

جدول (5-4) يمثل التعبير الجيني لـ CD25 باستخدام طريقة (CT Livak method).

M±SD	Fold change (2 ^{-ΔΔCT})	ΔΔCT	ΔCT (control)	ΔCT (Test)	CT (GAPDH)	CT (CD25)	Group
2.5604±0.64 ^{ab}	1.756031948	-0.8123191	-2.97	-3.782319092	31.61	31.61	T1
	3.75549886	-1.9090046	-2.97	-4.87900456	32.89	32.89	T1
	3.076472067	-1.6212769	-2.97	-4.591276894	31.93	31.93	T1
	3.757632866	-1.9098241	-2.97	-4.879824117	32.66	32.66	T1
	0.456627038	1.13091181	-2.97	-1.839088194	31.03	31.03	T1
3.7032±0.54 ^{ab}	2.469398735	-1.3041598	-2.97	-4.274159808	32.21	32.21	T2
	3.09574444	-1.6302864	-2.97	-4.600286379	32.74	32.74	T2
	4.848125712	-2.2774271	-2.97	-5.247427108	32.98	32.98	T2
	5.186792374	-2.3748426	-2.97	-5.34484262	32.36	32.36	T2
	2.916070834	-1.5440258	-2.97	-4.514025764	31.76	31.76	T2
4.4739±1 ^a	1.916109182	-0.9381798	-2.97	-3.90817977	31.53	31.53	T3
	4.556982034	-2.1880787	-2.97	-5.158078683	32.34	32.34	T3
	7.954734882	-2.9918138	-2.97	-5.961813849	33.53	33.53	T3
	3.19357323	-1.6751715	-2.97	-4.645171532	32.01	32.01	T3
	4.748384783	-2.2474368	-2.97	-5.217436848	32.78	32.78	T3
5.1936±2.17 ^a	13.50294067	-3.7552017	-2.97	-6.725201726	33.81	33.81	T4
	1.976918704	-0.9832535	-2.97	-3.953253545	32.21	32.21	T4
	4.846946993	-2.2770763	-2.97	-5.247076305	32.93	32.93	T4
	4.144429626	-2.0511736	-2.97	-5.021173566	33.14	33.14	T4
	1.497183703	-0.5822512	-2.97	-3.55225125	32.20	32.20	T4
1±0 ^b	1	0	-2.97	-2.97	32.12	29.15	M.c

M.c: تمثل الوسط الحسابي للسيطرة ، T1: تمثل مجموعة Vi Ag + Ch. T2: تمثل مجموعة Vi Ag T3: تمثل مجموعة Vi Ag +TT T4: ViAg +TT يمثل مجموعة ViAg+Ch.+TT

(2^{-ΔΔCT} Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) CD25 gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

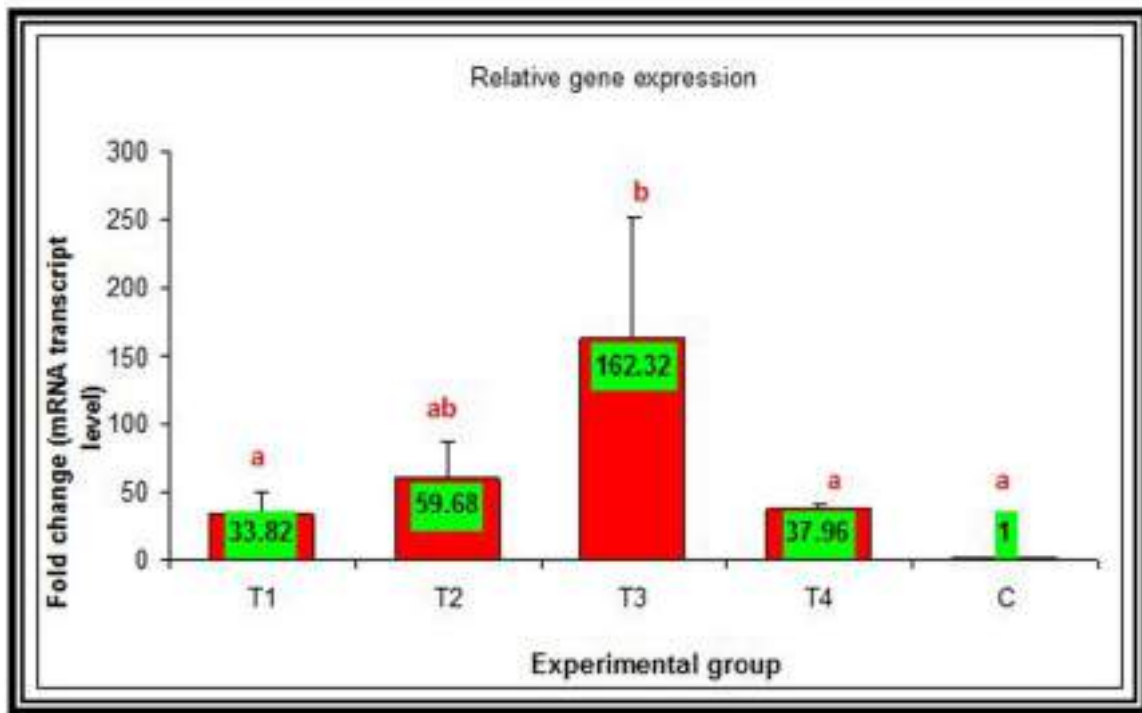
$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{control})$$

Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = (2^{-ΔΔCT}):

Normalized expression ratio

2-3-7-4- قياس التعبير الجيني لـ CD29 marker بواسطة Real-Time qPCR

اظهرت النتائج وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في مجموعة المعاملات ومجموعة السيطرة كما في الشكل (4-15)، حيث بيّنت نتائج التعبير الجيني زيادة بالتعبير عن جين CD29marker في الحيوانات المعاملة بـ (T3) (162.3256 ± 89.52) مقارنةً مع المجاميع الاخرى ومجموعة السيطرة (C) (1 ± 0)، و اقل زيادة منها كانت بالحيوانات المعاملة بـ (T2) (59.6817 ± 26.65) لكن كانت اعلى من مجموعة السيطرة (1 ± 0)، اما اقل تعبير سجل بالحيوانات المعاملة بـ (T4) (37.9605 ± 3.09)، و بمجموعة (T1) (33.8276 ± 16.6) على التوالي لكن كانتنا أعلى مقارنةً مع السيطرة (C) (1 ± 0) وتم تحليل هذه النتائج حسب معادلة ($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak Method) كما تظهر بالجدول (4-6).



شكل (4-15) يبين التعبير الجيني لـ CD29 marker بواسطة Real-Time qPCR

جدول (4-6) يمثل التعبير الجيني لـ CD29 باستخدام طريقة (Livak method).

M±SD	Fold change ($2^{-\Delta\Delta CT}$)	$\Delta\Delta CT$	ΔCT (control)	ΔCT (Test)	CT (GAPDH)	CT (CD25)	Group
33.8276±16.6 ^a	7.943553991	-2.9897846	4.9	1.910215378	31.61	33.53	T1
	98.74177254	-6.6255886	4.9	-1.725588638	32.89	31.16	T1
	18.5297168	-4.2117689	4.9	0.688231073	31.93	32.61	T1
	29.44446932	-4.8799248	4.9	0.020075233	32.66	32.68	T1
	14.47854243	-3.8558445	4.9	1.044155533	31.03	32.07	T1
59.6817±26.65 ^{ab}	10.20568609	-3.3513013	4.9	1.548698733	32.21	33.76	T2
	28.55128244	-4.8354836	4.9	0.064516356	32.74	32.80	T2
	106.508441	-6.734824	4.9	-1.834823961	32.98	31.14	T2
	139.9363003	-7.1286264	4.9	-2.228626445	32.36	30.14	T2
	13.20726196	-3.7232595	4.9	1.176740498	31.76	32.94	T2
162.3256±89.52 ^b	65.70489647	-6.037929	4.9	-1.137928982	31.53	30.40	T3
	127.2095796	-6.9910635	4.9	-2.091063508	32.34	30.25	T3
	515.3375031	-9.0093738	4.9	-4.109373777	33.53	29.42	T3
	33.94849453	-5.0852757	4.9	-0.185275693	32.01	31.83	T3
	69.42757363	-6.1174368	4.9	-1.217436848	32.78	31.57	T3
37.9605±3.09 ^a	37.63257633	-5.2339102	4.9	-0.333910155	33.81	33.48	T4
	26.82149075	-4.7453175	4.9	0.15468248	32.21	32.36	T4
	44.08929361	-5.4623565	4.9	-0.562356458	32.93	32.36	T4
	37.87854408	-5.243309	4.9	-0.343308975	33.14	32.80	T4
	43.38066634	-5.4389803	4.9	-0.538980308	32.20	31.66	T4
1±0 ^a	1	0	4.9	4.9	32.12	37.02	M.c

M.c: تمثل الوسط الحسابي للسيطرة، T1: تمثل مجموعة Vi Ag + Ch. T2: تمثل مجموعة Vi Ag T3: تمثل مجموعة Vi Ag + TT T4: Vi Ag + TT. يمثل مجموعة ViAg+Ch.+TT

($2^{-\Delta\Delta CT}$ Livak method) as following: First, the CT of the target gene was normalized to that of the reference (ref) CD25 gene, for both the test isolates and the control isolates group.

$$\Delta CT(\text{test}) = CT(\text{target, test}) - CT(\text{ref, test})$$

$$\Delta CT(\text{control}) = CT(\text{target, control}) - CT(\text{ref, control})$$

Second, the ΔCT of the test isolates were normalized to the ΔCT of the control:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT(\text{test}) - \Delta CT(\text{control})$$

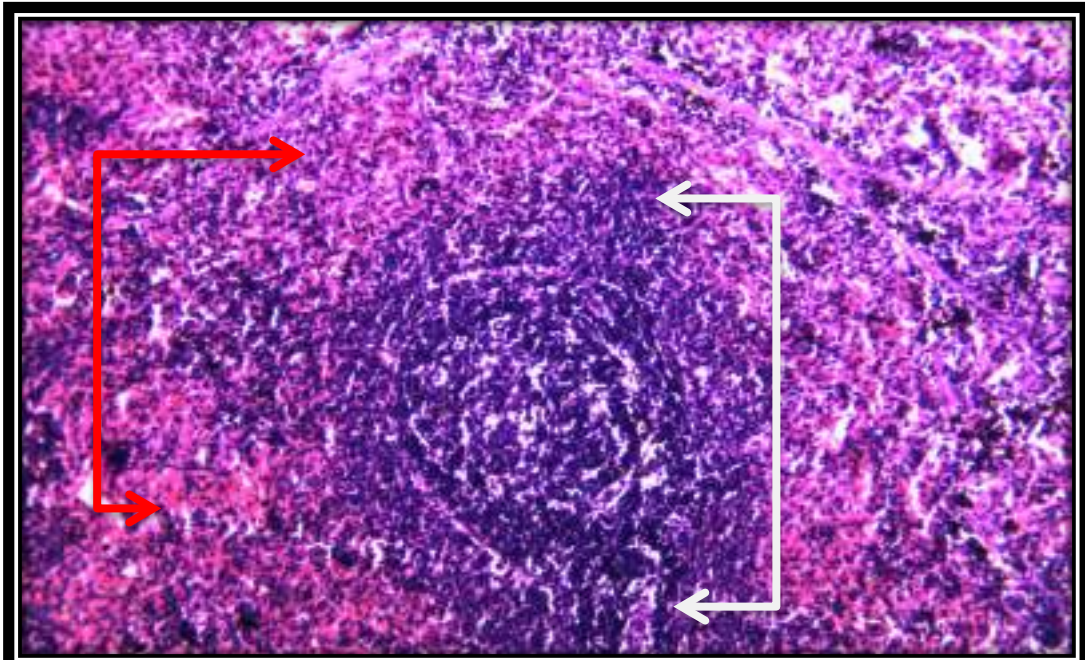
Finally, Fold change of relative gene expression was calculated by following equation = ($2^{-\Delta\Delta CT}$):

