تأثير بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Klebsiella pneumonia* كمحفز مناعي للأرانب المختبرية المصابة بطفيلي الأميبا الحالة للنسيج *Entamoeba histolytica*

أسامة ناظم نجرس وعهود مزاحم شاكر
كليه العلوم التطبيقية/ جامعة سامراء

الخلاصة

أجريت الدراسة للمدة من من شهر كانون الأول 2013 لغاية تشرين الثاني 2014 وقد تضمنت دراسة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي outer membrane (O-Antigen) المستخلص من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* على الاستجابة المناعية في ذكور الأرانب البيضاء النيوزلندية المخمجة بطفيلي *Entamoeba histolytica* المسبب لداء الزحار الأميبي (Amoebic dysentery) وذلك بالاعتماد على عدة معايير شملت دراسة التغيرات الحاصلة في مستويات تراكيز المحركات الخلوية الخاصة بعملية البلعمة وعرض المستضد والمناعة الخلوية المتمثلة بالانترفيرون كاما IFN-γ ، والبين ابيضاض-10 (IL-10) والبين ابيضاض 12 (IL-12) ومعامل البلعمة وعيوشية خلايا PMNs والخلايا اللمفية والتشكل الزهري التائي الفعال والكلي والبائي ومعامل انقسام خلايا نخاع العظم وتفاعل ارثس وفرط الحساسية الأجل والاستجابة المناعية الخلطية المتمثلة بالكلوبيولينات المناعية النوعية IgG, IgM باستخدام تقنية الإليزا وقد توصلت الدراسة الحالية إلى ارتفاع كل المؤشرات المناعية بعد التمنيع بالمستضد واستمرار ارتفاعهم بعد الخمج بالطفيلي وتبين من الدراسة الحالية إمكانية استخدام بروتينات الغشاء الخارجي المستخلص من بكتريا *Klebsiella Pneumoniae* بوصفه معدلاً مناعياً مؤثراً لتحفيز كل من المناعة الطبيعية والمكتسبة ضد الخمج بداء الزحار الأميبي في الأرانب البيض.

الكلمات المفتاحية: الأرانب، الأميبا، بكتريا *Klebsiella Pneumoniae*

Study the effect of *Klebsiella pneumonia* O-*antigen* as a immune catalyzer for laboratory rabbits infected with *Entamoeba histolytica*

O. M. Shakir and O. N. Negres
College of Applied Science/ University of Samarra

Abstract

Conducted this study for the duration from the December 2013 until November 2014 and our study have included extracted outer membrane protein (O-Antigen) from *Klebsiella pneumonia* and study chireffection the immune response in Neusland albino rabbits (male) infected with *Entamoeba histolytica* that cause amoebic dysentery disease depending on several criteria, including study the changes in variables cytokineetics concentration levels that response on phagocytosis and antigen presenting process like IFN-γ, IL-10 and IL-12 and phagocytosis coefficienit, and B T cells PMNs and lymphocytes cell life span, the T and B rossite formation test the miotic index factor for bone marrow cell Arthus reaction, delayed hypersensitivity, measure the humeral immune response that responsting by immunoglobulins like IgG, IgM using ELISA Technic. And The current study accessed to elevated all immunity indicator after immunization with (k) antigen and also continue in elevation after the infection with parasite, and we indicated from this study the possibility to use the outer membrane protein (O antigen) that extracted from *Klepsiella pneumoniae* as immunological modificicatory that can stimulate both innate (natural) and acquired immunity against amoebic dysentery infection in white rabbit.

Key Word: Rabbits, ***Klebsiella pneumonia***

المقدمة

يعتبر طفيلي أميبا النسيج *Entamoeba histolytica* من الاوالي المهمة الشائعة الانتشار في العالم ويسبب للإنسان داء الأميبا (Amoebiasis) ويقدر عدد المصابين به في جميع أنحاء العالم بـ 480 مليون إصابة ويتسبب في وفاة (40– 110 الف) حالة سنويا (1)، ويحتل داء الأميبا المرتبة الثالثة بعد الملاريا (Malaria) والبلهارزيا (Bilhariasis) في حالات الوفاة(2). يستوطن الطفيلي الأمعاء الغليظة ولاسيما منطقة الأعور (Cecum) ونهايات الأمعاء الدقيقة ويسبب أعراض مرضية (symptomatic amoebiasis) ويمكن ان تنتقل الإصابة إلى شخص آخر عن طريق الماء والطعام الملوث ببراز الأشخاص المصابين الحاوي على الطور المتكيس المعدي للطفيلي(3). ان استراتيجية العلاج التقليدي في علاج داء الزحار الأميبي غير تامة الوضوح، فضلا عما يرافق استعمال الأدوية من أضرار جانبية، وبتواصل تقدم البحوث والدراسات بشكل واسع فقد تم دراسة استخدام المعدلات المناعية (Immunomodulation) في تعديل الاستجابة المناعية ضد الطفيلي عن طريق تثبيط أو تحفيز خلايا معينة في الجهاز المناعي الخلوي بوصفها احدى الوسائل العلاجية أو لغرض إنتاج الكلوبيولينات المناعية المعروفة، ويعد السكر المتعدد للبكتريا السالبة لصبغة كرام من المعدلات المناعية الجيدة والمستخدمة سابقا لامتلاكه تأثيرات محفزة لمكونات الجهاز المناعي، إذ يعمل على تحفيز البلاعم الكبيرة والخلايا الوحيدة ويؤثر على تمايز الخلايا الوحيدة إلى أنواع أخرى من الخلايا(4)، كما تعمل الذيفانات الداخلية (Endotoxins)على تحرير المحركات الخلوية الالتهابية (Proinflammotory cytokines) مثل البين ابيضاض (IL- (10,8,4,1 (1,4,8,10 والانتروفيرون كاما (IFN-γ)(4). ومن اجل الكشف عن السبل الكفيلة والمفيدة في السيطرة على الطفيلي عن طريق تحفيز أو تعديل الاستجابة المناعية للمضيف لغرض الحماية من الإصابة بداء الزحار الأميبي كان الهدف من هذا البحث دراسة تأثير بروتينات الغشاء الخارجي المستخلص من بكتريا *K. pneumoniae* على تعديل الاستجابة المناعية في الأرانب المختبرية النيوزلندية ضد الخمج المنفعل بداء الزحار الأميبي.

المواد وطرائق العمل

- **تحضير المحاليل والدواريء والصبغات:** حضرت محاليل استخلاص بروتينات الغشاء الخارجي حسب طريقة(5) محاليل المستخدمة في تقدير البروتين(6) ومحاليل عزل وتشخيص الطفيلي حسب طريقة(7) أما محاليل الاختبارات المناعية فقد حضر دارئ الفوسفات الملحي PBS حسب طريقة (8) ومحلول واطئ التوتر والكولجسين والتثبيت حسب(9) وعالق كريات الدم الحمر للخروف ومصل المضاد للأرانب(10) ومتمم الفار وفق طريقة(11).
- **عينة البكتريا:** تم الحصول على عزله بكتيرية من *Klebsiella pneumoniae* النقية من مختبر الأحياء المجهرية في كلية العلوم التطبيقية/ جامعة سامراء وتم تأكيد التشخيص باستخدام عدة Api-20E بعد تنمية البكتريا على وسط نقيع القلب والدماغ وقد تم استخلاص بروتينات الغشاء الخارجي حسب طريقة(12) مع بعض التحويرات التي أجرتها(13)، وتم إجراء الفحوصات الكيموحيوية التقليدية، حيث قدر كمية البروتين من مستخلص بروتينات الغشاء الخارجي حسب طريقة (6).
- **عينات الطفيلي:** تم الحصول على عينات طفيلي *E.histolytica* من المراجعين والراقدين في مستشفى سامراء العام والذين يعانون من إسهال شديد إلى متوسط وفي معظم الحالات يعانون من إسهال دموي، وشخصت العينات بالطريقة المتبعة من قبل(14)، وتم عزل الطفيلي حسب طريقة (15) وقد تم حساب عدد الأكياس وتحديد جرعه الحقن حيث تم تحديد جرعة الحقن عن طريق حساب عدد الأكياس في كمية (0.1)

