امكانية استخدام مستضد Virulence Antigen كلقــاح ضد البكتيريـــا *Salmonella typhi* فى حيوان المختبر

ا.م.د مهدى حسين محيل الشمرى م.انغام جاسم محمد على الرماحى د. حقى عبد العباس الفتلاوى

كلية العلوم /جامعة الكوفة المعهد التقنى /الكوفة المعهد التقنى /الكوفة

الخلاصة:

تضمنت الدراسة الحالية التحري عن بكتريا *Salmonella typhi* في 50عينه سريريه تضمنت عينات الدم والغائط ، وتم تشخيص العزلات كيموحيوياً وزرعت على الاوساط الانتقالية والتفريقية ، تم ايضا فصل وتنقية مستضد الفوعة Vi- Ag باستخدام بعض الطرق الكيمياوية والحيوية حيث كانت التفاعلات ايجابية فضلا عن دراسة فحص العقامة والامـان. و درست قدرة المستضد على استحثاث الجهاز المناعي في الفئران المختبرية المحقونة من خلال أجراء عدد من الاختبارات المناعية ومنها الفعالية البلعمية، و قابلية التحول اللمصلى، و فرط الحساسية الاجل، اظهرت النتائج أن العزلة بالتركيز $1x10^7$ خلية /مل ظهرت الاكفأ بين العزلات .وهدف البحث لتحديد قدرة المستضد على تحفيز الاستجابة المناعية فى الحيوان المختبرى . بعد فصل و تنقية اللقاح من بكتريا *S typhi* تم حساب قيمة الجرعة القاتلة النصفية للفئران المحقونة ب 0.1 ml بالعالق البكتيري المحضر منها على النحو الاتي ($10^7\times3.3$, $10^7\times2.12$ CFU\ml (, $10^4\times2.6$. و تم اختيار التركيز 10^8 و10^7 , 10^6 لغرض تقويم التركيزالاكفأ في تعزيز الاستجابة المناعية . قيمت بعض جوانب الاستجابة المناعية في الفئران باستخدام الفحوصات الاتية: فحص التحول المصلي ، أختبار البلعمة ، وأختبار فرط الحساسية الآجل ، أظهرت النتائج ان اللقاح بأستخدام جرعة منشطة واحدة بعد ثمان ايام من الحقن هوالاكفاء حيث ظهر اعلى معدل لنسب الخلايا البلعمية الملتهمة واعلى نسب بالعيارات المصلية واعلى معدل في تفاعل فرط الحساسية المتأخر .

المقدمة:

أعتمدت اللقاحات التقليدية على ادخال العوامل المايكروبية المسببة للأمراض والتي تتكون من كائنات مضعفة أومقتولة والتي لاتحدث الاصابة لكنها قادرة على أحداث مناعة وقائية . كما أنها تتضمن أيضاً أزالة سمية بعض السموم المفرزة من البكتريا ، وتوجد الكثير من اللقاحات التقليدية التي تملك القابلية لازالة أو تقليل نسبة حدوث عدد كبير من الامراض المعدية القاسية والمميتة مثل: BCG ولقاح التيفوئيد وdiphtheria (Loosmore .,1990:; Boumer, *et al* ,1998) . ويعمل هذا المستضد (اللقاح) على تحفيز الاستجابة المناعية الخلوية المتوسطة بالخلايا اللمفية والخلايا البلعمية الكبيرة. كما يعمل على تحفيز إنتاج الأضداد بصورة مباشرة ضد العوامل الخمجية Infectious agents أو نواتجها السمية. وتكمن أهمية الاضداد المنتجة في تسهيل عملية البلعمة Phagocytosis والتفاعل مع مكونات منظومة المتمم. وعدم تنشيط نواتج البكتريا من البروتين السميّ الذائب ومعادلة الفعل الحيوي للذيفانات ومنع الاصابة البكتيرية وكذلك التفاعل مـــع مكونات سطح البكتريا لمنـــع عملية الالتصاق بالسطوح المخاطية(Stites *et al.*, 2004) . أستخدم مستضد الفوعة بوصفه لقاحاً وذللك لامتلاكه الخواص المستضدية منها كبر الوزن الجزيئي3×10^6 دالتون بالاضافة الى احتواءة على المركبات الكيمياوية المهمة مثل السكريات المتعددة ومجموعة الاستيل . ومن الادوار المناعية المهمة منها زيادة الاستجابة المناعية عن طريق زيادة تركيز الاضداد مثل IgG كذلك يساعد على التحول المصلى بنسبة تتراوح % 30 .(Robbins& Robbins,1984). وفى الدراسة التى اجراءها (*et al*,1987 Klugman) ان مستضد Vi الكبسولة السكري يمتلك فعالية وقائية عالية اتجاة حمى التيفوئيد. ومن الدراسات التى اجريت فى النيبال جرى استخدام العالق البكتيرى كلقاح ضد حمى التيفوئيد حيث ادى الى زياددة التحول المصلى بنسبة 4% عند الحقن بالعضلة فضلا عن اختبار فرط الحساسية المتاخر(Acharya,1987;) Pasture,1995. واستخدمت اللقاحات منذ وقت طويل فى الوقاية من الامراض من حيث الكفاءة والقابلية التمنيعية مثل اللقاحات المتكونة من الكائنات غير الفعالة inactivated أو من وحدات مستضدية antigens . ان البكتريا المضعفة يمكن أن تحور وراثياً لتعبر عن مستضدات مفردة أو متعددة وتجهز حماية مختلفة كامنة ضد أكثر من ممرض وأخيراً اللقاحات البكتيرية الحية غير مكلفة التصنيـــع وتطـــبق على نطاق واســـع(Trach *et al*,2002) يحدث التحفيز المناعيّ في كلٍّ من المناعة الخلطية والخلوية عند استخدام بعض مركبات الجدار البكتيري مثل المستضدات السوطية والجسمية بالاضافة الى مستضد الفوعة الموجودة فى بكتيريا *Salmonella typhi* كذللك الحوامض الشمعية مثل بكتريا *M. tuberculosis* المكونة للحامض Mycolic acid وبكتريـــا الجذام المكونة لحامض Lepronic acid عواملَ تساعد على تحفيز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية حيث تعمل خلايا T التي تضم CD_4 المرتبطة بجزيئات الصنف الثاني لمعقد التوافق النسيجيّ وCD8 التي ترتبط بجزيئات الصنف الأول على السيطرة على المرض. هنالك خمجات بكتيرية تحث

