EFFECT OF MIXING COLIGEN AND HEMORRHAGIC SEPTICAEMIA VACCINES ON THE IMMUNE RESPONSE IN ANIMALS

Khalifa A. Khalifa[1], Tarik J. Fiall[1] and Kifah A. Al-Jubouri[1], Department of Microbiology Department of Medicine & Therapeutic[1], College of Veterinary Medicine, University of Baghdad.

SUMMARY

This study was done to evaluate the possible effect of mixing coligen vaccine prepared from *E. coli* with hemorrhagic septicaemia vaccine prepared from *P. multocida* on the development of immunity. Awwasi sheep were used as experimental animals. A slight increase in the mean antibody titers in the animal group vaccinated with the mixed vaccine compared to the groups received each vaccine separately was noticed. Challenge experiment showed that protection against heterologous organisms by using homologous vaccine was low (12.5%) in comparison with the group received homologous vaccine (protection 87.5%). No detectable reaction was noticed with the antisera and heterologous antigens.

Parant, M., Audibert, F., Parent, F., Chedid, D., Solver, E., Polonsky, J. and Lederer, E. (1978). Nonspecific immunostimulant activities of synthetic trehalose-6, 6-Diester (Lower homologs of cord factor). Infec. Immun. 20:12.

Rush, H.G. Gloriosa, J.C., Dakito, A. and Olson, L. (1981). Resistance of *P. multocida* to rabbit neutrophil phagocytosis and killing. Amer. J. Vet. Res. 42:1760-1768.

Rutter, J.M. and Anderson, J.C. (1972). Experimental neonatal diarrhea caused by an enteropathogenic strain of *E. coli* in piglet: a study of the disease and effects of vaccinating the dam. J. Med. Microbiol. 5:197.

Sandhu, T.S. and Layton, H.W. (1985). Laboratory and field trails with formalin-inactivated *E. coli* (078) *Pasteurella anatipestifer* bacterin in white Pekin ducks. Avian Dis. 29:128-135.

Snodgrass, D.R. (1986). Evaluation of a combined rotavirus and enterotoxigenic *E. coli* vaccine in cattle. Vet. Rec. 119:39-42.

Al-Lebban, Z.S.M. (1983). Vaccine efficacy. Pathology and hematology of rabbits infected with *Pasteurella multocida* following vaccination with a mutant *Escherichia coli* O 111 or *Pasteurella multocida*. Ph.D. Thesis, Kansas State University.

Bennedsen, J. and Larsen, S.O. (1977). The BCG induced resistance to listeriosis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C. Immunol. 83:377.

Brandt, A.E. and Ziegler, E.J. (1977). Antibody to cell wall glycolipid of Gram negative bacteria induction of immunity to bacteremia and endotoxemia. J. Infec. Dis. 136 Suppl. 5167-5173.

Carter, G.R. (1955). Studies on *Pasteurella multocida*. A hemagglutination test for identification of serological types. Amer. J. Vet. Res. 16:481-484.

Carter, G.R. (1967). Pasteurellosis:*Pasterurella multocida* and *P. hemolytica*. Adv. Vet. Sci. 11:321-379.

Collins, F.M. (1973). Vaccines and cell mediated immunity. Bacteriol. Rev. 38:371-402.

Collins, F.M. and Scott, M.T. (1974). Effect of *Corynebacterium parvum* treatment on the growth of *Salmonella enteritides* in mice. Infec. Immun. 9:863.

Klein, E., Holtermann, O.A., Case, R.W., Milgrom, H., Rosner, D. and Adler, S. (1974). Responses of neoplasm to local immunotherapy. Amer. J. Clin. Pathol. 62: 281.

Nagy, L.K., Painter, K.R. and Mackenzie, T. (1985). Evaluation of procholeragenoid against experimental colibacillosis in piglets of vaccinated dams. Vet. Rec. 116:123-125.