مل وحددت الجرعة بمقدار 4× 10^3 كيس لكل أرنب يتم تجريعه فمويا، تم تجريع الأرانب بأكياس الطفيلي عن طريق الفم وتم التحري عن أكياس الطفيلي في غائط الأرانب المصابة يومياً ولمدة أسبوعين بعد الخمج للتأكد من حدوث الإصابة بالطفيلي وتم التأكد من حدوث الخمج عن طريق تحضير عدة مسحات من غائط الأرانب المصابة على شريحة زجاجية وفحصها تحت المجهر ومشاهدة الطور المتكيس للطفيلي وتم استخدام صبغات مختلفة منها صبغة لوكل ايودين (local iodin) وطريقة التطويف بالمحلول السكري.

- **الحيوانات المختبرية:** استعملت في هذه الدراسة ذكور الأرانب النيوزلندية البيضاء والتي تم الحصول عليها من المركز الوطني للرقابة والبحوث الدوائية وتراوحت أوزان الحيوانات المستعملة من (1000 – 1800) غم بينما تراوحت أعمارها من (10 – 18 شهر) وغذيت الحيوانات بالعليقة الجاهزة وأعطيت الماء والغذاء على نحو مستمر طوال مدة الدراسة.
- **تصميم التجربة:** تم استخدام 90 من ذكور الأرانب بعد التأكد من سلامتها من الأمراض الظاهرية، وتم تقسيمها إلى ثلاثة مجاميع رئيسية وكل مجموعة تضم 30 أرنبا، كما وتم تقسيم المجاميع الرئيسية إلى ستة مجاميع ثانوية كل مجموعة تكونت من خمسة أرانب، مجموعة المستضد O: تم تمنيع 30 أرنب بمستضد متعدد السكريات واجري التمنيع وفق طريقة(16، 17)، حيث استخدمت طريقة الحقن تحت الجلد (Inrademal) وفي العضلة (Intramuscular) بواقع 1 مل لكل حيوان، واستخدمت التراكيز (800, 400, 200, 100) مكغم/ مل. وبعد انتهاء فتره التمنيع تم سحب عينات دم وإجراء الفحوصات المناعية ومن ثم تجريعها بأكياس الطفيلي وبعد أسبوعين تم كذلك سحب الدم منها وإجراء الفحوصات المناعية مره أخرى، مجموعة الطفيلي: تم تجريع 30 أرنب بأكياس طفيلي *E.histolytica* بجرعة فموية مقدارها 4× 10^3، وقد تم فحص براز الحيوانات يومياً للتأكد من حدوث الخمج وبعد أسبوعين من الإصابة تم تقسيم الحيوانات إلى ستة مجاميع وكل مجموعة تم استخدامها في تجربة مناعية مختلفة، مجموعة السيطرة السالبة: تم معاملتها بمحلول الملحي الفسيولوجي وسحب الدم لإجراء الفحوصات المناعية عليها.
- **المعايير المستخدمة في الدراسة:**

- تأثير مستضد O على عيوشية الخلايا اللمفية وعيوشية متعددة أشكال النوى: حيث تم عزل خلايا (PMNs) تبعاً لطريقة(18)، وعزلت الخلايا اللمفاوية وفقاً لما جاء في(19) وحساب عيوشيتها اعتمادا على طريقة (10، 20)
- تأثير المستضد على عملية البلعمة في الزجاج وفق طريقة(18).
- تأثيره على التشكل الزهري التائي الفعال والكلي اعتمادا على طريقة(18).
- تأثيره على التشكل الزهري البائي B-Rosette حيث اعتمدت طريقة(21)، ولدراسة تأثيره على تفاعل ارثس (Arthus Reaction) اعتمدت طريقة(22) لذلك الغرض.
- تفاعل فرط الحساسية الأجل Delayed type hypersensitivity (DTH) فقد كان حسابه وفق طريقة(23)
- تأثيره على معدل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في الأرانب وفق طريقة(9).
- تأثيره على المحركات الخلوية من خلال الكشف عن وجود الانترفيرون كاما IFN-γ وبين ابيضاض −10 (IL−10) وبين ابيضاض−12 (IL−12) فقد اجري باستخدام تقنية ELISA.
- كما تم إجراء فحوصات الكلوبينات المناعية IgG, IgM لمجموعة الطفيلي بعد أسبوعين من الخمج. بطريقة الاليزا.

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج هذه الدراسة ان وسط الإنتاج الذي يتكون من نقيع القلب والدماغ BHI والمضاف إليه 3% خلاصة الخميرة و2% مالتوز كان وسطاً ملائماً لإنتاج بروتينات الغشاء الخارجي، وتم وضع المستخلص في جهاز Lypholyzor للحصول عليه بشكل مسحوق ابيض مصفر اللون، وتم حساب تركيز البروتين في محلول بروتينات الغشاء الخارجي كانت 250 مكغم/ مل حسب طريقة (6).

- **تأثير المستضد (O) على عيوشية خلايا متعددة أشكال النوى (PMNs) والخلايا اللمفية:** يتضح من الجدول (1) ان النسبة المئوية لعيوشية الخلايا PMNs لمجموعة الحيوانات المعاملة بمستضد (O) ارتفعت ولكن بشكل غير معنوي وبمستوى ($p<0.05$) مقارنة بمجموعة السيطرة السالبة حيث كانت(94.1 ,91.2%) على التوالي وكانت هذه النتائج متوافقة مع(13) عند استخدامها تراكيز (100,50) من مستخلص بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Klebsiella pneumonia* . أما بالنسبة لعيوشية الخلايا اللمفية فقد ارتفعت ارتفاعاً معنوي بمستوى ($p<0.05$) بالنسبة للمستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث كانت (92.6,94.8%)على التوالي وتدل هذه النتائج على ان المستضد (O) هي امنه للاستخدام لكونها لم تقتل الخلايا PMNs والخلايا اللمفية أو تقلل من نشاطها (جدول2). لوحظ بعد التمنيع بالمستضد ثم تجريع الحيوانات المختبرية بطفيلي *E.histolytica* ان عيوشية الخلايا PMNs والخلايا اللمفية (الجدول 3، 4) لم تتأثر بوجود الطفيلي وبقيت مرتفعة بنسبة مقاربة لقبل الخمج به وهذا يدل على ان المستضد هو من الممنعات الجيدة والآمنة لكونها لم تقتل الخلايا PMNs واللمفية حيث بقيت حية ولم يتأثر عددها ولا وظيفتها حتى بعد الإصابة بالطفيلي.