Normalized expression ratio

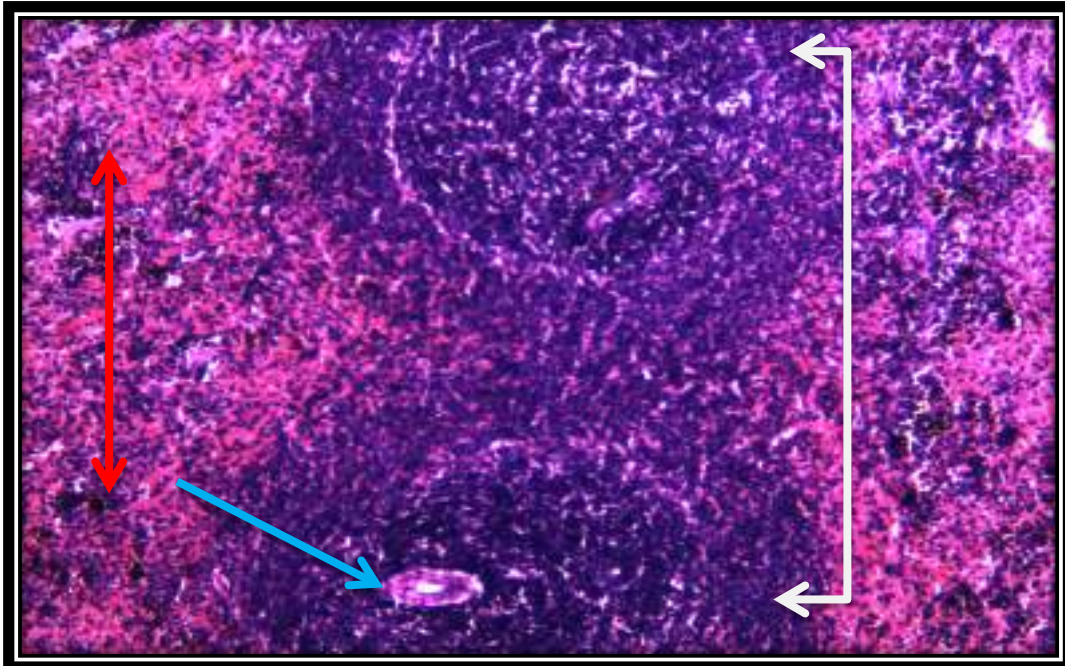
8-4- المقاطع النسيجية وتأثيرات توليد الخلايا اللمفية

Histopathological & Lymphoproliferative effects

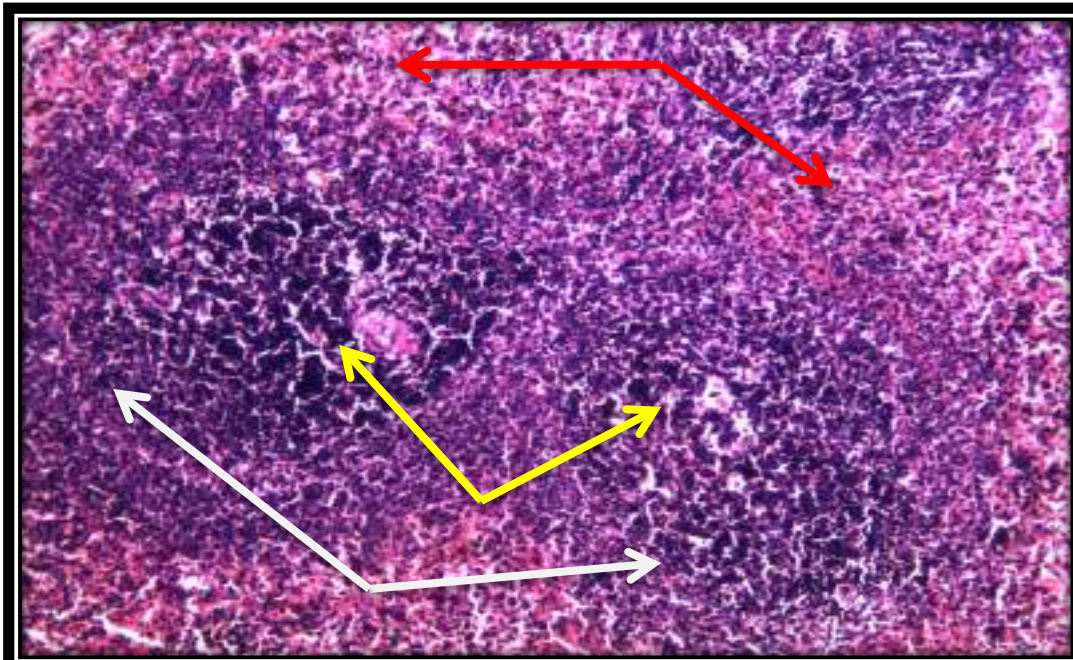
في هذه الدراسة ، تم دراسة المقاطع النسيجية المتمثلة بالطحال (Spleen) والغدة الزعترية (Thymus gland) التي اظهرت تغيرات على كل منهما اعتماداً على المعاملات المستخدمة حيث أظهرت نتائج الدراسة نشاطاً ملحوظاً في العقد اللمفاوية في الطحال والغدة الزعترية شملت توسع في حجم العقد اللمفاوية وزيادة نشاط الاجزاء المركزية Germinal centers في هذه العقيدات بالإضافة إلى زيادة أعدادها كما تظهر في الشكل ادناه .



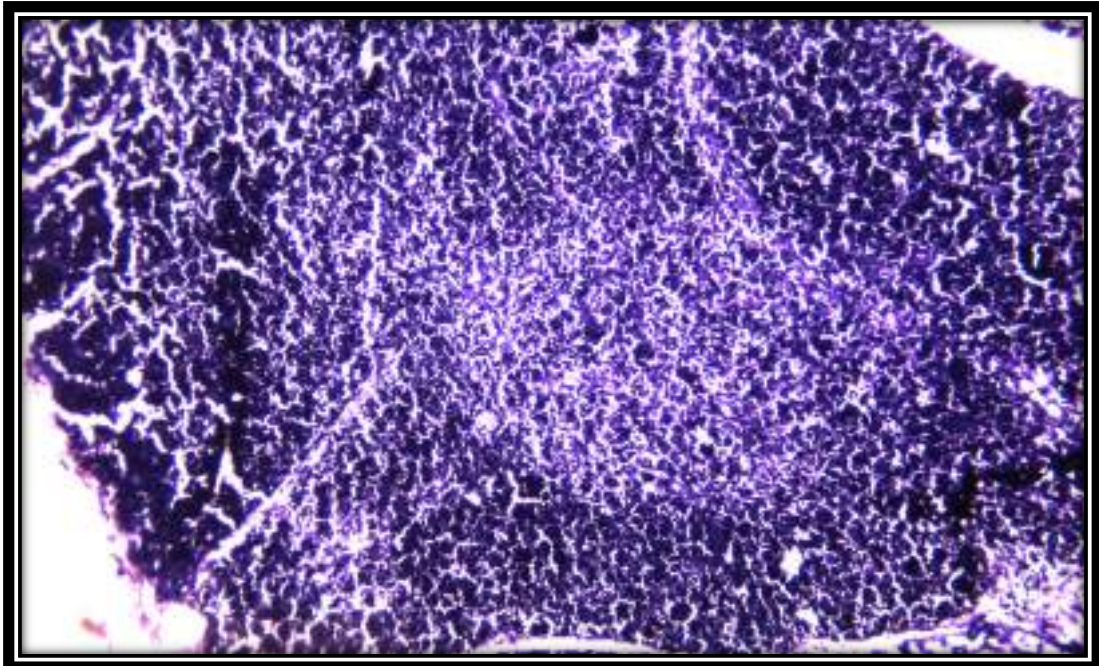
شكل(4-16): تمثل مقطع في الطحال ،حيث تم ملاحظة توسع للب الالبيض (السهم الالبيض) ، مع تكاثر واضح للب الالحم(السهم الالحم) (400X H&E).



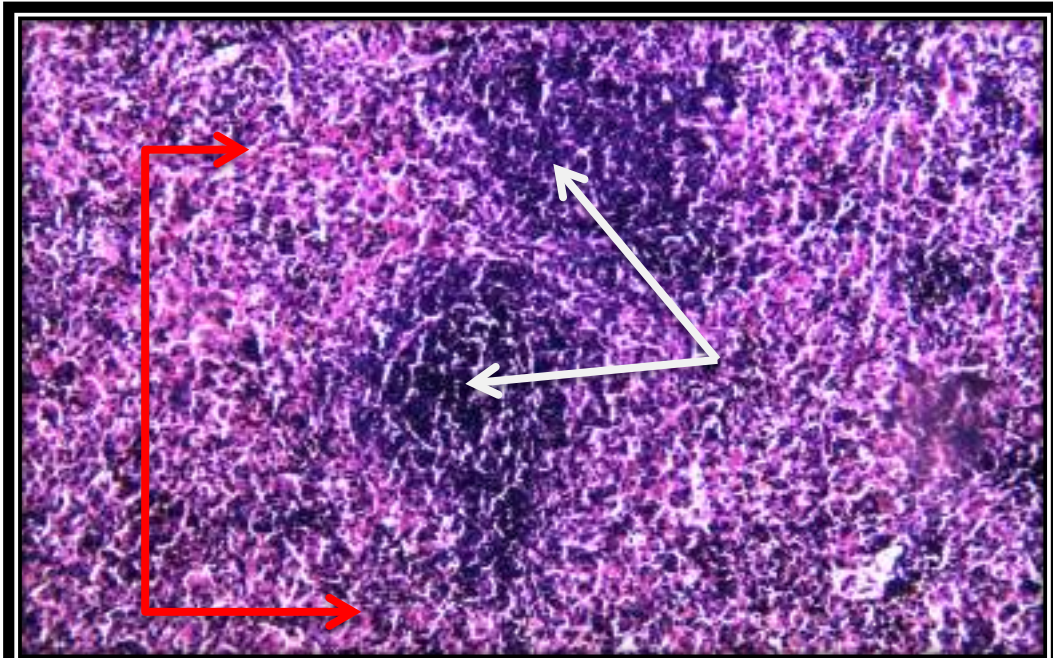
شكل(4-17): تمثل مقطع ثاني في الطحال ، حيث تم ملاحظة توسع لللب الابيض (السهم الابيض) ، مع تكاثر واضح لللب الاحمر (السهم الاحمر) وايضا تم ملاحظة الشرين (السهم الازرق) (400X H&E).



شكل(4-18): تمثل مقطع اخر للطحال ، حيث تم ملاحظة توسع وتكاثر لللب الابيض (السهم الابيض) مع ظهور الشرين داخل اللب الابيض (السهم الاصفر) وايضا تم ملاحظة اللب الاحمر المحاط بالللب الابيض (السهم الاحمر) ، (400X H&E).



شكل(4-19): تمثل مقطع في الغدة الزعترية ، حيث تم ملاحظة توسع في اللب ، (400X H&E).