مع كل لقاح على حدة ولقد لوحظ بان هناك زيادة طفيفة في مستوى الاجسام المضادة بعد مرور اربعة اسابيع من التمنيع ضد كل من جرثومتي الباستوريلا مالتوسيدا والاشريشيا القولونية في المجاميع التي منعت باللقاحين سوية مقارنة باعطاء اللقاحات بصورة منفردة لكن هذا الفرق لم يكن معنويا من الناحية الاحصائية. ان العدد القليل من الاغنام المستعملة قد لايعطي الصورة الواضحة لهذا التاثير لذلك يفضل اجراء مثل هذه التجارب على عدد اكبر من الحيوانات واختيار العتر المناسبة من البكتريا.

لقد اعطى لقاح الكولجين حماية ضئيلة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا وصلت الى ٥ر١٢٪ لكن افضل حماية هي بعد استعمال اللقاح النوعي. من ناحية اخرى لم يكن مستوى الاجسام المضادة في الاغنام الممنعة بلقاح الكولجين بالمستوى الذي يمكن قياسه باستعمال مستضدات الباستوريلا. لقد كان هذا المستوى واطئا او في اغلب الاحيان منعدما في الحيوانات طيلة الفترة الزمنية المحددة للتجربة. اوضح Rush et al., (1981) بان دور الاجسام المضادة قد لايكون كبيرا في مقاومة الاصابة بجراثيم الباستوريلا مالتوسيدا وربما يكون هناك دور للاجسام المضادة الموضعية خصوصا صنف IgA الثنائي او ربما يكون هناك دور للاستجابة المناعية الخلوية.

وعلى الرغم من ان استعمال المستضدات الخاصة بالباستوريلا تعطي حماية عالية ضد جرعة التحدي لهذه الجراثيم فلقد وجد بان التمنيع بجراثيم الاشريشيا القولونية يعطي حماية ضئيلة ضد الباستوريلا. ومن هذا المنطلق فان التمنيع باستخدام عتر معينة من جراثيم الاشريشيا القولونية مع لقاح الباستوريلا قد يكون مفيدا في كسب المناعة.

REFERENCES

Alexander, A.M. and Soltys, M.A. (1973). Relationship of serum agglutinin to protective immunity produced in turkeys immunized against fowl cholera. J. Comp. Pathol. 83:191-198.

المناقشـــة

تعتبر جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا من الجراثيم ذات الاهمية الاقتصادية حيث تسبب خسائر كبيرة في العديد من الحيوانات. لقد امكن عزل هذه الجراثيم من الابقار والجاموس والاغنام والخنازير، القطط والدواجن (Carter, 1967) وكذلك تعتبر الجرذان والفئران والارانب من الحيوانات التي تصاب بصورة طبيعية بهذه الجراثيم (Collins, 1973) تمتلك هذه الجراثيم مستضدات الكبسولة التي هي عبارة عن سكريات متعددة وكذلك تحتوي على المستضدات الجسمية.

لقد اجريت عدة محاولات لانتاج لقاح فعال ضد هذه الجراثيم. ومنذ ان قام باستور باشتاج لقاح ضد مرض الباستوريلا الا انه لازالت برامج التطعيم ضد هذا المرض غير فعالة ولعل ذلك يعود الى ان الحماية ضد المرض تمتاز بكونها خاصة للنمط المصلي (Collins, 1973). ان الحماية المتصالبة بين مختلف الانماط المصلية لجراثيم الباستوريلا مالتوسيدا تختلف كبيراً حتى ولو كانت هذه الانماط المصلية معزولة من نفس العائلة. هذه الحماية غالبا ماتكون غير مؤثرة الا في حالة استعمال النمط المصلي الخاص باللقاح (Alexander & Soltys, 1973).