جدول (1) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	(عيوشية الخلايا PMNs %) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	1.63 ± 94.18	a
Negative control	6.67 ± 91.22	a

جدول (2) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفية للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	عيوشية الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	1.56 ± 94.82	b
Negative control	2.759 ± 92.62	a

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

جدول (3) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا البلعمية متعددة أشكال النوى (PMNs) للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	عيوشية الخلايا PMNs% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-E	1.36 ± 93.64	a
positive control	1.75 ± 94.280	a

جدول (4) النسبة المئوية لعيوشية الخلايا اللمفية للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	عيوشية الخلايا اللمفية% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-E	1.45 ± 92.94	a
positive control	2.18 ± 94.58	a

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

وقد أظهرت نتائج الدراسة ارتفعاً معنوياً بمستوى معنوية ($p<0.05$) في معدلات معامل البلعمة لمجموعة الحيوانات (الأرانب) الممنعة بمستضد O مقارنة مع مجموعة السيطرة السالبة حيث كانت (60.7, 74.4%) على التوالي، (جدول 5). وتمثل بروتينات الغشاء الخارجي للبكتريا المعوية محفزات مناعية جيدة من خلال عملها على تحفيز إنتاج السايتوكينات (Cytokines) من قبل خلايا البلاعم الكبيرة (Macrophage) والخلايا القاتلة الطبيعية (Natural Killer (NK) (24) وأوضحت الدراسات الحديثة ان التمنيع بالبروتينات الكربوهيدراتية (Glycoprotein) من الغلاف الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* له تأثير مناعي محفز حيث انه يزيد من فعالية عملية البلعمة(25) واتفقت نتائج دراستنا مع(13) التي وجدت ان التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* أدى إلى زيادة في الفعالية البلعمية للخلايا متعددة أشكال النوى (PMNs) كما واتفقت أيضا مع (26، 27) عندما عملوا على التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Citrobactor freundii* وكذلك مع ما توصل إليه(28) الذي أشار إلى التراكيز (50 ,100) مايكروغرام/ مل من بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Pseudomonas aeruginosa* أدت إلى زيادة في معامل البلعمة في الزجاج وقد أشار (29) إلى ان المستضدات ذات الطبيعة البروتينية تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية ويتم التقاط المستضدات بعملية البلعمة بوساطة الخلايا البلعمية ويعرض بشكل ببتيد محمول علىMHC Class II. في حين كانت نتائج الدراسة الحالية غير متوافقة مع (30) التي وجدت ان بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Escherichia coli* مثبطه لعملية البلعمة. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية بعد معاملة الحيوانات الممنعة بالمستضد O وبعد تجريعها بطفيلي *E. histolytica* في الجدول (6) تبقى معامل البلعمة مرتفعة مع الإصابة بطفيلي *E.histolytica* مقارنة مع السيطرة الموجبة (56.8,33.1) وتدل نتائج هذه الدراسة إلى ان التمنيع بالمستضد (O) حفز فاعلية البلاعم على التهام الطفيلي ولهذه العملية أهمية بالغة في حماية الجسم حيث تعد عملية قتل الطفيليات عن طريق الخلايا البلعمية خطوة أساسية بوصفها خط دفاعي أولي غير متخصص ضد المسببات المرضية(31).

جدول (5) النسبة المئوية للفعالية البلعمية للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	معامل البلعمة (PI)% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O -Antigen	4.50 ± 74.46	a
Negative control	11.56 ± 60.7	b

جدول (6) النسبة المئوية للفعالية البلعمية لحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	معامل البلعمة (PI)% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O - E	7.16 ± 57.88	a
Positive control	11.50 ± 33.10	C

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير مستضد K في التشكل الزهري التائي:** يعد فحص التشكل الزهري من التقنيات البسيطة التي تستخدم لدراسة الاستجابة المناعية الخلوية من خلال التحري عن عدد الخلايا التائية النشطة إذ يكون العلاقة خطية بين عدد الزهرات المتكونة للخلايا التائية النشطة وبين العدد الكلي للخلايا التائية (32) ويحدث التشكل الزهري من خلال ارتباط المستقبل CD_2 للخلايا اللمفية (بروتين سكري سطحي) الذي يبلغ وزنه الجزيئي (50–58) KD الذي يظهر في بداية تطور الخلايا التوتية وكذلك يوجد في جميع الخلايا التائية الناضجة مع المركب

الترابطي Lymphocyte Function-associated antigen-3 (Lfa-3) (Ligand) الموجود على سطوح كريات الدم الحمر للخروف(33) وان الخلية اللمفية التي ترتبط بثلاث كريات دم حمر للخروف فأكثر تعد خلية ذات تشكل زهري و يوضح الجدول (7) وجود فروق معنوية بين الحيوانات المعاملة بمستضد (O) مقارنة بالسيطرة السالبة بالنسبة للتشكل الزهري التائي الفعال (70.1,78.3%)على التوالي والكلي (73.1, 83.5%) على التوالي وجاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع(13) التي وجدت ان التمنيع بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* وبتركيز (100) مايكروغرام/ مل أدى إلى زيادة النسبة المئوية للتشكل الزهري الفعال واتفقت أيضا مع(26) حيث ارتفعت نسبة التشكل عند استخدام مستضد بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *C .freundii*وكذلك مع(27) حيث وجد ان التمنيع بأحد بروتينات الغشاء الخارجي وهو Intimin للنمط الحياتي 4280 لبكتريا *C.freundii* يحفز الخلايا التائية. ولا تتفق مع (30) التي لاحظت فيها ان بروتينات الغشاء الخارجي وبالتركيز الخام والمنقاة لبكتريا *E.coli* أدت إلى انخفاض معنوي في النسبة المئوية للخلايا المكونة للتشكل الزهري التائي. يعود سبب قدرة بروتينات الغشاء الخارجي في تنشيط الخلايا التائية إلى ان المستضدات ذات الطبيعية البروتينية تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية ويتم اخذ المستضدات بعملية البلعمة بوساطة الخلايا البلعمية ويقدم بشكل ببتيد محمول على MHC ClassII الذي يتداخل مع TCR من قبل Th1 وتليها مرحلة تنشيط خلايا ($CD8^{++}$) التي تعمل على تحليل الخلايا المصابة(27) يبين الجدول (8) ارتفاع نسبة الشكل الزهري التائي والفعال والكلي معنوياً بمستوى ($p<0.05$) بعد الخمج بالطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث كانت نسبة المستضد O مع الطفيلي في التشكل الفعال (49.2, 77.8%) والتشكل الكلي (56.2, 82.4%) على التوالي.

جدول (7) النسبة المئوية للتشكل الزهري التائي الفعال والكلي للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

قيمة P	الشكل الزهري الكلي% المعدل ± الانحراف المعياري S.D±M	قيمة P	الشكل الزهري الفعال% المعدل ± الانحراف المعياري S.D±M	المجموعة
A	4.46±83.5	a	6.02±78.3	O-Antigen
b	1.51±73.10	B	2.62±70.12	Negative control

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى p>0.05 مقارنة بين المجاميع.

