عند الاصابة بحمى التيفوئيد نوعين من الاستجابة وهما :

2-2-1- الاستجابة المناعية الطبيعية او الآنية Innate immune response :-

السالمونيلا هي ممرض معوي ناجح جدا لأنها تمتلك استراتيجيات متطورة للمواجهة مع أغلب آليات الدفاعات المناعية المستخدمة من قبل المضيف خلال مراحل مختلفة من المرض. تبدأ الاستجابة المناعية عند دخول الممرض الى الجسم (Broz *et al*.,2012).

تعتبر آليات المناعة الطبيعية المعدية هي عقبة من العقبات التي تواجهها السالمونيلا عند الدخول الى الجسم هي عبارة عن طبقة سميكة مخاطية تغطي الطبقة الطلائية للقناة الهضمية وتشكل الحاجز الأولي، التي يجب اخترقه من اجل الحصول على اتصال مباشر مع الطبقة الطلائية ، و يتم تشكيل هذه الطبقة المخاطية بواسطة الـ mucins،الذي يعود الى عائلة البروتينات السكرية glycoprotein التي تفرزها أنواع متخصصة من الخلايا الظهارية، التي تعرف بالخلايا الكاسية (Goblet cells) (Broz *et al*.,2012). وبالإضافة إلى الـ mucins ، تفرز الخلايا الموجودة في القناة الهضمية أنواع متعددة من الببتيدات المضادة للميكروبات (antimicrobial peptides) ، والتي هي بروتينات صغيرة متقابلة الزمر(small amphipathic proteins) التي

تكون وظيفتها مثل وظيفة المضادات الحيوية البتدية (peptide antibiotics) التي تعمل على تعطيل تكوين غشاء الخلية البكتيرية .يتم إنتاج وتحرير البتيدات المضادة للميكروبات والـ mucins من قبل الخلايا الظهارية للأمعاء التي تمثل عائقا كبيرا ضد الغزو الميكروبي و تكون جزءاً مهماً جدا في الاستجابة المناعية الانية (Saleh & Trinchieri ,2011).

تعتبر آليات المناعة الطبيعية او الآنية innate immunity خط الدفاع الاول عند الاصابة بالبكتريا . الدفاعات الجسدية والخلوية و الكيموحيوية للمناعة الآنية تمثل مكان بداية الاصابة بالبكتريا او أي كائن ممرض آخر وتكون هذه مستعدة للاستجابة المناعية . ومن أبرز التكيفات في الجهاز المناعي هي قدرته على التعرف على الذات (Self). آليات المناعة الآنية تحفز الاستجابة فقط لغزو مسببات الأمراض pathogens. العناصر الأساسية للمناعة الآنية هي : الحواجز الفيزيائية و الكيميائية بما في ذلك الطبقة الطلائية epithal والمخاط mucus على سطح الظهارية ،و الملتهمات phagocytes، بما في ذلك البلاعم الكبيرة macrophages والوظيفة الرئيسية للـ macrophage هي التهام المواد الغريبة والعدلات neutrophils وكذلك الخلايا القاتلة الطبيعية natural killer cells و نظام المتمم complement system التي يتكون من بروتينات الدم التي تنتقل عن طريق العدوى التي تعمل باستخدام 1 من 3 مسارات، وتحدث الاستجابة من خلال مساعدة اختراق المكروب التي يدمر ويزيد الالتهاب و السيتوكينات التي تنظم وتوجه العديد من الاستجابات لخلايا المناعة عند حدوث الإصابة . (Abbas & Lichtman, 2005; Murray & Wynn, 2011). تبدأ الخلايا الملتهمة بالتهام المستضد وتمثيله عن طريق مستقبلات خاصة توجد على سطح كل من الـ macrophage والمستضد حيث تعرف المستقبلات الموجودة على سطح المستضد بـ pathogen associated molecular patterns (PAMP) بينما تعرف مستقبلات الـ macrophage بـ pattern recognition receptors (PRRS) وهذا الارتباط يعمل على تحفيز الـ macrophage لإنتاج السايتوكينات المتمثلة بـIFNγ وTNF-α و IFNγ له دور اساسي في تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية حيث يحفز عند تنشيط الـ macrophage ويحفز التعبير عن معقد النسيجي التوافقي (MHC II) وفي الغالب يتم انتاجه من قبل خلايا القاتل الطبيعي NK التي تعتبر جزء من الاستجابة المناعية الآنية (Schoenborn& Wilson , 2007) وايضا تشارك خلايا القاتل الطبيعي NK في الاستجابة المناعية الآنية حيث توفرخلايا القاتل الطبيعي NK استجابة سريعة للخلايا اثناء الاصابات الفيروسية و تسبب تحلل أو موت الخلايا المبرمج (Vivier *et al*.,2011).

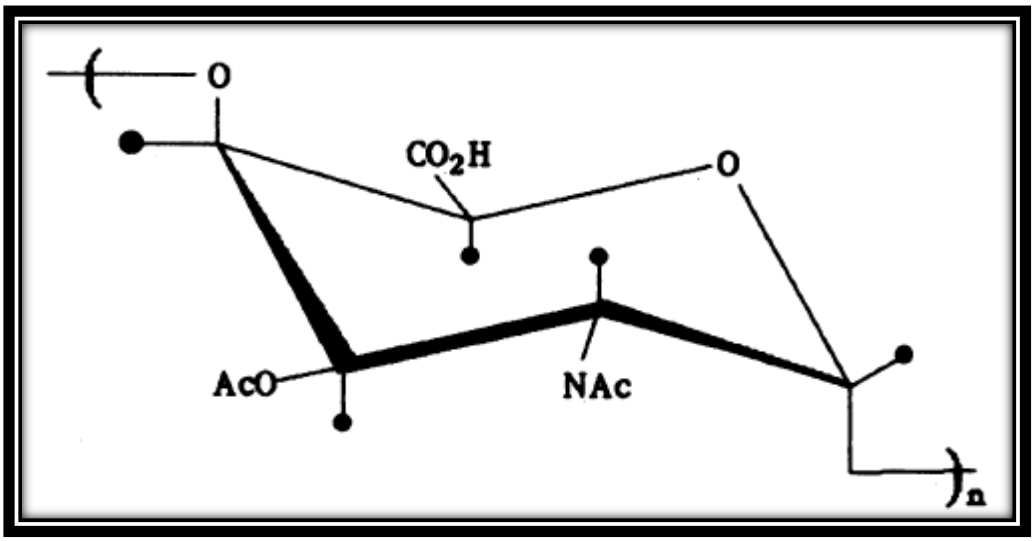
2-2-2- المناعة المكتسبة Adaptive immunity:-

الاستجابة المناعية تبدأ عند دخول الاجسام الغريبة او أي مستضد الى الجسم وبعد دخولها يتم اخذها من قبل خلايا تعرف بخلايا التقديم (antigen-presenting cells(APC)) وتتضمن هذه الخلايا : الخلايا التشجيرية Dendritic cell ، والـ Macrophage و B-Lymphocytes تعمل هذه الخلايا على معالجة الاجسام الغربية أنزيمياً واعادة التعبير عن شظايا البيبتيد Peptide و تجهيزه بجزيئات معقد النسيج التوافقي MHC و تعرف هذه بظاهرة تقديم المستضد (Tabeta, 2006). وبعد ذلك تبدا هذه الخلايا بالهجرة للاستقرار في الغدد اللمفاوية وتنشيط خلايا خاصة من الخلايا التائية T-cell التي تميز جزيئات معقد النسيج التوافقي الـ MHC عن طريق مستقبلات خاصة بالمستضد التي تعرف بـ ((TCRs) T- Cell Receptors). ويوجد مسار لمعالجة المستضد يعرف بالمسار الحشوي cytoplasmic أو lysosomal ، وتشارك ايضا جزيئات معقد النسيج التوافقي MHC في تقديم المستضد، التي تكون على نوعين هما MHC I و MHC II على التوالي ، وبالتالي يتم تنشيط نوعين من الخلايا التائية T هما CD8 + و CD4 + على التوالي (Germain & Miller, 2006). ان وظائف هذه الخلايا تشارك في الدفاع ضد الميكروبات (الاحياء المجهرية) ، إما مباشرة : على سبيل المثال، من خلال انحلال خلوي(انتحار الخلايا المصابة) بوساطة إنتاج Granzymes و Perforins من قبل +CD8 ، أو بشكل غير مباشر: على سبيل المثال، من خلال المساعدة التي تقدمها خلايا +CD4 cells الى الخلايا اللمفاوية البائية B لإنتاج الأجسام المضادة للمستضد المحدد او الخاص (Bhoj , 2008).

وخلايا الـ +CD4 helper T cells سوف تنقسم الى نوعين من الخلايا اعتمادا على توليد السايتوكينات cytokines التي تفرزها. خلايا الـ Th1 cells وظيفتها انتاج الحركيات قبل الالتهابية pro-inflammatory cytokine ولها دور في الاستجابة المناعية الحادة وتنتج انترفيرون كاما IFN-γ و TNF–α و IL-2 و IL-12 و IL-18 ووظيفتها الاساسية هي تحفيز الخلايا الالتهامية phagocyte mediated ضد الاصابة أي تنشط المناعة الخلوية Cellular immunity والالتهاب inflammation ، بينما خلايا الـ Th2 cells وظيفتها انتاج الحركيات ضد الالتهابية anti-inflammatory cytokine وتنتج IL-4 و IL-5 و IL-13 و IL-10 ووظيفتها الاساسية تحفز نشاط وتمايز الخلايا البائية (Spellberg & Edwards, 2001). العديد من الدراسات اظهرت ان نتائج اصابات السالمونيلا تعمل على تحفيز استجابة خلوية من Th1 (Pie *et al.*, 1997; Thatte *et al.*, 1993).

2-3- مستضد متعدد السكريد للسالمونيلا Vi antigen of *S. typhi* :-

مستضد متعدد السكريد (Vi-antigen)، هو مستضد تم اكتشافه من قبل العالمان Felix و Pitt عام 1934، وجدا أساسا في *S. typhi* و *S . paratyphi C* ، كذلك في بعض سلالات *S . Dublin* و *Citrobacter freundii* (Felix & Pitt, 1936; Baker *et al*., 1959). و قد تبين ان مستضد متعدد السكريد المحفظي الـ Vi يمتلك فعالية وقائية عالية اتجاه الاصابة بحمى التيفوئيد (Klugman *et al*.,1987). يتكون مستضد متعدد السكريد الـ Vi Ag يتكون من وحدات متكررة من (1–4)-2-deoxy-2-N-acetyl galacturonic acid و 60-90% من الـ O-acetylated في الموقع الثالث C-3 position ويتم تشفيره ضمن viaB locus من بكتريا *S.typhi* ،كما في شكل (2-1) (Raffatellu *et al*., 2008). استخدام مستضد متعدد السكريد بوصفه لقاحا ، وذلك لامتلاكه بعض الخواص المستضدية ، منها كبر الوزن الجزيئي 3×10^6 دالتون بالإضافة الى احتوائهِ على بعض المركبات الكيماوية المهمة مثل السكريات المتعددة ومجموعة الاستيل . ومن الادوار المناعية المهمة له زيادة الاستجابة المناعية عن طريق زيادة تركيز الاضداد مثل IgG (Robbins &Robbins, 1984).



الشكل (2-1) يبين الوحدة التركيبية لمستضد متعدد السكريد

* تمثل • الهيدروجين (H) ، NAc تمثل N-acetyl و AcO تمثل O-acetyl (Stone & Szu , 1988).

2-4- مناعة متعدد السكريد البكتيري Immunology of bacterial polysaccharides:

يعتبر الجدار الخلوي للعديد من الميكروبات المرضية الحاوية على الكربوهيدرات في شكل متعدد السكريد الشحميlipopolysaccharide او متعدد السكريد المحفظي polysaccharides من عوامل الضراوة للبكتريا. ويعتبر متعدد السكريد (Vi) لبكتريا *S.typhi* عامل اساسي و مستضد وقائي من خلال تحفيز الاجسام المضادة anti-Vi antibodies في الاطفال الصغار والبالغين ، لكنه ممنع ضعيف poor immunogenic ويؤدي الى استجابة مناعية غير معتمدة على الخلايا اللمفاوية التائية (T-lymphocyte independency) ، ويتميز ايضا بعدم تكوينهُ لخلايا الذاكرة للخلايا اللمفاوية التائية ونظرا لخصائص متعدد السكريد البكتيري المناعية ، فان الاستجابة ضعيفة لمستضد متعدد السكريد للأطفال التي تتراوح اعمارهم من أقل من سنتين وكبار السن. وعدم تجانس الهيكل بين السكريات داخلها وبين الأنواع الاخرى هو أيضا مشكلة اخرى (Weintraub ,2003). وللتغلب على قيود علاقة العمر و المستضدات الغير معتمدة على الخلايا اللمفاوية التائية (T-cell in depended) للقاحات تم التوجه الى ربط لقاح متعدد السكريد (Vi) مع ذيفان خارجي غير سام لبكتريا معينة كما هو الحال في exotoxin A *Pseudomonas aeruginosa* وهو بروتين معتمد على الخلايا اللمفاوية التائية وهذا هو لقاح Vi-rEPA (Lin *et al*. ,2001).

ان مستضدات متعدد السكريد لا يتم معالجتها بواسطة الخلايا المقدمة للمستضد (APC) وانما عن طريق دمج لقاحات الـ Glycoconjugate protein مع لقاح متعدد السكريد وهذا اللقاح يعطي الفة عالية للتقديم نظرا لتجهيز البروتين الحامل التي يتم بواسطة الـ APC وتقديم الببتيدات المشتقة من البروتين الحامل عن طريق جزيئات MHC-II إلى الخلايا T-helper ، ويليها تحفيز إنتاج السيتوكينات Cytokines التي تحفز الخلايا البائية B لعديد السكريد المحدد لإنتاج الأجسام المضادة الخاصة بمتعدد السكريد.(Latz *et al*., 2004) .

وعلى اساس اختلاف مستضدات متعدد السكريد البكتيري يتم تصنيف مستضدات الكربوهيدرات الى نوعين: النوع الاول هو متعدد السكريد الشحمي Lipopolysaccharides البكتيري (LPS)، وهو النوع الاول من المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية (TI-1) و النوع الثاني من المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية TI-2 و هو متعدد السكريد المحفظي capsular polysaccharides . ومع ذلك، تتميز بوسطة وجود الـ (Epitopes)

المتكررة التي تمتلك كفاءة عبر ربط مستقبلات الخلايا البائية (BCR) وتتسبب في تنشيط المستضدات الخاصة بالخلايا البائية. ان متعدد السكريد المحفظي يوجد في مجموعة متنوعة من مسببات الأمراض البكتيرية او البكتريا الممرضة ، مثل *Streptococcus Pneumoniae* و *Neisseria meningitidis* و *Bacillus anthrasis* ، وهي أمثلة كلاسيكية لمستضدات TI-2. ومستضدات الـ TI-2 تكون قادرة على إحداث استجابة ضدية قوية في البالغين لكن مع ذلك يكون ممنع ضعيف عند الأطفال الصغار(Shriner *et al.* ,2010) .

5-2- التطعيم Vaccination :-

التطعيم هو إعطاء اللقاح لتحفيز الاستجابة المناعية الوقائية لحماية الفرد من الميكروب الممرض أو السم الناتج عنه، والتطعيم هو وسيلة فعالة للغاية واقتصادية للوقاية من بعض الأمراض المعدية (Fiore *et al.* , 2009). واللقاح هو Immunogen ممنع غير مسبب للأمراض عند تلقيحه في المضيف، يحدث استجابة مناعية وقائية ضد الممرض المحدد، وكلمة " vaccine " تأتي من الكلمة اللاتينية للقاحات، وهي تعني "pertaining to cows".(Lombard *et al.*, 2007) .منذ تطبيقه من قبل إدوارد جينر في القرن الثامن عشر، والتطعيم أحدث ثورة في الطب. وقد أدت حملات التطعيم الواسعة النطاق في القضاء على الجدري وحددت منظمة الصحة العالمية هدفا للقضاء على شلل الأطفال، والحصبة الألمانية والحصبة و تستخدم إستراتيجية التطعيم في جميع أنحاء العالم في الوقت الحالي (WHO, 2009) . وكان اول لقاح معدل نسبيا هو لقاح فيروس جدري الابقار (cowpox virus) الذي يصيب الابقار بالإضافة الى الانسان وهذا اللقاح يحمي الانسان من الامراض ذات الصلة related ولكن الاكثر خطورة هو فيروس جدري البشر (smallpox virus) (Barouch , 2000) . معظم اللقاحات الناجحة يتم اعطاءها عن طريق الحقن واستهداف النظام المناعي ، قد تم تطوير اللقاحات النظامية الناجحة ضد العديد من مسببات الأمراض التي تدخل الى جسم المضيف من خلال الغشاء المخاطي، و قد فرضت قيودا على تطوير اللقاحات المخاطية لتلك الأمراض عن طريق استخدام التطعيم النظامي الذي لا يظهر أي تأثير عند استخدامه (Holmgren & Czerkinsky , 2005).حيث يتم تحضير مستضدات اللقاحات التي تحتوي على احياء مجهرية ممرضة مقتولة او غير منشطة و لقاحات السلالات الحية الموهنة (المضعفة) attenuated(weakened) او اجزاء منها التي تكون غير قادرة على اظهار علامات المرض (Daniel *et al.*,1992).

2-5-1- التطعيم ضد حمى التيفوئيد Vaccination against typhoid fever :

التطعيم ضد حمى التيفوئيد هومن التدابير الوقائية الرئيسية و بالرغم من أستخدامها بين السكان في وسط البلدان المتوطنة و ذات الدخل المنخفض يتم استخدمتها في الغالب بين المسافرين من البلدان ذات الدخل المرتفع وهذا الوضع آخذ في التغير، وذلك بفضل توافر قاعدة واسعة من بيانات المرضى في البلدان الموبوءة (البلدان التي يستوطنها المرض) (Ochiai *et al*., 2008) .

أعطت منظمة الصحة العالمية 2008 (WHO) توصية بشأن استخدام لقاحات التيفوئيد نظرا لارتفاع و استمرار المرض وزيادة المقاومة للمضادات الحيوية التي تنص على نظر البلدان في استخدام برنامج لقاحات التيفوئيد للسيطرة على الأمراض المتوطنة (WHO,2008). على الرغم من هذه التوصية فإن عدداً قليلاً جداً من البلدان الموبوءة بالتيفوئيد تعمل على تنفيذ برنامج تطعيم التيفوئيد (Maurice, 2012).

يوجد نوعان من لقاحات التيفوئيد المتوفرة حاليا على الصعيد الدولي :-

A- اللقاح الفموي الحي Ty21a (The live oral Ty21a vaccine) : وهو لقاح حي موهن يتم تحضيره من سلالة موهنة من *S. typhi* .

B - لقاح حمى التيفوئيد متعدد السكريد (Vi polysaccharide vaccine) :والذي يعطى حقناً تحت الجلد أو عضلياً (وهو لقاح يتم تحضيره من تنقية مستضد متعدد السكريد (Vi) لبكتريا السالمونيلا) .

وتوجد لقاحات أخرى لحمى التيفوئيد منها جديدة ومنها قديمة تم تطويرها ،مثل لقاح conjugated Vi vaccine (Vi- rEPA)، وهو قيد التطوير(Anwar *et al*.,2014) .