شكل(4-20): تمثل مقطع في الطحال ، حيث تم ملاحظة استنفاد واضح لللب الابيض (السهم الابيض) مع عدم ظهور الشرين وايضا تم ملاحظة تكاثر اللب الاحمر المحاط باللب الابيض (السهم الاحمر) ، (400X H&E)

5- المناقشة Discussion

5-1- بكتريا *S. typhi*

يمثل مرض التيفوئيد (حمى التيفوئيد) مشكلة مهمة للبشر وخاصةً في الدول النامية وتسجل سنويا حالات متزايدة من الوفيات ويمثل مستضد ViAg احد مستضدات البكتريا المهمة في عمليات التلقيح ويعود هذا المستضد الى مجموعة المستضدات الغير معتمدة على الخلايا للمفاوية (T-independent (TI) حيث يرتبط مباشرةً مع الخلايا البائية Bcell عبر مستقبلات الـ BCR ويعمل على تحفيز انتاج كميات كبيرة من الاضداد وخاصةً عند تحميله على جزيئات حاملة اما مجموعة المستضدات المعتمدة على الخلايا للمفاوية (T-independent(TD)) حيث تعمل على تحفيز خلايا Th من خلال تقديم المستضد الى خلايا CD4+ T cells التي ترتبط بها عن طريق مستقبلات الـ TCR التي تؤدي الى تحفيز تكوين خلايا الذاكرة memory B cells و memory T cells لذلك ، سوف تعمل على إنتاج الأضداد ونتائج خلايا الذاكرة (Mazmanian & Kasper , 2006) .

5-2- الاستجابة المناعية الخلطية Humoral immune response

5-2-1- معيارية الاضداد Antibody titers

تصنف الاستجابة المناعية لخلايا Bcell التي تعرف بالاستجابة الخلطية الى نوعين من الخلايا هما الخلايا المعتمدة (TD) والمستقلة عن الخلايا للمفاوية التائية TI اعتماداً على متطلبات الخلايا المساعدة Th في انتاج الاجسام المضادة ومستضدات TD هي بروتينات يتم معالجتها وتقديمها الى Th اما مستضدات TI فتكون على نوعين هما type I و type II ويعود عديد السكريد الى النوع الثاني الذي يمثل مستضد متعدد السكريد Vi Ag (Obukhanych & Nussenzweig , 2006) .

حيث اظهرت نتائج معيارية الاضداد كما في شكل (4-5) زيادة ملحوظة في المجموعة الاولى (T1) (620.8 ± 364.8) وتعود هذه الزيادة الى كون الـ ViAg سكريات متعددة تنتمي الى المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية (TI) وان تحميلها على حبيبات النانو الـ Chitosan يعمل على زيادة تنشيط الخلايا ، ومستضدات السكريد تنشيط مباشرةً خلايا B cell عن طريق Toll-like receptor وخلايا الـ Bcell تتميز الى خلايا البلازما (plasma cells) التي بدورها تؤدي الى إنتاج الاضداد ، و لكن لا تكون خلايا الذاكرة (memory B cells) وترتبط

هذه المستضدات مع خلايا الـ B cell مباشرةً عن طريق مستقبلات BCR كما سجلت في دراسة (AL-Shibbani,2014) عند استخدامه مستضد متعدد السكريد الشحمي (LPS) وتحميله على حبيبات النانو Chitosan و LPS بدوره يعود ايضا الى المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية (TI) حيث اظهرت نتائجه كذلك ارتفاعاً في عيارية الاضداد عند استخدام المساعد المناعي الـ Chitosan و الـ Chitosan لا يعمل فقط كمساعد مناعي و منشط للنظام المناعي ، لكن أيضا يعمل على زيادة حجم المستضد و تأخير فترة بقائه وينشط النظام المناعي الخلوي بقوة وهذا يعطي مؤشراً على أنه سيكون بديلاً جيداً للقاح المستضد البسيط (النقي او المهجن recombinant) (Mohammad *et al.*,2011). وايضا عند ربط المستضد مع حامل بروتيني مثل توكسيد الكزاز في المجموعة (T3) (537.6 ± 142.53) تم ملاحظة زيادة وهذا الزيادة تعود الى كون التوكسيد من مستضدات الـ (TD) والاستجابة المناعية له تبدأ عندما يتم تقديم الببتيدات محملة على معقد التوافق النسيجي MHC II الى خلايا Th التي بدورها تفرز الساييتوكينات وتنشط توليد خلايا الـ B cell التي تتميز الى خلايا بلازما التي بدورها تعمل على توليد الاضداد وخلايا الذاكرة التي لا تتكون في حالة كون المستضدات TI ، كما في دراسة (Baker *et al.*,2003) التي اظهرت نتائجه مستويات عالية من الاجسام المضادة نوع IgG عند التطعيم بـ CPS-TT conjugate vaccine وهو اللقاح المحضر من ربط توكسيد الكزاز مع مستضد متعدد السكريد المحفزي (Vi Ag) وهو لقاح ناجح ضد حمى التيفوئيد وذلك لأنه محضر من ربط مستضد متعدد السكريد المحفزي (Vi Ag) مع بروتينين وايضا كما في دراسة (Kothari *et al.*,2014) التي تم من خلالها تحضير لقاح تجريبي ضد حمى التيفوئيد عن طريق ربط المستضد Vi Ag مع بروتينين . ومجموعة (T2) (448 ± 117.73) التي تحتوي على مستضد الـ Vi Ag كذلك اظهرت نتائج عالية لمعيار الاضداد وذلك لان مستضد متعدد السكريد المحفزي الـ Vi Ag هو لقاح ناجح لوحده كما ذكرت الدراسات لكن أيضا كان استخدامه ناجحاً عند ربطه مع حامل بروتيني كسم الدفتيريا Diphtheria Toxin او توكسيد الكزاز Tetanus Toxoid الذي اظهر مناعة اكثر مما هي عليه عند استخدام مستضد متعدد السكريد المحفزي (Vi Ag) لوحده . و مؤخرا ، تم ترخيص لقاح (Vi-Tetanus Toxoid) لجميع الاعمار في الهند ، ويبدأ من الاعمار التي تزيد عن 3 أشهر من العمر وهذا الجيل الجديد من لقاح التيفوئيد يفتح حقبة جديدة في محاولات لمنع التيفوئيد والقضاء عليه (Szu ,2013). ونظرا لأهمية كل من المساعد المناعي الـ Chitosan والمساعد المناعي توكسيد الكزاز عند استخدامهما مع مستضد متعدد السكريد المحفزي الـ Vi Ag ودورهما في تحفيز الاستجابة المناعية لذلك تم ربطهما معا

في هذه الدراسة وتم كذلك ملاحظة زيادة في عيارية الاضداد عند استخدامهما معا وتم قياس الاضداد باستخدام فحص Passive haemagglutination . اذ ان ارتباط المستضد مع الضد النوعي سوف يؤدي الى تكوين معقد المستضد- الضد والذي يظهر بشكل كتل كبيرة يمكن ملاحظتها بالعين المجردة حيث ان مقلوب اعلى تخفيف يعطي نتيجة موجبة تمثل معيارية الاضداد (Reddy, 2010).

3-5- الاستجابة المناعية الخلوية Cellular immune response

1-3-5-1- العدد الكلي والتفريقي لكريات الدم البيض Total and Differential WBCs counts

تعتبر خلايا كريات الدم البيض من الخلايا التي تبدأ وظائفها بالعمل عند تحفيز الجهاز المناعي وتبدأ بالعمل عند كل من الاستجابة الأئية والاستجابة المكتسبة ، وتمتلك كريات الدم البيض وظائف مختلفة في الجهاز المناعي (Lydyard & Grossi, 1998). وبسبب الوظائف المناعية المختلفة التي تمتلكها كريات الدم البيض لذلك يمثل عد الكريات (العدد الكلي والتفريقي) عند حدوث الإصابة معياراً مهماً (Ad'hiah *et al.*, 2002) . حيث اظهرت نتائج التعداد الكلي كما في الشكل (4-6) زيادة في عدد كريات الدم البيض وخاصةً في مجموعة (T1) (21020 ± 891.85) التي تحتوي على مستضد الـ Vi Ag والمساعد المناعي الـ Chitosan وذلك لدور كل منهما في زيادة تنشيط خلايا الدم البيض والتي منها الخلايا للمفاوية وهي الخلايا التي تعتبر مركز الاستجابة المناعية المتخصصة التي تعطي للجهاز المناعي القدرة على التمييز بين الذات وغير الذات وتقسّم الخلايا للمفاوية الى مجموعتين رئيسيتين من الخلايا هما الخلايا للمفاوية البائية (Bcell) والخلايا للمفاوية التائية (Tcell) وفي عام 1950 تم التعرف على الخلايا للمفاوية المسؤولة عن كل من المناعة الخاطية و الخلوية عندما تم تطوير عمليات زرع الانسجة (Kindt *et al.*, 2007) وتم التأكد من ان الخلايا للمفاوية زادت في هذه المجموعة (T1) عند اجراء العدد التفريقي لكريات الدم البيض فقد اظهرت نتائج الخلايا للمفاوية نسباً مرتفعة في مجموعة (T1) (79.2 ± 2.7) مقارنةً مع المجاميع الاخرى وايضا يعود سبب الارتفاع الى زيادة الانواع الاخرى من كريات الدم البيض المتمثلة بخلايا العدلة والحمضة وحيدة النواة وذلك لدور كل من المستضد والمساعد المناعي الـ Chitosan في تحفيز الاستجابة المناعية كما في دراسة (Usami *et al.*, 1988) و دراسة (AL-Shibbani, 2014) التي بين دور الـ Chitosan في زيادة عدد كريات الدم البيض.

كذلك تم ملاحظة زيادة واضحة بعدد كريات الدم البيض في مجموعة (T3) (10740 ± 980.61) التي تحتوي على مستضد الـ Vi Ag و توكسيد الكزاز TT و قد يعود ذلك الى دور كل من المستضد و التوكسيد في تحفيز الخلايا للمفاوية (T&B cell) والخلايا الاخرى التي تتضمن العدلة والحمضة ووحيدة النواة كما في دراسة (Venkatesan , 2012) التي استخدم مستضد متعدد السكريد وتحميله على توكسيد الكزاز كلقاح بعد ذلك تم حقنه في الحيوانات المختبرية لقياس العد الكلي لكريات الدم البيض حيث لاحظ زيادة معنوة في عدد كريات الدم البيض في المجاميع المعاملة .

كذلك لوحظت زيادة بعدد كريات الدم البيض في مجموعة (T2) (9980 ± 572.18) التي تحتوي على مستضد الـ Vi Ag لوحده وذلك لقدرة المستضد في تحفيز الجهاز المناعي عن طريق تحفيز خلايا الدم البيض وخاصةً العدلة حيث تم ملاحظتها عند عد خلايا العدلة حيث كانت مرتفعة جدا مقارنةً مع المجاميع الاخرى وايضا قد يعود السبب الى تحفيز الخلايا للمفاوية (B cell) التي يعمل مستضد الـ Vi Ag على تنشيطها لأنه يعود الى المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية TI التي بدورها تعمل على تنشيط مباشر لخلايا B cell كما في دراسة (Marshall et al.,2012) التي بينت ان التطعيم بمستضد متعدد السكريد النقي يعطي حماية ضد حمى التيفوئيد و بالرغم من ان آلية فعاليته ليست محددة بوضوح ، كذلك بينت نتائج التطعيم بلقاح متعدد السكريد المحفظي (Vi-CPS) انه يعمل بسرعة على حث توليد خلايا B1b cells لذلك ظهرت الخلايا مرتفعة عند عدها وايضا تم ملاحظة زيادة في الخلايا للمفاوية في طحال الفئران مقارنةً مع السيطرة عند عدها في دراسة (Fiorino et al.,2012) .