المناعة الخلطية فقط أي أن مستضداتها السائدة من نوع المستضد المعتمد على الخلايا البائية التي تتمثل بتكوين الاضداد التي تقوم بوظائف دفاعية مهمة فقد تعمل الاضداد إما وحدها أو بارتباطها مع مكونات المناعة غير المتخصصة.وبالمقابل هناك خمجات تكون المناعة السائدة مناعة خلوية كبكتريا السالمونيلاً المسببة لمرض التايفوئيد *Salmonella typhi* . لوحظ أن بعض المواد المحفزة القادرة على تقوية الاستجابة المناعية في أحد الأنظمة قد تكون مثبطة للنظام الأخر. لذلك يجب الأخذ بنظر الاعتبار التأثيرات الحيوية المختلفة للمواد المحفزة المؤثرة في الاستجابة المناعية .(Stites *et al.*, 2004). أن تحفيز الاستجابة المناعية يزيد المقاومة ضد الأمراض الخمجية المختلفة، وذلك بتحفيز آليات الدفاع المناعية غير المتخصصة، أشارت العديد من الدراسات الحديثة التي اجريت على الإنسان إلى عدد من الآليات المحتملة لحدوث التحفيز المناعي منها تنشيط الجهاز الشبكيّ البطانيّ وتحفيز انتاج اللمفوكينات و الخلايا القاتلة الطبيعية(Pasture,1995 ;Acharya,1987).

ويمتلك المستضد قدرة على تحفيز الخلايا المناعية على انتاج كميات عالية من الاضداد مثل الغلوبيولين المناعي IgA والذى يعد من الاضداد المهمة في مصل دم الانسان والافرازات ، وتكمن اهمية هذا الضد في حماية السطوح المخاطية . وكذلك IgG الموجود في مصل الانسان ، إذ ينتقل من الام الى الجنين عن طريق المشيمة (وهو الضد الوحيد الذي يتمكن من عبور المشيمة عن طريق النقل الفعال Active Transport (Ismail *et al.*,1985;Meek *et al* 1995) .

إما الحركيات الخلوية عبارة عن ببتيدات متعددة Polypeptide ذات وزن جزيئي واطى تنتج بوساطة خلايا الجسم ومنها خلايا الجهاز المناعي ويزداد أفرازها من الخلايا ذات الانوية ، وتعد من المساهمات الاساسية في عمليات الالتهابات Inflammation ، وأمراض المناعة الذاتية ، رفض رقعه النسيج ، والاستجابة المناعية للاخماج. كما أن للحركيات الخلويه وظائف متداخلة ، إذ تعمل على تنظيم تأثير الهرمونات وتعمل منظمات خلوية بين الجهاز المناعي والجهاز الافرازي (Raghupathy *et al.*,2000; Lim *et al.*,1996). يحدث التمنيع الفاعل نتيجة لاستخدام اللقاحات التي تكون إما كائنات حية مقتولة أو موهنة أو منتجات الكائنات الحية والتي تؤدي إلى نشوء الاستجابة المناعية ويمتاز التمنيع الفاعل بمستضد الفوعة بان يكون كاملاً ما لم يتم تنشيط الخلايا بشكل كامل.و المناعة تكون طويلة الأمد و سهلة بإعادة التنشيط بوساطة جرعة من المستضد (اللقاح). فضلا عن تنشيط الخلايا المناعية الأساسية B وT .

المواد وطرائق العمل:

الاوساط الزرعية المستخدمة :

حضرت الأوساط الغذائية الزرعية حسب تعليمات الشركة المنتجة و عقمت في الموصدة بدرجة 121م لمدة 15 دقيقة باستثناء بعض الأوساط التي تتلف بالحرارة(MacFadin , 2000) .

- **جمع العينات Samples collection** : تم جمع العينات البكتيرية من المرضى المصابين بالتيفوئيد اعتمادا على التشخيص الاولى من قبل الطبيب اعتمادا على الفحص السريولوجى(Widal test).

- **التشخيص المختبرى**: **Bacterial identification** شخصت بكتريا *S.typhi* اعتمادا" على الخصائص الزرعية والمظهرية وباستخدام الاختبارات الكيموحيوية والفسلجية المبينة في , (Collee *et al.*, 1996).

- **الخصائص المظهرية والزرعية: Morphological and Culture Characteristic**

تم دراسة الخصائص المظهرية للبكتريا النامية عن طريق عمل صبغة غرام من الأوساط الزراعية المختلفة فضلا"عن دراسة الخصائص الزرعية للبكتريا النامية عن طريق ملاحظة شكل المستعمرات وخصائصها مثل :اللون ، والقطر، والنمو أو عدم النمو على الأوساط الانتقائية كوسط Tetrathionate broth ووسط MacConky agar.