جدول (8) النسبة المئوية للتشكل الزهري الفعال والكلي للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

قيمة P	الشكل الزهري الكلي% المعدل ± الانحراف المعياري S.D±M	قيمة P	الشكل الزهري الفعال% المعدل ± الانحراف المعياري S.D±M	المجموعة
a	1.95±82.48	A	4.93±77.80	O-Antigen
b	9.52±56.20	B	9.19±49.28	Negative control

- **تأثير مستضد (K) في التشكل الزهري البائي:** يعد اختبار التشكل الزهري البائي احدى وسائل قياس المناعة الخلطية المعتمدة على الخلايا البائية وتمتلك هذه الخلايا مستقبلات (Fc receptor CD_{16}) والكلوبيولينات المناعية السطحية (Surface immunoglobulins) ويعد الأول مستقبلاً لمكونات المتمم وتشتغل هذه الصفة لتميز الخلايا اللمفاوية البائية عن طريق ربط خلايا الدم الحمر للخروف والمعاملة بالضد IgG والعامل المتمم بالخلايا اللمفاوية البائية(34) ويبين الجدول (9) ارتفاع نسبة التشكل الزهري البائي معنوياً بمستوى ($P<0.05$)

للمستضد (O) حيث كانت (56.7, 69.6%) على التوالي مقارنة مع السيطرة السالبة وجاءت نتائج الدراسة الحالية متوافقة مع(13) التي وجدت ان التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *K. pneumoniae* أدت إلى زيادة النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي وتتفق أيضا مع(35) حيث ارتفعت نسبة التشكل باستخدام تراكيز (50 ,100) مكغم/ مل من بروتينات الغشاء الخارجي المنقاه لبكتريا *P.aeruginosa* وقد أشار(29) ان المستضدات ذات الطبيعية البروتينية تحفز الاستجابة المناعية الخلطية المعتمدة على الخلايا التائية ويتم اخذ المستضدات بعملية البلعمة بوساطة الخلايا البلعمية ويقدم بشكل ببتيد محمول على MHC ClassII وتليها مرحلة تنشيط خلايا (CD_8^+T) ومساهمة الخلايا وبالتالي دور الخلايا البائية ومساهمتها في إنتاج الكلوبيولينات. بعد الخمج بالطفيلي المبينة في الجدول (10) ارتفعت نسبة التشكل الزهري البائي حيث كانت مجموعة المستضد O مع الطفيلي مرتفعة معنوياً بمستوى ($P<0.05$) بنسبة (59.3,80.4%) مقارنة بالسيطرة الموجبة ويعود السبب في ارتفاع الخلايا اللمفية البائية مع وجود الطفيلي الذي يعتبر مستضد غريب فيحدث فعالية التحفيز المناعي العام والذي يشاهد على شكل مقاومة غير متخصصه تجاه الطفيلي حيث يعمل على تحفيز الخلايا البائية وهذا ما لاحظناه من خلال زياده التشكل الزهري البائي وتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا البلازما Plasms Cells والتي تحرر كميات كبيرة من الضد (36) وهذا ما أكدته الجداول اللاحقة بزياده نسبه الأجسام المضادة وكما تعمل هذه الأضداد على مهاجمه الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية إذ تقضي عليه والذي أكدته نتائجنا من ارتفاع معامل البلعمة عند وجود الطفيلي.

جدول (9) النسبة المئوية للشكل الزهري البائي للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	التشكل الزهري البائي% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	5.001 ± 69.68	b
Negative control	8.174 ± 56.72	C

جدول (10) النسبة المئوية للتشكل الزهري البائي للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	التشكل الزهري البائي% المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-E	4.40 ± 80.42	a
positive control	13.94 ± 59.30	b

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير مستضد O على معامل الانقسام الخيطي لنخاع العظم:** يبين الجدول (11) وجود زيادة معنوية بمستوى ($p<0.05$) في معامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم في مجاميع الحيوانات المعاملة بالمستضد O مقارنة مع السيطرة السالبة حيث ارتفعت بنسبه (53.8, 60.9%) على التوالي تدل نتائج دراسته الحالية ان المستضد (O) كان له تأثير محفز على انقسام خلايا نخاع العظم من خلال تأثيره على الخلايا السدوية Stromal cells الموجودة في نقي العظم من خلال تحفيزها لإطلاق عدد من الوسائط الخلوية الضرورية لانقسام وتمايز الخلايا الجذعية (Stem cells) إلى الأنواع المختلفة من خلايا الدم (38) كما يبين الجدول (12) ارتفاع معامل الانقسام معنويا بمستوى ($p<0.05$) بعد الخمج بالطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث ارتفع معامل الانقسام لمجموعة المستضد (O) بنسبة (48.5, 80.2%) على التوالي والسبب في زياده ارتفاع معامل الانقسام لنخاع العظم بسبب دخول جسم غريب وهو الطفيلي الذي استنزف عدد كبير من الخلايا البيضاء لكي تقاوم الجسم الغازي وبالتالي كانت هناك زياده في معامل الانقسام لكي تعوض عن النقص الحاصل بالكريات الدم البيض.

جدول (11) النسبة المئوية لمعامل الانقسام الخيطي لخلايا نخاع العظم للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	معامل الانقسام الخيطي %(Mitotic index MI) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	4.40 ± 60.96	b
Negative control	7.43 ± 53.86	C

جدول (12) النسبة المئوية لمعامل انقسام نخاع العظم للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	معامل الانقسام الخيطي %(Mitotic index MI) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-E	2.56 ± 80.2	a
positive control	2.87 ± 48.50	b

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير مستضد (O) على تفاعل الارثس وفرط الحساسية الأجل:** أظهرت نتائج الدراسة الحالية حدوث ارتفاع معنوي بمستوى معنوية $(P<0.05)$ لتفاعل الارثس كما في جدول (13) حيث يظهر ارتفاع سمك وسادة القدم المحسسة بكريات الدم للخروف للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) حيث بلغ سمك وسادة القدم المقاسة بالملمتر مقارنة مع السيطرة السالبة (0.8, 1.3) على التوالي أما الجدول (14) فيظهر تفاعل فرط الحساسية الأجل حيث استمرت وسادة القدم في الارتفاع وبلغت ذروتها بعد 24 ساعة من الحقن حيث بلغ الارتفاع للمستضد (O) بنسبة (0.8,1.6) على التوالي مقارنة مع السيطرة السالبة وبعد (48) ساعة بدأ سمك وسادة القدم بالانخفاض الذي ظهر في جدول (15) وقد جاءت نتائج هذه الدراسة متوافقة مع (13) حيث استخدمت مستضدات بروتينات الغشاء الخارجي والكبسولة لبكتريا *K. pnumaniae* وكذلك اتفقت مع(39) حيث لاحظ ان التمنيع ببروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Brucella ovis* قد زاد من فرط الحساسية الأجل خلال 24-48 ساعة اكثر من بروتينات الغشاء الداخلي والسايتوبلازم لهذه البكتريا. وأوضحت نتائج الدراسة الحالية ان المعاملة بالمستضد (O) أدت إلى رفع معامل فرط الحساسية الارثس والأجل. وان تفسير ذلك ربما يعود إلى التأثيرات المحفزة للقاح على الخلايا المنتجة للكلوبيولينات المناعية وعلى خلايا البلاعم الكبيرة مما أدى إلى زيادة المعقدات المناعية وتحفيز نظام المتمم مع زيادة في هجرة خلايا البلاعم الكبيرة إلى موقع حدوث التفاعل مما يؤدي إلى تجمع هذه الخلايا ومن ثم رفع معدل فرط الحساسية قياساً مع السيطرة ولوحظ وجود علاقة طردية بين نتائج فرط الحساسية ومعامل البلعمة فقد وجد ان هنالك زيادة في هذا العامل وقد يعزى إلى كفاءة اللقاح على تحفيز خلايا البلعمة والذي يؤدي بدورة إلى تحفيز الخلايا التائية لإنتاج الحركيات الخلوية مما تؤدي على سحب خلايا البلعم الكبير إلى موقع التفاعل وهذا ما أكدته نتائج دراستنا من ارتفاع معامل البلعمة وارتفاع الخلايا التائية وكذلك الزيادة في المحركات الخلوية. ان تحفيز عملية البلعمة وتنشيطها وزيادة تركيز الأنزيمات المختلفة للقيام بعملية قتل اكثر فعالية مؤديا إلى تحطيم موقعي للأنسجة(33، 38).