استخدمت الكثير من الطرق لغرض رفع الكفاءة المناعية من اللقاحات المحضرة من الجراثيم السالبة لصبغة كرام حيث ان اغلب هذه الجراثيم تشترك باحتوائها على نفس اللب core الخاص بالسكريات العدادية الدهنية. هذه المكونات تشترك بالصفة الاستضدادية المتصالبة وبالتالي الحماية المشتركة بينها. لقد وجد بان الامصال المضادة لبعض الطفرات الخاصة بالاشريشيا القولونية يمكنها علاج حالات الاصابة الشديدة الناتجة عن الاصابة بجراثيم الـ Klebsiella pneumoniae; Pseudomonas aeruginosa اضافة الى E. coli. وقد وصلت الحماية ضد P. aeruginosa في الارانب الممنعة بطفرة من جراثيم الاشريشيا القولونية الى درجة عالية مقارنة باستعمال لقاح الـ P. aeruginosa نفسه وذلك نظرا لكون السكريات العدادية الدهنية لجراثيم الباستوريلا تشترك مع سكريات الـ E. coli (Brandt and Ziegler, 1977). ثم في هذه الدراسة مزج لقاحي الباستوريلا والاشريشيا القولونية وقورنت النتائج

تكن ذات مستوى احصائي معنوي.

كان مستوى الاجسام المضادة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا في المجموعة الملقحة بلقاح الكولجين واطئا او معدوما طيلة فترة التجربة.

اما تفاعلات الانتشار المناعي فقد اظهرت عدم تكون خطوط ترسيبية مع مستضدات الخلايا المغايرة في حين تكونت هذه الخطوط مع المستضدات المماثلة.

المقاومة في الفئران:

ظهر افضل مستوى للحماية بعد مرور ٣ اسابيع من اجراء عملية التمنيع وكان ٨٧ر٥٪ في المجموعة المحقونة بلقاح جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا وكذلك المجموعة المحقونة بلقاح جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا ممزوجا مع لقاح الكولجين ثم بدء مستوى الحماية بالانخفاض بعد هذه الفترة. اما المجموعة المحقونة بلقاح الكولجين اظهرت مستوى منخفض من الحماية وصل الى ١٢ر٥٪ بينما لم تعط مجموعة السيطرة اي مستوى للحماية (جدول رقم ٥).

جدول رقم ٥: اختبار المقاومة في الفئران باستعمال 100 LD50 من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا عالية الضراوة

المجاميع	النسبة المئوية للمقاومة في الفئران		
	ثلاثة اسابيع	ستة اسابيع	تسعة اسابيع *
المجموعة الاولى	٨٧ر٥٪	٥٠٪	٠٪
المجموعة الثانية	١٢ر٥٪	٠٪	٠٪
المجموعة الثالثة	٨٧ر٥٪	٥٠٪	٠٪
المجموعة الرابعة	٠٪	٠٪	٠٪

* هلكت كافة الحيوانات كذلك عند اجراء فحص التحدي لفترتي ١٢ و ١٥ اسبوع.

جدول رقم ٣: المعيار الحجمي للاجسام المضادة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا في الاغنام المحقونة باللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا ممزوجا بلقاح الكولجين

رقم الحيوان	المعيار الحجمي للاجسام المضادة بعد التمنيع			
	اسبوعين	اربعة اسابيع	ستة اسابيع	ثمانية اسابيع
١	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	٥١٢
٢	١٠٢٤	٥١٢	٥١٢	٥١٢
٣	٢٥٦	٥١٢	٥١٢	٢٥٦
٤	١٠٢٤	١٠٢٤	١٠٢٤	٥١٢
المعدل الحسابي	٨٣٢	٧٦٨	٧٦٨	٤٤٨
الانحراف القياسي	٣٣٢ر٥٥	٢٥٦ر٠٠	٢٥٦ر٠٠	١١٠ر٨٥

جدول رقم ٤: المعيار الحجمي للاجسام المضادة ضد جراثيم الاشريشيا القولونية في الاغنام المحقونة باللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا ممزوجا بلقاح الكولجين