- **الفحوصات البايوكيميائية والفسلجية : Biochemical and Physiological Tests**

أجريت هذه الفحوصات كما جاء في (Collee *et al.*, 1996 , Baron *et al.*, 1995) حيث تم استخدام المزروع البكتريا النامي على وسط نقيع المخ و القلبBrain Heart Infusion Broth وبعمر (24) ساعة وهذه الفحوصات شملت :

1- اختبار الاوكسيداز و الكاتالاز (Harley and Prescott,2002) .

2- اختبار الحركة (Baron *et al*.,1994) .

3 - الكشف عن إنتاج الاندول (Baron *et al*.,1994) .

4 - اختبار احمر المثيل والفوكس بروسكاور (MacFaddin,2000) .

5 الكشف عن إنتاج كبريتيد (MacFaddin,2000).

6- الكشف عن إنتاج الهيمولايسين Haemolysin Production Test

7- الكشف عن انظيم (Collee *et al*., 1996) .

وبالمقارنة مع النتائج المرجعية المبينة في (Holt *et al* ., 1994; MacFaddin .,2000) . تم التشخيص الأولي لبكتريا *S.typhi* بعد إجراء كافة الفحوصات البايوكيميائية والفسلجية والسيريولوجية المذكورة .

- تحديد العزلة البكتيريا الآمثل للدراسة: – زرعت كل عزلة من عزلات بكتريا *S.typhi* في 100 مليلتر من وسط Brain heart infusion broth وحضنت لمدة 18 ساعة بدرجة حرارة 37 م° ، ثم نبذ المزروع البكتيري بالمنبذة المبردة بسرعة (6000 دورة/دقيقة) لمدة (30) دقيقة بدرجة (4) م° غسلت الخلايا مرتين بأستخدام محلول دارئ الفوسفات المعقم ذو الاس الهيدروجيني(7.2) .وأخيراً علق الراسب بكمية مناسبة من دارئ الغسل نفسة ليعطي أمتصاصية قيمتها (1) بجهاز المطياف وعلى طول موجي (600) نانوميتر ، للحصول على عالق بكتيري بتركيز (1×10^9 خلية/مللتر) والحاوى على كميات من المستضد .

- تحضير الوزن الجاف: تم تحضير الوزن البكتيرى الجاف حسب طريقة (Westphal's,1952)

- تحضير لقاح مستضد Vi- Ag من البكتيريا *S.typhi* : يحضر ما مقدارة 1 غم وزن جاف بكتيريا ثم يعلق0.4 بالملح الوظيفى ويرج لمدة 30 دقيقة، بعدها ينبذ العالق بسرعة 300دورة\ دقيقة لمدة 30 دقيقة. يجمع الرائق وتجرى عملية الدليزة عبر ماء الحنفية لمدة 16 ساعة بعدها يضاف Nacl لمحلول الديلزة ليصبح نسبتة 0.9% يرسب المحلول بالايثانول بتركيز نهائى 0.1,0.2,0.3 مول.بعد ذلك تجمع الرواسب من كل تركيزوتذاب بالماء المقطر،ثم يضاف حامض الخليك ليصبح تركيزة 0.1 مول يتبعة اضافة ايثانول لتركيز0.1,0.2,0.3 مول للحصول على راسب ،ثم يعاد اذابتة بالماء المقطر ويعامل بحامض الخليك مرة اخرى .يعامل المحلول بجهاز Refluxed لمدة 24 ساعة وتجرى له عملية الدليزة ويرسب بالايثانول ويجمع الراسب ويحفظ فى الثلاجة بدرجة 4 م.(Webster's *et al* , 1952).

- الكشف عن المستضد كيمياويا: تم استخدام طريقة(Pasteur,1995) للتعرف على المركبات الكيمياوية الموجودة فى المستضد .

- فحص السلامة Safety test: حقنت 4 فئران بيض تزن الواحدة (20-25) غم باللقاح المحضر بمقدار 1 مليلتر في غشاء البريتون ، وتمت مراقبة الفئران المحقونة مدة 7 أيام للتأكد من سلامة اللقاح المستعمل في التجربة . ان عدم ظهور علامات مرضية على تلك الفئران دلالة على سلامة اللقاح المحضر (Robbins,& Robbins,1984).

- فحص العقامة Sterility test : زرع عينة من اللقاح المحضر على عدد من الاوساط الزرعية ، ووسط آغار نقيع القلب والدماغ ،وسط آغار الدم وسط المرق المغذي الاعتيادي . وحضنت الاوساط المزروعة تحت الظروف الهوائية بدرجة 373م° لمدة 24-48 ساعة ، للتأكد من نقاوة اللقاح وخلوه من البكتريا ، وعدم تلوثه (Robbins,& Robbins,1984).

- تحديد قيمة (LD50%) فى الحيوانات المحقونة بعالق Vi-Ag : حُضر العالق البكتيري للحصول على تركيز/3 mg من اللقاح والذي عُملت منة سلسلة تخافيف عشرية للحصول على التراكيز الاتية(10^2 ، 10^3 , 10^4 , 10^5 ,10^6 ,10^7,10^8 ,10^9 Cfu/ml) .