يعكف الباحثون على تطوير لقاحات التيفوئيد منخفضة التكلفة التي تكون فعالة عند الأطفال الذين تقل أعمارهم عن سنتين، وبالتالي يمكن أن تدرج في برنامج التطعيم الموسع للرضع ((Expanded Programme on Immunization (EPI) ، ان تطوير لقاحات التيفوئيد تتحرك في اتجاهين رئيسيين: هما تطويرVi conjugate vaccines ، وتطوير القاح الفموي الحي (WHO , 2008).

2-5-1-1- لقاح التيفوئيد الحي الفموي Ty2la vaccine:-

لقاح التيفوئيد الحي الفموي Ty21a هو لقاح حي موهن يعطى عن طريق الفم فقط ، يحتوي هذا اللقاح على سلالة موهنه من السالمونيلا التيفية Ty21aو يعمل ضد حمى التيفوئيد (Germanier & Fürer 1983; Curtiss, 2002) .الـ Ty21a هي سلالة موهنة متحولة (attenuated mutant strain) من بكتريا الـ *S.typhiTy21* التي تكون آمنة وواقية بمثابة اللقاح الفموي الحي ، تم عزل هذه السلالة الطافرة في وقت مبكر من عام 1970 م عن طريق المطفرات الكيميائية وتمتلك النمط المظهري لسلبية مستضد متعدد السكريد (Germanier & Fürer 1975). Attenuated *Salmonella enterica serovar typhi* strain Ty21a هو لقاح مهم للسيطرة على حمى التيفوئيد وبمثابة ناقل فموي لتقديم مستضدات مغايرة. وقد تم الكشف عن تسلسل الجينوم الذي يمتلك 679 من الأشكال المتعددة للتركيبات النووية المنفردة و التي سوف تساعد في تحديد التعديلات التي تسهم في سلامة Ty21a والتمنيع (Xu *et al*., 2013). وهذا اللقاح الحي يعطى عن طريق الفم اما بشكل كبسولة مغلفة او سائل . وتعطى منه ثلاث جرعات في اليوم ، وتمت الموافقة على استخدامه للأطفال التي تتراوح أعمارهم 5 سنوات على الاقل من العمر. و أيضا هذا اللقاح يحفز الحماية بعد 10 او 14 يوم من إعطاء الجرعة الثالثة. المسافرون يجب ان يعاد تلقيحهم سنويا ، وكذلك الأشخاص الذي يعيشون في المناطق الموبوءة بالمرض يجب تلقيحهم كل ثلاثة سنين (WHO, 2008) .

2-5-1-2- لقاح متعدد السكريد Vi polysaccharide vaccine: -

يعود للقاحات الوحيدات الثانوية (subunit) لحمى التيفوئيد التي يتم تحضيرها بواسطة تنقية متعدد السكريد المحفظي بواسطة مادة تعرف بـ hexadecyltrimethylammonium bromide في ظل ظروف غير متغيرة(طبيعة) (Robbins &Robbins,1984) . وهذا اللقاح المتعدد السكريد المحفظي يعطى بالحقن بشكل جرعة واحدة ، وتبدأ الحماية بعد سبعة أيام من الحقن ،و أقصى قدر من الحماية يكون لـ 28 يوما بعد الحقن عندما يتم الحصول على أعلى تركيز من الأجسام المضادة (Garmory, 2002) .و تمت الموافقة على استخدام هذا اللقاح للأشخاص من 2 سنة من العمر وكبار السن. ويوصى إعادة التطعيم كل ثلاث سنوات.

2-5-1-3- لقاح Vi-rEPA vaccine:-

وهو لقاح تجريبي حديث تم تطوير من تحوير لقاح متعدد السكريد (Vi) عن طريق ربط لقاح متعدد السكريد مع ذيفان خارجي غير سام للزائفة الزنجارية (rEPA) التي جرى تقييمها في التجارب العشوائية ((Randomized controlled trial (RCT) بين الأطفال من 5-2 سنوات من العمر . هذا اللقاح (Vi-rEPA) لديه القدرة على أن يكون مناعة لدى الرضع الذين تقل أعمارهم عن السنتين (Parry *et al*., 2002). ومع ذلك يُعدّ هذا اللقاح غير مرخص بعد .

2-6- المساعدات المناعية والجزيئات الحاملة للقاح

استخدمت المساعدات المناعية Adjuvants لزيادة الاستجابة المناعية للمستضدات لأكثر من 70 عاماً . وكان الاستخدام الاول للمساعدات المناعية من قبل رامون Ramon الذي تمكن من زيادة الاستجابة المناعية ضد الخناق diphtheria و الكزاز tetanus عن طريق الحقن مع مركبات أخرى مثل bread crumbs وagar وtapioca وزيت النشأ starch oil وlecithin و saponin (Ramon, 1925; Kenney & Edelman, 2004).

ان مصطلح المساعدات المناعية Adjuvants يأتي من الكلمة اللاتينية adjuvare وتعني مساعدة وتعرف كذلك كمركبات غير متجانسة heterogeneous واستخدمت لأول مرة كما ذكر اعلاه من قبل العالم رامون الذي استخدم مادة ودمجها مع مستضد معين وهذه ادت الى زيادة حصانة المستضد اكثر من استخدام المستضد لوحده (Ramon, 1926;Wang & Singh, 2011) وتوجد انواع متعدد من المركبات التي تزيد من الاستجابة المناعية لمستضد معينة وتصنف المواد المساعدة الى انواع متعددة منها الاملاح المعدنية Mineral Salts وSurface-Active Agents and Microparticles ومنتجات البكتريا Bacterial Products وCytokines and Hormones وPolyanions و الحوامل Carriers وVectors Living وغيرها من المواد المساعدة وقد صنفت مؤخرا المواد المساعدة إلى مجموعتين واسعتين هما مجموعة الذائبة particulate والغير ذائبة nonparticulate (Cox& Coulter, 1997). وفي عام 1959، ناقش العالم الفيزيائي الكبير ريتشارد فاينمان Richard Feynman ، القدرة على استخدام مجموعة واحدة من أدوات دقيقة لبناء وتشغيل مجموعة أخرى اصغر نسبيا عن طريق التلاعب وتطوير الذرات والجزيئات الفردية (Phoenix,2008). وفي أواخر عام 1970، أدرك اريك دريكسلر Eric Drexler

أن الآلات الجزيئية يمكنها السيطرة على تصنيع المواد الكيميائية من المنتجات المعقدة و ستكون هناك تقنية قوية powerful technology (Shantha , 2009). والنانو هي كلمة إغريقية تعني dwarf (القزم) (Saxl, 2013). وتقنية النانو تكنولوجي Nanotechnology هي من العلوم التطبيقية التي تتعامل مع إنشاء وتصنيع العناصر والأجهزة من الذرات المتطايرة atomic plane التي تكون ضمن مجموعة تتراوح من 1- 100 نانومتر. وحبيبات النانو Nanoparticles هي أي حبيبات يكون قطرها أقل من حوالي 100 نانومتر. وتطوير اللقاحات القائم على حوامل النانو nanocarrier بدأ في الحصول على الكثير من الاهتمام من أجل توفير التطعيم الفعال من خلال تحسين مكان الهدف و إحداث استجابة للأجسام المضادة على المستوى الخلوي. والامثلة على جسيمات النانو (NPS) هي dendrimers، جسيمات النانو البوليمرية polymeric NPs، جسيمات النانو المعدنية metallic NPs ، وجسيمات النانو المغناطيسيmagnetic NPs والعوامل المساعدة التي تستخدم كلقاح فعال للأمراض المعدية وعلاج السرطان .(Bolhassani *et al*.,2011) .

2-6-1- حبيبات النانو Chitosan Nanoparticles:-

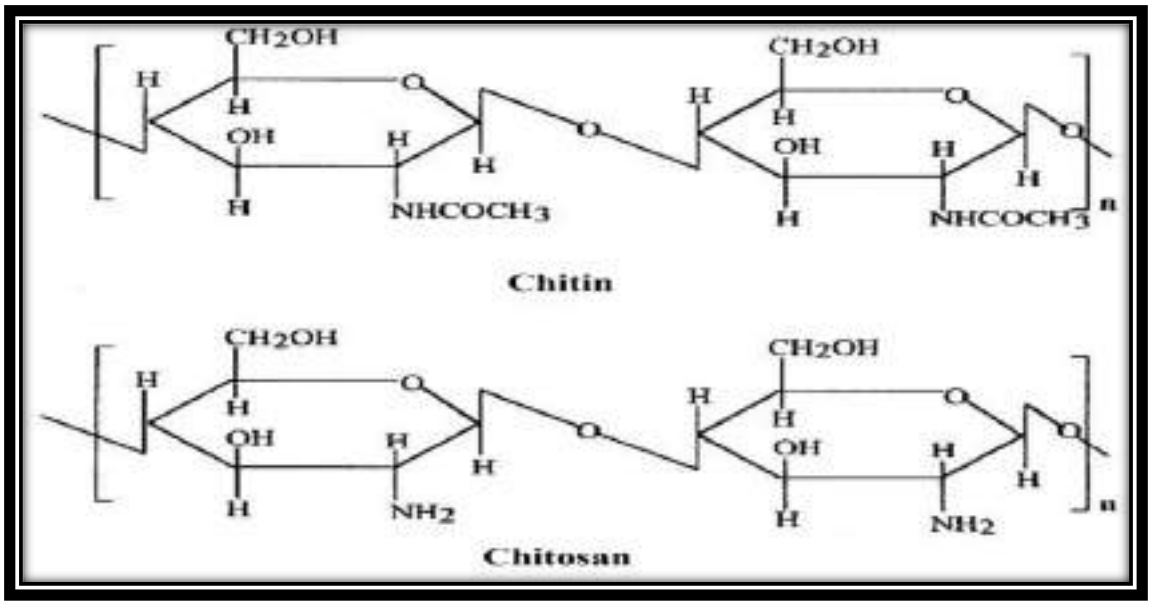
الـ chitosan هو جزيئات غير سامة ، ومتوافقة حيويا biocompatible ، وقابلة للتحلل biodegradable ،وهي من السكريات المتعددة الطبيعية والتي يتم انتاجها من الكيتين chitin بواسطة عملية تدعى deacetylation ويمثل شكل (2-2) التركيب الكيميائي (Pillai *et al*.,2009) . وبذلك يتكون الـ chitosan من الـ glucosamine ومن وحدات N-acetyl glucosamine التي تربط بينهما آصرة خطية β(1→4) ويتم الحصول عليه من الكيتين والسكريات المتعددة توجد بوفرة في القشريات البحرية marine crustaceans مثل سرطان البحر والروبيان (Prabaharan & Mano, 2005). وبالإضافة إلى ذلك ،فان التحلل الحيوي للـ chitosan يرتبط إلى حد كبير مع درجة الـ deacetylation وهذه الخصائص تجعل الـchitosan مهما بشكل خاص للتطبيقات السريرية والبيولوجية كمادة حيوية للغاية مع انخفاض الامراض السمية والمناعية (Illum *et al*., 2001). كذلك ،ان وجود المجموعات الأمينية شديدة التفاعل على طول هيكلها سوف تجعل الـ chitosan حساس للمجاميع الفعالة الكيميائية أو البيولوجية (Jayakumar *et al*., 2007) .ان تحضير حبيبات النانو الـchitosan يتم على أساس البوليمر التي يمكن القيام به بسهولة دون استخدام المذيبات العضوية، والتي هي مثيرة للاهتمام للحفاظ على مناعة المستضدات(تركيباً) (Illum *et al*., 2001).وقد تم تصميم العديد من التقنيات

لتجميع حبيبات النانوية الـ chitosan nanoparticles (CNP_S) كنظام لتحضير الادوية بما في ذلك المستحلبات (emulsions) ، ionotropic gelation ، المذيلات(micelles) ، والتجفيف بالرش (spray drying). هنالك مجموعة متنوعة من العوامل العلاجية يمكن تحميلها على CNP_S بكفاءة عالية، والتي يتم بعد ذلك حقنه عن طريق الوريد، داخل الغشاء البريتوني (intraperitoneally) ، أو intrathecally (Vila *et al*., 2002).

2-6-1-1- خواص Properties of Chitosan

يُعدّ الـchitosan كيميائيا متعدد السكريات المختلفة (heteropolysaccharide) متعدد الكايتون (ذرة ذات شحنة موجبة) (polycationic) عالي الوزن الجزيئي خطي يتكون من N-اسيتيل-D-الجلوكوزامين (N-acetyl-D-glucosamine) وD-الجلوكوزامين (D-glucosamine) التي تربط بينهما أصرة كليكوزيدية β(1→4)glycosidic bonds كما في الشكل (2-2)، فإن كمية كل سكر احادي تعتمد على درجة deacetylation بنسبة (75-95%) من البوليمر (Raafat & Sahl, 2009).

الـchitosan يمتلك خصائص مفيدة أخرى مثل تكاليف الإنتاج المنخفضة وقدرته على تعزيز تغلغل الجزيئات عبر الحواجز المعوية والأنفية، وهذا جعله مرشحا مناسبا لتصميم تركيبات اللقاح المخاطي (Masotti & Ortaggi, 2009).



شكل (2-2) يوضح تركيب الـ chitosan والكيتين (Naira &Laurencin, 2007).

2-1-6-2- استخدامات Uses of Chitosan :-

بدأ تاريخ Chitosan عندما ناقش روجيه Rouget شكل deacetylated من Chitosan. وقد ناقش الباحثون كذلك مختلفة الاحتياجات من فهم هذهِ المواد ودراستها وأيضا من اجل إنتاج أفضل طرق تنقية مثل إدخال تعديلات على البنية الأساسية وتطبيقاتها (Il'ina & Varlamov, 2005). وقد اعتبر Chitosan كمصدر للمادة المنشطة حيويا bioactive المتحملة، لكن ايضا هنالك العديد من القيود على استخدامه في النظام البيولوجي، بما في ذلك فقر ذوبانه في ظل الظروف الفسيولوجية (Borchard ,2001) .وللتغلب على هذه القيود ركز الباحثون على اشتقاق الـ Chitosan من التعديلات الكيميائية والتحلل الجزئي للـ Chitosan بواسطة التفاعلات الانزيمية لأنه يحتوي على مختلف المجاميع الوظيفية الفعالة. وقد تم الكشف عن نتائج التعديلات الكيميائية لتركيب الـ Chitosan التي تعمل على زيادة قابلية الذوبان في الماء بالإضافة الى المذيبات العضوية من قبل بعض الباحثين. والتحلل الجزئي للـ Chitosan من النتائج التي لها خصائص هامة في تحسين الأساليب الأنزيمية (Chen, 2008).

2-1-6-3- خصائص chitosan المناعية Immunolological Properties

جسيمات الـchitosan هي عامل مساعد آمن وفعال قد تكون مناسبة للقاحات العلاجية. وقد أثبتت نتائج التجارب أن جسيمات الـchitosan لم تسبب أي ضرر للخلية أو اي آثار جانبية ، كذلك جسيمات الـchitosan تسبب زيادة ملحوظة في أنشطة و فعالية خلايا الـ NK، ولقد كانت له إمكانات قوية في زيادة كل من الاستجابة المناعية الخلوية و الخلطية وأثارت توازن استجابة Th2 / Th1 (Wu *et al.*, 2006).

2-6-2- بروتين توكسيد الكزاز Tetanus Toxoid protein

توكسيد الكزاز Tetanus toxoid هو مستحضر فاقد الفعالية يحضر من ذيفان الكزاز من بكتريا C*lostridium tetani* وذلك بعد معاملته بـ formaldehyde وهو كيميائيا من بروتين يتكون من 1292 حامض اميني التي تكون بشكل من سلسلتين احدهما طويلة يبلغ وزنها 98كيلو دالتون والاخرى صغيرة يبلغ وزنها 52 كيلو دالتون وتربط بينهما آصرة كبريتيدية ثنائية (Eisel *et al*., 1986; Halpern & Ofthus, 1993) .و لكونه مستضد مهم في الوقاية تم استخدامه كحامل بروتيني في اللقاحات المقترنة conjugate vaccines

(Astronomo & Burton,2010; Sigurdardottir *et al*.,1997) ، وايضا يمتلك فعالية عالية في حمل اللقاحات الكربوهيدراتية مثل من *Streptococcus pneumoniae* (Harding *et al*.,2012).

2-7-عناقيد التمايز Cluster of differentiation

هنالك مجموعة من الجزيئات الموجودة على سطح الخلايا والتي تسمى المعلمات السطحية ومنها مناطق التمايز او كتل من التمايز (cluster of differentiation) وتعرف كذلك بـ cluster of designation او بـ Classification Determinant وعادةً يرمز لها برمز الـ CD وهي بروتوكول يستخدم لتحديد والتحقيق من جزيئات سطح الخلية لتوفير النمط المظهري المناعي (immunophenotyping) للخلايا الهدف (Chan *et al*.,1988).

CD25marker -1-7-2

الـ CD25marker يعرف أيضا بـ Interleukin 2 Receptor Alpha . الذي يعود الى النوع الاول من البروتينات الغشائية (transmembrane protein) الذي يكون موجوداً على الخلايا التائية T المنشطة ، الخلايا البائية B المنشطة ، بعض thymocytes ، سلائف النخاعي (myeloid precursors) والخلايا قليلة التغضن(oligodendrocytes) التي تكون مرافقة مع CD122 لتشكيل مغاير ، و التي يمكن أن تعمل بألفة عالية لمستقبلات IL-2. بالرغم CD25 استخدمت كعلامة لتحديد regulatory T cells CD4+FoxP3+ في الفئران، قد وجد بقاء نسبة كبيرة من خلايا الذاكرة للخلايا التائية تستمر في التعبير وانتاج CD25 في البشر (Triplett *et al.* , 2012). تسمى خلايا CD25+CD4+T بالخلايا التائية T التنظيمية (Treg) ومنذ ذلك الحين اتسمت بكثافة الخصائص بواسطة العديد من المجاميع (Maloy & Powrie, 2001; Shevach, 2002; Sakaguchi, 2004). يبدأ تطور الخلايا التائية T في الغدة الزعترية (thymus)، حيث إعادة ترتيب thymocytes تعمل على تطوير جينات TCR الخاصة بها . بآلية الاختيار الإيجابية (Positive selection) ينقذ thymocytes من موت الخلايا المبرمجة على أساس قدرة TCR التي تتفاعل مع جزيئات معقد النسيج اللمفاوي MHC ، والتي احتلت معظمها الببتيد الذاتي (Starr *et al.*, 2003). تم العثور على تشكيل CD4+CD25+regulatoryTcells لتمثيل حدوث اختيار الغدة الزعترية أخرى (another thymic selection) التي تقوم على أساس التفاعل thymocytes الذي يعرض نحو الببتيد الذاتي التي قدمته جزيئات MHC (Jordan *et al.*, 2001). الخلايا التائية

T المنضمة (Tregs) تلعب دورا رئيسيا في التفاعلات المناعية التي تتضمن المناعة الآنية(autoimmunity)، تحمل زرع الانسجة (transplantation tolerance) ، مناعة مكافحة الاصابة (anti-infectious immunity) والسرطان. اليوم النمط الظاهري الأكثر قبولا لـ Tregs هو coexpression لـ CD4، CD25 وFoxP3 (Lastovicka , 2013) . توجد مجموعتين رئيسيتين من Tregs هما الطبيعية (nTregs) والمتكيفة او المستحثة (iTregs)(Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). يتم التعبير عن مستقبلات CD25 و IL-7 خلال تطوير الخلايا البائية (B cell) في نخاع العظم (bone marrow) وكذلك يمكن أن تعمل كمستقبلات لعامل النمو في الفئران (Namen *et al*.,1988;Rolink *et al*.,1994).