من خلال النتائج اعلاه واهمية كل من المساعدات فقد تم ايضا ربط المساعدات مع المستضد وايضا تم ملاحظة زيادة واضحة في عدد كريات الدم البيض وخاصةً الخلايا للمفاوية التي عمل كل من الـ Chitosan و التوكسيد في زيادتها بالإضافة الى اهمية المستضد حيث تم ملاحظة اهمية الـ Chitosan في تحفيز كل من المناعة الخلوية و الخلطية ويحفز التوازن بين استجابة Th1/Th2 بسبب تمثل الخلايا للمفاوية في الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية اللذان يعتبران ذراع المناعة المتخصصة (Kramer, 2003). كما بينت نتائج دراسة (Wen et al.,2011) الى ان المساعد المناعي الـ Chitosan له إمكانيات قوية لزيادة كل من الاستجابة المناعية الخلوية و الخلطية وأثارت توازن استجابة Th2 / Th1، وبالتالي يؤدي الى زيادة في اعداد الخلايا للمفاوية ، ونتيجة لما اظهرت النتائج من اهمية الـ Chitosan كمساعد مناعي آمن وفعال ومناسب لطيف واسع من اللقاحات الوقائية والعلاجية فقد رشحا للاستخدام كمساعد

مع اللقاحات . وايضا يلعب الـChitosan دوراً مهماً في تنشيط الخلايا المناعية (وحييدات الخلية والبلاعم الكبيرة و العدلات والخلايا النجمية وخلايا الذاكرة) عند موقع الإصابة او الالتهاب (inflammation) (Iwasaki & Medzhitov, 2012; Kaiko *et al.*,2008) . وايضا يلعب التوكسيد دوراً مهماً في تحفيز الاستجابة المناعية لأنه من المستضدات البروتينية التي تعود الى المستضدات المعتمدة على الخلايا التائية (TD) التي يبدأ تفاعلها مع خلايا تقديم المستضد (APC) مثل الخلايا النجمية dendritic cells والبلاعم الكبيرة والخلايا البائية Bcell والمستضدات البروتينية عندما تندمج مع خلايا تقديم المستضد فان خلايا التقديم تعالجها وتحولها الى جزيئات بيتيدية صغيرة التي بعد ذلك تقدمها الى الخلايا للمفاوية التائية T lymphocytes التي تكون مرتبطة مع معقد النسيج التوافقي النوع الثاني (MHC-II) وبعد تفاعلها مع الخلايا التائية T cell تعمل الخلايا التائية على تحفز الخلايا البائية B cell على التمايز إلى خلايا البلازما وخلايا الذاكرة memory B cells وتكون عكس مستضدات TI التي تحفز الخلايا البائية مباشرةً و لا تكون خلايا الذاكرة ، و مستضدات TD تعزز الاستجابة المناعية طويلة الامد (Avci & Kasper,2010 ; Guttormsen *et al.*,1999) .

4-5-التحليل الجزيئي Molecular Analysis

تم قياس التعبير الجيني لجينات CD25 وCD29 وذلك لكونهما من معلمات التحفيز المناعي (activation markers) وكذلك للتحري عن دور الخلايا التائية المنظمة (Treg) . عند بدء الاستجابة المناعية سوف تنشيط خلايا CD4+Tcell التي بدورها تنقسم الى خلايا للمفاوية المساعدة Th والخلايا التائية المنظمة Treg التي تعبر عن CD4,CD25,Foxp3 (Corthay,2009). والخلايا التائية المنظمة Treg تشكل حوالي 1-2 % من الخلايا الدم وحيدة النواة (PBMC) وتمتلك خصائص تجعلها قادرة على تثبيط توليد الخلايا التائية T في المختبر (Baecher-Allan *et al.*,2001) وتمتلك خلايا T reg خصائص تجعلها تعمل بالتعبير عن IL-2Rα (CD25) بمستويات عالية (Sakaguchi *et al.*,1995; Miyao *et al.*,2012) اما CD29 فله دور في التصاق الخلايا cell adhesion كذلك يساعد في هجرة الخلايا خلال توليد خلايا Tcell وموت الخلايا المبرمج apoptosis والتئام الجروح wound healing (Ip *et al.* ,2007) كذلك يلتصق بخلايا العدلات ويعبر عن كل من خلايا الدم البيض (Rüster *et al.* ,2006 ; Haubst *et al.*, 2006) .

1-4-5- قياس التعبير الجيني لـ CD25 marker

أظهرت النتائج كما موضح في الشكل (4-14) وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني في مجموعة المعاملات ومجموعة السيطرة، حيث بينت نتائج التعبير الجيني زيادة بالتعبير عن جين CD25 marker في مجموعة (T4) (5.1936 ± 2.17) المعاملة بمستضد متعدد السكريد المحفزي (Vi Ag) والمساعد المناعي الـ Chitosan والمساعد المناعي توكسيد الكزاز Tetanus Toxoid مقارنة مع مجموعة السيطرة والمجاميع الأخرى وهذه الزيادة ربما تعود إلى دور كل منهما في تحفيز الاستجابة المناعية وبالتالي زيادة في التعبير عن CD25 والـ CD25 هو أحد مكونات مستقبل الـ IL-2 الذي يكون مهماً في توليد خلايا T cell وتنشيط وتحفيز كل من خلايا الـ T-Reg و الـ T-eff (Brusko et al.,2009). وخلايا الـ T-Reg تلعب دور أساسي في تنظيم الاستجابة المناعية وأغلب الـ T-Reg التي بينت هي الـ CD25+ (CD4+CD25+Foxp3+) ، وثبت أن التحفيز يتطلب تحفيز المستقبلات الأمثل لخلايا الـ T cell و السيتوكينات ذات الصلة (Horwitz et al.,2008) .

كذلك تم ملاحظة زيادة في التعبير الجيني لـ CD25 في مجموعة (T3) (4.4739 ± 1) المعاملة بمستضد الـ ViAg و توكسيد الكزاز وذلك لأهمية كل من توكسيد الكزاز في زيادة التعبير عن CD25 على الخلايا اللمفاوية ، وتحفيز استجابة Th1 التي بدورها تحفز تنشيط الـ IL-2 و تعتبر من الخلايا التائية المساعدة التي بدورها تزيد التعبير عن CD25 (Livingston et al.,2011) ، ومستضد الـ ViAg يعود إلى المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية (TI) التي بدورها تحفز الخلايا البائية Bcell مباشرةً وهذه الخلايا تحمل على سطحها الـ CD25 لذلك عند قياس مستوى التعبير الجيني في المجاميع التي تحتوي على مستضد الـ ViAg تم ملاحظة ارتفاع في نتائج قياس التعبير الجيني لـ CD25 ، والخلايا البائية تعبر عن CD25 وتفرز مستويات أعلى من IL-6 ، IL-10 و INFC كرد على مختلف مستقبلات TLR ، لذلك تم ملاحظة تنشيط عالي لجين CD25 (Amu et al.,2010) .

سجلت نتائج الدراسة الحالية زيادة في التعبير الجيني لـ CD25 في مجموعة (T1) (2.5604 ± 0.64) التي تحتوي على مستضد الـ ViAg والمساعد المناعي الـ Chitosan وذلك لأهمية كل منهما في زيادة تنشيط CD25 وتتمثل أهمية استخدام المساعد المناعي Chitosan في صنع اللقاحات ضد العديد من الأمراض و كونه أيضاً غير سام ، مثل لقاح الحمض النووي المحملة على جسيمات النانو Chitosan ضد سرطان الثدي التي حقن في الفئران حيث أظهرت

نتائج هذا اللقاح زيادة في تنشيط الخلايا للمفاوية التائية السامة (cytotoxic) ($CD3+/CD8+/CD25+$) عندما تمت معاملتها بحامض alginic acid المحمل على حبيبات النانو chitosan وكذلك بينت حبيبات النانو chitosan المرتبطة مع حمض الألجنيك (alginic acid) بانها تكون امنة وفعالة و تحسنه ردت فعل المناعة الأنية (Liu *et al.*,2013). وايضا أظهرت حبيبات النانو الـ Chitosan المقترنة مع لقاح الأنفلونزا المعطل زيادة في تنشيط الخلايا السامة للطحال (NK&T-lymphocytes) وتعزز تنشيط توليد الخلايا للمفاوية وحيدة النواة (mononuclear) في الطحال. وعلاوة على ذلك، فقد بينت زيادة في عدد $CD3$, NK وخلايا T-CD25 زادت أيضا التي نتحرى عن جين تعبيرها. ويرى الباحثون أن Chitosan ينشط مناعة الخلايا لأنه يعمل على زيادة تنشيط توليدها، والذي يبدأ من خلال مستقبلات TCR-CD3 وكذلك من إشارات تفعيلها التي ترتبط مع مستقبلات (lectin receptors) (Ghendon *et al.*,2009 ; Heidkamp *et al.*,2001).

2-4-5- قياس التعبير الجيني لـ CD29 marker

أظهرت النتائج كما في الشكل (4-15) وجود فروقات واضحة في مستويات التعبير الجيني لـ CD29 في مجموعة المعاملات ومجموعة السيطرة، حيث بينت نتائج التعبير الجيني زيادة بالتعبير عن جين CD29 في حيوانات المجموعة (T3) (162.3256 ± 89.52) المعاملة بمستضد متعدد السكريد المحفزي (ViAg) والمساعد المناعي توكسيد الكزاز (Tetanus Toxoid) مقارنة مع المجموع الأخرى ومجموعة السيطرة، و ان CD29 وهو احد مستقبلات عائلة الانتغرين (Integrin) التي تتألف من سلسلتين هما α و β وسلسلة β_1 هي CD29 التي ترتبط مع ببتيدات متعددة polypeptides ويوجد ملتصق على الخلايا وله دور في الاستجابة المناعية (Wu *et al.*,2010)، ودور توكسيد الكزاز كحامل للمستضد ويعمل محفزاً مهماً في الاستجابة المناعية و تنشيط الخلايا للمفاوية المساعدة الـ Th التي لها دور في الاستجابة المناعية وتحمل على سطحها خلايا CD4+T التي بدورها تقسم الى مجموعتين، مجموعة خلايا الذاكرة وخلايا (naive T cell) وهي خلية فرعية يتم على اساسها التعبير عن كل من (CD45 isoforms) و (CD29/integrin beta1 subunit) (Kobayashi *et al.*,2004)، ويوجد كذلك دور لمستضد متعدد السكريد دوراً في زيادة تعبير CD29 لان متعدد السكريد يعود الى المستضدات الغير معتمدة على الخلايا التائية (TI) وبالتالي يحفز خلايا B cell التي يلتصق على سطحها مستقبل CD29.

كذلك تم ملاحظة زيادة في المجاميع التي تحتوي على المساعد المناعي الـ Chitosan دور حبيبات النانو الـ Chitosan في تنشيط الـ CD29 وذلك لان الـ Chitosan يساعد في انتاج Th1 (IL-2 and IFN- γ) وانتاج Th2 (IL-4, IL-5, IL-9 and IL-13) لذلك تم ملاحظة الزيادة في التعبير عن جين CD29 لأنه يعمل كمستقبل التصاق على سطوح الخلايا المناعية المحفزة اثناء التلقيح او الاصابة (Wu et al., 2006).

كذلك تم ملاحظة زيادة في التعبير الجيني لـ CD29 في المجاميع الاخرى التي سواء تحتوي على مستضد متعدد السكري لوحدته او مع الـ Chitosan او مع توكسيد الكزاز وذلك لدور كل منهما في تحفيز الاستجابة المناعية وبالتالي تحفيز الخلايا المناعية التي يلتصق بها CD29 .