- تم تهيئة (7) مجاميع من الفئران بواقع (5) فئران، و تم حقن كل تخفيف في أحد المجاميع أعلاه وبجرعة 1 مليلتر /فأرة في البريتون ، وحقنت مجموعة السيطرة بدارئ الفوسفات الملحي المعقم .وبعد خمسة أيام تم حساب

عدد الفئران الحية والميتة لكل جرعة من العالق نسبة الى العدد الكلي الذي تم حقنه بأتباع طريقة (Chan ,*et al* 1991;Reed and Munch .,1938)

- تجربة قياس كفاءة اللقاح : تم تهيئة (45) فأرة ، وقسمت الى : **المجموعة الاولى**: تضم(36) فأرة قسمت على مجاميع ثانوية حقنت بلقاح العالق البكتيرى وبالشكل الاتي :**المجموعة A**: يضم (12) فأرة حقنت باللقاح بتركيز 1×10^6 mg-ml(تحقن الجرعة الاولى وبعد 8 أيام نأخذ(4) فأرة لأجراء الاختبارات والباقي يعطى الجرعة الثانية boosting dose، ثم بعد 8 أيام من إعطاء الجرعة الثانية نأخذ (4) فأرة والمتبقي يحقن بالجرعة الثالثة وبعد 8أيام نجري علية الاختبارات المناعية

المجموعة B: يضم (12) فأرة حقنت باللقاح بتركيز 1×10^7(كما في المجموعةA)، **المجموعة C** : يضم (12) فأرة حقنت باللقاح بتركيز1×10^8 (كما في المجاميع أعلاه)، **المجموعة الثانية** : تضم (9) فأرة حقنت بالدارئ الفوسفاتي المعقم مقابل كل جرعة من اللقاح البكتيرى المستخدم كمجموعة سيطرة. حقنت الفئران جميعها عن طريق غشاء البريتون بجرعة مقدارها 0.1 مليلتر / فأرة من كل تركيز من اللقاح،و بعد الاسبوع الاخير من الحقن شرحت الحيوانات بعد تخديرها و جمع الدم من القلب مباشرة و وضع في انابيب بدون مانع للتجلط للحصول على المصل و انابيب ذات مانع للتجلط ،تم قياس العيارات المصلية بواسطة اجراء اختبار التلازن بالانابيب كذلك تم أختبار فرط الحساسية الاجلة حيث حقنت راحة القدم اليمنى للفئران بعالق البكتيريا المستضدي .

- **مقاييس الاستجابة المناعية:**

- فحص البلعمة Phagocytosis assay:

- درست عمليه البلعمة بأستعمال الخلايا البلعمية Macrophage المستخرجه من منطقه غشاء الخلب حسب طريقه (Cohen ,.1975). خدر الحيوان بالكلوروفورم ، وحقنت منطقه البريتون 3 مل من محلول (PBS) Phosphate buffer saline لجمع اكبر عدد ممكن من الخلايا البلعمية . سحب الدارئ المحقون من منطقه البريتون بمحقنه نابذه ووضع في انبوبة نظيفة ومعقمة . نبذت الخلايا مركزيا بسرعة 2000 دورة/دقيقة لمدة 5 دقائق وأهمل الرائق. علق الراسب بأضافة 1 مل من PBS . عدت الخلايا وقدرت العيوشية لها بأستعمال صبغة التريبان الزرقاء وضبط التركيز الى 1×10^6 خلية/مللتر، درست عملية البلعمة بمزج 150 مايكروليتر من عالق الخلايا بتركيز 1×10^6 مع50 مايكروليترمن عالق البكتريا *Staph aureus* بتركيز 1×10^6خلية /مل و20 مايكروليتر من مصل الانسان ثم حضنت في حمام مائي هزاز بدرجة حرارة 37 لمدة 60 دقيقة. بعد نهاية فترة الحضانة عملت مسحة smear على شريحة زجاجية نظيفة وثبتت باضافة قطرات من كحول الايثانول ،جففت بالهواء وصبغت بوضعها في وعاء حاوٍ على صبغة كمزا لمدة 10 دقائق . فحصت الشرائح تحت المجهر الضوئي وبقوة 100 X وعد على الاقل 100 خلية مرتبطة ملتصقة او ملتهمة ،يعبر عن عملية البلعمة بمعامل البلعمة Phagocytic index.

- تفاعل فرط الحساسية لآجل Delayed-Type Hypersensitivity (DTH)

استعملت طريقة Triolo *et al*. (1989) لأجراء الفحص في اليوم الثامن بعد التمنيع في الحيوانات المعاملة وحيوانات السيطرة وتم بحقن راحة القدم الخلفي الأيمنRight hind foot pad ب (0. 1) مليلتر من العالق البكتيرى بتركيز 1×10^7 خلية/مليلتر ، أما راحة القدم الخلفي الأيسر فحقنت بـ(0.1) من دارئ الفوسفات الملحي، وقد سجلت النتائج على اساس الفرق بين سمك راحة القدم عن طريق قياسه بالفرنية Vernier، والزيادة الحاصلة بعد 24 ساعة من الحقن .

- **اختبار التلازن بالانابيب** :استخدم هذا الاختبار للتحري عن وجود او عدم وجود خاصية ضدية للكلوبيولينات المناعية لمستضدات البكتريا و تحديد العيارات المصلية (Garvey *et al*. ;1977) .

- **أختبار التحدي Challenge test** : اجري اختبار التحدي على مجموعتين، المجموعة الاولى(A) تمثل المجموعة الممنعة بلقاح Ag- Vi المحضر إذ اعطيت جرعتين من اللقاح الجرعة الاولى1 مليلتر/فأرفي البريتون وبعد مرور 8 أيام أعطيت الجرعة الثانية (الجرعة المنشطة)،ثم أعطيت جرعة التحدي بعد مرور 8 أيام من أعطاء جرعة التقوية،حقنت الفئران بجرعة التحدي والمساوية لـ LD_{50} 100 بعد حساب الجرعة القاتلة لنصف عدد الحيوانات التي كانت ($10^7\times3.3$cfu/ ml)،وتم أعتماد جرعة ($10^9\times1$cfu/ml)وأعطيت بحقنها

بالبريتون. المجموعة الثانية(B) تمثل مجموعة السيطرة (غيرممنعة) أعطيت جرعة التحدي بطريقة إعطاء جرعة التحدي نفسها للمجموعة الاولى.