رقم الحيوان	المعيار الحجمي للاجسام المضادة بعد التمنيع			
	اسبوعين	اربعة اسابيع	ستة اسابيع	ثمانية اسابيع
١	٥١٢	٥١٢	١٢٨	٦٤
٢	٥١٢	١٠٢٤	٢٥٦	١٢٨
٣	٥١٢	١٠٢٤	١٢٨	١٢٨
٤	٥١٢	١٠٢٤	١٢٨	١٢٨
المعدل الحسابي	٥١٢	٨٩٦	١٦٠	١١٢
الانحراف القياسي		٢٢١ر٧٠	٥٥ر٤٣	٢٦ر٥٣

جدول رقم ١: المعيار الحجمي للاجسام المضادة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا في الاغنام المحقونة باللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا

رقم الحيوان	المعيار الحجمي للاجسام المضادة بعد التمنيع			
	اسبوعين	اربعة اسابيع	ستة اسابيع	ثمانية اسابيع
١	١٠٢٤	٥١٢	٥١٢	٢٥٦
٢	١٠٢٤	٥١٢	١٠٢٤	٥١٢
٣	٥١٢	١٠٢٤	٥١٢	٥١٢
٤	١٠٢٤	٥١٢	٥١٢	٥١٢
المعدل الحسابي	٨٩٦	٦٤٠	٦٤٠	٤٤٨
الانحراف القياسي	٢٢١ر٧٠	٢٢١ر٧٠	٢٢١ر٧٠	١١٠ر٨٤

جدول رقم ٢: المعيار الحجمي للاجسام المضادة ضد جراثيم الاشريشيا القولونية في الاغنام المحقونة بلقاح الكولجين

رقم الحيوان	المعيار الحجمي للاجسام المضادة بعد التمنيع			
	اسبوعين	اربعة اسابيع	ستة اسابيع	ثمانية اسابيع
١	٥١٢	١٠٢٤	٢٥٦	١٢٨
٢	٥١٢	١٠٢٤	١٢٨	١٢٨
٣	٥١٢	٥١٢	١٢٨	٦٤
٤	٥١٢	٥١٢	١٢٨	١٢٨
المعدل الحسابي	٥١٢	٢٦٨	١٦٠	١١٢
الانحراف القياسي		٢٥٦	٥٥ر٤٣	٢٦ر٥٣

من مجموع الفئران المستخدمة في كل عملية تحدي.

تمنيع الاغنام: قسمت الاغنام الى اربعة مجاميع وكما يلي:

حقنت المجموعة الاولى بلقاح الباستوريلا. اما المجموعة الثانية حقنت بمزيج من لقاحي الباستوريلا والكولجين وحقنت المجموعة الثالثة بلقاح الكولجين فقط وتركت المجموعة الرابعة كسيطرة.

النتائـــــج

قياس مستوى الاجسام المضادة:

تم قياس مستوى الاجسام المضادة في الاغنام الممنعة باللقاحات المستخدمة في هذه الدراسة باستخدام طريقة التلازن الدموي غير المباشر. اظهرت مجاميع الاغنام الممنعة بلقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا افضل مستوى للاجسام المضادة بعد مرور اسبوعين من اجراء التمنيع حيث وصل الى ١٠٢٤ وبمتوسط حسابي ٨٦٠ ثم بدأ هذا المستوى بالانخفاض التدريجي بعد هذه الفترة حتى وصل ادنى مستوى له ٢٥٦ وبمتوسط حسابي ٤٤٨ بعد مرور ثمانية اسابيع من اجراء التمنيع (جدول رقم ١) واعطيت الاغنام المحقونة بلقاح الكولجين افضل مستوى للاجسام المضادة بعد مرور اربعة اسابيع من الحقن حيث كان ١٠٢٤ بمعدل حسابي ٧٦٨ ثم بدأ المستوى بالانخفاض حتى وصل ٦٤ بمعدل حسابي ١١٢ بعد ثمانية اسابيع من الحقن (جدول رقم ٢).