CD29 β1intgrin -2-7-2

الانتغرينات (Integrins) هي مستقبلات غشائية heterodimeric تتألف من وحيدات الفاα وبيتا β.مجموع الاشكال المعروفة هي 18 سلسلة الفا α و8 سلسلة بيتا β التي تميز 24 مستقبلاً التي تتشكل بشكل واسع في تنشيط الخلايا (Askari, 2010 ; Hynes, 2002) . CD29 هو وحيدات إنتغرين β1 (integrin beta1 subunit). و عائلة الإنتغرين هي مستقبلات غشائية تشارك في التصاق الخلايا وتميز (recognition) مراحل متنوعة من العمليات الحيوية بما في ذلك مرحلة التطور الجنيني (embryogenesis)، إصلاح الأنسجة والاستجابة المناعية (Wu *et al*.,2010). ويتكون التركيب الجزيئي لـ CD29 من 130 كيلو دالتون بشكل مغاير مع إنتغرين α فرعية (CD49) تتوسع بشكل واسع يتضمن بطانة خلايا العضلات الملساء لبطانة الخلايا اللمفاوية و وظيفته الاساسية هي الالتصاق Adhesion (Mendrick & Kelly,1993). وينشط CD29 مباشرةً من قبل الاجسام المضادة (Diamond & Springer,1994; Byron *et al*.,2009) . تمت ملاحظة CD29 على الخلايا الجذعية العصبية البشرية (human neural stem cells) التي تم الحصول عليها من الانسجة الجنينية (Hall *et al*.,2006). وبالإضافة الى ذلك ، فقد تبين ان الانتغرين integrin يشير الى تكوين وظيفة ذات اهمية لكلا neural crest وتطور الانسجة المزنكمية mesenchymal ويلعب CD29 دوراً اساسيا في عمليات الاستجابة المناعية لخلايا الجسم وذلك من خلال عمليات التميز والالتصاق ويعتبر احد معلمات التنشيط لخلايا الجهاز المناعي (Breau *et al*.,2006; Miller,2007; Fuchs *et al*.,2008).

3- المواد وطرائق العمل Materials and Methods

3-1- المواد Materials

3-1-1- الاجهزة والأدوات المختبرية

الجدول (3-1) يمثل جميع الأجهزة والمعدات المختبرية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

اســـم الجهـــاز		المنشأ (الشركة المصنعة)
المؤصدة	Autoclave	Hiclave (Japan)
الحاضنة	Incubator	Memmert (Germany)
ميزان حساس	Sensitive balance	Kern (Germany)
مازج	Vortex mixer	Stuart Scientific (UK)
حمام مائي	Water bath	GFL (Germany)
جهاز تقطير	Distilled water	GFL (Germany)
جهاز طرد مركزي مبرد	Cooling centrifuge	Hettich (Germany)
فرن	Oven	Eriotti (Italy)
ثلاجة	Refrigerator	Concord (Lebanon)
حاضنة هزازة	Shaker Incubator	(USA) Lab-line
هزاز	Shaker	Germany/Labover
جهاز الموجات الفائقة	Ultrsonication	Kodo/ Korea
مطياف ضوئي	Spectrophotometer	Apel (Japan)
جهاز قياس الحموضة	pH-meter	Ino-lab. (Germany)
مرشحات دقيقة	Millipore filters	Difco (USA)
انابيب اختبار	Test tubes	Superestar (India)
مسخن حراري	Hot plate&Stir	K&K (Korea)
انابيب ابندورف	Ependorff tubes	Sigma (England)
أطباق بتري بلاستيكية	Disposable Petri dishes	Al-Hani (China)
كابينة الزرع المجهري	Cabient	Lab.Companion (Korea)
الناقل الزرعي القياسي	Standard wire loop (1µ)	Himedia (India)
منبذة عالية السرعة	High speed centrifuge	Hettich (Germany)
محقنات معقمة مختلفة	Disposable Syringe	Meheco, China

		الأحجام
Meheco-China	Slides	شرائح زجاجية
Superstar/India	Cover slides	اغطية الشرائح الزجاجية
BBL / USA	Tips	تبات
BBL / USA	Beakers	بيكرات
Amal/Turkey	Burner	مصباح بنزن
Olympus/Japan	Compound light microscope	مجهر ضوئي
BBL / USA	Conical flasks	فلاسكات
Meheco-China	Counting chamber	وحدة العد البكتري
Meheco-China	Capillary tubes	انابيب شعرية
BioRad (USA)	Miniopticon Real-Time PCR	جهاز المدور الحراري ذي الوقت الحراري
Bioneer (Korea)	Thermo cycler apparatus (PCR)	جهاز الدورات الحرارية
Eppendorf (Germany)	Micropepitte 0.5-10, 20-200, 100-1000	ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
Bioneer (Korea)	Exispin vortex centrifuge	جهاز الطرد المركزي الهزاز
THERMO (U.K)	Nanodrop spectrophotomerter	مطياف نانودروب

3-1-2- المواد الكيمياوية Chemicals

الجدول (3-2) يمثل المواد الكيمياوية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

المنشأ (الشركة المصنعة)	اسم المادة الكيماوية	
BDH (England)	α-naphthol ($C_{10}H_8O$)	الفا- نفثول
BDH	Ethanol (96%)	كحول الايثانول
Fluka	Glycerol ($C_3H_8O_3$)	كليسرول
BDH	Hydrochloric acid (HCl)	حامض الهيدروكلوريك
SDI (Iraq)	Hydrogen peroxide (H_2O_2)	بيروكسيد الهيدروجين
Himedia.	Kovac's reagent	كاشف كوفاكس
BDH	Methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_2$)	احمر المثيل
BDH	Sodium chloride (NaCl)	كلوريد الصوديوم

BDH	Trichloroacetic acid	حامض الخليك ثلاثي الكلور
BDH.	NaHCO3	كاربونات الصوديوم
BDH.	Acetone	استون
BDH.	Buffer phosphate saline(BPS)	محلول دارئ الفوسفات الملحي
BDH.	Formalin	فورمالين
BDH.	Chloroform	كلورفروم
BDH.	Tetramethyl-*P*-phenylene diamine dihydrochloride	رباعي المثيل- ثنائي كلوريد الهيدروجين
BDH.	Potassium hydroxide (KOH)	هيدروكسيد البوتاسيوم
BDH	Ethylene-diamine- tetra acetic acid (EDTA)	اثيلـــين - ثنـــائي الامـــين- رباعي حامض الخليك
BDH (England)	Acetic acid (CH3COOH)	حامض الخليك
Sigma (USA)	Chitosan	الكيتوساين
Fluka (Switzerland)	Disodium hydrogen phosphate(Na2HPO4)	فوسفات الهيدروجين ثنائية الصوديوم
BDH (USA)	Monosodium hydrogen phosphate ($NaHPO_4$)	فوسفات الهيدروجين احادية الصوديوم
BDH (USA)	Phenol	فينول
Sigma (USA)	Sodium tripolyphosphate (TPP)	صوديوم ثلاثي الفوسفات
BDH	WBC solution	محلول كريات الدم البيض
BDH	Lishmen stain	صبغة لشمن
Difco	Glucose	كلوكوز
BDH		صبغة الحبر الهندي
BDH	$CuSO_4.5H_2O$	كبريتات النحاس المائية
BDH	$NaKc.4H_4O_6.4H_2O$	نترات الصوديوم – البوتاسيوم المائية
BDH	KI	يوديد البوتاسيوم
BDH	Tannic acid	حامض التانك
BDH (England)	Isopropanol	الأيزوبروبانول
Bioneer/ Korea	DEPC water	محلول دبك
Bioneer/ Korea	Free nuclease water	محلول النيوكليز
France	Tetanus toxoid	توكسيد التيتانوس

3-1-3- الاوساط الزرعية Culture Media

الجدول (3-3) يمثل الاوساط الزرعية التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

اسم الاوساط الزرعية		المنشأ (الشركة المصنعة)
وسط نقيع القلب-الدماغ السائل	Brain– heart infusion broth	Mastdiagnostic
وسط نقيع القلب-الدماغ الصلب	Brain – heart infusion agar	Mastdiagnostic (USA)
	Xylose–lysine deoxycholate (XLD)	Himedia
وسط اكار السالمونيلا – شيكلا	Salmonella – Shigella agar (S.S)	Himedia
الوسط المغذي السائل	Nutrient broth	Himedia
وسط سيمون السترات	Simmon's citrate agar	Mastdiagnostic (USA)
وسط ماء الببتون	Peptone water	BDH
وسط المثيل الأحمر/ فوكس-بروسكاور السائل	Methyl red – Voges proskaur (MR.VP)	Biolife (Italy)
	Triple Sugar Iron agar (TSI)	Himedia
اكار	Agar	Biolife (Italy)

3-1-4- العُدد الجاهزة Kits

الجدول (3-4): يمثل جميع العُدد التي استخدمت في هذه الدراسة مع اسم الشركة المصنعة وبلد المنشأ.

اسم العدة	مكوناتة	الشركة وبلد المنشأ
AccuZol™ Total RNA Extraction Kit	Trizol Reagent 100ml	Bioneer (Korea)
AccuPower® RocktScript RT PreMix	- RocketScript Reverse Transcriptase (200 u) - 5× Reaction Buffer (1×) - DTT (0.25 mM) - dNTP (250 µM each) - RNase Inhibitor (1 u)	Bioneer (Korea)
AccuPower® 2× Greenstar qPCR Master Mix	2× Greenstar Master mix -8 Well strips × 12 each -DEPC – D.W. 1.8 ml × 4 tubes	Bioneer (Korea)
DNase I enzyme set kit	DNase I enzyme 10X buffer Free nuclase water	BioBasic (Canada)

3-1-5- البادئات Primers

تم تصميم هذه البادئات في هذا الدراسة وذلك باستخدام التتابع الخاص بالجينين من موقع NCBI GenBank Data وباستخدام برنامج تصميم البادئات Primer3 plus . وقد تم تجهيز هذا البادئات من قبل شركة بايونير الكورية كما في الجدول(3-5) :

جدول (3-5): يوضح تسلسل وحجم البادئات المستخدمة في الدراسة

Primer البادئ	تسلسل القواعد للنيتروجينية Sequence		Product size حجم الناتج	Reference المصدر
GAPDH	ATGGGAGTTGCTGTTGAAGTCA	F	-	Hayase *et al* ., 2005
	CCGAGGGCCCACTAAAGG	R		
CD25	AACGGCACCATCCTAAACTG	F	108bp	صمم في هذه الدراسة
	TGTGCACTGACAGTTGTTGC	R		
CD29	AAGCTCACGTGCATGTTGTG	F	121bp	صمم في هذه الدراسة
	TTCCAAATCAGCAGCAAGGC	R		

F: Forward primer البادئ الامامي R: Reverse primer البادئ العكسي

3-2- طرائق العمل Methods

3-2-1- تحضير الاوساط الزرعية

تم تحضير الاوساط الزرعية حسب تعليمات الشركة المصنعة لها. بعد تحضير الاوساط تم تعقيمها بواسطة المؤصدة ، باستثناء وسط اكار سالمونيلا - شكلا (S.S.A) ووسط الـ (XLD) التي تم تعقيمها بواسطة الغليان، وبعد ذلك تم سكبها بأطباق بتري او انابيب معقمة وبعد ذلك تم حضنها لمدة24 ساعة لتجنب التلوث. وبعد ذلك تم تخزينها في 4 م° لحين الاستخدام (Isenberg & Garcia,2004).

3-2-1-1- وسط اختبار الحركة Motility Test Medium

حضر عن طريق إذابة 0.4% من مسحوق الأكار مع 13غرام من المرق المغذي في لتر واحد من الماء المقطر. تم تحضيره في أنابيب وتم التعقيم بواسطة المؤصدة. استخدمه لاختبار حركة البكتريا. (Isenberg & Garcia , 2004).

3-2-1-2- وسط الحفظ طويل الأمد Maintenance medium

حضر الوسط بإضافة (15%) من الكليسيرول إلى الوسط المغذي السائل المحضر بإذابة 4 غرام من الوسط في 50 مل من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى 100 مل ، وعقم بالمؤصدة ، وترك ليبرد في درجة حرارة 56 م باستعمال الحمام المائي ، ووزع على أنابيب اختبار معقمة وذات سدادات محكمة وحفظ في 4 م° لحين الاستعمال . استعمل هذا الوسط لحفظ البكتريا المعزولة والمشخصة لعدة أشهر في درجة حرارة - 20 م° (NCCLS, 2003) .

3-2-2- المحاليل والكواشف Reagents &Solution

3-2-2-1- كاشـــف الكتاليز Catalase reagent

حضر الكاشف آنياً بإضافة 21 مل من بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز (70%) إلى 50 مل من الماء المقطر المعقم ، وأكمل الحجم إلى 100 مل للحصول على تركيز نهائي (30%) ،وحفظ في قنينة معقمة . استعمل هذا الكاشف للاستدلال على البكتريا المنتجة لإنزيم الكتاليز (MacFaddin,2000).

3-2-2-2- كاشف الأوكسيديز Oxidase reagent

حضر الكاشف آنياً بإذابة 1غرام من رباعي المثيل- بارافنيلين ثنائي أمين ثنائي كلوريد الهيدروجين في 100 مل من الماء المقطر المعقم ، وحفظ في قنينة معتمة. استعمل هذا الكاشف في اختبار الأوكسيديز للتحري عن قدرة البكتريا على إنتاج إنزيم الأوكسيديز (Forbes *et al*., 2007).

3-2-2-3- كاشف فوكس بروسكاور Voges Proskauer reagent

حضرت المحاليل بحسب ما جاء في (MacFaddin, 2000).:

محلول (A) الفانفثول (5%): حضر بإذابة 5 غرام من الفانفثول في 100 مل من الكحول الأثيلي بتركيز (96%).

محلول (B) هيدروكسيد البوتاسيوم (40%): حضر بإذابة 40 غرام من هيدروكسيد البوتاسيوم في حجم من الماء المقطر ، وأكمل الحجم إلى 100 مل. استعمل هذا الكاشف للتحري عن قدرة البكتريا على تخمير سكر الكلوكوز وانتاج الاستيل مثيل كاربينول في اختبار الفوكس - بروسكاور.

3-2-2-4- كاشف احمر المثيل Methyl Red Reagent

حضر بإذابة 0.1 غرام من المثيل الأحمر في 300 مل من أيثانول 96 % ثم أكمل الحجم إلى 500مل من الماء المقطر واستعمل هذا الكاشف في فحص احمر المثيل (MacFaddin, 2004).

3-2-2-5- محلول دارى الفوسفات الملحي (7.2) Phosphate buffer saline

حضر هذا المحلول حسب تعليمات الشركة المصنعة له بإذابة 10غرام من دارى الفوسفات الملحي في لتر واحد من الماء المقطر وضبط الاس الهيدروجيني له وبعد ذلك يتم تعقيمه بالمؤصدة (Forbes *et al*., 2007) .

3-2-2-6- المحلول الملحي الفسيولوجي Normal saline solution

حضر المحلول بإذابة 0.85غرام من كلوريد الصوديوم في 90 مل من الماء المقطر، وأكمل الحجم إلى 100 مل ، وعقم بالمؤصدة . استعمل هذا المحلول في أعداد اللقاح البكتيري المباشر (MacFaddin, 2004).

3-2-2-7- محلول Chloride sodium NaCL (0.15M)

حضر المحلول بإذابة 4.383 غرام من كلوريد الصوديوم في 500 مل من الماء المقطر وعقم بالمؤصدة (MacFaddin, 2004).

3-2-2-8- محلول 0.1M Na2HPO4/NaH2PO4, 0.05M EDTA buffer (pH 8.0)

حضر هذا المحلول بإذابة 16.86 غرام منNa2HPO4 مع 0.730 غرام من NaH2PO4 مع 1.86 غرام EDTA في لتر واحد من الماء المقطر ، ويعقم بالمؤصدة(MacFaddin, 2004).

3-2-2-9- محلول 0.1M Na2HPO4/NaH2PO4,1.5M NaCl PBS buffer(pH 7.2)

حضر هذا المحلول بإذابة 16.86 غرام منNa2HPO4 مع 0.730 غرام من NaH2PO4 مع 88.0غرام NaCl في لتر واحد من الماء المقطر ، وعقم بالمؤصدة (MacFaddin, 2004) .

3-2-2-10- المحاليل والمواد المستعملة في قياس تركيز الكربوهيدرات

حضرت المحاليل على وفق ما جاء في (Dubois *et al.* , 1956) وعلى النحو الآتي :-

1- محلول 5 % فينول :حضر بإذابة 5 غم من الفينول البلوري في كمية من الماء المقطر ثم أكمل الحجم إلى 100 مل.

2- حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4.

3- محلول الكلوكوز بتركيز 100 مايكرو غرام/مل :حضر بإذابة 0.01 غم من الكلوكوز في كمية من الماء المقطر ثم اكمل الحجم الى 100 مل وعد محلول خزين (stock solution) حضرت منه التراكيز المطلوبة لتحضير المنحني القياسي لسكر الكلوكوز (10 ،20 ،30، ...100 مايكرو غرام/مل).

3-2-2-11- محلول مولش Molish solution

حضر بإذابة 5 غم من مسحوق الفا- نفثول في 100 مل من الكحول المطلقAbsolute ethanol ليصبح التركيز 5% ، استعمل للكشف عن وجود الكربوهيدرات في مستخلص متعدد السكريد المحفظي . (Macfaddin, 2000)

3-2-2- 12 -محلول البايوريت Biuret solution

حضر بإضافة 3 غم من مادة كبريتات النحاس المائية $CuSO_4.5H_2O$ في نصف لترمن الماء المقطر وتم اضافة 9 غم من مادة ترترات الصوديوم – البوتاسيوم$NaKC.4H_4O6.4H_2O$ و 5 غم من يوديد البوتاسيوم KI و بعد إذابة هذه المكونات الثلاثة تم اضافة 100 مل من محلول هيدروكسيد الصوديوم NaOH بتركيز 0.6 عياري و تم اكمال الحجم النهائي الى لتر بإضافة الماء المقطر ، استعمل هذا المحلول في الكشف عن وجود البروتينات في مستخلص متعدد السكريد المحفظي . (Bishop *et al.*, 1985)

3-2-2-13- محلول الـ Al –Sever

حضر هذا المحلول حسب طريقة (Boyden,1951) من خلط المواد التالية:

كلوكوز 20.5غم ، وكلوريد الصوديوم 4.2 غم ،سترات الصوديوم 8.0غم ، حامض السترك 0.55غم وتم وضعها في 1 لتر من الماء المقطر ،ثم عقمت بالمؤصدة وبعد ذلك تم حفظها بدرجة 4مْ ، تستخدم كـantcoagulat ومحلول preservative لـRBCs.

3-2-2-14- محلول حامض التانك Tannic acid (1:2000)

حضره حسب طريقة (Boyden,1951) كما يلي :

A- حضر بإذابة 40 ملغم من حامض التانك في 10 مل من الـPBS.

B- اخذ 1 مل من (A) وأضيف الى 4 مل من الـPBS.

C - اخذ 2 مل من محلول (B) وأضيف الى 38 مل الـPBS التي يساوي الى 2 ملغم / 40 مل التي يساوي الى 1:2000

3-2-2-15- محلول 1 % مصل الارنب الطبيعي

حضر بإضافة 1 مل من مصل الارنب الغير نشط (بعد حضنه بدرجة 56 مْ لمدة 30 دقيقة في الحمام المائي) في 99 مل من الـPBS (Boyden,1951).