النتائج والمناقشة

- **الدراسة البكتريولوجية** : تبين من خلال نتائج الاختبارات الكيموحيوية المستعملة فى التشخيص ان بكتريا *S. typhi* كانت سالبة لفحص الاوكسديز والكاتليز والاندول فضلا عن فحص ONPG، لكنها موجبة لفحص احمر المثيل وانتاج كبريتيد الهيدروجين وانتاج الحامض وكانت النتائج متوافقة مع النتائج القياسية (Collee *et al* ,1996).

- **الفحص الكيمياوى و الحيوى للمستضد :** اوضحت نتائج الدراسة ان التفاعلات الكيمياوية كانت ايجابية وهذا دليل على احتواء مستضد الفوعةعلى مركبات السكر المتعدد فضلا عن مجموعة الاستيل التي لهما دور في تحفيز الاستجابة المناعية وهذا يتفق مع (Robbins,& Robbins,1984) واوضح الفحص الحيوي فعالية تمنيعية عالية بالحيوانات المحقونة بالمستضد مع خمول الحيوانات بعد مرور 24 ساعة من الحقن وظهور احمرار المنطقة المحقونة بالجلد بعد مرور اسبوع من الحقن العضلي (Pasteur,1995)

- **تحديد تركيز اللقاح الاكفا في استحثاث الجهاز المناعي** : تم تحضير ثلاث تراكيز من اللقاح وقد أختبرت كفاءتها المحصل عليها في هذه الدراسة على استحثاث الجهاز المناعي في الفئران المختبرية عن طريق قياس أعلى أستجابة مناعية متولدة فيها حيث أختبرت قابلية التحول المناعى المصلى وعيار الضد المتخصص و اظهرت نتائج الاختبارات المناعية أن التركيز 10^7cfu/ml هو الاكفاء لذاتم اختياره لاكمال خطوات الدراسة.

- **تحديد قيمة الجرعة القاتلة للنصف (LD 50) من الحيوانات المختبرية المحقونة باللقاح** : لبيان تأثير اللقاحات المحضرة في الجرعة القاتلة للنصف في الفئران المختبرية تم اولاً تحديد الجرعة القاتلة النصفية للقاح البكيتري بأستخدام الفئران البيض وبواقع (5) فئران لكل تركيز ، جدول رقم (1) حيث وجد أن الجرعة أدت الى هلاك (50%) من الفئران خلال (5) ايام .

جدول (1) تحديد الجرعة القاتلة النصفية (LD50) من الفئران المختبرية المحقونة باللقاح.

عدد خلايا اللقاح المقتولة بالحرارة	عدد الفئران المحقونة	عدد الفئران		العدد التراكمي		العدد التراكمي الكلي	النسبة المئوية للهلاك
		الحي	الميت	الحي	الميت		
10^2	5	5	0	5	8	13	0
10^3	5	5	0	10	8	18	16
10^4	5	4	1	14	7	21	25
10^5	5	4	1	18	6	24	33.3
10^6	5	3	2	21	4	25	44.4
10^7	5	1	4	22	0	26	61.5
^{8}10	5	0	5	24	0	28	85

حسب المعادلة الاتية على وفق طريقة (Reed and Muench ., 1938)

المسافة النسبية= 50%-% للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50% /% للفئران في التركيز الاعلى من 50% -% للفئران الميتة في التركيز الادنى من 50%

$$\text{المسافة النسبية من } 50 = \frac{50-40}{63.6-40} = 0.42\%$$

وان الجرعة المميتة ل 50% م الحيوانات المختبرية $=10^6-10^7$

أظهرت نتائج التجربة أن قيمة الـ LD50 في كلا الحالتين كان 10^7 ، لذا تم أختيار الجرعة القاتلة للنصف مع التركيز الاعلى والادنى لغرض المقارنة وتقويم تأثير التراكيز المختلفة من اللقاح في زيادة أو تقليل الاستجابة المناعية لتحديد التركيز الاكفاء .

- أختبار التحدي Challenge investigation: يعد هذا إلاختبار من أهم الاختبارات المناعية المعتمدة في تقويم اللقاحات ومدى فاعليتها في توفير الحماية للمجاميع الملقحة مع المجاميع غير الملقحة ، وذلك بعد إعطاء جرعة التحدي challenge dose وأن نتائج هذا الاختبار تختلف بأختلاف نوع وضراوة المسبب المرضي، وقدرة اللقاح) ،تُعطى جرعة التحدي إعتماداً على الجرعة المميتة لنصف العدد LD50(Maslog ., 1997)) . اظهرت النتائج المبينة في جدول (2) ان مجموعة الفئران المحقنة بلقاح البكتيرى كانت الافضل في مقاومة جرعة التحدي ، اذ سجل هلاك فأرين فقط ، اما مجموعة السيطرة فقد هلكت جميعها خلال 24 ساعة من حقن جرعة التحدي ، ان استخدام اختبار التحدي هو الطريقة المثلى لتقويم الحماية المتولدة .

جدول(2): النسبة المئوية للاحياء المتبقية بعد اعطاء جرعة التحدي

المجموعة	عددها	عدد الاحياء المتبقية بعد إعطاء جرعة التحدي	النسبة المئوية للاحياء المتبقية
المحقنة بلقاح Vi-Ag	20	18	%90
المحقنة بالبكتيريا *S.typhi*	20	2	%10
السيطرة	4	0	%0

اظهرت النتائج البينة في الجدول اعلاه ان اللقاح *S.typhi* –Vi- Ag وفر أعلى حماية 90% قياساً بـمجموعة السيطرة وسجلت الفئران الحية المتبقية بعد جرعة التحدي جدول (3) اعلى نسبة للخلايا البلعمية الملتهمة مع شدة تفاعل فرط الحساسية والآجل قياساً مقارنة بالسيطرة . ان تحفيز الاستجابة المناعية في المجموعة الاولى جراء استخدام اللقاح وفر حماية اكبر ضد اختبار التحدي (Robbins &Robbins,1984).