جدول (13) تفاعل الارثس بعد (24) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	تفاعل ارثس بعد 4 ساعات المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	2.308 ± 1.3	a
Control Negative	4.489 ± 0.8	b

جدول (14) فرط الحساسية العاجل بعد (24) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	فرط الحساسية الاجل بعد(24)ساعه المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	2.308 ± 1.6	a
Control Negative	4.489 ± 0.8	b

جدول (15) فرط الحساسية الآجل بعد (48) ساعات للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	فرط الحساسية الآجل بعد 48 ساعة	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري	
O-Antigen	2.308±40.220	A
Negative Control	4.489±17.320	B

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى p>0.05 مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير المستضد O على مستوى البين ابيضاض 10(IL-10):** أوضحت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً معنوياً بمستوى (P<0.05) لمستوى البين ابيضاض 10(IL-10) لمجموعة المستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة حيث ارتفعت (O) بنسبة (18.7,34.5) بيكو غرام/ مللتر على التوالي كما في جدول (16) وجاءت هذه النتائج متفقة مع(38، 39) حيث ارتفع لديهم مستوى البين ابيضاض 10 في الفئران بعد حقنها بلقاح البكتريا *K.pneumoniae*. ويقوم البين ابيضاض 10 بتنظيم مناعي يشمل تأثيرات إيجابية وسلبية فهو يحفز قابلية الخلايا البلعمية وهذا ما تم ملاحظته في النتائج المدونة في الجدول (5) حيث ان المستضد قد أدى إلى ارتفاع معامل البلعمة وكذلك جدول (16) الذي بين ارتفاع البين ابيضاض 10(IL-10) فالعلاقة بينها طردية ويقوم البين ابيضاض 10 بتنشيط استجابات T-helper 1 (Th_1) ويعتبر من الجزيئات المهمة في السيطرة على الإصابات الفايروسية وحالات الحساسية وأمراض المناعة الذاتية(40) تبين النتائج المعروضة في الجدول (17) مستويات البين ابيضاض 10 للحيوانات المختبرية بعد تجريعها بالطفيلي، ولوحظ الاستمرار في ارتفاع البين ابيضاض 10 اكثر من السابق بفروق معنوية بمستوى (P<0.05) مقارنة مع السيطرة الموجبة حيث ارتفعت نسبته بنسبة (23,43.2) بيكو غرام/ مللتر على التوالي وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات (41، 42، 43) كما أنها جاءت غير متفقة مع(44) وقد أشار (45) ان البين ابيضاض 10 يساهم في مقاومة المضيف من خلال قيامه بالحفاظ على الحاجز الطلائي للأمعاء وان البين ابيضاض 10 يعمل على تحفيز إنتاج المادة المخاطية Mucin بوساطة الخلايا الكأسية Goblel Cell في الطبقة الظهارية (epithelium layer) المخاطية للأمعاء وقد لوحظ في الفئران التي لديها نقص في البين ابيضاض 10 (IL-10) تكون الخلايا الظهارية (Epithelium cell) لها غير قادرة على إنتاج Mucin الذي يعتبر المركب الأساسي للحد من التصاق الأميبا بالأمعاء (46) وقد وجد (47) ان النقص في البين ابيضاض 10 في الفئران المختبرية يؤدي إلى زيادة في قابلية الخمج بالأميبا ويزيد من إمراضيه الطفيلي.

جدول (16) مستوى البين ابيضاض 10 (IL-10) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	بين ابيضاض 10(Il-10) (Pg/ml)	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري	
O-Antigen	5.45 ± 34.58	a
Negative control	3.01 ± 18.72	b

جدول (17) مستوى البين ابيضاض10(IL-10) للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	بين ابيضاض 10(Il-10) (Pg/ml)	قيمة P
	المعدل ± الانحراف المعياري	
O – E	6.58 ± 43.2	a
Positive control	8.33 ± 23.06	a

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى p>0.05 مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير المستضد (O) على مستوى البين ابيضاض 12 (IL-12):** بينت نتائج الدراسة الحالية المبينة في جدول (18) ارتفاع معنوي بمستوى (P<0.05) للبين ابيضاض 12 (IL-12) حيث بلغت نسبته للمستضد (O) (18.6,29.3) بيكو غرام/ مللتر مقارنة مع السيطرة السالبة أما بعد الخمج بالطفيلي المبينة في جدول (19) فنلاحظ ارتفاع مستوى البين ابيضاض 12(IL-12) اعلى من النتائج السابقة الذكر بوجود المستضد وحده حيث ارتفعت معنوياً بمستوى (P<0.05) حيث بلغ مستضد (O) مع وجود الطفيلي بنسبة (17.3, 40.2) بيكو غرام/ مللتر مقارنة مع السيطرة الموجبة وجاءت هذه النتائج متوافقة مع العديد من الدراسات التي تؤكد ان الابتدائيات الطفيلية لها دور فعال في تحفيز البلاعم والخلايا التشجيرية لإنتاج البين ابيضاض 12(IL-12)(48) يمنع طور أمامي السوط (Promastigote) لطفيلي *Lishmania major* يمنع البلاعم من إنتاج IL-12 في الفئران وفي المقابل فإن الطور اللامسوط (amastigote) يحفز الخلايا التشجيرية لإنتاج البين ابيضاض 12 (49)، وكذلك بالنسبة لطفيلي *Trypanosome cruzi* فإن الطور المثقبي Trypomastigole يحفز البلاعم لإنتاج البين ابيضاض 12 (IL-12) في الفئران وكذلك الحال بالنسبة لطفيلي المقوسات الكونديه *Toxoplsma gondii* (50) ونلاحظ ارتفاع البين ابيضاض 12(IL-12) متزامن مع ارتفاع الانترفيرون كاما وجاءت نتائجنا هذه متوافقة مع (51) حيث وجد ارتفاع البين ابيضاض 12(IL-12) مع ارتفاع الانترفيرون كاما في المصابين بطفيلي *E. histolytica* والسبب في ذلك هو ان مستضدات البكتريا سوف تعمل على تحفيز البلاعم (Macrophage) على إنتاج الانترفيرون كاما وان مصدر إنتاج الانترفيرون كاما هي الخلايا القاتلة الطبيعية والخلايا العدلة عند الإصابة بالابتدائيات والتي تتشابه مع مصدر إنتاج البين ابيضاض 12(IL-12) حيث ان البلاعم والخلايا التشجيرية والعدلات (Neutrophil) فالبلاعم المستحثة بأنتروفيرون كاما تساهم في إنتاج البين ابيضاض 12(IL-12).