5-5- المقاطع النسيجة

في هذه الدراسة ، تم دراسة المقاطع النسيجة المتمثلة بالطحال (Spleen) والغدة الزعترية (Thymus gland) التي ظهرت تغيرات نسيجية في كل منهما اعتماداً على المستضدات المستخدمة .

حيث أظهرت نتائج الدراسة نشاطاً ملحوظاً في العقد اللمفاوية في الطحال والغدة الزعترية شملت زيادة في حجم العقد اللمفاوية بالإضافة إلى الأعداد المتزايدة من هذه العقد وذلك قد يعود الى مستضد متعدد السكريد والمساعدات المناعية التي هي توكسيد الكزاز وحبيبات النانو الـ Chitosan حيث تعمل هذه الحبيبات مع المستضد على تحفيز خلايا Th-1 التي بدورها تحفز الخلايا البلعمية التي تتضمن البلاعم الكبيرة والخلايا اللمفاوية والعدلة التي يؤدي تنشيطها الى توسيع وزيادة العقيدات اللمفاوية وتعتبر العقيدات اللمفاوية جزءاً مهماً جداً من جهاز المناعة وتسمى المكونات الثانوية للجهاز المناعي وفيها يتم التخصص للخلايا اللمفاوية من خلال وجود تفاعل بين الخلايا اللمفاوية مع خلايا APC التي تقوم بالتعامل مع المستضد الغريب المار مع اللمف للعقيدات اللمفاوية الامر الذي يؤدي لزيادة حجم ونشاط هذه العقيدات الذي يعود الى التغيرات الخلوية النشطة في التفاعل كما في دراسة (AL-Shibbani & Alkhozai , 2015) التي لاحظ فيها زيادة في العقد اللمفاوية عند استخدام حبيبات النانو الـ Chitosan .

عند استخدام توكسيد الكزاز تم ملاحظة زيادة في العقد اللمفاوية وذلك لان توكسيد الكزاز يعود المستضدات البروتينية التي تحفز الخلايا اللمفاوية والبلاعم الكبيرة والعدلات . كذلك عند استخدام مستضد متعدد السكريد Vi Ag سواء لوحدته او مع المساعدات تم ملاحظة زيادة في

العقد اللمفاوية وذلك لدوره في زيادة اعداد كريات الدم البيض كما في دراسة (Al-Ammar , 2006) الذي لاحظ زيادة في العقد اللمفاوية في الطحال عند حقن مستضد متعدد السكريد Vi Ag في حيوانات التجربة .

6 - الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendations

6-1- الاستنتاجات :

- 1- يمثل الـ ViAg مستضداً مهماً لبكتريا *S.typhi* المتوطنة في العراق .
- 2- استخدام حوامل المستضد مثل حبيبات النانو Chitosan و توكسيد الكزاز تحفز الاستجابة المناعية الخلطية والخلوية في الجرذان ، مثل ارتفاع عيارية الاضداد والعد الكلي لكريات الدم البيض (Total WBCs) والنسب المئوية للخلايا اللمفاوية .
- 3- امكانية استخدام مستضد متعدد السكريد ViAg مع حبيبات النانو Chitosan وتوكسيد الكزاز Tetanus Toxoid في تحفيز الاستجابة المناعية وخاصةً عند قياس التعبير الجيني لجين CD25 بواسطة RT-qPCR .
- 4- استخدام مستضد متعدد السكريد ViAg مع توكسيد الكزاز Tetanus Toxoid يؤدي الى تحفيز الاستجابة المناعية وخاصةً عند قياس التعبير الجيني لجين CD29 بواسطة RT-qPCR .
- 5- ان استخدام اللقاح المحمل أدى الى زيادة واضحة في النشاط المناعي النسيجي في الطحال و الغدة الزعترية .

6-2- التوصيات :

- 1- التوجه نحو تصنيع اللقاحات في العراق نظراً للكلف العالية في استيرادها و لتوفر الكوادر العلمية المتمكنة .
- 2- استخدام لقاحات الوحدات الثانوية مع حوامل اللقاح يمثل خطوة مهمة باتجاه تحضير لقاح فاعل وأمن .
- 3- توجيه الدراسات البحثية نحو إنتاج لقاحات حديثة أخرى تلبي احتياجات البلد .

7- المصادر Reference

- Abbas, A. K. and Lichtman , A. H.** (2005). Cellular and Molecular Immunology, *Elsevier Saunders*. London.
- Ad'hiah , A. H.; Al-Kashaly , S. S. and Abbas, T. A. A.** (2002). Group A streptococcus (*Streptococcus pygoenes*) and the mitotic activity of lymphoid organs in albino mice. *The Eight Scientific Conferences of the Technical Education Committee* .302-208.
- Al-Ali, A.; Alkhawajah, A; Randhawa, M.A. and Shaikh, N.A.**(2008).Oral and intraperitoneal LD50 of thymoquinone , an active principle of *Nigella sativa*, in mice and rats. *J Ayub Med Coll Abbotabad*. **20**(2):25–7.
- Al-Ammar, M. H. M.** (2006).Some Aspects of Specific Immunity For *Salmonella typhi* In Typhoid Patients and Rabbits. Ph.D. thesis in Biology /Microbiology. Babylon University.
- Allen, D.C. and Cameron, R.I.**(2004). Histopathology specimen. Clinical, Pathological and Laboratory Aspects. Spring–Vela London Limited .
- AL-Shibbani , L. B.O. and Alkhozai , Z. M. F.** (2015). Histopathological and Lymphoproliferative effects for some experimental nanovaccines prepared from some bacteria. *journal of al-qadisiyah for pure science(quarterly)*.
- AL-Shibbani , L. I. O.**(2014).The Immunogenicity of Lipopolysaccharide extracted from a certain Pathogenic Bacteria in White Rats. Master of Science in Biology / Microbiology. Al-Qadisiya University

- Amu , S.; Gjertsson , I. and Brisslert , M.** (2010). Functional Characterization of Murine CD25 Expressing B Cells. *Scand J Immunol.* **71**(4):275-282 .
- Anwar , E. ; Goldberg , E . ; Fraser , A.; Acosta , C. J.; Paul , M. ; Leibovici , L.** (2014) .Vaccines for preventing typhoid fever. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, **1**: CD001261.
- Askari , J. A . ; Tynan , C. J; Webb, S. E. D. ; Martin-Fernandez , M. L; Ballestrem , C. and Humphries, M.J.** (2010). Focal adhesions are sites of integrin extension. *J Cell Biol.* **188**:891–903.
- Astronomo , R. D. and Burton , D. R.**(2010). Carbohydrate vaccines: Developing sweet solutions to sticky situations? *Nat Rev Drug Discov.* **9**:308–324.
- Avci , F. Y and Kasper, D. L.**(2010) How Bacterial Carbohydrates Influence the Adaptive Immune System. *Annu Rev Immunol.* **28**:107-130.
- Baecher-Allan , C. ; Brown , J. A. ; Freeman , G. J. and Hafler , D. A.** (2001). CD4 + CD25 high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol .* **167**:1245-1253.
- Baker, C. J.; Rench ,M. A. and McInnes ,P.**(2003). Immunization of pregnant women with group B streptococcal type III capsular polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. *Vaccine .* **21**(24):3468-3472.
- Baker, E. E.; Whiteside, R. E.; Basch, R. and Derow, M. A.** (1959). The Vi antigen of the *Enterobacteriaceae*. 11. Immunologic and biologic properties. *J Immunol* **83**: 680-686.

- Barouch , D. H.** (2000). Control of viremia and prevention of clinical AIDS in rhesus monkeys by cytokine-augmented DNA vaccination. *Science*. **290**:486–492.
- Bhoj ,V.G.** (2008) .MAVS and MyD88 are essential for innate immunity but not cytotoxic T lymphocyte response against respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*;**105**:14046–14051.
- Birkhead , G. S ; Morse , D. L. ; Levine , W. C. ; Fudala , J. K. ; Kondracki , S. F.; Chang, H. ; Shayegani , M.; Novick , L. and Blake, P. A.** (1993) . Typhoid fever at a resort hotel in New York: a large outbreak with an unusual vehicle. *J Infect Dis*,**167**:1228-1232.
- Bishop , M. C. ; Dben-VonLaufer , J. L. ; Fody , E.P. and Thirty three contributors.** (1985). *Clinical Chemistry Principles, Procedures and Correlations*. The Murray Printing company. Philadelphia ,USA. 181-182.
- Bolhassani , A . ; Safaiyan , S. and Rafati , S.** (2011) . Improvement of different vaccine delivery systems for cancer therapy. *Mol Cancer*. **10**:3.
- Borchard , G.** (2001) . Chitosans for gene delivery. *Adv Drug Deli Rev*. **52**(2): 145–150.
- Bottone , E. J. ; Patel , L. ; Patel , P. and Robin , T.** (1998). Mucoïd encapsulated *Enterococcus faecalis* an emerging morphotype isolated from patients with urinary tract infections. *Diagn Microbiol Infect Dis*. **31**: 429-430.
- Boyden , S.V.** (1951). Fixation of bacterial products by erythrocytes treated with tannic acid and subsequent haemagglutination by antiprotein sera. *J. Exp Med*. **93**:107.

- Breau , M. A. , Pietri , T. ; Eder , O. ; Blanche , M . ; Brakebusch , C . ; Fassler , R . ; Thiery , J. P. ; Dufour , S. (2006).** Lack of $\beta 1$ integrins in enteric neural crest cells leads to a Hirschsprung-like phenotype. *Development* . **133**: 1725–1734.
- Broz , P. ; Ohlson , M. B. and Monack , D. M.(2012).** Innate immune response to *Salmonella typhimurium* , a model enteric pathogen. *Gut Microbes* , **3**(2): 62–70.
- Brusko , T. M . ; Wasserfall , C. H.; Hulme , M. A. ; Cabrera , R . ; Schatz , D. and Atkinson, M. A. (2009)** Influence of Membrane CD25 Stability on T Lymphocyte Activity: Implications for Immunoregulation. *PLOS ONE*. **4**(11): e7980.
- Byron , A. ; Humphries , J. D. ; Askari , J. A. ; Craig , S. E. ; Mould , A. P. ; Humphries , M . J. (2009).** Anti-integrin monoclonal antibodies. *J Cell Sci.***122**:4009–4011.
- Chan , J. K . C.; NG, C. S. and HUI , P. K. (1988).** A simple guide to the terminology and application of leucocyte monoclonal antibodies. *Histopathology*. **12**: 461–480.
- Chen , Y. L. (2008).** Preparation and Characterization of Water Soluble Chitosan Gel for Skin Hydration. MPH Thesis, University Sains Malaysia, 1-181.
- Collee , J. G. ; Fraser, A. G.; Marmiom , B. P. and Simmon , A. (1996).** Mackie and McCartney , Practical Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone inc. ; U.S.A.
- Corthay , A.(2009).** How do Regulatory T Cells Work? *Scand J Immunol*. **70**(4): 326–336.