جدول (3) : نتائج الاختبارات المناعية للفئران المختبرية بعد أعطاء جرعة التحدي

مجموعة *S.typhi*	اللقاح Vi-Ag	مجموعة السيطرة	الاختبارات المناعية
80.66	51.66	0	اختبار البلعمة
320-160	320-160	0	العيارات المصلية
3.35	1.69	0	فرط الحساسية الآجل

- أختبار البلعمة Phagocytosis : أظهرت نتائج البلعمة في مجموعة الحيوانات المحقنة بالعالق البكتيرى بتركيز 10^7 جدول (5) اعلى نسب لمعدلات الخلايا الملتهمة فقد أعطت الجرعة الاولى (3.21 ± 56.33) ، أما جرعة التقويه (3.05±84.66) يليها التركيز 10^6 حيث سجلت الجرعة الاولى (2.31 ± 47.3) ،أما جرعة التقوية (2.08± 66.66) وكان اقلهم معدل بنسب الخلايا الملتهمة للكتيريا10^8 حيث كانت الجرعة الاولى (40 ± 2) ، أما جرعة التقوية (1.52 ± 60.33) . أظهرت النتائج أن اللقاح وبجرعة التقوية لتركيز 10^7 كان الاكفاء في استحثاث الفعالية البلعمية قياساً مع مجموعة السيطرة . لقد تم أستخدام اكثر من جرعة معززة لكل من اللقاحات المستخدمة في هذه الدراسة ، وذلك لان اللقاح المقتول يتطلب اكثر من جرعة ليحفز أستجابة مناعية

مستمرة ، بينما يتطلب اللقاح الحي جرعة واحدة ليحفز مناعة طويلة الامد (Goldsby *et al* .,2000) ، كما أن القابلية على الالتهام تزداد بزيادة عدد الاجسام الغريبة الداخلة للجسم ، وجد أن الاصابة *S.typhi* تعمل على تنشيط خلايا macrophage لعملية البلعمة عن طريق تحفيزها لانتاج كميات كبيرة من أوكسيد النتريك (NO) الذي يعد ساماً للكائنات المجهرية ، وتعزى أهمية اوكسيد النتريك المنتج من خلايا البلعمة الى قدرته على تنشيط انزيم Ribonucleotide reductase فقد وجد أن هذا الانزيم يكون حساساً في المستويات الواطئة من اوكسيد النتريك (Serbina *et al* .,2003). تدل النتائج التي توصلنا اليها على أن اللقاح حفز فعالية البلاعم على التهام البكتيريا ولهذه العملية أهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعد عملية قتل البكتريا عن طريق الخلايا البلعمية خطوة اساسية بوصفها خط دفاعي أولي غير متخصص ضد المسببات المرضية (Macatonia ،*et al* ,1995) . ان معاملة الفئران بلقاح Vi -Ag تؤدي الى زيادة وتنشيط خلايا Monocyte التي تؤدي بدورها الى زيادة معدلات عملية البلعمة حيث أظهرت النتائج زيادة واضحة في قدرة الخلايا على التهام خلايا البكتيريا المقتولة بالحرارة (Pasteur ,1995) ، كما ان اللقاح له دور في الاستجابة المناعية المكتسبة وفي تنشيط الخلايا التائية وأخيراً لقابليتها على تنشيط IL-12, TNF-α ، وهي مركبات خلوية مهمة في تنشيط الخلايا التائية ومن ثم تحفيز أستجابة مناعية مثل زيادة القابلية البلعمية وزيادة فرط الحساسية المتأخر ، كما أنها تملك دوراً في اثارة كلا من CD8, CD4 عن طريق مسار تقديم الانتجينات الى مستضدات التوافق النسيجي صنف الاول والثاني (Myamoto.,2003). أظهرت النتائج أنخفاض معامل البلعمة في المجموعة الثانية بزيادة عدد الجرع وللتراكيز الثلاث 10^6 ، 10^7 ، 10^8 وان سبب أنخفاض قدرة الخلايا البلعمية على التهام البكتيريا فقد يعزى لزيادة تراكيز المواد السامة والانزيمات الحالة التي تنتج من الخلية نفسها والتي من المحتمل انها تكون سامة لتلك الخلايا (Lock *et al* .,1990) ، او قد تموت الخلية البلعمية نتيجة ما تتعرض له من ضغط العمل المستمر فيحدث موت الخلية الفسلجي (Apoptosis) ، واحتمال أخر ان يكون حدوث الموت الفسلجي تسببه البكتريا نفسها او التعرض لمستضداتها أو احد أفرازاتها (Carrero *et al* .,2004 a) .

جدول(4) معدل تاثير اللقاح البكتيري في معامل البلعمة Phagocytosis في الفئران

مجـــــاميع الدراسة	الجرعة الاولى			الجرعة الثانية			الجرعة الثالثة		
	العدد	الوســـط الحسابي	الانحراف المعباري	العدد	الوســـط الحسابي	الانحـــراف المعباري	العدد	الوســـط الحسابي	الانحـــراف المعباري
السيطرة	3	21.67	0.57	3	22.66	0.59	3	24.33	0.58
10^6	4	33	HS 1	4	43	HS 2.64	4	53.35	HS 2.08
10^7	4	37.33	HS 1.15	4	48.67	HS2.88	4	59.66	HS1.5275
10^8	4	28.66	HS 0.57	4	34.34	HS 0.57	4	44	HS 2
المجموع	15			15			15		
المقارنـــــه المعنويه ANOVA (F-test)	P-value	0.00		0.00					
	م. المعنويه	HS		HS					

HS: high significant ,NS: no significant , S: significant

-أختبار فرط الحساسية الآجلة: تشير النتائج الموضحة في الجدول الى قابلية لقاح مسضد *S.typhi* وبتركيز 10^7 بجرعة واحدة اوجرعة المنشطة على توليد استجابة مناعية قياساً مع مجموعة السيطرة . لقد بلغ معدل فرق سمك وسادة القدم المحقنة بعالق بالقاح وسمك وسادة القدم المحقنة بالمحلول الفسيولوجي في الحيوانات

المحقنه بالقاح بتركيز 10^7 وبجرعة أولى (0.02 ± 1.52) مليمتر، والجرعة المنشطة (0.17 ± 3.01) ملم
جدول(5) .