3-2-3- طرائق التعقيم Sterilization Methods

عُقّمت جميع الأوساط الزرعية الجاهزة، والتركيبية، وأغلب المحاليل المستعملة التي لا تتأثر بالحرارة بجهاز المؤصدة عند درجة حرارة 121 مْ وتحت ضغط 15 باوند / انج ^{2} لمدة 15 دقيقة، أما الزجاجيات فقد تم تعقيمها بالفرن الكهربائي عند درجة حرارة 168مْ مدة ساعتين، كما عقمت بعض المحاليل التي تتأثر بالحرارة باستعمال مرشحات غشائية ذات فتحات بقطر (0.22 µm & 0.45 µm) (Ryan & Ray, 2004; MacFaddin, 2000).

3-2-4- حفظ وإدامة العزلات البكتيرية

Preservation and Maintenance of Bacterial Isolates

3-2-4-1- الحفظ قصير الأمد

لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي الصلب المائل بالبكتريا المراد حفظها وحُضنت في درجة حرارة 37 مº لمدة 24 ساعة، ثم حفظت بدرجة 4مْ، وكررت عملية الحفظ لتجديد حيوية العزلات، وتجنب حدوث التلوث(Collee *et al*., 1996) .

3-2-4-2- الحفظ طويل الأمد

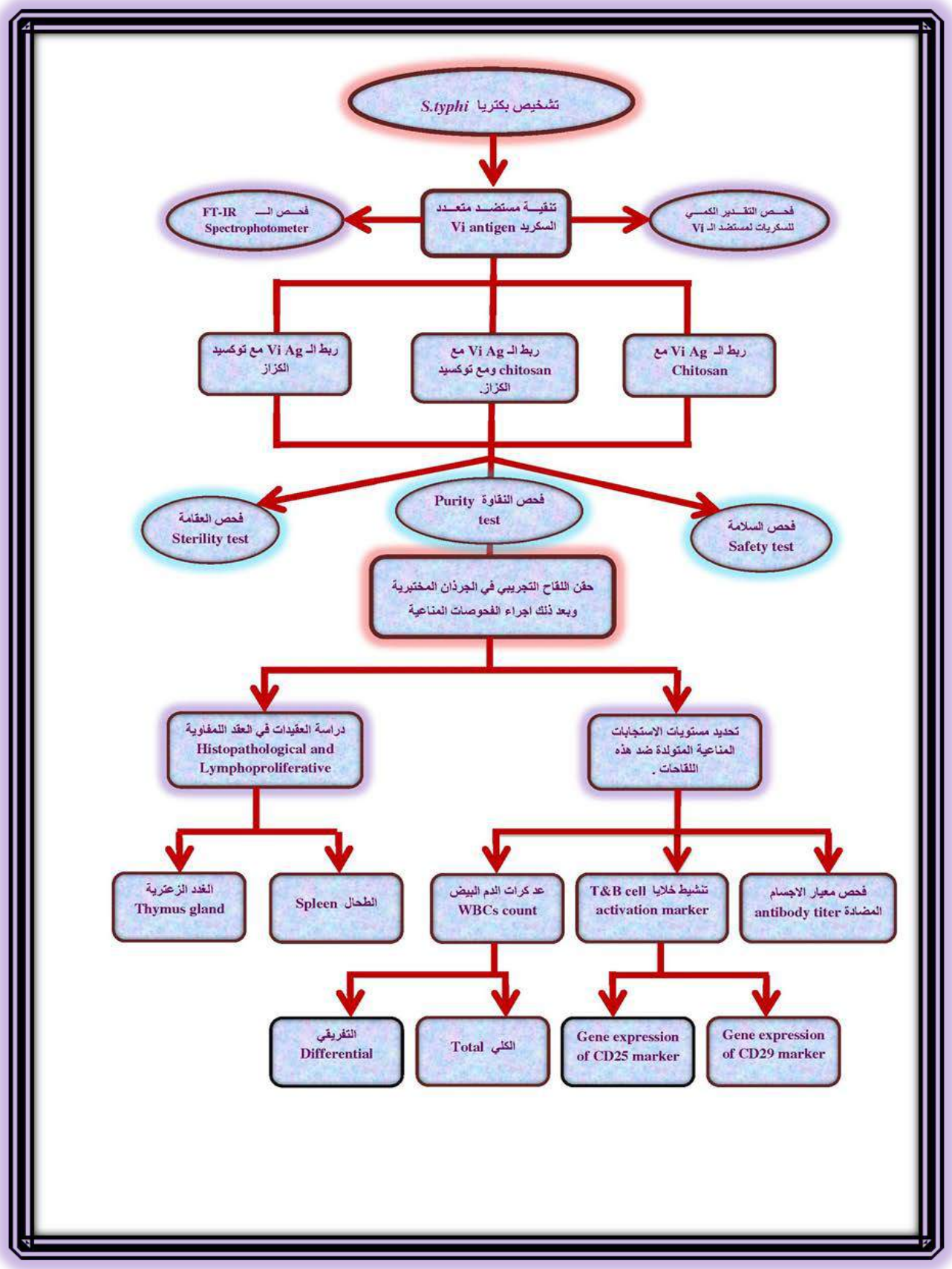
لقحت الأنابيب الحاوية على الوسط المغذي السائل المدعم بالكليسيرول بتركيز(15%) بالبكتريا قيد الدراسة، وحُفظت بدرجة - 20 مْ(Collee *et al*., 1996) .

3-2-5- الحيوانات المختبرية Laboratory animals

اخذ 50 جرذ من ذكور الجرذان البيض (*Rattus norvegicus*) من كلية الطب البيطري / جامعة القادسية . وتراوحت اعمارهم بين 8-6 اسابيع ، وكانت تتراوح اوزانهم بين 120-80 غرام وقسمت الى خمس مجاميع .

3-4- تصميم التجربة Experimental design

شـمل تصـميم التجربـة تشـخيص بكتريـا *S.typhi* ، ثـم تنقيـة مستضـد متعـدد السـكريد (Vi Ag) بعد ذلك حمل المستضد على حبيبات الـ Chitosan وعلى توكسيد الكزاز وأجريت الفحوصات المختبرية للمستضد في الحيوانات المختبرية ، ثم حددت مستويات الاستجابات المناعية (الخلطية والخلوية) ، كما مبين في الشكل (3-1).



شكل (3-1) :- تصميم الدراسة

3-4-1- جمع عينات البكتريا

آخذت عينة البكتريا من مركز الصحة المركزي في بغداد معزولة ومشخصة بفحص الـ API-20 وجزئيا حيث تم جلبها الى مختبر المناعة في كلية العلوم جامعة القادسية وتم التأكد من العينات من خلال زرعها على وسط XLD حيث ظهرت البكتريا بشكل مستعمرات دائرية حمراء ذات مركز اسود وذلك بسبب قدرتها على انتاج غاز الـ H_2S ، ووسط الـ SSA حيث ظهرت بشكل مستعمرات دائرية شاحبة اللون ذات مركز اسود ،كذلك اظهرت نتيجة سالبة لفحص الاندول وفحص فوكس بروساكور وموجبة لاختبار احمر المثيل واختبار استهلاك السترات (MacFaddin, 2004).

3-4-2- الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests

3-4-2-1- اختبار الاوكسيديز Oxidase Test

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بواسطة ناقل خشبي معقم إلى ورقة ترشيح مشبعة بكاشف الاوكسيديز و الدليل على ايجابية الاختبار هو تكوّن اللون الأزرق خلال 10-5 ثوانٍ . (Forbes *et al*., 2007)

3-4-2-2- اختبار الكتاليز Catalase test

نقل جزء من مستعمرة فتية بعمر 24 ساعة بوساطة ناقل زرعي إلى شريحة زجاجية نظيفة وتم إضافة قطرة من محلول بيروكسيد الهيدروجين (H_2O_2) بتركيز(30%). تكون النتيجة موجبة بظهور فقاعات من غاز الأوكسجين (MacFaddin, 2000).

3-4-2-3- اختبار الاندول Indole test

لقح وسط ماء الببتون السائل بالعزلات وحضن بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 48-24 ساعة ، اضيف 0.5 مل من كاشف كوفاكس لكل انبوب، وعدت النتيجة موجبة بظهور حلقة بلون أحمر على سطح الوسط . (Macfaddin, 2004)

3-4-2-4- اختبار احمر المثيل Methyl red test

لقح وسط (MR/VP) السائل بالبكتريا وحضن بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24ساعة بعد ذلك تم إضافة 5 قطرات من كاشف احمر المثيل (Methyl red reagent) مع الرج ، النتيجة الموجبة هي اكتساب

اللون الأحمر مما يدل على التحلل الكامل للسكر وإنتاج الحامض وإما أذا تغير إلى اللون الأصفر فدلالة على (PH) الوسط أكثر من 6 وهذا يعني أن النتيجة سالبة (Macfaddin, 2004).

3-4-2-5- اختبار الفوكس – بروسكاوير Voges-proskauer test

لقح وسط (MR/VP) السائل بالبكتريا وحضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة بعد ذلك تم إضافة 0.6 مل من كاشف الفانفثول ، 0.2 مل من كاشف هيدروكسيد البوتاسيوم ، أن تغير لون الوسط إلى الأحمر بعد مرور 15 دقيقة دلالة على التحلل الجزئي للسكر وإنتاج مركب الاثيل مثيل كاربينول. (Macfaddin, 2000).

3-4-2-6- اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization

خطط وسط السترات المائل بالبكتريا ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ، الدليل على النتيجة الموجبة هو تغير لون الوسط الزرعي من اللون الأخضر إلى الأزرق وهذا دليل على استهلاك السترات (Macfaddin, 2004).

3-4-2-7- اختبار الحركة Motility test

لقحت الأنابيب الحاوية على وسط الحركة بواسطة الطعن Stabing ، ثم حضنت بدرجة حرارة 37مْ لمدة 24 ساعة ، انتشار النمو خارج حدود الطعن يدل على قابلية البكتريا على الحركة (Macfaddin, 2004) .

3-4-2-8- اختبار الكشف عن أنتاج غاز كبريتيد الهيدروجين H2S

لقح وسط (TSI agar) ببكتريا حديثة النمو بطريقة الطعن والتخطيط ، ثم حضنت لمدة 48 ساعة بدرجة حرارة 37مْ إن النتيجة الموجبة يستدل عليها من تكون راسب اسود في أسفل مائل الوسط الصلب وتخمر السكريات الموجودة في الوسط (Macfaddin, 2000).

3-4-2-9- اختبار الكشف عن تكوين المحفظة Capsule

استخدمت طريقة التصبيغ بالحبر الهندي للكشف عن وجود المحفظة ، اذ تم اخذ جزء من المستعمرة البكتيرية ووضعت على شريحة زجاجية ، ثم أضيفت اليها قطرة من صبغة الحبر الهندي ومزجت ثم نشر

المزيج على سطح الشريحة وتركت الشرائح في الهواء لتجف وفحصت بالعدسة الزيتية لملاحظة وجود المحفظة (Bottone *et al.*, 1998) .

3-4-3- تنقية واستخلاص مستضد الـ (Vi) Vi-Antigen extraction and purification

3-4-3-1- تحضير الوزن الجاف preparation of bacterial dry weight

حضر الوزن الجاف للخلايا البكتريا حسب طريقة (Silipo *et al.*,2002) كالاتي :

1- حضرت الخلايا وذلك من خلال تنمية كل عزلة في دورق (flask) يحتوي على 25 مل من مرق لوريا (Luria-Bertani broth (LB) ، وسط نقيع القلب-الدماغ السائل ثم حضنت بدرجة 37 مْ لمدة 18 ساعة.

2- نميت البكتريا بتحضير 3 لتر من وسط نقيع القلب-الدماغ السائل في دوارق سعة250 مل ووضع في كل دورق 100 مل من الوسط ، ثم عقمت بجهاز الموصدة بدرجة 121 مْ لمدة 15 دقيقة .لقحت الدوارق بواقع1 مل عالق البكتريا المنماة مسبقًا في وسط نقيع الدماغ والقلب السائل ووسط (LB) بدرجة 37 مْ لمدة 18 ساعة . ثم حضنت الدوارق في حاضنة هزازة بدرجة 37 مْ لمدة24ساعة بواقع 150- 200 هزة / دقيقة .

3- حصدت الخلايا المنماة بوساطة جهاز الطرد المركزي المبرد (Cooling centerfuge) وبواقع 3000دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة ، ثم غسلت مرتين بدارى الفوسفات الملحي المعقم (pH=7.2) وبواقع 3000 دورة / دقيقة لمدة 10 دقيقة ، ثم علقت الخلايا في دارى الفوسفات الملحي المعقم التي يحوي على 0.5 % من الفورمالين وحفظة بدرجة 4 مْ لمدة 18 ساعة .

4- رسبت بجهاز الطرد المركزي المبرد وبسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 15 دقيقة، ثم غسلت مرتين بالمحلول اعلاه ولمدة 10 دقائق.

5- أخيرا، جففت الخلايا باستخدام الأسيتون المبرد مسبقا وبواقع عشر مرات حجم العينة، ثم تم الحصول على الوزن الجاف لاستخلاص المستضد (Vi Ag).

3-4-3-2- استخلاص مستضد متعدد السكريد (Vi Ag):

تم تنقية واستخلاص مستضد متعدد السكريد حسب طريقة (Esposito & Feeley,1970) المتمثلة بالخطوات التالية :

1- علقت الخلايا المجففة في 10 أحجامها من 0.15 مولاري من كلـــوريد الصوديوم (NaCl) (w/v) ووضعت بجهاز الهزاز (shaker) لمدة 10 دقائق ، ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي centrifuge بسرعة 9000 X g لمدة 30 دقيقة .

2- اخذ الرائق Supernatant fluid ويوضع في انبوبة اختبار ، ثم تعاد الخطوات اعلاه على الراسب Sediment وأخذ الرائق وأهمل الراسب .

3- إضيف 0.25 نورمالي من حامض الخليك ثلاثي الكلورtrichloroacetic acid الى محلول الرائق حتى يترسب ثم وضع بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12,100 X g لمدة 30 دقيقة ،بعد ذلك أخذ الرائق واهمل الراسب .

4- ضبط الاس الهيدروجيني (pH) إلى 7.0 بواسطة NaHCO3 ، بعد ذلك اضافة حجمين من كحول الايثانول C_2H_5OH ثم وضع بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12,100 X g لمدة 30 دقيقة .

5- أهمل الرائق وأخذ الراسب وأُذيبَ بالماء المقطر حتى اصبح محلولاً يحوي على المستضد Solution containing Vi antigen.

6-التخلـص مـن الشوائب تـم اضـافة10µمـن RNase –free DNase و10µمـنbuffer ووضـع بالحمام المائي لمدة 30 دقيقة وبعد ذلك اضيف1µمن الـstop solution ووضع بالحمام المائي لمدة 10 دقائق .

7- رشح المحلول بورقة ترشيح Filter paper وعمل ديلزة dialyze بعد ذلك تم الحصول على المستضد وحفظ بدرجة 4 مْ لحين الاستخدام .

3-4-3-3- التقدير الكمي للكربوهيدرات في مستضد متعدد السكريد (Vi Ag)

قدرت كمية الكربوهيدرات في المستضد باستخدام طريقة الفينول – حامض الكبريتيك حسب ما ورد (Dubois *et al.* , 1956) وعلى النحو الآتي :

1- تحضير المنحنى القياسي لسكر الكلوكوز

2- حضرت التراكيز المطلوبة من سكر الكلوكوز من المحلول الخزين حسب فقرة (3-2-2-10) وحسب الجدول الآتي:

جدول (3-6) :- يبين تراكيز سكر الكلوكوز المستخدمة في تحضير المنحنى القياسي

رقم الانبوبة	حجم محلول الكلوكوز(مل)	حجم الماء المقطر (مل)	الحجم النهائي (مل)	التركيز (مايكرو غرام/مل)
1	0.0	1.0	1	0
2	0.1	0.9	1	10
3	0.2	0.8	1	20
4	0.3	0.7	1	30
5	0.4	0.6	1	40
6	0.5	0.5	1	50
7	0.6	0.4	1	60
8	0.7	0.3	1	70
9	0.8	0.2	1	80
10	0.9	0.1	1	90
11	1.0	0.0	1	100

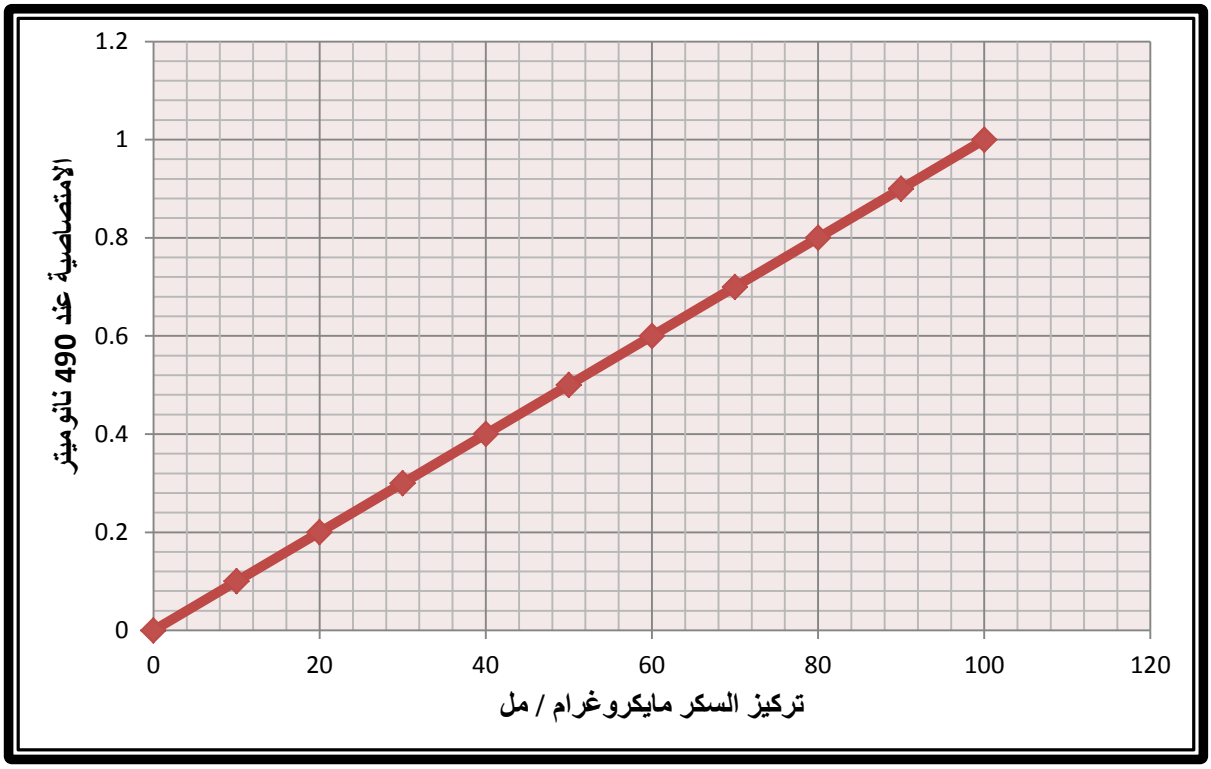
2- اضيف 1 مل من محلول الفينول 5 % المحضر في فقرة (3-2-2-10) إلى كل أنبوبة ورجت جيدا لكي يتجانس وتركت لمدة 3 دقائق.

3- اضيف 5 مل من حامض الكبريتيك المركز 98% الى الخليط وبهدوء على حافة الانبوبة ، ثم رج جيدا وبرد في حمام ثلجي.

4- حضر محلول الـ (Blank) من إضافة المواد المذكورة في(2 و3) الى واحد ملي لتر من الماء المقطر .

5- قرأت الامتصاصية عند الطول الموجي 490 نانوميترفي جهاز المطياف .