- Cox , J. C. and Coulter , A. R.** (1997) Adjuvants—a classification and review of their modes of action. *Vaccine* .**15**: 248–256.
- Curotto de Lafaille , M. A. and Lafaille , J. J.** (2009). Natural and adaptive foxp3+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. **30**(5): 626-635.
- Curtiss , R. III.** (2002). Bacterial infectious disease control by vaccine development. *J. Clin. Invest.* **110**: 1061-1066.
- Daniel , M. D. ; Kirchoff , F. ; Czajak , S. C. ; Sehgal , P. K. and Desrosiers , R. C.** (1992). Protective effects of a live attenuated SIV vaccine with a deletion in the *nef* gene. *Science*. **258**:1938–1941.
- Diamond , M. and Springer, T.** (1994) . The dynamic regulation of integrin adhesiveness. *Curr Biol* .**4**:506–517.
- Dubois , N. ; Gilles , K. A. ; Hamilton , J. K. ; Rebers , P. A. and Smith , F.** (1956). Colorimetric method for detection of sugars and related substances. *Anal Chem*. **28**: 350-356.
- Eisel , U . ; Jarausch , W. ; Goretzki , K. ; Henschen , A., Engels , J. ; Weller , U. ; Hudel , M. ; Habermann , E. and Niemann , H.** (1986). Tetanus toxin: Primary structure, expression in *E. coli*, and homology with botulinum toxins. *EMBO J.* **5**: 2495–2502.
- Esposito , V. M. and Feeley , J. C.** (1970). Isolation of Vi Antigen from *Escherichia coli* by a New Method . *Infect Immun.***1**(1) : 69-73
- Ewing , W. H.** (1986). Differentiation of Enterobacteriaceae by biochemical reactions. In Edwards and Ewing's identification of the Enterobacteriaceae , 4th ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York, N.Y. 47–72.

- Ezaki , T. ; Kawamura , Y. and Yabuuchi , E.** (2000). Recognition of nomenclatural standing of *Salmonella typhi* (Approved Lists 1980) , *S. enteritidis* (Approved Lists 1980) and *S. typhimurium* (Approved Lists 1980), and conservation of the specific epithets *enteritidis* and *typhimurium*. Request for an opinion. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**: 945–947.
- Felix , A. and Pitt , R. M.** (1936). The Vi antigens of various *Salmonella* types. *Br J Exp Patbof* **17**: 81-86.
- Fiore , A. E. ; Bridges , C. B. and Cox , N. J.** (2009). Seasonal influenza vaccines. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **333**: 43–82.
- Fiorino , F. ; Ciabattini , A. ; Rondinib , S. ; Pozzia , G. ; Martinb , L. B. and Medaglinia , D.** (2012). Immunization with the conjugate vaccine Vi-CRM197 against *Salmonella Typhi* induces Vi-specific mucosal and systemic immune responses in mice. *Vaccine* . (**30**): 6111– 6114.
- Forbes , B. A. ; Sahm , D. F. and Weisfeld , A. S.** (2007). Baily and Soott’ Diagnostic Microbiology, 12th ed., 1031, Mosby-Elsevier.
- Fuchs , B. C. ; Fujii , T. ; Dorfman , J. D. ; Goodwin , J. M. ; Zhu , A. X. ; Lanuti , M. ; Tanabe, K. K.** (2008) . Epithelial-to-mesenchymal transition and integrin-linked kinase mediate sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibition in human hepatoma cells. *Cancer Res.* **68**(7):2391–2399.
- Gan , Q. ; Wang ,T. ; Cochrane , C. and McCarron , P.** (2005). Modulation of surface charge, particle size and morphological properties of chitosan-TPP nanoparticles intended for gene delivery. *Colloids Surf B Biointerfaces.* **44**(2-3):65-73.

- Garmory , H. S. ; Brown , K. A. and Titball , R. W. (2002) .***Salmonella* vaccines for use in humans: present and future perspectives. *FEMS Microbiol Rev.* **26**(4):339–353.
- Germain , R. N. and Miller , M. J . (2006).** Dynamic imaging of the immune system: Progress, pitfalls and promise. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:497.
- Germanier , R. and Fürer , E. (1983).** Characteristics of the attenuated oral vaccine strain *S. typhi* Ty21a. *Develop. Biol. Standard* **53**: 3–7.
- Germanier , R. and Furer , E. (1975).** Isolation and characterization of Gal E mutant Ty21a of *Salmonella typhi*: a candidate strain for a live typhoid vaccine. *J. Infect. Dis.* **141**:553–558.
- Ghendon ,Y.; Markushin, S.; Vasiliev, Y.; Alkopova , I.; Koptiaeva , I.; Krivtsov , G.; Borisova , O.; Ahmatova , N.; Kurbatova , E.; Mazurina , S. and Gervazieva , V.(2009).** Evaluation of properties of chitosan as an adjuvant for inactivated influenza vaccines administered parenterally . *J Med Virol.* **81**(3) : 494–506.
- Gillespie , S. H. and Hawkey , P.M. (2006).** Principles and practice of clinical Bacteriology. 2nd ed . John wiley and Sons , Ltd .
- Guttormsen , H. K. ; Sharpe , A. H. ; Chandraker , A. K. ; Brigtsen , A. K. ; Sayegh , M. H. and Kasper , D. L. (1999) .**Cognate stimulatory B-Cell-T-Cell interactions are critical for T cell help recruited by glycoconjugate vaccines. *Infect Immun.* **67**:6375-6384.
- Guzman , C. A. ; Borsutzky , S. and Griot-Wenk , M. (2006).** Vaccines against typhoid fever. *Vaccine.* **24**:3804 –3811.
- Haen , P. J. (1995).** Principles of Hematology. Edited by L. H. Young and W. B. Publisher, London. 310 – 325.

- Hall , P. E. ; Lathia , J. D. ; Miller , N. G. ; Caldwell , M. A. ; French-Constant , C.**(2006). Integrins are markers of human neural stem cells. *Stem Cells*. **24**(9):2078–2084.
- Halpern , J. L. and Ofthus , A. L.** (1993). Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin. *J Biol Chem*. **268**: 11188–11192.
- Harding , S. E. ; Abdelhameed , A. S.; Morris , G. A. ; Adams , G. ; Laloux , O. ; Cerny , L. ; Bonnierc , B. ; Duvivierc , P. ; Conrathc , K. and Lenfant , C.** (2012). Solution properties of capsular polysaccharides from *Streptococcus pneumoniae*. *Carbohydr Polym*. **90**: 237–242.
- Haubst , N. ; Georges-Labouesse , E. ; De Arcangelis , A. ; Mayer , U. and Götz , M.** (2006). Basement membrane attachment is dispensable for radial glial cell fate and for proliferation, but affects positioning of neuronal subtypes. *Development* .**133**(16):3245-54.
- Hayase , H. ; Ishizu , A. ; Ikeda , H. ; Miyatake , Y. ; Baba , T. ; Higuchi , M. ; Abe , A. ; Tomaru , U. and Yoshiki , T.** (2005). Aberrant gene expression by CD25⁺CD4⁺ immunoregulatory T cells in autoimmune-prone rats carrying the human T cell leukemia virus type-I gene. *Int Immunol*.**17** (6):677-684.
- Heidkamp , M. C. ; Bayer , A. L. ; Martin , J. L. and Samarel , A. M.** (2001). Differential activation of mitogen-activated protein kinase cascades and apoptosis by protein kinase C epsilon and delta inneonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res*. **89**(10) : 882–890.
- Holmgren , J. and Czerkinsky , C.** (2005). Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med*. **11**(4): 45–53.

- Holt , K. E. ; Dutta , S. ; Manna , B. ; Bhattacharya , S. K. ; Bhaduri , B. ; Pickard , D. J. ; Ochiai , R. L.; Ali , M. ; Clemens , J. D. and Dougan , G. (2012).** High-Resolution Genotyping of the Endemic *Salmonella Typhi* Population during a Vi (Typhoid) Vaccination Trial in Kolkata. *PLOS Negl Trop Dis* .**6**(1): e1490.
- Hornick , R. B. (1977).** Typhoid Fever in Infection Diseases. Edited by B. D, Hoeprich. Cambridge. New York., 562-569.
- Horwitz , D. A.; Zheng , S. G.; and Gray, J.D. (2008).** Natural and TGF- β -induced Foxp3⁺CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells are not mirror images of each other. *Trends Immunol.* **29**(9) : 429–435.
- Huang , K. S.; Wu , W. J. ; Chen , J. B. and Lian , H. S. (2008).** Application of low-molecular weight chitosan in durable press finishing. *Carbohydr Polym.* **73**: 254–260.
- Hynes , R. (2002)** Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* **110**:673–687.
- Il'ina , A. V. and Varlamov , V. P. (2005)** Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review. *Appl Biochem Microbiol.* **41**(1):5-11.
- Illum , L. ; Jabbal-Gill , I. ; Hinchcliffe , M. ; Fisher, A. N. and Davis, S. S. (2001).** Chitosan as a novel nasal delivery system for vaccines. *Adv. Drug Deli. Rev.* **51**(1–3): 81–96.
- Ip , J. E. ; Wu , Y. ; Huang , J. ; Zhang , L. ; Pratt , R. E. and Dzau , V. J. (2007).** Mesenchymal Stem Cells Use Integrin β 1 Not CXC Chemokine Receptor 4 for Myocardial Migration and Engraftment. *Mol Biol Cell.* **18**(8): 2873–2882.

- Isenberg and Garcia (ed.).** (2004) (updated, 2007). Clinical microbiology procedures handbook, 2nd ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Iwasaki , A. and Medzhitov , R.**(2012). Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. **327**:291–295.
- Jayakumar , R. ; Nwe , N. ; Tokura , S. and Tamura, H.** (2007) . Sulfated chitin and chitosan as novel biomaterials. *Int J Biol Macromol*. **40**(3):175–181.
- Jones , C.** (2005) : Vaccines based on the cell surface carbohydrates of pathogenic bacteria. *An Acad Bras Cienc.*, **77**(2): 293-324.
- Jordan , M. S. ; Boesteanu , A. ; Reed , A. J. ; Petrone , A. L. ; Hohenbeck , A. E. ; Lerman , M. A. ; Naji , A. and Caton , A. J.** (2001) .Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* . **2**:301–306.
- Judicial Commission of the International Committee on Systematics of Prokaryotes (JCICSP)** (2005). The type species of the genus *Salmonella* Lignieres 1900 is *Salmonella enterica* (ex Kauffmann and Edwards 1952) Le Minor and Popoff 1987, with the type strain LT2T, and conservation of the epithet *enterica* in *Salmonella enterica* over all earlier epithets that may be applied to this species. Opinion 80. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**:519–520
- Kaiko , G. ; Horvat , J. and Beagley , K.** (2008). Immunological decision making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunol*. **123**(3):326–338.

- Kaur , J. and Jain , S. K.** (2012) .Role of antigens and virulence factors of *Salmonella enterica serovar Typhi* in its pathogenesis. *Microbiol Res.* **167**(4): 199– 210
- Kenney , R. T. and Edelman , R.** (2004). Adjuvants for the future. In *New Generation Vaccines* (Eds. Levine, M.M., Kaper, J.B., Rappuoli, R., Liu, M. & Good, M.F.) Marcel Dekker, Inc., New York. 213-223.
- Keusch , G. T.** (1998). Typhoid fever. In : Harrison’s Principle of Internal Medicine. Fauci, A.S., Branwald, E., Isselbacher, K.J., wilson, J.D., Martin, J.B., Kasper, D.L., Houser, S.L., Longo, D.L. (eds). 14th ed. McGraw-Hill Book Company., **1**: 951-954.
- Kindt , T. J.; Goldsy , R. A. and Osborne , B. A.** (2007). Kuby Immunology. Sixth Edition. W.H. Freeman, New York, 3.
- Klugman , K. P. ; Gilberson , I. T.; Koornhof , H. J.; Robbins , J. B. ; Schneerson , R. ; Schulz , D. ; Cadoz , M. and Armand, J.** (1987). Protective Activity of Vi- capsular polysaccharide vaccine Against typhoid fever .*The Lancet.***2**:1165-1169.
- Kobayashi , H. ; Hosono , O. ; Iwata , S. ; Kawasaki , H. ; Kuwana , M. ; Tanaka , H. ; Dang , N. H. and Morimoto , C.** (2004).The tetraspanin CD9 is preferentially expressed on the human CD4+CD45RA+ naive T cell population and is involved in T cell activation. *Clin Exp Immunol.***137**:101–108.
- Koneman , E. W. ; Allen, S. D. ; Janda , W. M. ; Schreckenberger , P. C. and Winn, W. C.** (1997) . Coloratlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. J. B. Lippincott company, New York.