جدول(5) معدل تاثير اللقاح البكتري في اختبار تفاعل فرط الحساسية الآجل في الفئران المعاملة (10^7).

مجاميع الدراسة	الجرعة الاولى			الجرعة الثانية			الجرعة الثالثة		
	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعباري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعباري	العدد	الوسط الحسابي	الانحراف المعباري
السيطرة	3	0.65	0.01	3	0.69	0.01	3	0.70	0.01
10^7	3	1.52	HS 0.02	3	3.01	HS 0.17	3	0	0
المجموع	6			6			6		
المقارنه المعنويه ANOVA (F-test)	P-value	0.01		0.00					
	مستوى المعنويه	HS		HS					

اوضحت النتائج ان المعاملة باللقاح أدت الى رفع معامل فرط الحساسية الاجل حيث ادت الجرعة المنشطة للقاح أقصى زيادة في تفاعل الحساسية الاجل، وان تفسير ذلك ربما يعود الى التأثيرات المحفزة للقاح على الخلايا المنتجه للكلوبيولينات المناعية وعلى خلايا البلعم الكبير ، مما ادى الى زيادة المعقدات المناعية وتحفيز نظام المتمم ، مع زيادة في هجرة خلايا البلاعم الكبيرة الى موقع حدوث التفاعل مما يؤدي الى تجمع هذه الخلايا ومن ثم رفع معدل فرط الحساسية قياساً مع السيطرة وهذا يتفق مع ما أكده (Klugman ,*et al*. 1987) الذي وجد ان اللقاح ادى الى زيادة انتاج الكلوبيولينات المناعية ولاسيما IgG, IgM وزيادة في تفاعل فرط الحساسية الاجل .

وجد ان اللقاح ينشط فاعلية Macrophage في تعزيز الاستجابة المناعية ، لوحظ وجود علاقة طردية بين نتائج فرط الحساسية وبين معامل البلعمة فقد وجد أن هناك زيادة في هذا العامل وقد يعزا الى كفاءة اللقاح على تحفيز خلايا البلعمة Macrophage والذي يؤدي بدوره الى تحفيز الخلايا التائية لانتاج الحركيات الخلوية على سحب خلايا البلعم الكبير الى موقع التفاعل ، مما يؤدي الى تحفيز عملية البلعمة وتنشيطها وزيادة تركيز الانزيمات المختلفة للقيام بعملية قتل اكثر فعالية مؤدياً الى تحطيم موقعي للانسجة (Klugman *et al*,1997;Roitt *et a*l.,1998) .

References

Acharya Il, *et al* .(1987) Preventation of Typhoid Fever in Nepal with the Vi capsular polysaccharide of *Salmonella typhi* . N Engi J Med;317:1101-1104

Baron, E. J.; Petersonee, L. R. and Finegoldens, S. M. (1995). Bailey Scotts Diagnostic microbiology. 9th ed.,The C.V. Mosby Company, USA.

Boumer , H.G. ;Bai,A. ; Forma,j.;Gresory ,S.H.; Wing,E.H. and Hinrichs ,D.J.(1998) : *Listeria monocytogenes* infected hepatocyte are target of major histocompatibility complex class 1 b- restricted antilisterias cytotoxic T lymphocytes .Infec.Immun.6:2814-2817 .

Carrero,J.A.; Calderon, B. and Unanue, E.R.(2004) : Type 1 interferon sensitizes lymphocytes to apoptosis and reduces resistance to listeria infection . J.E.M.200(4) :535-540.

Chan ,S.H. ; Perussia, B. ; Gupta ,J .W.(1991) : Induction of interferon γproduction by natural killer cell stimulatory factor: characterization of responder cells and synergy with other inducers. J .Exp. Med .173:869–879.

Cohen , F.; (1975) : Clinical features in combined Immunodeficiency Diseases and Adenosine deficiency : A molecular Defect . Academic Press , New York .P245-248 .

Collee, J. G.; Fraser, A. G.; Marmion, B. P. and Simmon, A. (1996) Mackie and McCartney medical microbiology. 14th ed ., The Churchill livingstone. Inc. USA.

Garvey, J.S.; Cremer, N.L. & Sussdorf, H.D. (1977) *Methods in Immuology*, 3rd (ed.). Benjamin, W.A., Inc., Advanced Book Program, Canada.
Goldsby ,R.a. ;Kindt ,T.J. and Osborne ,B.a. (2000):Cuby Immunology,4th ed .U.S.A. PP.670.

Harly ,J. and Prescott ,L. (2002) : Laboratory Exercises in Microbiology .5th ed .McGraw-Hill companies, U.S.A.

Holt , J.G. ; Kriegean , N.R.; Sneather , P.H. ;Staleyley , J.T. and Williamsers ,S.T. (1994) : Bergeś manuals of determination bacteriology .9th ed. , Williamś and Wilks Baltimor,USA.