6- رسم المنحنى القياسي شكل (3-2) والذي يمثل العلاقة بين تراكيز الكلوكوز المتدرجة و الامتصاصية .



شكل (3- 2) المنحني القياسي بين تركيز الكلوكوز والامتصاصية

3-4-3-4- الكشوفات الكيميائية اللونية على مستخلص متعدد السكريد المحفظي .

تم الكشف عن الكربوهيدرات والبروتينات والدهون والاحماض النووية وحسب ما ورد في (Plummer, 1978) كما في الفقرات التالية :-

3-4-3-4-1- الكشف عن الدهون في المستخلص

حضر هذا الكشف بإضافة 1 ملغم من كبريتات البوتاسيوم الهيدروجينية $KHSO_4$ إلى 100 مل من المستخلص ثم سخن المزيج وقد أنبعثت رائحة كريهة تشبه الرائحة التي تنتج من تسخين مزيج الكليسيرول مع كبريتات البوتاسيوم دلالة على ايجابية الفحص .

3-4-3-4-2- الكشف عن البروتينات في المستخلص

استخدم كشف البايوريت المحضر في الفقرة (3-2-2- 12) للتحري عن وجود البروتينات ، حضر بإضافة خمس قطرات من هذا المحلول الى المستخلص ومزج الخليط جيداً ، ظهور اللون البنفسجي يدل على ايجابية الفحص حيث ان كبريتات النحاس المائية الموجود في الكاشف لها القدرة على التفاعل مع الاواصر الببتيدية مكونه معقداً لونه بنفسجي .

3-4-3-4-3- الكشف عن الكربوهيدرات في المستخلص

استخدم كشف مولش المحضر في الفقرة (3-2-2-11) للتحري عن وجود الكربوهيدرات. اضيفت قطرتين من محلول مولش الى 2 مل من المستخلص ، بعد ذلك اضيف 2 مل من حامض الكبريتيك المركز باحتراس على جدار الانبوب بحيث تتكون طبقتين ، المستخلص الى الاعلى وحامض الكبريتيك الى الاسفل ، و ظهور حلقة أرجوانية تفصل بين الحامض والمستخلص تدل على ايجابية الفحص .

3-4-3-5- تحضير الـ Chitosan

حضر حسب طريقة (Huang *et al*., 2008) كما في الخطوات ادناه :-

1- أذيب 2 غم من Chitosan في 100 مل من 0.1 مولاري من حامض الهيدروكلوريك ،ثم يرج المحلول بجهاز stirred لمدة 30 دقيقة .

2- أضيف بيروكسيد الهيدروجين H_2O_2 الى واحد من خمس تراكيز (1%, 1.5%, 2% and 2.5%).

3- وضع الخليط على جهاز heated stirred بدرجة حرارة 60 مْ لمدة ساعتين ثم يتم ترشيحه بورق الترشيح.

4- التخلص من البقايا العليا المتحدد مع الماء المقطر ويبقى المحلول السفلي .

5- اضافة ايثانول الى المحلول السفلي و يترك لمدة 24 ساعة ليترسب ويجمع الراسب ويتم حساب وزنه . اعطى الرمز C1، C1.5، C2، وC2.5 للوزن الجزيئي الواطئ لذوبان Chitosan low-molecular-weight water-soluble chitosans (LWCS) .

6- بعد المعاملة بـ H_2O_2، فان الوزن الجزيئي للـChitosan انخفض واستمر في الانخفاض كلما يتم إضافة المزيد من H_2O_2 وذلك بسبب تحلل سلسة الـChitosan بـ H_2O_2 .

7- أذيب 0.5 غم من LWCS في لتر من 2 % من حامض الخليك ثم رج المحلول لمدة 30 دقيقة.

8- إضافة 100 مل من كل محلول لـ 40 مل من TPP (0.05، 0.1، 0.2 غم /لتر) ، و رج المحلول لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة ثم يوضع بجهاز الطرد المركزي على سرعة عالية (6000 دورة/ دقيقة) لمدة 10 دقائق .

9- عزلت جزيئات nanochitosan التي يتم شطفها بالماء المقطر، وتجفف بالتجميد ليتم استخدامها في التجارب اللاحقة .

3-4-3-6- تحديد التركيز الامثل للـ Chitosan

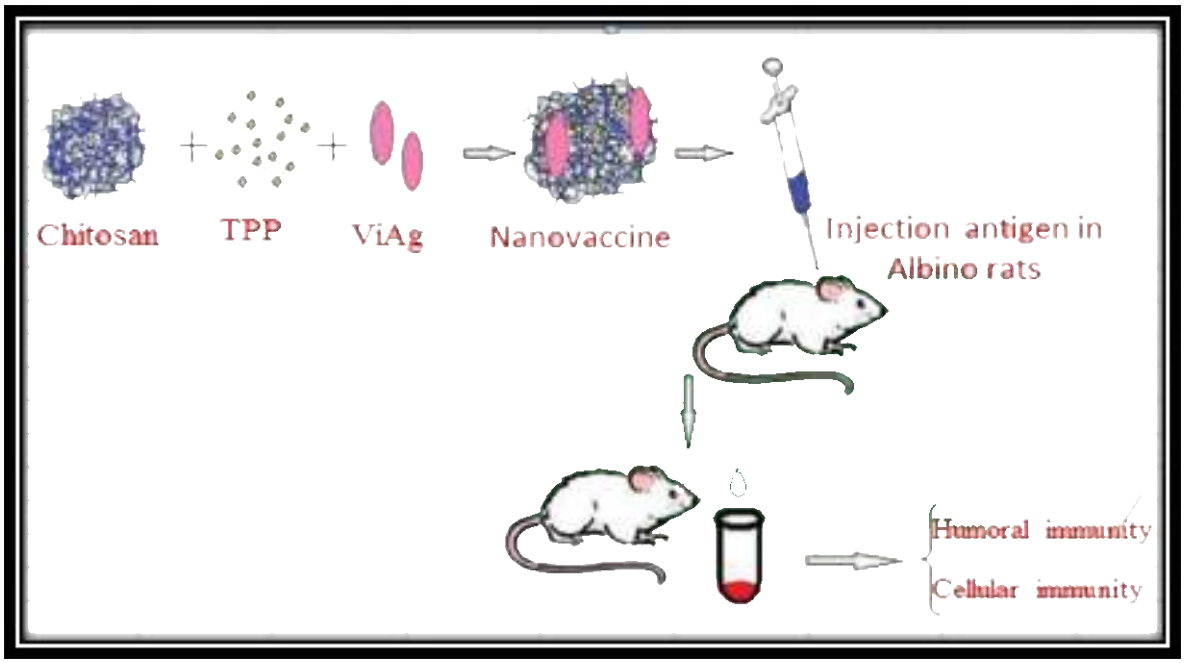
Detection the optimum concentration of chitosan nanoparticles

تحديد التركيز الامثل لتراكيز الـ Chitosan من التراكيز(2.5 % و 5%) التي اعدت ، وتراكيز الـ TPP(0.5 و 1.0 غم / لتر) ، تم من خلال قياس الامتصاصية بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 595 نانومتر (Gan *et al*.,2005) لتحديد افضل تركيز.

3-4-3-7- تحميل المستضد على حبيبات الـChitosan

Loading antigen on Chitosan Nanoparticles

تم بإعادة تعليق حبيبات الـ Chitosan في 25 مل من الماء المقطر في تركيز 5 ملغ / مل تحت استمرارية استخدام الموجات الفائقة ultrasonication لفصل جزيئات Chitosan. بعد ذلك حُمل المستضد مع حبيبات الـ Chitosan في درجة حرارة الغرفة لمدة 15 دقيقة. بعد ذلك يتم اخذ1مل من محلول الجزيئات المحملة مع المستضد ويطرد بجهاز الطرد المركزي بسرعة 13,200 rpm لمدة 20 دقيقة ، ثم اخذ كمية من الرائق وتم قياس الامتصاصية للمحلول بجهاز المطياف الضوئي عند طول موجي 570 نانوميتر واستخدم محلول Chitosan كمحلول blank لتصفير قراءة جهاز المطياف الضوئي. بعد ذلك استخدمت الكثافة الضوئية (OD) كقيمة تصحيح لحساب تركيز المستضد في الرائق(Lubben *et al*.,2002) ويوضح شكل (3-3) خطوات تحضير الـNanovaccine



شكل (3-3) يوضح خطوات تحضير Nanovaccine

3-4-3-8- ربط توكسيد الكزاز مع مستضد متعدد السكريد

Coupling Vi antigen with Tetanus toxoid protein

تم ربط توكسيد الكزاز (التي تم الحصول عليه مجهز من الشركة) مع مستضد متعدد السكريد بأخذ حجم من المستضد مع حجم مساوي له من التوكسيد بعد ذلك عرض للرج لمدة 4 ساعات تحت درجة 2-4 مْ . لإنهاء هذا التفاعل يتم اضافة دارئ 0.1M Na2HPO4/NaH2PO4, 0.005M EDTA (pH 8.0) وبعد ذلك تم خلط المحلول مع دارى 0.1 M Na2HPO4/NaH2PO4 , 1.5M NaCl PBS (Venkatesan , 2012)

3-4-3-9- الفحوصات المناعية Immunological Tests :-

3-4-3-9-1- تحديد الجرعة القاتلة للنصف LD50

لتحديد جرعة مستضد متعدد السكريد المحفضي ، تم استخدام جرعات مختلفة من المستضد المحضر (10، 20، 30، 40 ميكروغرام / مل)، حيث تم حقن 1 مل من كل تركيز في (10 حيوانات في كل مجموعة) من خلال الغشاء البريتوني (IP) وتم تحديد 50% من الجرعة القاتلة لنصف العدد LD50 عن طريق عد الوفيات خلال 5 أيام وتحديد كذلك الجرعة القاتلة لنصف المجموعة LD50 . وايضا تم

حقن مجموعة السيطرة بـ 1 مل محلول (PBS). واستخدم عد الفئران الحية والميتة لتحديد الجرعة المميتة المتوسطة والمؤثرة (Miller &Tainter, 1944; Al-Ali *et al.*,2008)

3-4-3-9-2- فحص السلامة Safety test :-

حقنت 10 جرذان بيضاء بعمر(6-8 اسابيع) بالمستضد المحضر بجرعة مضاعفة في البرويتون intraperitoneal (i.p.) ، وفي نفس الوقت حقنت مجموعة السيطرة والتي كانت بنفس نوع ووزن المجموعة الاولى بمحلول الملح الفسلجي وبنفس طريقة الحقن ،وتمت مراقبة الجرذان المحقونة مدة 7 أيام للتأكد من سلامة المستضد وصلاحيته للاستعمال (Wang *et al*., 2005; . Guzman *et al*., 2006) .

3-4-3-9-3- فحص العقامة Sterility test :-

زرعت عينة من المستضد البكتيري المحضر على عدد من الاوساط الزرعية ، وسط الماكونكي ، ووسط المرق المغذي الاعتيادي ووسط آكار نقيع القلب والدماغ ، ووسط آكار الدم حضنت الاوساط المزروعة تحت الظروف الهوائية و اللاهوائية باستخدام حاضنه لاهوائية مجهزة بـ CO_2 بدرجة حرارة 37 مْ لمدة 24-48 ساعة للتأكد من نقاوة المستضد ، وخلوه من البكتريا الحية، وعدم تلوثه (Robbins& Robbins,1984; Guzman *et al*., 2006) .

3-4-3-9-4- فحص النقاوة Purity test :-

اجري فحص النقاوة للمستضد كمياً حسب الفقرة **(3-4-3-3)** ولونياً حسب الفقرة **(3-4-3-4)**.

3-4-3-9-5- اختبار التحدي Challenge test :-

تم استخدام خمسون جرذ من ذكور الجرذان البيضاء (*Rattus norvegicus*) في اختبار التحدي، ثم تم تقسيم هذه الحيوانات في خمسة مجاميع ، كل مجموعة تحتوي على10 جرذان ، كما هو مبين في الجداول (3- 7) .

الجدول (3-7) يمثل تصميم تجربة اختبار التحدي The design of the challenge test

المجموعة	عدد الحيوانات	المعالجة		
		الجرعة الاولى **First dose**	جرعة التنشيط **Boosting dose**	جرعة التحدي **Challenge dose**
		الاسبوع الاول	الاسبوع الثالث	الاسبوع الخامس
T1	10	20+21.8µg/ 0.25ml	20+21.8µg/ 0.25ml	40+43.75µg/ 0. 5ml
T2	10	20µg/0.25ml	20µg/0.25ml	40µg/0.5ml
T3	10	20+20µg/ 0.25ml	20+20µg/ 0.25ml	40+40µg/ 0. 5ml
T4	10	20+20+21.8µg/ 0.25ml	20+20+21.8µg/ 0.25ml	40+40+43.75 µg/ 0. 5ml
C	10	0.25ml(PBS)	0.25ml(PBS)	0. 5ml(PBS)

حيث تمثل T1: مجموعة المعاملة بـ .Vi Ag + Ch ، تمثل T2 : مجموعة المعاملة بـ Vi Ag ، تمثل T3: مجموعة المعاملة بـTT+ Vi Ag ، تمثل T4: مجموعة المعاملة بـTT+.Ch+ Vi Ag وتمثل C: مجموعة السيطرة.

3-4-3-9-4-1- جمع عينات الدم Blood samples collection

بعد سبعة أيام من آخر جرعة من الحقن ، جمع 3 مل من عينات الدم من جرذان عن طريق طعنة القلب تحت التخدير العام باستخدام diethylether ، بعد ذلك قسمت عينات الدم التي تم جمعها الى مجموعتين : المجموعة الأولى وضعت في انابيب تحتوي على مادة مانعة للتخثر وهذه استخدمت في عد كريات الدم البيض الكلي والتفريقي وايضا استخدمت في الـ Real-time PCR اما المجموعة الثانية وضعت في انابيب غير حاوي على مادة مانعة للتخثر وتركت حتى تتخثر ثم وضعت بجهاز الطرد المركزي لفصل المصل ثم نقل إلى أنابيب مناسبة للاختبارات المصلية (Lewis, 2001).

3-4-3-9-5- فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) Quantitative Reverse Transcription Real-Time PCR (RT-qPCR)

أجري فحص تفاعل سلسلة البلمرة في الوقت الحقيقي الكمي (الاستنساخ العكسي) وذلك لقياس مستويات كميات الحمض النووي المرسل (mRNA) للدلالة على مقدار التعبير الجيني Gene expression لجين (CD25 and CD29) وكذلك تم استخدام جين الـ (GAPDH) كجين منظم قياسي لحساب التعبير الجيني.

اجري هذا الفحص حسب طريقة (Wang& Hardy,2004) كما في الفقرات التالية :

3-4-3-9-5-1-استخلاص الحمض النووي الريبوزي Total RNA extraction

استخلاص الحمض النووي الكلي Total RNA تم باستخدام عدة الـ Trizol kit المجهزه من قبل شركة (Bioneer (Korea وتم العمل بهذا العدة حسب تعليمات الشركة المصنعة كما في الخطوات التالية :

1- اخذ 250µL من عينات دم جرذان التجربة و اضيف الى 1 مل من محلول الـ Trizol ووضع في انبوبة قياس 1.5 مل ومزج جيدا لمدة دقيقتين.

2- اضيف 200 مايكرو ليتر من محلول الـ chloroform لكل عينه من العينات وعمل لها رج لمدة 15 دقيقه بواسطه الـ vortex .

3- حضن الخليط في الثلج لمدة10 دقائق.

4- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 10 دقائق بسرعه 12000دوره / دقيقة.

5- نقلت الطبقة العليا (الشفافة) الى انبوبه انبوبة قياس 1.5 مل جديده بواسطة micropipette واضيف اليها كميه متساوية من isoprobanol al cohool وقلبت الأنبوبة 4 -5 مرات باليد.

6- حضنت العينات بدرجة حراره -20مْ لمدة 10 دقائق .

7- وضعت العينات في جهاز الطرد المركزي12000 دوره/دقيقه لمدة 10 دقائق بعد ذلك تم التخلص من الطافي وأخذ المترسب pellet.

8- أضيف للمترسب 1 مل من ethanol alcohol بتركيز80% وعمل له رج مستمر بجهاز vortex ثم وضع الخليط بجهاز الطرد المركزي بسرعة 12000دوره / دقيقة لمدة 5 دقائق واهمل الطافي وأخذ الراسب pellet.

9- جفف الراسب بتركه بدرجه حراره الغرفة (60-55) مْ ولمدة10 دقائق بعد ذلك يحفظ الحمض النووي RNA المستخلص في درجة حرارة - 70 مْ.

3-4-3-9-5-2- قياس تركيز ونقاوة الحامض النووي الرايبوسومي

Assessing RNA yield and quality

كشف عن الحمض النووي RNA المستخلص من العينات وذلك من خلال استخدام جهاز خاص Nanodrop spectrophotometer وذلك لتحديد تركيز الحمض النووي الريبوسومي RNA ng\µl و قياس نقاوة الحمض النووي RNA من خلال قراءة الامتصاصية بدرجة (260/280 nm) حيث ان الحمض النووي RNA المستخلص يعتبر نقي عندما تكون نسبة الامتصاصية هي (1.8).

3-4-3-9-5- 3-المعاملة بانزيم DNase I Treatment

اجريت معاملة مستخلص الحمض النووي الريبوسومي RNA باستخدام Dnase I treatment وذلك لتخلص من بقايا الحمض النووي DNA في عملية الاستخلاص وذلك بالاعتماد على طريقة عمل عدة الأنزيم كما في جدول (3-8):

جدول(3-8) يمثل مكونات عُدة الإنزيم المستخدمة للتخلص من بقايا الحامض النووي DNA في عملية الاستخلاص.

Mix	Volume
Total RNA 100ng/µl	10µl
DNase I enzyme	1µl
10X buffer	4µl
DEPC water	5µl
Total	20µl

بعد ذلك حضن المزيج في الحاضنة بدرجة حرارة 37مْ لمدة 30 دقيقه، وبعدها اضيف 1 ميكروليتر من مادة الـ EDTA وحضنت ايضا بالحمام المائي بدرجة حرارة 65 مْ لمدة 10 دقائق وذلك لتثبيط فعل الانزيم.

3-4-3-9-5-4- طريقة تصنيع الـ cDNA synthesis

استخدام طريقة تصنيع الحمض النووي cDNA المكمل للـ DNA من عينات الحمض النووي ال RNA المستخلص باستخدام عده Accupower Rockscript RT Premix kit المجهزة من قبل شركة بايونير الكورية. وتم اجراء هذا العملية حسب طريقة عمل العدة كاما في جدول (3-9):

جدول (3-9) يمثل عُدة كاما المستخدمة في عملية تصنيع ألـ cDNA synthesis

RT master mix	Volume
Total RNA 100ng/µl	10µl
Oligo d.t	1µl
DEPC water	9µl
Total	20µl

بعد ذلك اضيفت مكونات مزيج RT master mix التي ذكرت في الجدول اعلاه الى انابيب عدة cDNA synthesis والحاوية على انزيم الاستنساخ العكسي Reverse transcription ، ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج vortex centrifuge (Exispin) بسرعة 3000rpm لمدة ثلاثة دقائق. بعد ذلك تم نقل الانابيب الى جهاز المدوار الحراري Thermocycler وتم تطبيق الظروف الحرارية لعملية تصنيع ال cDNA حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول(3-10):

جدول(3-10) يمثل الظروف الحرارية لمراحل تصنيع ألـ cDNA حسب طريقة عمل العُدة

Step	Temperature	Time
cDNA synthesis (RT step)	50 °C	1 hour
Heat inactivation	95 °C	5 minutes

بعد ذلك تنقل العينات لحفظها بدرجة -20 مْ لحين استخدامها في فحص Real-time PCR .