جدول (18) مستوى البين ابيضاض 12 (IL-12) للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	بين ابيضاض 12(Il-12) (Pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-Antigen	1.455 ± 29.320	b
Negative control	2.976 ± 18.620	C

جدول (19) مستوى البين ابيضاض12(IL-12) للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	بين ابيضاض 12(Il-12) (Pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O-E	2.308 ± 40.220	a
Positive Control	4.489 ± 17.320	b

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى p>0.05 مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير المستضد (O)على مستوى الانترفيرون كاما(IFN-γ):** أوضحت نتائج الدراسة الحالية المبينة في جدول (20) ان مستوى الانترفيرون كاما IFN-γ قد ارتفع معنويا بمستوى (P<0.05) حيث بلغت نسبة لمستضد (O) مقارنة مع السيطرة السالبة (20.3, 29.1) بيكو غرام/ مللتر على التوالي أما بعد التجريع بالطفيلي كما في جدول (21) نلاحظ ارتفاع الانترفيرون كاما IFN-γ اعلى من السابق وبفروق معنوية بمستوى (P<0.05) حيث ارتفعت نسبته مع الطفيلي بنسبة (16.4, 45.3) بيكو غرام/ مللتر مقارنة مع السيطرة الموجبة، وتوجد الكثير من الدراسات لتي تشير إلى دور انترفيرون كاما IFN-γ في القضاء على الطفيليات ومنها طفيلي الأميبا حيث ان ارتفاع انترفيرون كاما IFN-γ يوفر حماية ضد الأميبا من خلال تحفيز البلاعم وخاصه العدلات داخل الجسم ولا يستطيع الانترفيرون كاما IFN-γ ان يحقق هذا بدون مساعدة أو تعزيز

مناعي حيث بين (52) ان ارتفاع الانترفيرون الفا TNF-α مع كاما IFN-γ مع البين ابيضاض 2(IL-2) المنتج من خلايا T ,CD_4 كلها متناسقة العمل ضد الأميبا وتكون ذات فعل تآزري لقتل ناشطات الأميبا، كما تتفق دراستنا مع(53) حيث اعتبر الانترفيرون كاما IFN-γ هو الخطوة الأولى لصناعة لقاح ضد الأميبا حيث ارتفع عنده انترفيرون كاما IFN-γ وسايتوكينات Th_2 , والبين ابيضاض2 (IL-2) وعامل تنخر الأورام الفا TNF-α كما استطاع من توفير الحماية ضد الأميبا كما بينت نفس الدراسة إمكانية استخدام الانترفيرون كاما IFN-γ والبين ابيضاض 12(IL-12) البين ابيضاض 10(IL-10) لصنع لقاح للإنسان ضد طفيلي *E.histolytica* وهناك الكثير من الدراسات التي تدل على استخدام الانترفيرون كاما IFN-γ كلقاح بمساعدة العديد من السايتوكينات المنتجة من Th_1 حيث ان Th_1 تحفز وتعزز اللقاحات مثل IL-12 الذي تم استخدامه كلقاح ضد طفيلي *Leishmania major* (54) وضد الملاريا (55) والمقوسات الكوندية *Toxoplsma gondii* (56).

جدول (20) مستوى الانتروفيرون كاما IFN-γ للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O)

المجموعة	انترفيرون كاما IFN – γ (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O – Antigen	2.306 ± 29.180	ab
Negative control	7.886 ± 20.360	b

جدول (21) مستوى الانترفيرون كاما IFN-γ للحيوانات الممنعة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	انترفيرون كاما IFN – γ (pg/ml) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O – E	3.854 ± 45.320	a
Positive Control	3.827 ± 16.400	b

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

- **تأثير المستضد O على مستوى الكلوبيولينات المناعية IgG وIgM:** أظهرت نتائج الدراسة الحالية ارتفاعاً معنوياً بمستوى ($P<0.05$) لكلا الكلوبينات المناعية IgM ,IgG حيث يبين الجدول (22) مستوى الكلوبين المناعي IgG وجدول (23) مستوى الكلوبين المناعي IgM. وبلغت نسبة الكلوبين المناعي IgG لمجموعة المستضد (O) مع وجود الطفيلي مقارنة مع السيطرة الموجبة (3.46 ,2.24) مليغرام/ ديسيلتر على التوالي أما الكلوبين المناعي IgM فقد بلغت نسبته للمستضد (O) مقارنة مع السيطرة الموجبة هي (5.02 ,1.2) مليغرام/ ديسيلتر وهذه النتائج جاءت متوافقة مع العديد من الدراسات التي تشير إلى ارتفاع الأجسام المضادة IgG ,IgM المعنوية في مصول المصابين بالطفيلي حيث ان الامراضية التي يحدثها الطفيلي تقود إلى استجابة مناعية متمثلة بإنتاج الأجسام المضادة (57) حيث اتفقت أيضا مع (57، 58) حيث ارتفعت مستوى الأجسام المضادة في الحيوانات المصابة تجريباً بالطفيلي ولكن لم يكن معنوياً وكذلك مع (59) حيث وجد الزيادة الحاصلة في IgM اعلى من الزيادة الحاصلة في IgG وكذلك مع (60) حيث ارتفع IgM ,IgG في الأشخاص المخمجين بالطفيلي وتتفق أيضا مع (61) حيث لاحظ ارتفاع IgG عند حقن جسم الأرانب بكميات كبيرة من الطفيلي حيث أشار إلى ان IgG من اكثر الأضداد الموجودة في المصل حيث تؤدي دوراً كبيراً في النظام المناعي وذلك من خلال قيامها بمعادلة السموم ونظراً لبقائها فترة طويلة في الدم فهي قادرة على حماية المضيف من حالات تكرار الخمج بالطفيلي وكانت النتائج غير متوافقة مع (62) حيث انخفضت الأجسام

المضادة في الحيوانات المجرعة تجريبا. ويعزى السبب في ارتفاع مستوى الكلوبيولينات المناعية بعد التعرض للمستضد (O) هو ان المستضد يعتبر ذيفان خارجي يعزز تكوين الضد والذي قد يكون من النوع الذي يتفاعل تصالبياً مع (Anti-antibody) الخاصة بالطفيلي نتيجة لاحتمالية التشابه بين المحددات المستضدية بين المستضد قيد الدراسة والطفيلي وعندما يتم التجريع بالطفيلي فانه يعتبر مستضد آخر دخل الجسم فيحدث فعالية التحفيز المناعي العام والذي يشاهد على شكل مقاومة غير متخصصة تجاه الخمج وذلك من خلال عمله على تحفيزه الخلايا البائية على الانقسام بعدها تبدأ خلايا B بالتضخم وبالانقسام المتكرر وتمايز الخلايا الناتجة عنها إلى خلايا البلازما (Plasma Cells) والتي تستجيب بتحرير كميات كبيرة من الضد ونوع آخر من الخلايا هي خلايا الذاكرة (63) memory cell كما يعزى السبب في ذلك إلى تزامن الاستجابة المناعية الخلوية من خلال الزيادة في أعداد الارومات اللمفية مع الإنتاج العالي للخلايا البلازمية التي تعمل على تكوين الأضداد التي تهاجم الطفيلي فلا يتمكن الطفيلي المرتبط مع الضد والمتمم من مقاومة الخلايا البلعمية إذ تقضي عليه وهذا ما أكدته نتائجنا من ارتفاع معامل البلعمة عند وجود الطفيلي.

جدول (22) مستوى الكلوبين المناعي IgG للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	مستوى الكلوبين IgG(mg/dl) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O – E	0.634 ± 3.4600	a
Positive Control	0.433 ± 2.2400	b

جدول (23) مستوى الكلوبين المناعي IgM للحيوانات المختبرية المعاملة بالمستضد (O) مع طفيلي *E. histolytica*

المجموعة	مستوى الكلوبين IgG(mg/dl) المعدل ± الانحراف المعياري	قيمة P
O – E	0.810 ± 5.020	a
Positive Control	0.308 ± 1.20	b

الأحرف الإنكليزية المتشابهة دلالة على عدم وجود فروق معنوية بمستوى $p>0.05$ مقارنة بين المجاميع.