Ismail , M.A. ; Yang , S.; Abusharif , A .N. and Moawad ,A.H. (1985)Immunoglobulines in prolonged ruptured membranes . Am . J. Obstet . Gynecol . 153 :390 –393.

Klugman KP , Kenyon, T.A.; Rumisha, D.; Huebner,. (1987).Protective Activity of Vi- capsular polysaccharide vaccine Aginsat typhoid fever .The Lancet.Vol:1165-1169.

Lim , K . J . H .; Odukoya , O . A .; Li , T. C . and Cooke , I .D. (1996) . Cytokines and immuno- endocine factors in recurrent miscarrige . Hum . Reprod . Update . 2 : 469-481 .

Lock ,R.; Dahlgren ,C.; Linden ,M. ;Stendahl ,O. ;Svensbergh , A. and Ohman ,L.(1990) : Neutrophil killing of tow type 1 Fimbrio-Bearing Escherichia coli strain :Dependence on Respiratory Burst Activation .Infec.and Immun. ,58 :37-42

Lockmann, S., Tappero, J.W., Kenyon, T.A.; Rumisha, D.; Huebner, R.E. and Binkin,N.J**.** (1999) :Tuberculin reactivity in a pediatric population with high BCG vaccination coverage. Int. J. Tuberc Lung Dis. 3:23-30.

Loosmore, S.M.; Zealey, G.R.; Boux, H.A.; Cockle, S.A.; Radika, K., Fahim R.E.;Zobrist, G.J.; Yacoob, R.K.; Chong, P.C.; Yao, F.L. and Klein, M.H. (1990): Engineering of genetically detoxified pertussis toxin analogs for development of a recombinant whooping cough vaccine. Infect. Immun. 58, 3653-3662.

Macatonia, S.E.; Hosken, N.A.; Litton ,M. (1995): Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive $CD4^+$ T cells. J Immunol .154:5071–5079.

MacFaddin , J.F. (2000) : Biochemical test for identification of medical bacteria . 1st ed .The Williamś and Wilkins, Baltimore ,USA.

Maslog, F.S., (1997).Fractionation of *pasteurella multocida* group A for active mouse protection tests for swine plaque and Fowl cholera vaccine Production .the philippine J.I.biotech .8(1):21-29.

McCance , K . L . and Huether , S . F . (1990) . Pathophysiology : The biologic basis for disease in adults and children . St . Louis: Mosby . C. V . , St . Louis

Myamoto , M. ; iang , J.;Serbino , N and Hayashi , F.(2003) : Neutrophillia in LFA-1 deficient mice resistance to listeriosis : possible contribution of granulocyte- colony – stimulating factor and IL-17 .J.Immuno. 170 :5228-5234.

Pasteur (1995) *Salmonella typhi* Vi- capsular polysaccharide vaccine. Lyon France .Vol:61-62.

Raghupathy , R .; Makhseed , M .; Azizieh , F .; Omu , A .; Gupta , M . and Farhat , R . (2000) . Cytokine production by maternal lymphocyte during normal human pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion . Hum . Reprod . 15 : 713-718 .

Reed , L.J. and Muench , H.(1938) : A simple method of estimating fifty percent endpoints . Am. J. Hyging . 27(3) : 493-498.

Robbins JD ,Robbins JB .(1984) Re-examination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi-antigen) of *Salmonella typhi* . J infect Dis 150:436-49.

Roitt , I. ; Brostoff , J. and Male , D. (Editors) (1998) : Immunology. 5th ed , Mosbay Ltd., UK.pp: 288-343.

Serbina , N.V.; Salazar-Mather , T.P. ; Biron , C.A. ; Kuziel , W.A. and Pamer , E.G. (2003) : TNF/iNOs- producing dendritic cells mediated innate immune defence against bacterial infection . Immun. 19 :59-70.

Stites , D.P.;Terr,A.J. and Parslow ,T.G. (2004):Basic and Clinical Immunology ,8th (ed) .Lange Medical book,USA .

Trach, D.D.; Cam, P.D.; Ke, N.T.; Rao, M.R.; Dinh, D.; Hang, P.V.; Hung,.(2002):Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Vietnam. Bull. World Health Organ. 80,-8.

Triolo ,A.J. ;Osteholm ,L. and Kratky ,M.T.(1989) :Enhancement of the Arthus and suppression of delayed type hypersensitivity by bluronic of 68.Adetergently used to prepare per carbon emulion ,Int.J. of Immuno.11:41-48.

Westphals, O. and Jann, K.(1965). Bacterial LPS extraction with phenol water and further applications of the procedure, Methods Carbohydr Chem.,83-91.

Abstract

The present study was conducted to investigate the presence of *S. typhi* in clinical samples such as blood &stool . The isolates was diagnosed depending on the biochemical tests and growth characteristics on selective and differential culture media. The chemical reaction and bioassay were positive .Also the vaccine sterility and safety were tested .

The activity of Vi-antigen to stimulate the immune response in immunized mouse through a number of immune tests which are: phagocytosis , seroconversion and delayed hypersensitivity reaction ,The result revealed that 10^7 is the best immunizing dose.

After separation and purification of the vaccine prepared from *S.typhi* , LD50 was calculated by injected mice with the following concentrations (2.6×10^4 ;3.3×10^7 ; 2.12×10^7) in 0.1 ml respectively , and the 10^6 ,10^7,10^8 were chosen to evaluate the best concentration the in stimulate immune response.

Immune response in mice was evaluated using the following assays :Ab. titration assay , phagocytosis and delayed hypersensitivity. The results of this study confirmed that , Vi – vaccine in boosting dose after 8 days from vaccination is the best efficient and gave highest mean in phagocytosis , Ab. titration assay and significant increase in delayed hypersensitivity.