3-4-3-9-5-5 فحص Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

اجراء فحص الـ qPCR لعينات الـ cDNA لمجاميع التجربة باستخدام عدة Accupower 2x Green Star qPCR kit المجهزة من قبل شركة Bioneer (Korea) ، لأجراء

هذا الفحص والحاوي على صبغة السايبر الخضراء والتي تتفاعل مع الجينات المتضخمة في جهاز الـ Real-Time PCR كما يأتي :

A)- تحضير مزيج تفاعل qPCR لجينات الهدف CD25 , CD29 **كما في جدول (3-11)**

جدول (3-11) يمثل مكونات مزيج تفاعل qPCR لجينات الهدف CD25 , CD29

qPCR master mix		Volume
cDNA template		2.5µL
Primers (10pmol)	Forward primer	1.25 µL
	Reverse primer	1.25 µL
2x green star master mix		25 µL
DEPC water		20 µL
Total		50 µL

B)- تحضير مزيج تفاعل qPCR جين المحافظ القياسي GAPDH genes كما في جدول (3-12)

جدول (3-12) يمثل مكونات مزيج تفاعل qPCR جين المحافظ القياسي GAPDH genes

qPCR master mix		Volume
cDNA template		2.5µL
Primers (10pmol)	Forward primer	1.25 µL
	Reverse primer	1.25 µL
2x green star master mix		25 µL
DEPC water		20 µL
Total		50 µL

بعد ذلك اضيفت هذا المكونات التي ذكرت في الجداول اعلاه الى انابيب qPCR الخاصة. ومن ثم وضعت جميع الانابيب في جهاز الطرد المركزي المازج (Exispin) centrifuge vortex بسرعة

3000rpm لمدة ثلاثة دقائق . وبعدها نقلت صفيحة الى جهاز (Miniopticon Real-Time PCR) وتم تطبيق الظروف الحرارية qPCR Thermocycler conditions لكل الجينات حسب طريقة عمل العدة كما في الجدول (3-13) الاتي:

جدول (3-13) يمثل الظروف الحرارية المُثلى لمراحل qRT-PCR وبحسب طريقة عمل العُدة

qPCR step	Temperature	Time	Repeat cycle
Initial Denaturation	95 °C	3 min	1
Denaturation	95 °C	20 sec	45
Annealing\ Extention Detection(scan)	60 °C	30 sec	
Melting	60-95°C	0.5 sec	1

3-4-3-9-5-6- طريقة تحليل بيانات Real-Time PCR data anlysis

حللت البيانات الناتجة من تفاعل السلسلة المتبلمرة في الوقت الحقيقي الكمي من خلال استخدام طريقة livak method والتي وضعت من قبل (Livak & schmittgen, 2001) والتي تعتمد على استخراج الكميه النسبية (Relative Quantitive) والكميه المطلقة (Absolute Quantitive) من خلال عملية تصحيح ومعادله الجينات الهدف مع عينات السيطرة حتى تكون النتائج ذات معنى بيولوجي لكل عينه من عينات الهدف تصحح مع عينة السيطرة لينتج مستوى محدد من التعبير النسبي وكما في المعادلات التالية :

1- $\Delta CT\ (test) = CT\ (target,test) - CT\ (ref, test)$

2- $\Delta CT\ (control) = CT\ (target,control) - CT\ (ref, control)$

3- $\Delta\Delta CT = \Delta CT\ (test) - \Delta CT\ (control)$

4- Gene expression Ratio = $2^{-CT\ \Delta\Delta CT}$.

3-4-3-9-6- Passive haemagglutination test: :

أجرى فحصPassive haemagglutination test حسب طريقة (Boyden,1951) وكما في الخطوات التالية :

1- كريات الدم الحمراء للأغنام Sheep RBCs :

سحب 5 مل من دم الأغنام عن طريق محقنة معقمة ،و خلط مع 5 مل من محلول al-sever solution ، بعد ذلك حفظت بدرجة 4 مْ لمدة 72 ساعة. ثم طردت عينة الدم بسرعة 1500 دورة لمدة 10دقائق لهمل al-sever solution ، ثم غسلت كريات الدم الحمراء ثلاث مرات مع PBS (الرقم الهيدروجيني = 7.2) وطردت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة لمدة 5 دقائق. ثم أعدت 2.5 % من كرات الدم الحمراء للأغنام المعلقة.

2- كريات الدم الحمراء المدبوغة Tanned RBCs:

خلط 10 مل من (2.5 %) كريات الدم الحمراء مع حجم مساو من محلول حامض التانيك tannic acid (1: 20000)، حضنت في 37 مْ لمدة 20 دقيقة ، وضعت بجهاز الهزاز Shaker لمدة 5 دقائق، ثم بعد ذلك تم طردها بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000دورة لمدة 10 دقائق لإزالة حامض التانيك، و غسلت كريات الدم الحمراء ثلاث مرات مع PBS (الرقم الهيدروجيني = 7.2) وطردت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1500 دورة لمدة 5 دقائق.

3- غسل كرات الدم الحمراء المدبوغة Sensitized of washed tanned RBCs

أعدت سلسلة من التخافيف للمستضد الخاص لـ sensitize washed tRBCs وكشف عن تركيز المستضد الأمثل الذي أعطى رد فعل إيجابي مع ارتفاع الأجسام المضادة المخففة.1مل من مستضدات الذوبان خلط مع 1 مل من tRBCs المغسولة ثم تم حضنها بدرجة 37مْ لمدة 30 دقيقة، وبعد الحضن وضعت بلطف في جهاز الهزاز لمدة 5 دقائق ، ثم بعد الخلط وضعت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 2000 دورة لمدة 10 دقائق لإزالة المستضدات المفرطة ، وأخيرا، غسلت كرات الدم الحمراء الحساسة بمحلول الـ PBS (الرقم الهيدروجيني =7.2) وطردت بجهاز الطرد المركزي بسرعة 1300 دورة لمدة 5 دقائق ثلاث مرات.

4- المصل الغير منشط Inactivation of serum :-

حضنت عينات المصل في حمام مائي بدرجة 56 مْ لمدة 30 دقيقة لضمان تعطيل النشاط الكامل للمتمم .

الطريقة Procedure :

أضيف 0.05 مل من 1% من مصل الأرنب الغير منشط في الحفر بواسطة الـ microtiterplate (تمتلك 96 حفرة بشكل حرف U)، ثم اضافة 0.05 مل من مصل العينات الى أول حفرة في raws ، ثم عملت سلسلة من التخافيف للمصل بواسطة الماصة بأخذ 0.05 مل من الخليط ونقلها إلى الحفرة التالية وهكذا إلى آخر حفرة ، والتي تم اخراج 0.05 مل منها واهمل ثم اضيفت إلى كل حفرة (0.05 مل) من tRBCs الحساسة ، بعد ذلك تم تغطية اللوحة بغطاء ورق الألومنيوم وحضنت في درجة حرارة الغرفة لمدة 2 ساعة على الأقل ، ثم بعد 18 ساعة في 4 مْ تم قراءة النتائج .وقد يكون رد فعل إيجابي عندما التصقت كرات الدم الحمراء وعلى شكل حصيرة carpet (shape). ويكون رد فعل سلبي عندما تترسب في القاع كرات الدم الحمراء كما في مثل نقطة بدون تراص.

السيطرة Control: -

- 0.05 مل من كريات الدم الحمراء الغير حساسة + 0.05 مل الـ PBS.
- 0.05 مل من كريات الدم الحمراء الغير حساسة + 0.05 مل NRS (مصل الأرنب العادي الغير منشط).
- 0.05 مل من كريات الدم الحمراء الغير حساسة + 0.05 مل من التخفيف الأول من المصل الإيجابي.
- 0.05 مل كريات الدم الحمراء الغير حساسة + 0.05 مل من المستضدات.
- 0.05 مل من كريات الدم الحمراء الحساسة + 0.05 مل من PBS.
- 0.05مل كريات الدم الحمراء الحساسة + 0.05 مل من NRS.

3-4-3-9-7- العد الكلي لكريات الدم البيض Total leukocytes count

جمعت عينات الدم وتم اجراء العد الكلي لكريات الدم البيض حسب طريقة (Haen ,1995). سحب 0.02 مل من الدم وخلطه مع 0.38 مل من محلول الـ leukocyte diluent في انبوبة اختبار وترك في درجة حرارة الغرفة لمدة 3 دقائق . ثم وضعت قطرة من الخليط على سطح شريحة العد Neubauer chamber تحت غطاء الشريحة cover slip ، وتركت في الغرفة لمدة 3 دقائق لتسوية الخلايا. عدت كريات الدم البيضاء في 4 مربعات كبيرة (مع كل 16 مربعات صغيرة)، وتم الحصول على العدد الكلي لكريات الدم البيضاء باستخدام المعادلة التالية:

العدد الكلي (خلية /1مل .الدم) = $\frac{\text{عدد الخلايا المحسوبة}}{4}$ * 20 * 10

Total Count (cell/1ml.blood) =$\left(\frac{\text{Number of Cells Counted}}{4}\right)$ x 20 x 10

3-4-3-9-8- العد التفريقي لكريات الدم البيض Differential of WBCs

وضعت قطرة واحدة من الدم على شريحة نظيفة باستخدام شريحة أخرى وتركت في الهواء لتجف في درجة حرارة الغرفة. وهذه المسحة تم تصبغها بصبغة ليشمان لمدة 3-5 دقائق ، بعد ذلك اضيف ماء مقطر ضعف حجم صبغة لشمن لمدة 10 دقائق ، واخيرا تم غسلها بماء الحنفية. وبعد ذلك ترك الشريحة لتجف في الهواء، ومن ثم تفحص تحت العدسة الزيتية (100X) (Haen, 1995) . ويتم فحص 100 من كريات الدم البيض على الأقل ، وسجلت النسبة المئوية لكل نوع من الخلايا .

3-4-3-9-9- الدراسة النسيجية

أجري التقطيع النسيجي لنماذج مأخوذة من بعض اعضاء الحيوانات المستخدمة (الطحال و الغدة الزعترية) في التجارب واعتمدت طريقة (Allen& Cameron,2004).

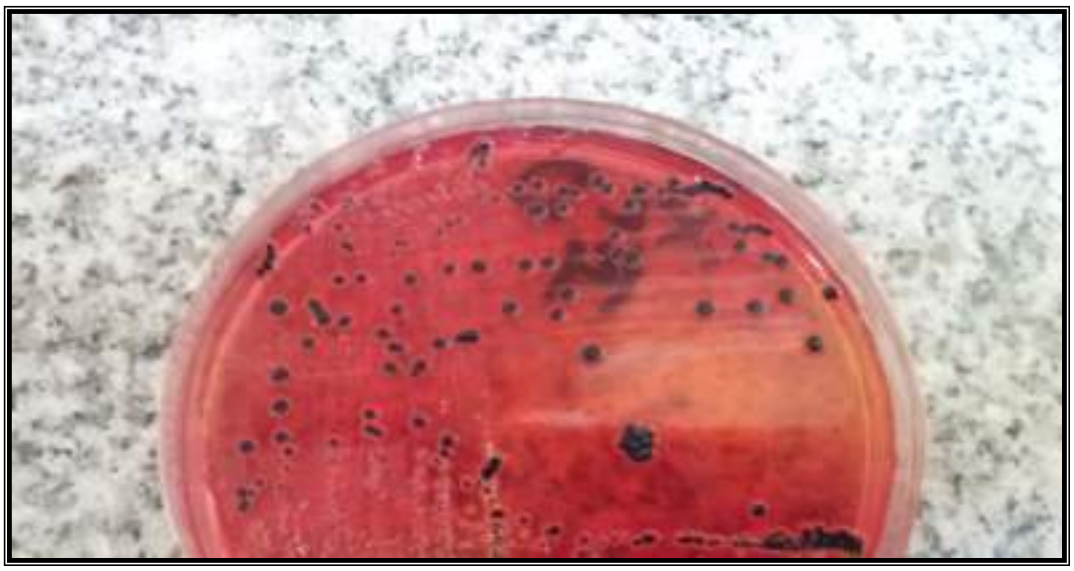
3-4-3-9-10- التحليل الإحصائي Statistical analysis

حُلِّلت البيانات إحصائياً بإستخدام برنامج التحليل الإحصائي (SPSS) نسخة 20 لجدول تحليل التباين (One WayANOVA) بإتجاه واحد، وقورنت المتوسطات والخطأ القياسي (Std. error) والتباين المعنوي بإستخدام إختبار أقل فرق معنوي Least significant difference (LSD) عند مستوى إحتمالية ($P \leq 0.05$) (McDonald, 2009) .

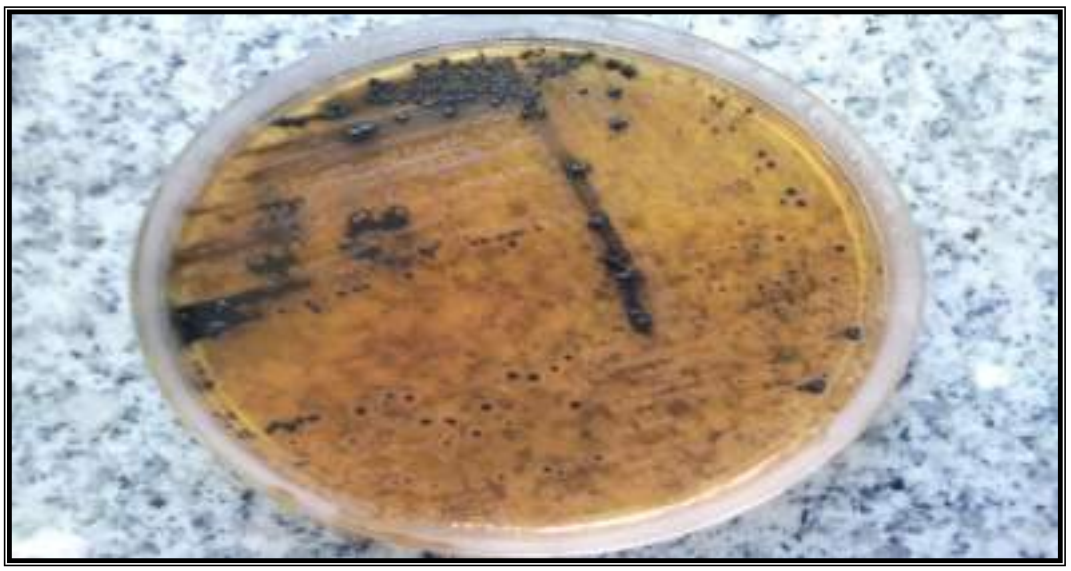
4- النتائج Results

4-1- تشخيص بكتريا السالمونيلا *Salmonella typhi* :-

أظهرت النتائج بأن بكتريا السالمونيلا تكون مستعمرات بشكل دائري حمراء اللون ذات مركز اسود على وسط الـ XLD agar وتُكّون مستعمرات بشكل دائري شاحبة الون وذات مركز اسود ايضا على وسط الـ SSA نتيجة انتاجها غاز الـ H_2S وكما بالشكلين (4-1)،(4-2) .



شكل (4-1) : مستعمرات بكتريا الـ *Salmonella typhi* على وسط XLD agar



شكل (4-2) : مستعمرات بكتريا الـ *Salmonella typhi* على وسط SSA

4-2- الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

أظهرت نتائج الاختبارات الكيموحيوية Biochemical Tests كما موضح بالجدول (4-1) لجميع العزلات نتائج ايجابية لإنتاج H_2S، تخمير الكلوكوز، الكتاليز catalase ،اختبار احمر الميثيل ، اختبار المحفظة واختبار الحركة في حين أعطيت نتائج سلبية لإنتاج الأندول، استخدام السترات كمصدر للكربون و الأوكسيديز.

جدول (4-1): يمثل نتائج الفحوصات الكيموحيوية لبكتريا *Salmonella typhi*.

الاختبار Test	النتيجة
اختبار الكتاليز Catalase test	+
اختبار الأوكسيديز Oxidase test	-
اختبار الفوكس- بروسكاور Voges Proskauer test	-
اختبار احمر المثيل Methyl Red test	+
اختبار الاندول Indole test	-
اختبار استهلاك السترات Citrate Utilization	-
اختبار الحركة Motility test	+
اختبار الكشف عن أنتاج غاز H2S وتخمر الكلوكوز ولاكتوز على وسط TSI agar	A/K, with H2S, No gas
تكوين المحفظة	+

+ تمثل النتيجة الموجودة – تمثل النتيجة السالبة

4-3- الوزن الجاف للبكتريا dry weight

بعد تحضير الوزن الجاف للبكتريا حسب طريقة (Silipo *et al.*,2002) تم الحصول على حوالي 2غم من وزن البكتريا الجاف التي من خلاله يتم تنقية مستضد Vi Ag.

4-4- تقدير تركيز متعدد السكريد المحفظي Vi capsular polysaccharide

جرى تقدير تركيز متعدد السكريد المحفظي لبكتريا *S.typhi* في المستخلص وحسب طريقة (Dubois *et al.*, 1956) بالاعتماد على المنحني القياسي للسكريات ، حيث أوضحت النتائج أن تركيز الكربوهيدرات في المستخلص بلغ 80 مايكروغرام/مل .

4- 5- الكشوفات الكيميائية اللونية على متعدد السكريد المحفظي (ViAg)

بعد إجراء عملية الاستخلاص تمت معاملة المستخلص بعدد من الكشوفات اللونية للتأكد من ان المادة المستخلصة من بكتريا *S.typhi* هي متعدد السكريد المحفظي Vi capsular polysaccharide ، اظهر كشف مولش نتيجة موجبة بظهور حلقة ارجوانية اللون بين المستخلص وحامض الكبريتيك المستخدم في التجربة مما يدل على وجود الكربوهيدرات في المستخلص ، اما باقي الكشوفات فقد اعطت نتيجة سلبية ، حيث لم يتلون المستخلص باللون البنفسجي عند معاملته بكاشف البايوريت مما يؤكد خلو المستخلص من البروتينات في المستخلص كما اظهر كشف الاكرولين نتيجة سالبة حيث لم تنبعث رائحة تشبه رائحة تزنخ الدهون مما يؤكد خلو المستخلص من الدهون .