اما مجموعة الاغنام الممنعة باللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا ممزوجا مع لقاح الكولجين فقد اظهرت افضل مستوى للاجسام المضادة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا بعد اسبوعين من التمنيع وكان ١٠٢٤ بمعدل حسابي ٨٣٢ (جدول رقم ٣).

لوحظ افضل مستوى للاجسام المضادة ضد جراثيم الاشريشيا القولونية بعد مرور اربعة اسابيع من التمنيع حيث كان ١٠٢٤ بمعدل حسابي ٨٩٦ (جدول رقم ٤). لقد لوحظ في التحليل الاحصائي بان افضل زيادة حاصلة في مستوى الاجسام المضادة كانت محصورة للفترة بعد ٤-٦ اسابيع من عملية التمنيع واظهرت المجاميع المحقونة بلقاح الكولجين ممزوجا مع اللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا زيادة ملحوظة في مستوى الاجسام المضادة الا انها لم

للامراضية في العجول هي:

B 41 (0101:K-:K99),(08:K85:K99), (0101:K30:K99,(09:K35:K99)

٢. العترة الجرثومية : استخدم نوعين من الجراثيم:

اولا: جراثيم P.multocida استخدمت العترة الجرثومية المجهزة من مديرية المختبرات والبحوث البيطرية وكان تصنيفها روبرت ١ حسب تصنيف كارتر (Carter, 1955)

ثانيا: جراثيم E.coli: استعملت اربعة عتر تم الحصول عليها من Bozeman, Montana State رقم الوجبة 59717.

٣. الحيوانات:

اولا: الاغنام: استخدمت الحملان المحلية (ذكور واناث) من النوع العواسي بعمر تسعة اشهر تقريبا وشخصت سريريا ومختبريا للتأكد من سلامتها من الامراض. تم التحري عن وجود الاجسام المضادة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا والاشريشيا القولونية قبل البدء بالتجربة.

ثانيا: الفئران: استخدمت الفئران البيضاء نوع BALB/C من الذكور والاناث وتم فحصها للتأكد من سلامتها من الامراض.

تصنيع الفئران: قسمت الفئران الى اربع مجاميع تضم المجموعة الواحدة اربعون فأرا. حقنت المجموعة الاولى بـ ٠٫٢٥ ملليتر من لقاح الباستوريلا مالتوسيدا تحت الجلد واعطيت جرعتين من هذا اللقاح. اما المجموعة الثانية فلقد حقنت بكمية ١٫٠ ملليتر من لقاح الكولجين تحت الجلد وبجرعتين ايضا. حقنت المجموعة الثالثة بمزيج من لقاحي الباستوريلا والكولجين بجرعتين ايضا وتركت المجموعة الرابعة كسيطرة.

حساب المقاومة باجراء اختبار التحدي:

تم اجراء التحدي بجرعة مقدارها 100 LD50 من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا عالية الضراوة وعلى فترات زمنية منتظمة بعد ٣، ٦، ٩، ١٢، ١٥ اسبوع من التمنيع ومن ثم مراقبة الفئران لمدة اسبوع وحساب الفئران الناقة. ثم حساب مستوى الحماية بحساب عدد الفئران المقاومة لجرعة التحدي