- Kothari , N.; Genschmer , K. R.; Kothari , S. ; Kim , J. A. ; Briles , D. E. ; Rhee , D. K. and Carbis , R.**(2014). Preparation and testing of a Vi conjugate vaccine using pneumococcal surface protein A (PspA) from *Streptococcus pneumoniae* as the carrier protein. *Vaccine*. **14**: 01164-5.
- Kothari , S. ; Kothari , N. ; Kim , J. ; Lee , E. ; Kyung Yoon , Y. ; An , J. ; Jones , C. ; Choe , W. and Carbis , R.** (2013). A novel method for purification of Vi capsular polysaccharide produced by *Salmonella enterica subspecies enterica serovar Typhi*. *Vaccine*. **31** : 4714– 4719.
- Kramer , R. J.** (2003). Complete Blood Count. Internet: www.jci.org.
- Lastovicka , J.** (2013). The Phenotypic Markers of CD4+CD25+ T Regulatory Lymphocytes . *Res Immunol An International Journal*. 1-14.
- Latz , E. ; Franko , J. ; Golenbock , D. T. and Schreiber , J. R.** (2004). *Haemophilus influenzae* Type b Outer Membrane Protein Complex Glycoconjugate Vaccine Induces Cytokine Production by Engaging Human Toll-Like Receptor 2 (TLR2) and requires the Presence of TLR2 for Optimal Immunogenicity. *J. Immunol*. **172**:2431-2438.
- Lewis , S. M. ; Bain , B. J. and Bates , I.** (2001): Dacie and Lewis. Practical Haematology. 10th ed Churchill Living Stone, London. U.K.
- Lin , F. Y. ; Ho ,V. A. ; Khiem , H. B. ; Trach , D. D. ; Bay , P. V. ; Thanh , T. C. ; Kossaczka , Z. ; Bryla , D. A. ; Shiloach , J. ; Robbins , J. B. ; Schneerson , R. and Szu , S.C.** (2001): The Efficacy of a *Salmonella typhi* Vi Conjugate Vaccine in Two to Five Year Old Children. *N. Engl. J. Med.*, **344**: 1263-1269.

- Liu , Z.; Lv , D.; Liu , S.; Gong , J.; Wang , D. ; Xiong , M. ; Chen, X. ; Xiang, R. and Tan, X.** (2013) Alginic Acid-Coated Chitosan Nanoparticles Loaded with Legumain DNA Vaccine: Effect against Breast Cancer in Mice. *PLOS ONE*. **8**(4): e60190.
- Livak , K. J. and Schmittgen , T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* . **25** : 402-410.
- Livingston , K. ; Jiang , X. and Stephensen , C.** (2011) . CD4 T-helper cell cytokine phenotypes following tetanus toxoid immunization. *J Immunol*.186, 52.3.
- Lombard, M. ; Pastoret , P. P. and Moulin , A. M.** (2007). A brief history of vaccines and vaccination. *Rev Sci Tech*. **26** (1): 29–48.
- Lubben , M. V. D. ; Van Opdorp , F. A. C. ; Hengeveld , M. R. ; Onderwater , J. J. M. ; Koerten , H. K. ; Verhoef , J. C. ; Borchard , G. and Junginger , H. E.** (2002). Transport of Chitosan Nanoparticles for Mucosal Vaccine Delivery in a Human Intestinal M-cell Model. *J Drug Target*. **10**:449-456.
- Lydyard , P. and Grossi , C.** (1998). Cells involved in the immune response. In: Immunology, 5th ed., Edited by I. Roitt, J. Biostoff and D. Male. Mosby International Ltd.UK. 14-30.
- MacFaddin , J. F.** (2000). Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria 3rd ed. Lippincott Williams and Wilkins, U.S.A.
- MacFaddin , J.E.** (2004). Biochemical tests for identification of medical bacteria, 4th ed., Waverly press , Inc., Baltimore, U.S.A.

- Maloy , K. J. and Powrie , F.** (2001) . Regulatory T cells in the control of immune pathology. *Nat Immunol* . **2**:816–822.
- Marshall , J. L. ; Flores-Langarica , A. ; Kingsley, R. A. ; Hitchcock , J. R. ; Ross , E. A. ; Lopez-Macias , C. ; Lakey , J. ; Martin , L. B. ; Toellner , K. ; MacLennan , C. A. ; MacLennan , I. C. ; Henderson , I. R. ; Dougan , G. and Cunningham , A. F.**(2012). The Capsular Polysaccharide Vi from *Salmonella Typhi* Is a B1b Antigen. *J Immunol*. **189**(12): 5527–5532.
- Masotti , A. and Ortaggi , G.** (2009). Chitosan micro- and nanospheres : fabrication and applications for drug and DNA delivery. *Mini Rev Med Chem*. **9**(4):463–469.
- Maurice , J.** (2012) A first step in bringing typhoid fever out of the closet. *The Lancet*. **379**:699–700.
- Mazmanian , S. K. and Kasper , D. L.** (2006) . The love–hate relationship between bacterial polysaccharides and the host immune system . *Nat Rev Immunol*. **6**: 849-858.
- McDonald , J. H.** (2009). Handbook of Biological Statistics. 2nd ed., Sparky House Publishing, Baltimore, Maryland.
- Mendrick , D. L. and Kelly, D. M.** (1993). Temporal expression of VLA-2 and modulation of its ligand specificity by rat glomerular epithelial cells *in vitro*. *Lab Invest*. **72**:367-702.
- Miller , F. D.** (2007) . Riding the waves: Neural and nonneural origins for mesenchymal stem cells. *Cell Stem Cell*. **1**(2):129–130.
- Miller , L. C. and Tainter , M. L.** (1944). Estimation of LD50 and its error by means of log- probit graph paper. *Proc Soc Exp Bio Med*. **57**:261.

- Miyao , T. ; Floess , S. ; Setoguchi , R. ; Luche , H. ; Fehling , H. J. ; Waldmann , H. ; Huehn , J. and Hori , S. (2012) .** Plasticity of Foxp3(+) T cells reflects promiscuous Foxp3 expression in conventional T cells but not reprogramming of regulatory T cells. *Immunity* . **36**:262-275.
- Mohammad , A. D. ; Javad , S. ; Afshin , S. E.; Mohammad , B. and Soliman , M. (2011).** Nanovaccine for leishmaniasis: preparation of chitosan nanoparticles containing *Leishmania* superoxide dismutase and evaluation of its immunogenicity in BALB/c mice. *Int J Nano*. **6**: 835–842.
- Murray , P. J. and Wynn , T. A. (2011).** Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. **11**: 723-737.
- Naira , L. S. and Laurencin, C. T. (2007).** Biodegradable polymers as biomaterials. *Prog Polym Sci*. **32**:762 - 798.
- Namen , A. E. ; Lupton , S. ; Hjerrild , K. ; Wignall , J. ; Mochizuki , D. Y. ; Schmierer , A. ; Mosley , B. ; March , C. J. ; Urdal , D. and Gillis , S. (1988).** Stimulation of B-cell progenitors by cloned murine interleukin-7. *Nature*. **333**(6173):571-573.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) . (2003a) .** Performance standards for disk susceptibility testing; approved standard, 6th ed. M 100-S13. NCCLS, Wayne, Pa.
- NIAID (National Institute of Allergy and Infectious Diseases).(2002).** Food borne Diseases.(Internet).

- Obukhanych , T. V. and Nussenzweig , M. C.** (2006). T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med.* **203**(2): 305–310.
- Ochiai , R. L. ; Acosta , C. J. ; Danovaro-Holliday , M. C. ; Baiqing , D. ; Bhattacharya , S. K. ; Agtini , M. D. ; Bhutta , Z. A. ; Canh do , G. ; Ali , M. ; Shin , S. ; Wain , J. ; Page , A. L. ; Albert , M. J. ; Farrar , J. ; Abu-Elyazeed , R. ; Pang , T. ; Galindo , C. M. ; von Seidlein , L. ; Clemens , J. D. and Domi Typhoid Study Group.**(2008). A study of typhoid fever in five Asian countries: disease burden and implications for controls. *Bull World Health Organ.* **86** (4):260–268.
- Parry , C. M. and Threlfall , E. J.** (2008). Antimicrobial resistance in typhoid and non typhoid salmonellae. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **21**:531-538.
- Parry , C. M. ; Hien , T. T.; Dougan , G. ; White , N. J. and Farrar , J. J.** (2002). Typhoid fever. *N Engl J Med.* **347** (22):1770–1782.
- Pealver , C. M. C. ; Medina , J. ; Quiones , G. ; Wochinger , A. V. and Vega , E. Z.** (2004). Development of DNA sequences for the detection of *Salmonella*. Biology Department, University of Puerto Rico.
- Pegues , D. ; Ohl , M. and Miller , S.** (2005) . *Salmonella* species, Including *Salmonella Typhi*. In: Mandell G, J Bennett and R Dolin, editors. Principles and Practise of Infectious Diseases. 6th ed. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone, 2636-2654.
- Phoenix , C.** (2008) .History of nanotechnology .The Center for Responsible Nanotechnology.

- Pie , S. ; Truffa-Bachi , P. ; Pla , M. and Nauciel , C.** (1997). Th1 response m *Salmonella typhimurium*-infected mice with a high or low rate of bacterial clearance. *Infect. Immun.* (65): 4509-4514.
- Pillai , C. K. S. ; Paul , W. and Sharma , C. P.** (2009). Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. *Prog Polym Sci.* 34(7) : 641–678.
- Plummer , D. T.** (1978). An Introduction to Practicl Biochemistry. McGraw-Hill Book Company limited.
- Popoff , M. Y. ; Bockemuhl , J. and Gheesling , L. L.** (2004). Supplement 2002 (no. 46) to the Kauffmann-White scheme. *Res. Microbiol.* 155:568–570.
- Prabaharan , M. and Mano , J. F.** (2005). Chitosan-Based Particles as Controlled Drug Delivery Systems. *Drug Deliv.* 12(1):41-57.
- Prescott , L. M. ; Harley , J. P. and Klein , D. A.** (1996). Microbiology. 3rd ed. The McGraw-Hill companies. U.S.A.
- Raafat , D. and Sahl , H.G.** (2009). Chitosan and its antimicrobial potential a critical literature survey. *Microb Biotechnol.* 2: 186-201.
- Raffatellu , M. ; Wilson , R. P. ; Winter , S. E. and Baümler , A. J.** (2008) . Clinical pathogenesis of typhoid fever. *J. Infect. Dev. Ctries.* 2: 260–266.
- Ramon , G.** (1925). Sur l’augmentation anormale de l’antitoxine chez les chevauxproducteurs de serum antidipherique. *Bull. Soc. Cent. Med. Vet.* 101: 227-234.