المصادر

1. Tan, Z. N.; Wong, W. K.; Nik Zairi, Z.; Abdullah, B.; Rahmah, N.; Zeehaida, M.; Rumaizi, S.; Lalitha, P.; Tan, G. C.; Olivos-Garcia, A. & Lim, B. H. (2010). Identification of *Entamoeba histolytica* trophozoites in fresh stool sample: comparison of three staining techniques and study on the viability period of the trophozoites. Tropical Biomedicine. 27(1): 79-88.
2. Choi, M. H.; Sajed, D. & Poole, L. (2005). An usual surface peroxiredoxin protects invasive *Entamoeba histolytica* from oxidant attak.Mol. Bio., 10:9689-9699.
3. Fotedar, R.; Stark, D.; Beebe, N.; Marriott, D.; Ellis, J. & Harkness, J. (2007). Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin. Microbiol. Rev., 20(3): 511-532.
4. Belloni, A.; Aubert, D.; Gomez-Marin, J. E.; LeNaour, R.; Bohnomme, A.; Guenounou, M. & Pinon, J. M. (2000). Involvement of tumor necrosis factor-α during infection of human monocytic cells by *Toxoplasma gondii*. Parasitol. Res., 86: 406-412.
5. Hunter, S. B.; Bibb, W. F.; Shih, C. N.; Kaufman, A. F.; Miachel, J. R. & Mekinney, R. M. (1986). Enzyme Linked immunosorbentassay with major outer membrane prateins of Brucella melitensis to measure immune response to Brucella species. J. Clin. Microbiol., 24 (4): 566-572.
6. Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. & Randal, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193(1):265- 275.

7. John, D. T. & Petri, J. W. A. (2006). Medical Parasitology. q th ed. Saunders Elsevier.
8. Myers, R. L. (1995). Immunology A Laboratory Manual. 2nd Ed., W. C. Brown publishers. P. 83.
9. Allen, J. W.; Shuller, C. F.; Mendes, R. W. & Lah, S. A. (1977). A simplified technique for in vivo analysis of sister chromatid exchange using 5-bromodeoxy-uridine tablets. Cytogent. Cell Genet., 18: 231-237.
10. Hudson, L. & Hay, F. C. (1980). Practical Immunology. 3thed Black well Scientific Publication, Oxford London.
11. السعدي، حسن علي حسين. (2005). دراسة بكتيرية ومناعية للأنزيم الحال للبروتين نوع – أ – المستخلص من بكتريا *Proteus Mirabilis* المعزولة من خمج السل البولية. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم– الجامعة المستنصرية.
12. Murphy, T. F.; Dudas, K. C.; Mylotte, J. M. & Apicella, M. A. (1983). Subtyping system for an typable Haemophilus influenza based on outer membrane protenins. J. Infect. Dis., 147: 838-846.
13. Al-Kabi, S. J. M. (2006). A study of the effect of some antigens of *Klebsiella pneumoniae* on the immune response. Ph.D. Thesis. Al-Mustansiriya University.
14. Singh, A.; Ericttouft, B. H. & William, A. C. (2009). Rapid diagnosis of intestinal parasitic protozoa. J. Infect. Dis., 61(3): 280-286.
15. Clark, C. G. & Diamond, L. S. (2002). Methods of Cultivation of huminal parasitic protists of clinical importance. Clin. Microbiol. Rev., 15 (2): 329-341.
16. Griffiths, E.; Stevenson, P.; Thorpe, R. & Chart, H. (1985). Naturally occurring antibodies in human sera that react with the iron-regulated outer membrane protein of *Echerichia Coli.* Infect. Immun., 47 (3): 808-813.
17. Tomas, J. M.; Benedi, V. J.; Ciurana, B. & Jofre, J. (1986). Role of Capsule and O Antigen in Resistance of *klebsiella pneumonia* to serum Bactericidal activity. Infect. Immun., 54 (1): 85-89.
18. Cech, P. & Lahrer, R. I. (1984). Heterogenicity of human neutrophil phagolysosomes: Functional consequences for candidacidal activity. Blood, 64: 147-151.
19. Boyum, A. (1968). Isolation on mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest., 21: 77-89.
20. Nonoyama, S.; Kojo, H.; Mine, Y.; Nishida, M.; Goto, S. & Kuwahara, S. (1979). Inhibitory effect of *pseudomonas aeruginosa* on the phagocytic and killing of rabbit polymorphonuclear leukocytes: Mechanism of action of a Polymorphonuclear leukocytes inhibitor. Infect. Immun., 24: 399-403.
21. Mendes, N. E.; Tolnal, M. E. A.; Silveira, N. P.; Gillbertsew, R. B. & MetzGar, R. S. (1973). Technical aspects of the rosette lest used to detect human complement receptors (B) and sheep erythrocyte binding (T) Lymphocytes. J. Immunol., 111: 861-867.
22. Cryz, S. J.; Furer, E. & Germanier, R. (1985). Safety and immunogenicity of *Klebsiella pneumonia* K1 Capsular Polysaccharide vaccine in human. J. Infect. Dis., 151: 665-671.
23. Black wood, L. I. & Rowe, J. I. (1987). Suppression of delayed type hypersensitivity and cell-Mediated immune responses to *Listeria monocytogenes* induced by *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immune., 55: 639-644.
24. Alurkar, V. & Kamat, R. (1997). Immunomodulatory properties of porins of some members of the family Enterobacteriaceae. Infect. Immun.,65(6):2382-2388.

25. Weber, F. S.; Ramos, V. V. & Barajas, C. A. (2001). Evoluacion de la eficacia de glucoproteinas de *Klebsiella pneumoniae* en infeccions recurrentes. Alerg. Asma. Immunol. Pediatr., 10:33-39.

26. الخفاجي، نور سلمان كاظم. (2010). دراسة بكتريولوجية ومناعية لبكتريا *Citrobacter freundii* في الأرانب. رسالة ماجستير، كلية العلوم- جامعة بابل.

27. Simmons, C. P.; Clare, S.; Ghaem-Maghami, M.; Uren, T. K.; Rankin, J.; Huett, A.; Goldin, R.; Lewis, D. J.; MacDonald, T. T.; Strugnell, R. A.; Frankel, G. & Dougan, G. (2003). Central role for B lymphocytes and CD4+ T cells in immunity to infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. Infect. Immunol., 71:5077.

28. Abdurrahman, E. A. (2002). Extraction, purification and identification of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane immunological study. Ph.D. Thesis. Al- Mustansiriya University.

29. Goldsby, R. A.; Kindt, T. J. & Osborne, B. A. (2003). Kuby Immunology. 5th ed., W.H. Freeman and Company. New York.

30. كندريان، سوزان إسماعيل مجيد. (2002). دراسة بعض الجوانب المناعية لمستضدات بروتينات الغشاء الخارجي لبكتريا *Escherichia coli*. رسالة ماجستير، كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

31. 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. Immun1., 54:5071-5079.

32. Weir, D. M. (1973). Handbook of experimental immunology Vol. 2: Cellular Immunol. PP. 2712-2718.

33. Roitt, I.; Brostoff, J. & Male, D. (2001). Immunology. 6th ed., Harcourt publisher limited. Mosby. London.

34. Bellani, J. A. (1985). Immunology. 3ed W. B. Saunders Company. Philadelphia, Lendon, Toranto, Mexico city, Riodejaneiro, Sydnuy, Tokyo.

35. عبد الرحمن، إبراهيم عبد الكريم. (2002). استخلاص وتنقية وتوصيف الغشاء الخارجي لبكتريا *Psudomonas aeurignosa* دراسة مناعية.أطروحة دكتوراه، كلية العلوم- الجامعة المستنصرية.

36. Levinson, W. & Jawetz, E. (2000). Medical microbiology and immunology. 6th ed. Lange medical Books/ Mc Grow Hill Medical Publishing Division. U.S.A.

37. Klugman, K. P.; Kenyon, T. A.; Rumisha, D. & Huebner, D. (1987). Protective activity of Vi-capsular polysaccharide vaccine aginsat typhoid fever. The Lancet.Vol:1165-1169.