وذلك باستعمال لقاحات بعض الجراثيم المغايرة مثل لقاح السل BCG ضد مرض اللستريا (Bennedsen & Larsen, 1977) والـ Corynebacterium parvum على السالمونيلا (Collins & Scott, 1974) كذلك استخدمت بعض المركبات الكيمياوية كمواد مقوية للاستجابة المناعية مثل الـ DNCB (Klein et al., 1974) والـ Trehalose (Parant et al., 1978) كذلك حاول Al-Lebban (1983) استخدام الاشريشيا القولونية للوقاية من الباستوريلا مالتوسيدا. كذلك استخدم لقاح مركب من P.multocida, E.coli 078 (Sandhu and Layton, 1985)، كما استخدم Nagy et al., (1985) توكسيدات الكوليرا (التوكسويد) للتمنيع ضد الاشريكيا القولونية المنتجة للذيفانات الداخلية. واستخدم بعض الباحثين لقاحات مركبة من الاشريشيا القولونية وبعض الفايروسات (Snodgrass, 1986). كان الغرض من هذه الدراسة هو تتبع الاستجابة المناعية في الاغنام بعد تطعيمها بلقاح عفونة الدم النزفية ولقاح الكولجين بصورة منفردة وممزوجة وكذلك دراسة المقاومة في الفئران ضد جراثيم P.multocida عالية الضراوة بعد تطعيمها بنفس اللقاحين بصورة ممزوجة ومنفردة ايضا.

المواد وطرق العمـــــل

١. اللقاحات

اولا: لقاح عفونة الدم النزفية Hemorrhagic septicaemia vaccine

تم تحضير هذا اللقاح في مختبر المناعة/ كلية الطب البيطري - جامعة بغداد من عشر جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا المعزولة محليا والمصنفة روبرت ١ (Robert, 1) على وسط زرعي خاص يحتوي المليلتر الواحد منه على حوالي ١٠x٥ / مللتر بكتريا مقتولة بمادة الفورمالين ٠ر٥٪ مضافا اليها هيدروكسيد الالمنيوم ٠ر٣٪ كعامل مساعد.

ثانيا: لقاح الكولجين المحضر من قبل شركة Fort Dodge Laboratories Inc. رقم وجبته Vet.No.112 ويتكون اللقاح من جراثيم الاشريشيا القولونية المرضية Enterotoxigenic E.coli المقتولة بالفورمالين والحاوي على هيدروكسيد الالمنيوم كعامل مساعد. يتكون اللقاح من اربعة عشر مسببة

تأثير مزج لقاح الكولجين ولقاح عفونة الدم النزفية على الاستجابة المناعية في الحيوانات

خليفة احمد خليفة ١، طارق جعفر فعل ١ وكفاح عودة الجبوري ٢، فرع الاحياء المجهرية ١، فرع الطب والعلاج ٢، كلية الطب البيطري، جامعة بغداد.

الخلاصة

تم في هذا البحث دراسة تأثير مزج اللقاح المحضر من جراثيم Pasteurella multocida مع اللقاح المحضر من جراثيم الـ Escherichia coli على تقوية الاستجابة المناعية الناجمة من كلا اللقاحين ورفع مستوى المقاومة ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا عالية الضراوة. استخدمت في الدراسة الاغنام العراقية نوع العواسي حيث اظهرت مجموعة الاغنام التي تم تمنيعها بمزج اللقاحين المستخدمين في الدراسة معا مستوا من الاجسام المضادة اعلى بقليل من الاغنام التي منعت بكلا اللقاحين على انفراد بعد اربعة اسابيع من التمنيع. وعند دراسة المقاومة باستعمال جرعة التحدي من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا 100 LD50 في الفئران لم نلاحظ وجود فارق في مستوى المقاومة الناشئة في المجموعة الممنعة باللقاحين معا والمجموعة الممنعة باللقاح المحضر من جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا فقط، كذلك لوحظ عدم وجود تصالب مناعي في المجموعة الممنعة بلقاح الكولجين ضد جراثيم الباستوريلا مالتوسيدا.

المقدمة

لقد جرت محاولات للوقاية من الامراض المختلفة التي تسببها جراثيم P. multocida و E. coli لكن النتائج لم تكن بمستوى الطموح (Rutter & Anderson, 1972) جرت محاولات كثيرة لزيادة مقاومة المضيف بشكل غير خاص