4- 5- تحضير حبيبات النانو Preparation of Chitosan Nanoparticles

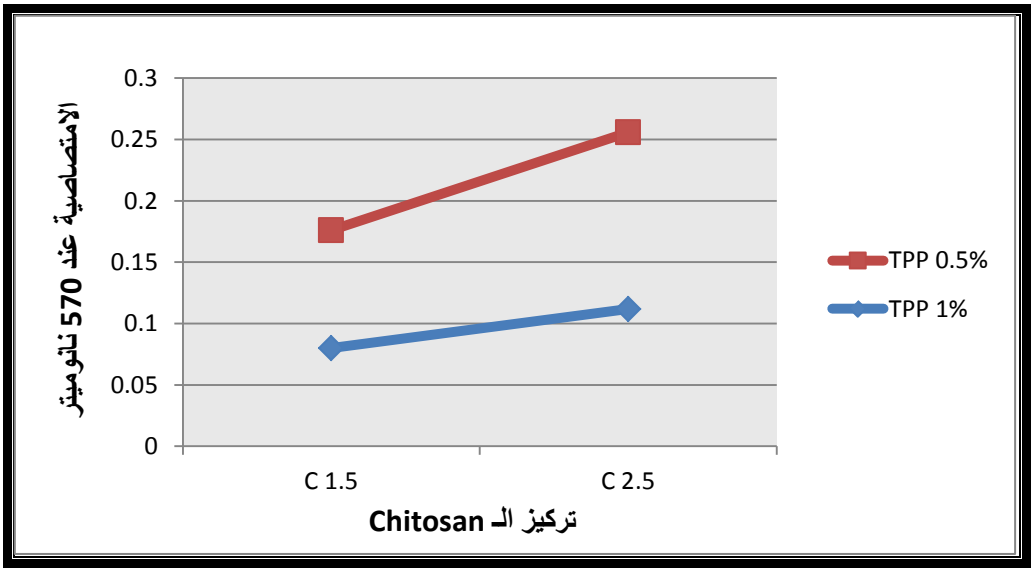
4-5-1- تحديد التركيز الامثل لحبيبات النانو Detection the optimum concentration of Chitosan nanoparticles

أظهرت النتائج أن أعلى امتصاصية لتركيز الـ chitosan هو (2.5 %) مع (0.5 %) من ترايبوليفوسفيت (TPP) الذي يساوي (0.114) نانومتر الطول الموجي (حسب الجدول 4-2)، والتي يتمثل في التركيز الأمثل لحبيبان النانو chitosan ، في حين وجدت تراكيز أخرى من الـ chitosan وترايبوليفوسفيت تمتلك امتصاصية أقل من التركيز الأمثل، (حسب الشكل 4-1).

جدول (4-2) :يوضح الامتصاصية الامثل لحبيبات النانو Chitosan

تركيز *TPP / تركيز **CNP	الامتصاصية عند 570 نانوميتر	
	% 1	% 0.5
1.5 CNP	0.080	0.096
2.5 CNP	0.112	0.144

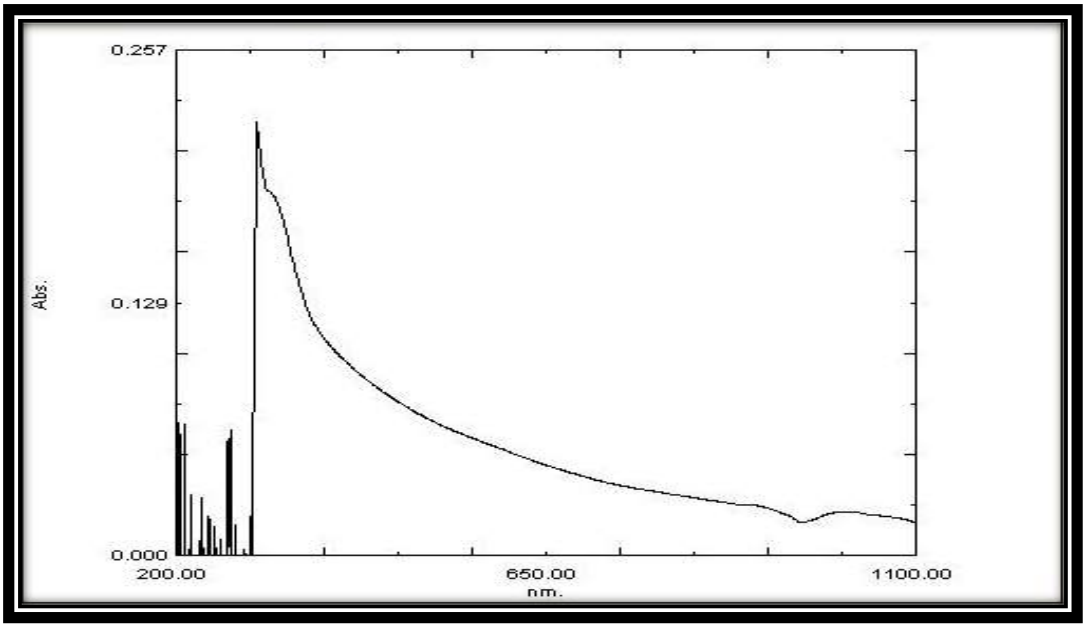
*حيث يمثل TPP تركيز الترايبوليفوسفيت ، ** وتمثل CNP حبيبات النانوChitosan



الشكل (4-3) : يوضح الامتصاصية الامثل لحبيبات النانو Chitosan

4-2-5- تحميل حبيبات النانو **Loading antigen on Chitosan Nanoparticles**

بعد تحميل حبيبات النانو على مستضد (Vi Ag) وقياس تركيز الامتصاصية الامثل وتحديد التركيز تم قياس التركيز الامثل بجهاز stander spectrophotometer وأظهرت النتائج حسب شكل (4-4) التي يوضح التركيز الامثل حيث تم استخدام طول موجي يتراوح من 200-1100 حيث اظهرت اعلى امتصاصية (0.220)عند طول موجي 289 ثم بدأت بالانخفاض عند الاطوال الموجية الاخرى كما يوضح الشكل (4-4) .



شكل (4-4): يوضح التركيز الامثل بجهاز stander spectrophotometer

4-6- الفحوصات المناعية Immunological test

4-6-1- تحديد الجرعة القاتلة للنصف LD50

كانت الجرعة المؤثرة لمستضد متعدد السكريد هي جرعة 40µl اما الجرعة المتوسطة كانت جرعة 20µl التي استخدمت في اختبار التحدي واستخدمت جرعة توكسيد الكزاز مساويه لها .أما جرعة حبيبات النانو الـ Chitosan فقد استخدمت حسب جرعة الباحث (AL-Shibbani & Alkhozai ,2015).

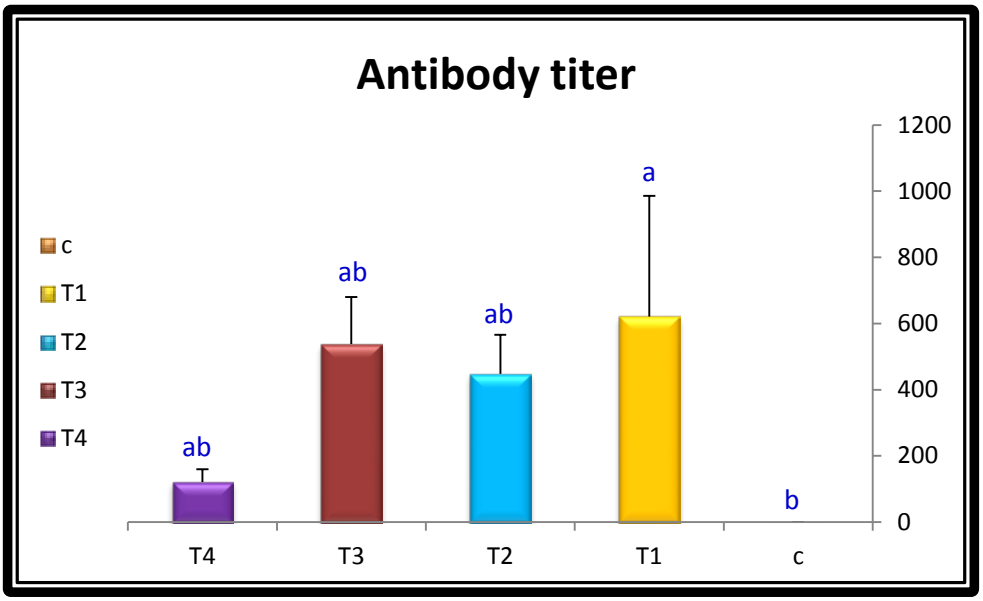
4-6-2- فحص السمية والعقامة

أظهرت النتائج سلامة المستضد المستخلص من البكتريا وعقامته حيث لم تسجل اي علامات مرضية على الفئران المحقونة به وهذا يدل على سلامة المستضد المحضر ، كما لم يظهر نمو بكتيري في الاوساط الزرعية التي زرعت عليها مسحات من المستخلص دلالة على عدم تلوثه بالبكتريا.

4-6-3- الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response

4-6-3-1- معيارية الاضداد Antibody titers

اظهرت نتائج معيارية الاضداد كما موضح بالشكل (4-5) ارتفاعاً واضحاً بالأضداد عند حيوانات التجربة المعاملة بـ (Vi Ag + Ch) (T1) (620.8±364.8) مقارنةً بالسيطرة (C) والمجاميع الاخرى يلي هذا الارتفاع الحاصل زيادة اقل منها بالأضداد عند الحيوانات المعاملة بـ (ViAg + TT) (T3) (537.6±142.53) مقارنةً بالسيطرة والمجاميع الباقية ، وايضا تم ملاحظة زيادة بالأضداد عند الحيوانات المعاملة بـ (ViAg)(T2) لوحده (448±117.73)،واظهرت النتائج اقل أرتفاع بالأضداد حصل عند الحيوانات المعاملة بـ (Vi Ag+ Ch+ TT) (T4) (121.6±38.4) مقارنةً بالمجاميع الاخرى.



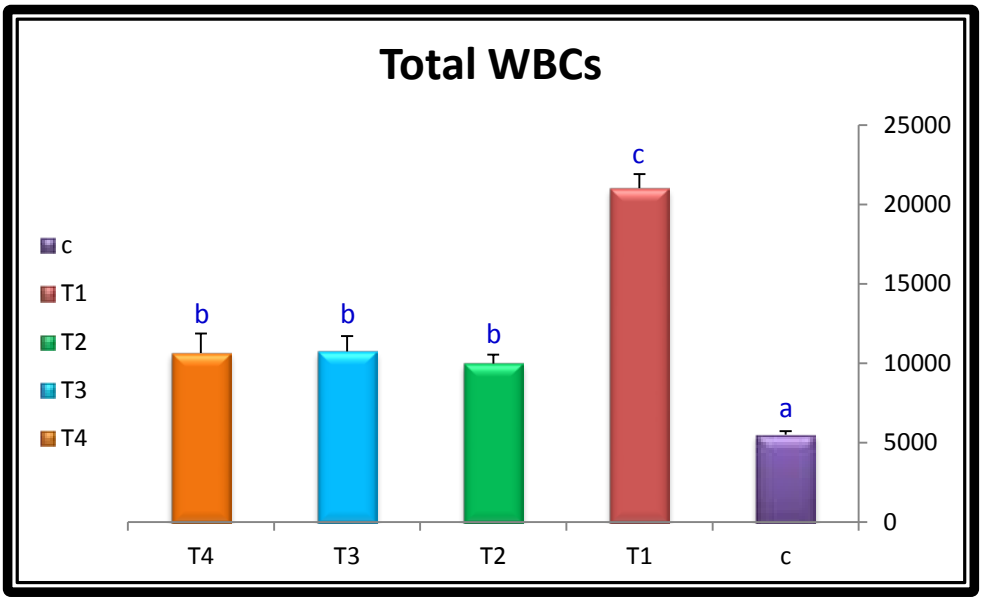
شكل (4-5) :يوضح معاير الاجسام المضادة عند التمنيع

الحروف المختلفة تشير الى وجود فروق معنوية عند مستوى احتمالية $p \leq 0.05$

4-6-4- الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune response

4-6-4-1- العد الكلي لكريات الدم البيض Total white blood cells (WBCs) count

اظهرت نتائج التعداد الكلي لكريات الدم البيض للحيوانات المعاملة بمستضد متعدد السكريد المحفظي (T1) اعلى زيادة بكريات الدم البيض الكلي (21020±891.85 خلية/مل) مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C) (5500±230.94 خلية/مل) والمجاميع الاخرى ، يلها زيادة بعدد كريات الدم البيض الكلي في الحيوانات المعاملة بـ (T3) (10740±980.61 خلية/مل) مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C) (5500±230.94 خلية/مل) والمجاميع الباقية ، ثم تليها زيادة اقل مقارنةً باعلاه في الحيوانات المعاملة بـ (T4) (10650±1217.78 خلية/مل) بينما كانت أعلى من مجموعة السيطرة (C) (5500±230.94خلية/مل) ، كذلك بينت النتائج اقل زيادة حاصلة في التعداد الكلي لكريات الدم البيض في الحيوانات المعاملة بـ (T2) (9980±572.18 خلية/مل) مقارنةً مع المجاميع الاخرى حيث كانت اعلى من مجموعة السيطرة (C) (5500±230.94 خلية/مل) كما في الشكل (4-6).

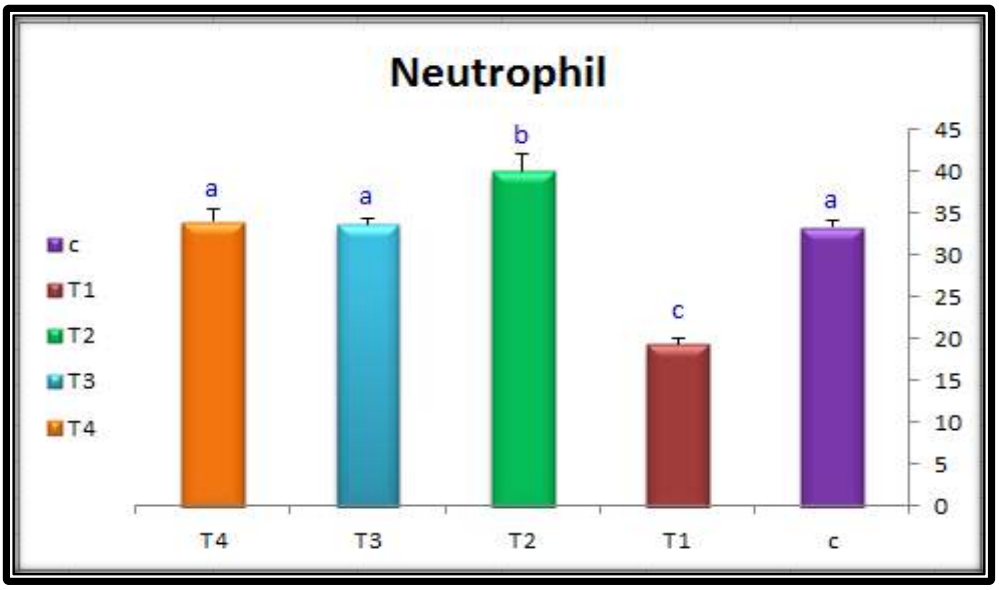


شكل (4-6) : يوضح التعداد الكلي لكريات الدم البيض

4-6-4-2- العد التفريقي لكريات الدم البيض Differential count of leukocytes (DCL)

4-6-4-2-1- العدلة Neutrophils

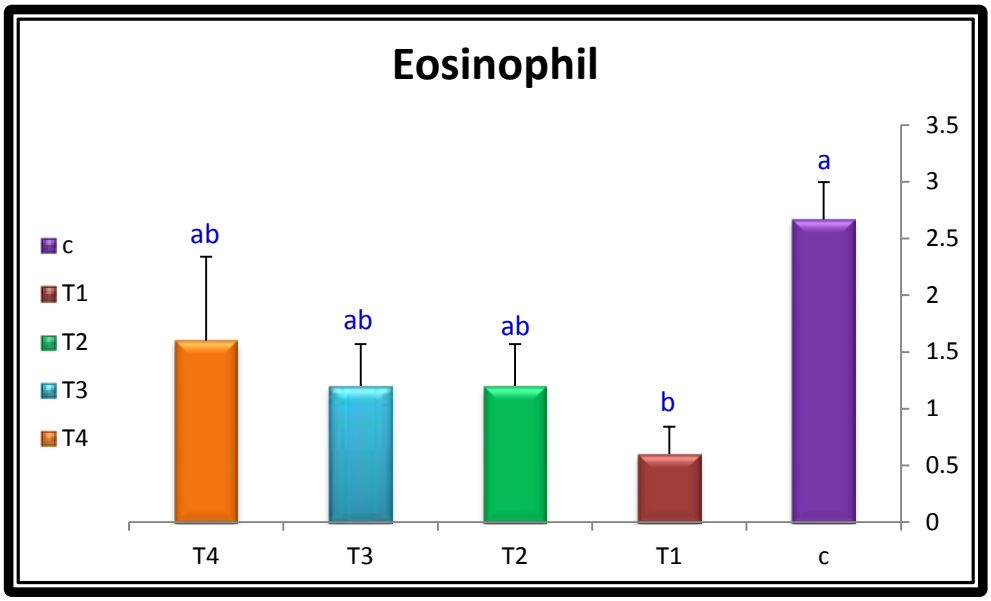
أظهرت النتائج المبينة بالشكل (4-7) والجدول (4-3)،ظهور زيادة معنوية بعدد كريات الدم البيض (العدلة) في الحيوانات المعاملة بـ(T2) (40±1.89%) مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C) (33.3333 ±0.66%) والمجاميع الاخرى ، تليها الزيادة الحاصلة في الحيوانات المعاملة بـ (T4) (34±1.37 %) مقارنةً بالمجاميع الباقية ومجموعة السيطرة (C) (33.3333 ±0.66%) ، ثم تليها زيادة في الحيوانات المعاملة بـ (T3) (33.6±0.67%) مقارنةً بمجموعة السيطرة (C) (33.3333 ±0.66%)، بينما سجلت اقل زيادة حصلت في الحيوانات المعاملة بـ (T1) (19.4±0.66%) مقارنةً مع مجموعة السيطرة والمجاميع الاخرى .



شكل (4-7) : يوضح عد كريات الدم البيض العدلة Neutrophil

4-6-4-2-2- الحمضة Eosinophils

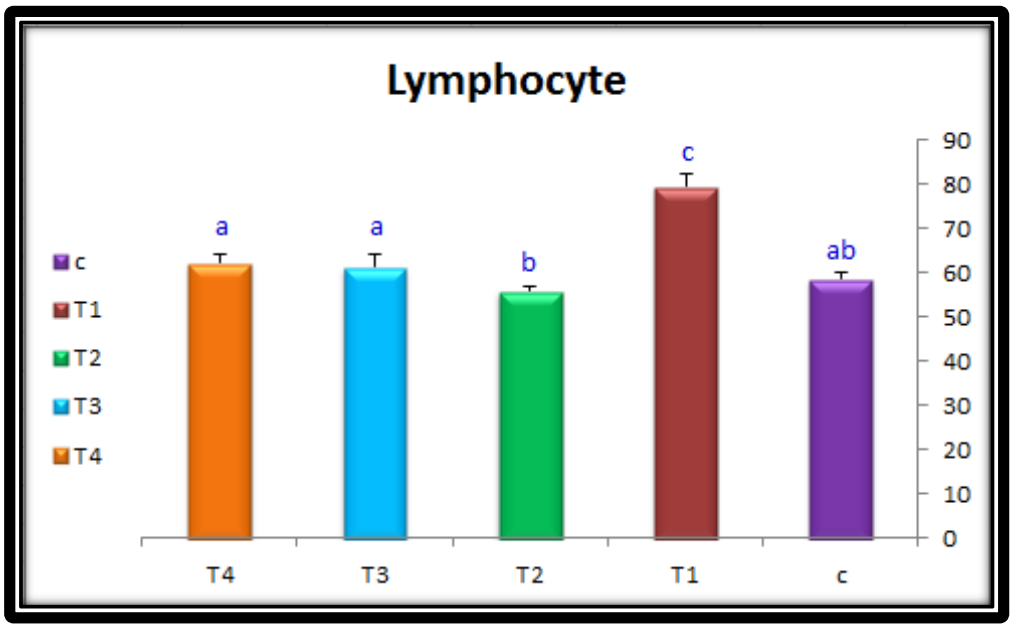
أظهرت نتائج عد كريات الدم البيض الحمضة حسب الشكل (4-8) والجدول(4-3) ، حيث كانت نتائج المعاملات منخفضة مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C)(2.6667%±0.33) واظهرت النتائج كما يلي : حيث اظهرت مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T4) (1.6%±0.74) ،مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T2) (1.2%±0.37) ،مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T3) (1.2%±0.37) بينما كانت اقل زيادة بمجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T1)(0.6%±0.24) .