- Ramon , G.** (1926) Procèdes pour accroitre la production des antitoxines. *Ann. Inst. Pasteur* **40**: 1–10.
- Reddy, K. R.** (2010). *Microbiology and Parasitology* . 4th ed. Paras Medical Puplisher. New Delhi.
- Reeves , P. and Stevenson , G.** (1989). Cloning and nucleotide sequence of the *Salmonella typhimurium* LT2 gnd gene and its homology with the corresponding sequence of *Escherichia coli* K12. *Mol. Gen. Genet.* **217**:182–184.
- Rementeria , A. ; Vivanco , A. B. ; Ramirez , A. ; Hernando , F. L. ; Bikandi , J. ; Herrera-Leon , S. ; Echeita , A. and Garaizar , J.** (2009): Characterization of a monoclonal antibody directed against *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* and Serovar [4,5,12:i:-]. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1345–1354.
- Robbins , J. D. and Robbins , J. B.** (1984) Re-examination of the protective role of the capsular polysaccharide (Vi-antigen) of *Salmonella typhi* . *J infect Dis* **150**:436-449.
- Rolink , A. ; Grawunder , U. ; Winkler , T. H. ; Karasuyama , H. and Melchers , F.**(1994) .IL-2 receptor alpha chain (CD25, TAC) expression defines a crucial stage in pre-B cell development. *Int Immunol.* **6**(8):1257-1264.
- Rüster , B. ; Göttig , S. ; Ludwig , R. J. ; Bistrrian , R. ; Müller , S. ; Seifried , E. ; Gille , J. and Henschler , R.** (2006). Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* **108**(12):3938-3944.

- Ryan , K. J. and Ray , C. G. (2004).** Sherris Medical Microbiology (4th ed.). McGraw Hill.
- Sakaguchi , S. ; Sakaguchi , N. ; Asano , M. ; Itoh , M. and Toda , M. (1995).** Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* . **155**:1151-1164.
- Sakaguchi , S. (2004).** Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* . **22**:531–562.
- Saleh , M. and Trinchieri , G. (2011) .** Innate immune mechanisms of colitis and colitis-associated colorectal cancer. *Nat Rev Immunol* , **11**:9-20.
- Saxl ,O.(2013).**What is Nanotechnology? Institute of nanotechnology.(Internet).
- Scherer , C. A. and Miller, S. I. (2001).** Molecular pathogenesis of *Salmonella*. In E. A. Groisman (ed.), Principles of bacterial pathogenesis. Academic Press, Inc., New York, NY. 266–333.
- Schoenborn , J. R and Wilson , C. B. (2007).** Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* . **96**: 41–101.
- Selander , R. ; Li , J. and Nelson , K. (1996).** Evolutionary Genetics of *Salmonella enterica*. In: Neidhardt F. *Escherichia coli* and *Salmonella*. 2nd ed. Washington D.C.: ASM Press; 2691-2703.
- Shantha , S. L. (2009).**Nanotechnology- A technological tsunami. *Res. J. Biotec* . **4** (1):1-8.

- Shevach , E. M.** (2002) .CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* . **2**:389–400.
- Shriner, A. K. ; Hongqi , L. ; Guizhi ,S.; Martin ,G. and Kishore, R. A.** (2010) . IL-7-Dependent B Lymphocytes are essential for the Anti-polysaccharide Response and Protective Immunity to *Streptococcus pneumonia* . *J. Immunol.* **185**: 525-531.
- Sigurdardottir , S. T. ; Vidarsson , G. ; Gudnason , T. ; Kjartansson , S. ; Kristinsson , K. G. ; Jonsson , S. ; Valdimarsson , H. ; Schiffman , G. ; Schneerson , R. and Jonsdottir , I.** (1997). Immune responses of infants vaccinated with serotype 6B pneumococcal polysaccharide conjugated with tetanus toxoid. *Pediatr Infect Dis J.* **16**: 667–674.
- Silipo , A. ; Lanzetta , R. ; Garozzo , D. ; Lo Cantore , P. ; Lacobellis , N. S. ; Molinaro , A. ; Parrilli , M. and Evidente , A.** (2002). Structural determination of lipid A of the lipopolysaccharide from *Pseudomonas reactans*. A pathogen of cultivated mushrooms. *Eur J Biochem.* **269**:2498-2505.
- Spellberg , B. and Edwards, J. E. , Jr.**(2001) Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases. *Clin. Infect.Dis.*, **32**:76-102.
- Starr , T. K. ; Jameson , S. C. and Hogquist , K. A.** (2003) .Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* . **21**:139–176.
- Stone , A. L. and Szu , S. C.**(1988). Application of Optical Properties of the Vi Capsular Polysaccharide for Quantitation of the Vi Antigen in Vaccines for Typhoid Fever. *J Clin Microbiol.* **26** (4): 719-725.
- Szu , S. C.** (2013). Development of Vi conjugate - a new generation of typhoid vaccine. *Expert Rev Vaccines.***12**(11):1273-1286.

- Tabeta , K.** (2006). The Unc93b1 mutation 3d disrupts exogenous antigen presentation and signaling via Toll-like receptors 3, 7 and 9. *Nat. Immunol.* **7**: 156–164.
- Thatte , J.; Rath , S. and Bal , V.** (1993). Immunization with live versus killed *Salmonella typhimurium* leads to the generation of an IFN-gamma-dominant versus an IL-4-dominant immune response. *Int. Immunol.* **5**: 1431-1436.
- Tindall , B. J.; Grimont , P. A.; Garrity, G. M. and Euzeby, J. P.** (2005). Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **55**: 521–524.
- Triplett , T. A. ; Curti , B. D. ; Bonafede , P. R. ; Miller , W. L. ; Walker , E. B. and Weinberg , A. D.** (2012). Defining a functionally distinct subset of human memory CD4+ T cells that are CD25POS and FOXP3NEG. *Eur J Immunol.* **42** (7):1893-1905.
- Usami , Y. ; Okamoto , Y. ; Takayama , T. ; Shigemasa , Y. and Minami, S.** (1988). Chitin and chitosan stimulate canine polymorphonuclear cells to release leukotriene B4 and prostaglandin E2. *J Biomed Mater Res.* **42**(4):517-522.
- Venkatesan , R.** (2012). Development of typhoid Vi polysaccharide-tetanus toxoid conjugate vaccine. Ph.D. Thesis .Jawaharlal Nehru Technological University of Hyderabad.
- Vila , A. ; Sánchez , A. ; Tobío , M. ; Calvo , P. and Alonso , M. J.** (2002). Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Contr. Release.* **78**(1–3):15–24.

- Vivier , E. ; Raulet , D. H. ; Moretta , A. ; Caligiuri , M. A. ; Zitvogel , L. ; Lanier, L. L. ; Yokoyama, W. M. ; Ugolini , S. ; Raulet ; Moretta ; Caligiuri ; Zitvogel ; Lanier; Yokoyama; Ugolini (2011).** Innate or Adaptive Immunity? The Example of Natural Killer Cells. *Science* . **331** (6013): 44–49.
- Wang , W. and Singh , M. (2011)** Selection of adjuvants for enhanced vaccine potency. *World J. Vacc.* **1**: 33–78.
- Wang , G. and Hardy, M. P. (2004).** Development of leydig cells in the insulin-ike growth factor-I (igf-I) knockout mouse: effects of igf-I replacement and gonadotropic stimulation. *Biol Reprod.* **70**:632–639.
- Wang , H. ; Huff , T. B. ; Zweifel , D. A. ; He , W. ; Low, P. S. ; Wei , A. ; and Cheng , J. X. (2005).**In vitro and *in vivo* two photonluminescence imaging of single gold nanorods. *Proc Natl Acad Sci USA* .**102** (44): 15752-15756.
- Weintraub , A. (2003):** Immunology of bacterial polysaccharide antigens *Carbohydrate. Res.*, **338**: 2539-2547.
- Wen , Z. S. ; Xu , Y. L. ; Zou X. T. and Xu , Z. R. (2011).** Chitosan Nanoparticles Act as an Adjuvant to Promote both Th1 and Th2 Immune Responses Induced by Ovalbumin in Mice. *Mar Drugs.* **9**(6):1038-1055.
- WHO, WHO preventable disease: Monotoring system, W.H. Organization, Editor. (2009):** Geneva.

- Wilson , B. ; Samanta , M. K. ; Santhi , K. ; Kumar, K. P. ; Ramasamy , M. ; Suresh, B. (2010).** Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine. *Nanomedicine*. **6** (1): 144-152.
- World Health Organisation.** (2008) Typhoid vaccine: WHO position paper. *Weekly Epidemiological Record*,**83**(6):49–60.
- Wu , F. ; Chen , L. ; Liu , X. ; Su , P. ; Li , M. ; Yu , X. and Li , Q. (2010).** A novel CD29-like protein expressed in Japanese lamprey (*Lethenteron japonicum*) and involved in immune response. *Fish Shellfish Immunol*. **29**(3):407-413.
- Wu , K. Y. ; Wu , M. and Fu , M. L. (2006).** A novel chitosan CpG nanoparticle regulates cellular and humoral immunity of mice. *Biomed Environ Sci*. **19**(2): 87–95.
- Xu , D. ; Cisar , J. O. ; Poly , F. ; Yang , J.; Albanese , J. ; Dharmasena , M. ; Wai , T. ; Guerry , P. and Kopecko , D. J. (2013).** Genome sequence of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* oral vaccine strain Ty21a. *Genome Announc*. **1**(4) : e00650-13.

Summary

Summary

This study was carried out during the period from October 2013 to September 2014. *Salmonella typhi* Samples were obtained from the Central Health Laboratory for the purpose of purification capsular polysaccharide antigen (Vi Ag). Capsular polysaccharide antigen was loaded on chitosan nanoparticle and tetanus toxoid . Recorded results showed that the antibody titers in (T1) Vi Ag + chitosan groups(620.8 ± 364.8) were increased significantly than other groups, it included (T2) Vi Ag group (448 ± 117.73), (T3) Vi + Tetanus toxoid group (537.6 ± 142.53) and (T4) Vi Ag+ Ch. +TT group (121.6 ± 38.4) at ($P \leq 0.05$).

The documented results of total and differential WBCs counts were showed a significant increment in group (T1) (21020 ± 891.85 cell/1ml) compared with the control group (C) (5500 ± 230.94 cell/1ml) and other groups , it included (T3) group (10740 ± 980.61 cell/1ml) , (T4) group (10650 ± 1217.78 cell/1ml) and (T2) group (9980 ± 572.18 cell/1ml) at ($p \leq 0.05$). On the other hand, the results of differential count showed elevation in percentage of neutrophils in group (T2) ($40 \pm 1.89\%$) compared with the control group (C) ($33.3333 \pm 0.66\%$) and other group, it included a (T3) group ($33.6 \pm 0.67\%$) , (T4) group ($34 \pm 1.37\%$) and (T1) group ($19.4 \pm 0.66\%$) at ($p \leq 0.05$). Results also showed an increase in lymphocytes in the group (T1) ($79.2 \pm 2.7\%$) compared with the control group ($58.3333 \pm 1.76\%$) and other group , it included (T4) group ($62 \pm 2.06\%$), (T3) group ($61.2 \pm 2.72\%$) and (T2) group ($55.8 \pm 1.11\%$) at ($p \leq 0.05$).

Also The study included determination the level of gene expression of two clusters of differentiation , CD25 and CD29 gene expression by RT-qPCR. The results of relative gene expression in CD25 gene showed in T4 (5.1936 ± 2.17) were increased significantly than other groups, it included T1 (2.5604 ± 0.64),

Summary

T2 (3.7032 ± 0.54) and T3 (4.4739 ± 1) at ($P \leq 0.05$). The results of relative gene expression in CD29 gene which showed T3 (162.3256 ± 89.52), increased significantly than other groups, it included T1 (33.8276 ± 16.6), T2 (59.6817 ± 26.65), and T4 (37.9605 ± 3.09) at ($P \leq 0.05$).

This findings were supported by the increment activity determined in lymph nodes of spleen & thymus which increased in size and numbers with active germinal centers. The overall results indicated that the use of chitosan nano particles and tetanus toxoid can enhance and improve the immune response against a given vaccines.