38. Moore, T. A.; Perry, M. L.; Getsoian, A. G.; Newstead, M. W. & Standifor, T. J. (2002). Divergent role of gamma interferon in a murine model of pulmonary versus systemic *Klebsiella pneumoniae* infection. Infect. Immun., 70 (116): 310-631.

39. Yoshida, K.; Matsumoto, T.; Tateda, K.; Uchida, K.; Tsujimoto, S.; Yamaguchi, K. (2001). Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. J. Med. Microbiol., 50(5):456-461.

40. Maldonado-Bernal, C.; Kirschning, C. J.; Rosenstein, Y.; Rocha, L. M.; Rios-Sarabia, N.; Espinosa-Cantellano, M.; Becker, I.; Estrada, I.; Salazar-González, R. M.; López-Macías, C.; Wagner, H.; Sánchez, J. & Isibasi, A. (2005). The innate immune response to *Entamoeba histolytica* lipopeptidophosphoglycan is mediated by toll-like receptors 2 and 4. Parasite Immun., 27(4): 127-137.

41. أنور، شيلان اكبر. (2014). دراسة وبائية مناعية للخمج بطفيلي *E. histolytica/ E. dispar* بين الأطفال المراجعين لمستشفى الأطفال في كركوك مع محاولة علاجية باستخدام Deferoxamine والزنك كعلاج بديل للزحار الأميبي. أطروحة دكتوراه، كليه التربية– جامعة تكريت.

42. الخزعلي، رغد خويطر مايح. (2014). دراسة لمستوى البين ابيضاض 17، عامل التنخر الورمي– ألفا والبين ابيضاض10 وبعض التغيرات الدموية للمرضى المصابين بالأميبا الحالة للنسج *Entamoeba histolytica*. رسالة ماجستير، كلية العلوم للبنات– جامعة بغداد.

43. Isabel, W.; Marcela, A.; Ismael, M.; Itzmel, R.; Lourdes, A.; Eduardo, F.; Constantino, L. & Armando, I. (2010). The role of lipopeptido phosphoglycan in the immune response to *Entamoeba histolytica* biomed and Biotechnol, Articale ID 254521, P. 12.

44. Garcia, Z.; Rojas, L.; Esquivel, V. & Ostoa, S. (2007). Regulation of the inflammatory immune response by the cytokine/ chemokine network in amoebiasis. Parasite Immunol., 10: 136-148.

45. Kyou-Nam, C.; Stephen, M. & Eric, R. (2010). The NF-κB p50 subunit is protective during intestinal *Entamoeba histolytica* infection of 129 and C57BL/6 Mice. Infect. Immun., 78 (4): 1475-1481.

46. Shinjiro, H.; Amon, A.; Suzanne, E.; Thomas, A.; Edward, H. & Eric, H. (2006). Resistance of C57BL/6 mice to amoebiasis is mediated by nonhemopoietic cell but requires hemopoietic IL-10 production. Am. Ass. Immunol., 177: 1208-1213.

47. Moonah, S. N.; Jiang, N. M. & Petri, W. A. (2013). Host immune response to intestinal amebiasis. PLoS Pathog. 9:e1003489.

48. Gazzinelli, R. T.; Camargo, M. M.; Almeida, I. E.; Morita, Y. S.; Giralda, M.; Acosta Serranom, A.; Hieny, S.; Englund, P. T.; Ferguson, A. J.; Ravassos, L. R. & Sher, A. (1997). Identification and characterization of protozoan productsthat trigger the synthesis of 1L-12 by inflammmatory. macrophages Chem. lmmunol., 68:136-152.

49. Von Stebut, E.; Belkaid, Y.; Jakob, T.; Sacks, D. L. & Udey, M. C. (1998). Uptake of leishmania major amastigotes resultsin activation and interleukin-12 release from murine skin-derived dendritic cells: Implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. J. Exp. Med., 188:1547-1552.

50. Camargo, M. M.; Almeida, I. E.; Pereira, M. E. S.; Ferguson, M. A. J.; Travassos, L. R. & Gazzinelli, R. T. (1997). Glycophosphatidylinositol.-anchoredmucin-like glycoproteinsisolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the of proinflammatory cytokines by macrophages. J. Immunol., 158:5890-5901.

51. Pfaff, A. W.; Kirch, A. K.; Hoffmann, W. H.; Banla, M.; Key, H. S.; Geiger, S. M. & Soboslay, P. T. (2003). Regulatory effects of IL-12 and IL-18 on *Onchocerca volvulus*- and *Entamoeba histolytica*-specific cellular reactivity and cytokine profiles. Parasite Immunol., 25 (6): 325-332.

52. Haque, R.; Mondal, D.; Shu, J.; Roy, S.; Kabir, M.; Davis, A. N.; Duggal, P.; Wilium, A. & Petri, J. R. (2007). Correlation of interferon-γ production by peripheral blood mononuclear cells with childhood malnutrition and susceptibility to amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 76 (2): 340-344.

53. Guo, X.; Stroup, S. E. & Houpt, E. R. (2008). Persistence of *Entamoeba histolytica* infection in CBA mice owes to intestinal IL-4 production and inhibition of protective IFN-γ. Mucos. Immunol., 1:139-146.

54. Kenney, R. T.; Sacks, D. L.; Sypek, J. P.; Vilela, L.; Gam, A. A. & Evans-Davis, K. (1999). Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. J. Immunol., 163: 4481-4488.

55. Su, Z.; Tam, M. F.; Jankovic, D. & Stevenson, M. M. (2003). Vaccination with novel immunostimulatory adjuvants against blood-stage malaria in mice. Infect. Immun., 71:5178-5187.

56. Cuppari, A. F.; Sanchez, V.; Ledesma, B.; Frank, F. M.; Goldman, A.; Angel, S. O. & Martin, V. (2008). *Toxoplasma gondii* protease inhibitor-1 (TgPI-1) is a novel vaccine candidate against toxoplasmosis. Vaccine, 26:5040-5045.

57. Wright, R. L.; Seaner, R. M.; Keepers, T. R.; Wilkins, L. A. & Petri, W. A. (2002). The mouse model of amoebic colitis reveals mouse strain susceptibility to infection and exacerbation of disease by CD4 T-cells. J. Immunol., 169 (15): 440-450.

58. Jarillo-Luna, R. A.; Campos-Rodriguez, R. & Tsutsumi, V. (2002). *Entamoeba histolytica*: immunohistochemical study of hepatic amoebiasis in mouse, neutrophils and nitric oxide as possible factors of resistance. Exp. Parasitol., 101(13):40-56.

59. Ximénez, C.; Hernández, J.; Melendro, E. & Ramíro, M. (1990). Fecal and serum anti-amebic antibodies in acute intestinal amebiasis. Arch. Invest. Med., (Mex)., 21 (1):239-244.

60. Al-Khushali, M. N. (2012). Toxoplasmosis in relation to *Entamoeba histolytica* and *Giardia lamblia* Infection. D. J. M., 2(1):38-45.

61. Abioye, A. A.; Lewis, E. A. & Mcfarlane, H. (1972). Clinical evaluation of serum immunoglobulins in amoebiasis. Immunolo., 23: 937-946.

62. Costa, C. A. X.; Nunes, A. C.; Ferreira, J. A.; Gomes, M. A. & Caliari, M. V. (2010). *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* trophozoites in the liver of hamsters: in vivo binding of antibodies and complement. Published online 3: 23.

63. Levinson, W. & Jawetz, E. (2000). Medical microbiology and immunology. 6^{th} ed., Lange medical Books/ Mc Grow Hill Medical Publishing Division. U.S.A.