شكل (4-8) :يوضح نتائج عد كريات الدم البيض الحمضة

4-6-4-2-3- الخلايا اللمفاوية Lymphocytes

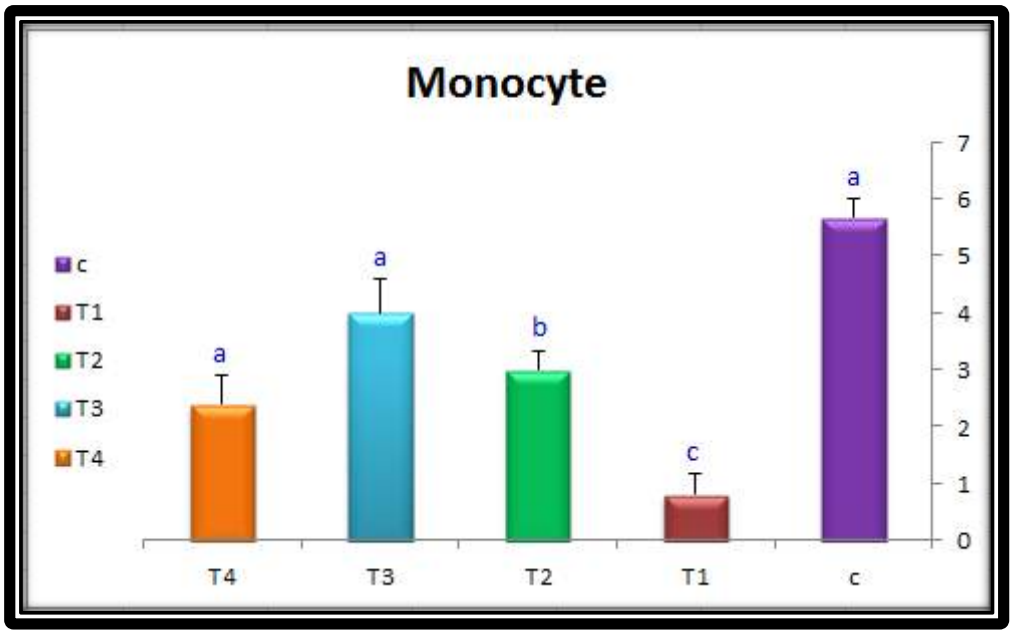
أظهرت النتائج المبينة بالشكل (4-9) والجدول(4-3) زيادة واضحة في ارتفاع الخلايا اللمفاوية في الحيوانات المعاملة بـ (T1)(79.2±2.7%)مقارنةً مع مجموعة السيطرة(C)(58.3333±1.76%) والمجاميع الاخرى ، تليها زيادة في الحيوانات المعاملة بـ (T4) (62±2.06%) مقارنةً بمجموعة السيطرة(C)(58.3333±1.76%) والمجاميع الاخرى ، ثم تليها زيادة بمجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T3) (61.2±2.72%) مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C)(58.3333±1.76%) بينما كانت اقل زيادة بمجموعة (T2) (55.8±1.11%) مقارنةً مع مجموعة السيطرة(C)(58.3333±1.76%).



شكل (4-9) يوضح عد كريات الدم البيض الخلايا اللمفاوية

4-6-4-2-4- وحيدة الخلية Monocytes

أظهرت النتائج المبينة بالشكل التالي (4-10) والجدول (4-3) انخفاضاً واضحاً في عدد خلايا وحيدة النواة مقارنةً مع مجموعة السيطرة (C) (5.6667±0.33%) وكانت النتائج كما يلي : في مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T4) (2.4±0.48%) و مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T3) (4±0.58%)و مجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T2) (3±0.31%) ومجموعة الحيوانات المعاملة بـ (T1) (0.8±0.37%) .



شكل (4-10): يوضح عد كريات الدم البيض وحيدة الخلية

جدول (4-3) جدول يبين العد التفريقي لكريات الدم البيض عند المعاملة بالمستضدات

وحيدة الخلية Monocyte	خلايا اللمفاوية Lymphocyte	الحمضة Eosinophil	العدلة Neutrophil	WBCs المجاميع
5.6667 ± 0.33^{a}	58.3333 ± 1.76^{ab}	2.6667 ± 0.33^{a}	33.3333 ± 0.66^{a}	C
0.8 ± 0.37^{c}	79.2 ± 2.7^{c}	0.6 ± 0.24^{b}	19.4 ± 0.66^{c}	T1
3 ± 0.31^{b}	55.8 ± 1.11^{b}	1.2 ± 0.37^{ab}	40 ± 1.89^{b}	T2
4 ± 0.58^{a}	61.2 ± 2.72^{a}	1.2 ± 0.37^{ab}	33.6 ± 0.67^{a}	T3
2.4 ± 0.48^{a}	62 ± 2.06^{a}	1.6 ± 0.74^{ab}	34 ± 1.37^{a}	T4

* الحروف المتشابهة تشير الى عدم وجود فروقات معنوية بينما الحروف المختلفة تشير الى وجود فروقات معنوية عند مستوى احتمالية ($P \leq 0.05$).

4-7- التحليل الجزيئي Molecular analysis

4-7-1- تراكيز ونقاوة الحامض النووي RNA الكلي

The concentrations and purity of total RNA

قُيِّمت نقاوة وتركيز الحامض النووي Total RNA (ng/µl) المستخلص باستخدام جهاز ألـ Nanodrop spectrophotometer وعلى طولين موجيين (260 و 280نانوميتر) للعينات المراد دراستها والتي أعطت تركيزاً عالياً من الحامض النووي Total RNA وكانت ذات تركيز مثالي لإكمـــال عملية Quantitive reverse transcriptase real- time PCR وكما موضح في جدول (4 - 4).

جدول (4 - 4): يوضح تركيز ونقاوة Total RNA

Group	260/280R(purity)	RNA conc.(ng/ ul)	M ± SE
C	2.42	14.8	40.175 ± 8.77
C	1.43	45.9	
C	1.00	44.8	
C	1.87	55.2	
T1	1.07	56.3	55.38± 11.90
T1	1.22	36.1	
T1	2.50	48.8	
T1	2.08	100.3	
T1	1.39	35.4	
T2	1.74	45.4	46.14± 4.04
T2	1.73	57.2	
T2	2.15	32.4	
T2	2.14	50.1	
T2	1.20	45.6	
T3	1.01	67.1	53.42 ± 4.2
T3	1.50	47.1	
T3	1.26	52.9	
T3	2.04	42.8	
T3	1.22	57.2	
T4	1.16	45.8	39.88 ± 1.86
T4	1.28	37.7	
T4	1.23	42.6	
T4	1.42	35.7	
T4	1.60	37.6	

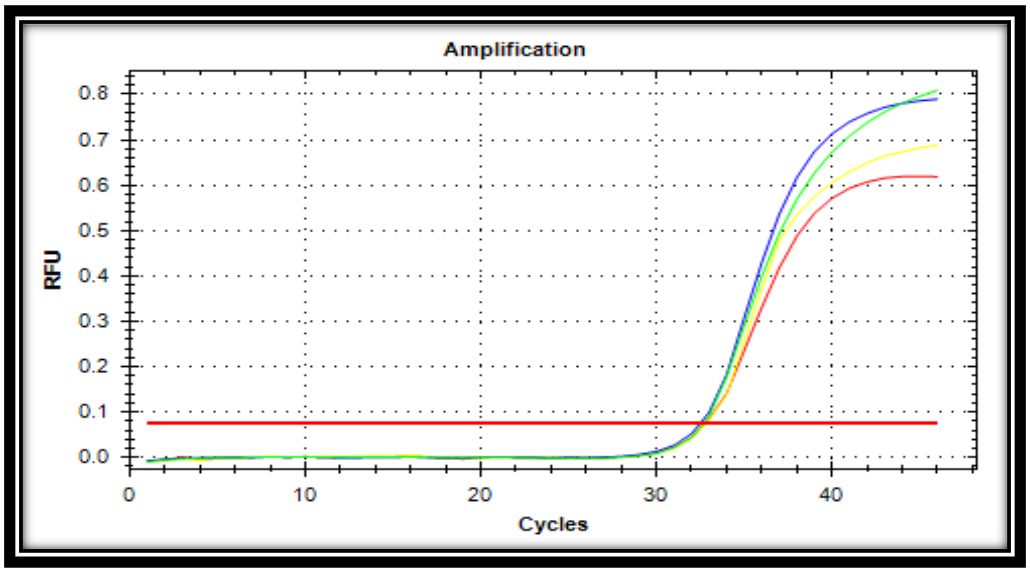
M±SE: تمثل الوسط الحسابي ± الخطأ المعياري. C : تمثل مجموعة السيطرة. T1: تمثل مجموعة .Vi Ag + Ch.
T2: تمثل مجموعة ViAg T3:تمثل مجموعة ViAg +TT .T4: يمثل مجموعة ViAg+Ch.+TT

4-7-2- كمية الاستنساخ العكسي او النسبي للـReal-Time PCR

Quantitative Reverse Transcriptase Real-Time PCR

أجريت كمية الاستنساخ العكسي او النسبي للـ Real-Time PCR لقياس العد النسبي (relative quantification) (تحليل التعبير الجيني) لمستويات التعبير الجيني لجينات CD25 وCD29 عن طريق housekeeping gene expression (GAPDH) .

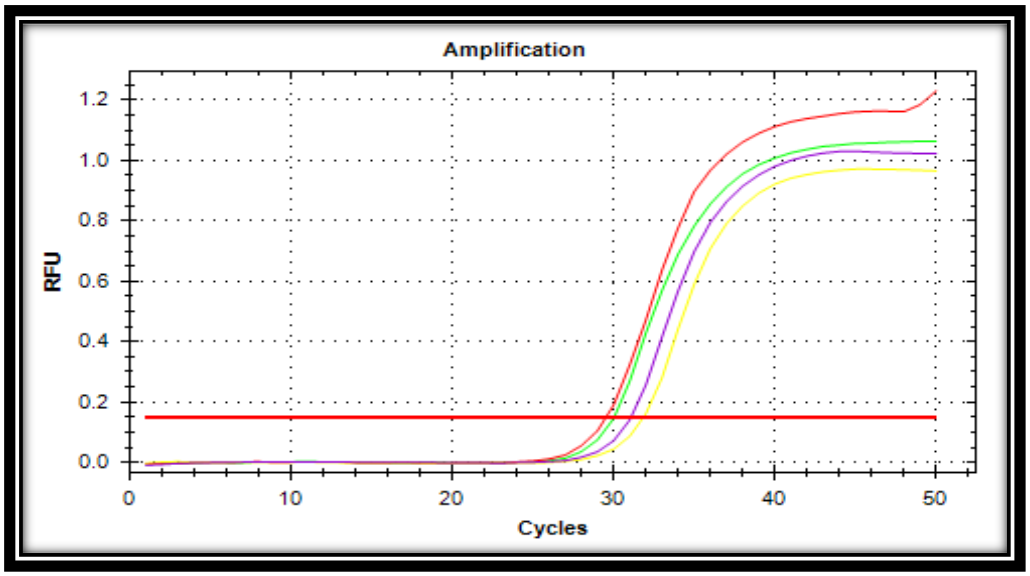
RT-qPCR quantification طريقة في نظام Real-Time PCR تعتمد على قيم عدد دورات العتبة (CT) لمنحنى التضخم (amplification plot) للجينات الهدف وجين housekeeping . وفيها نتيجة منحنى تضخم Real-Time PCR لجين GAPDH التي أظهرت قيمة (CT) في مجموعة السيطرة (CT=27) وايضا في المجاميع المعاملة كذلك ظهرت (CT=27) . كما في شكل (4-11)



شكل (4-11) : يوضح منحني التضخم لجين GAPDH في اختبار RT-qPCR

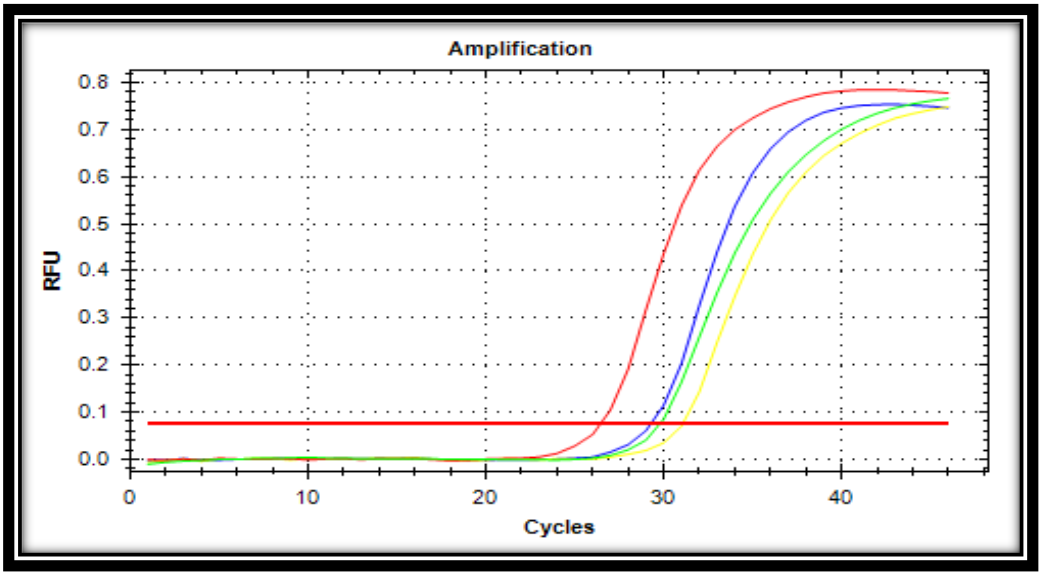
Red :يمثل مجموعة المعاملة الاولى المعاملة بـ .Vi Ag Blue :يمثل مجموعة المعاملة الثانية المعاملة بـ .Vi Ag +Ch
Green : يمثل مجموعة المعاملة الثالثة المعاملة بـ TT +Vi Ag Yellow : يمثل مجموعة المعاملة الرابعة المعاملة بـ .Vi Ag + Ch +TT

أما نتيجة منحني تضخم Real-Time PCR لجين CD25 أظهرت زيادة في التعبير الجيني من خلال تسجيل الفروقات للمجموعات المعاملة كما في الشكل (4-12) وكذلك ظهرت فروقات معنوية لجين CD29 في مجموعة المعاملات كما في الشكل (4-13) .



شكل (4-12) يوضح منحنى التضخم لجين CD25 في اختبار RT-qPCR

Red: يمثل مجموعة المعاملة الاولى المعاملة بـ .Vi Ag + Ch. Violet: يمثل مجموعة المعاملة الثانية المعاملة بـ Vi Ag . Green: يمثل مجموعة المعاملة الثالثة المعاملة بـ Vi Ag+ TT. Yellow : يمثل مجموعة المعاملة الرابعة المعاملة بـ Vi Ag +Ch +TT.



شكل (4-13) يوضح منحنى التضخم لجين CD29 في اختبار RT-qPCR

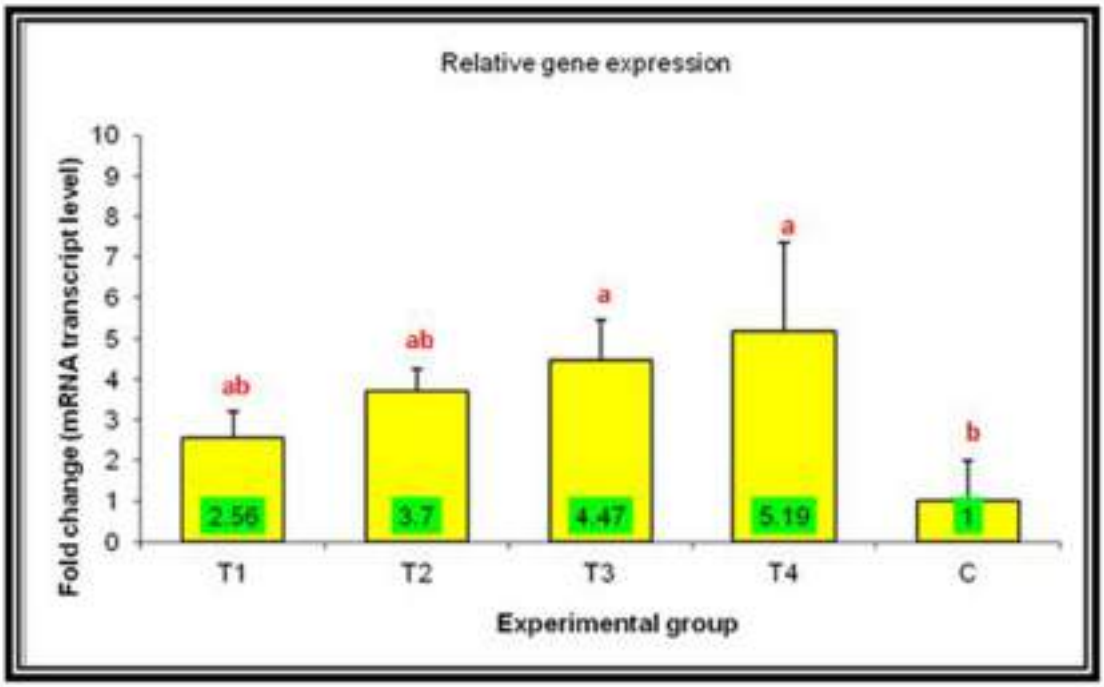
Red: يمثل مجموعة المعاملة الاولى المعاملة بـ .Vi Ag +Ch. Blue: يمثل مجموعة المعاملة الثانية المعاملة بـ ViAg . Green: يمثل مجموعة المعاملة الثالثة المعاملة بـ Vi Ag+ TT. Yellow : يمثل مجموعة المعاملة الرابعة المعاملة بـ Vi Ag +Ch +TT.

4-3-7- نتائج التعبير الجيني النسبي Relative gene expression results

حسب التعبير الجيني Gene expression لكل من جين CD25 وCD29 تم أجراء العد النسبي باستخدام طريقة (Livak Method) المعتمدة على عملية التصحيح (Normalization) باستخدام الجين المحافظ Housekeeping gene، وحُلِلت قيم ألـ RT-qPCR لكل جين من جينات الهدف باستخدام قيم ألـ CT للجين المحافظ (GAPDH) في كل معاملات التجربة ومجموعة السيطرة لتمام عملية التصحيح في التعبير الجيني.

4-3-7-1- قياس التعبير الجيني لـ CD25 marker بواسطة Real-Time qPCR

اظهرت النتائج وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في مجموعة المعاملات ومجموعة السيطرة كما في الشكل (4-14)، حيث بيَّنت نتائج التعبير الجيني زيادة بالتعبير عن CD25 marker في الحيوانات المعاملة بـ (T4) (5.1936±2.17) مقارنة مع مجموعة السيطرة (1±0) والمجاميع الاخرى ،واقل زيادة منها كانت بالحيوانات المعاملة بـ (T3) (4.4739±1) وكانت اعلى مقارنةً مع مجموعة السيطرة (1±0) والمجاميع التي تليها ، اما اقل تعبير سجل بالحيوانات المعاملة بـ(T2) (3.7032±0.54)، و ب(T1)(2.5604±0.64)على التوالي مقارنةً مع المجاميع بينما كانت هذه المعاملات اعلى من السيطرة (1±0) وتم تحليل هذه النتائج حسب معادلة (Livak Method) كما تظهر بالجدول (4-5).



شكل (4-14) يبين التعبير الجيني لـ CD25 marker بواسطة Real-Time- qPCR