التصالب المناعي بين جرثومتي *Nocardia asteroides* و *Salmonella typhimurium* في الفئران

محمد جويد علوان وميسون صباح عباس وسحر حسن علي وزينب عبد الزهره
وحدة الامراض المشتركه–كلية الطب البيطري–جامعة بغداد–بغداد – العراق

الخلاصه

لغرض دراسة التصالب المناعي بين جرثومتي *Nocardia asteroides* وجرثومة *Salmonella typhimurium* , استخدم 18 من الفئران البيضاء السويسريه قسمت بصوره عشوائيه الى ثلاثة مجاميع بالتساوي . منّعت المجموعه الاولى بمستضد جراثيم النوكارديا ومنّعت المجموعه الثانيه بمستضد جراثيم السالمونيلا وبعد اسبوع اعطيت نفس الجرعه كتقويه وبعد مرور شهر من التمنيع تم اجراء فحص التحسس الاجل وفحص التلازن الانبوبي باستخدام مستضد النوكاردين والسالمونلين للمجموعتين.

بينت النتائج ان الحيوانات الممنعه اعطت تفاعل ايجابي في قياس الاستجابه المناعيه الخلويه والخلطيه تجاه كل من مستضد النوكاردين والسالمونلين مما يشير الى وجود تصالب مناعي بين مستضد جرثومة *Nocardia asteroids* وجرثومة*Salmonella typhimurium*.

Cross Immunological reaction between *Nocardia asteroides* and *Salmonella typhimurium* in mice

Muhamed Juweed Alwan,Maysoon Sabah Abbas, Sahar Hasan Ali and Zanab Abd Alzahra
Zoonosis unit- college of Vet. Med. – Baghdad university –Baghdad-Iraq

SUMMARY

The aim of this study was carried out to demonstrate the cross-immunity between *Nocardia asteroids* and *Salmonella typhimurium* antigens in mice. 18 mice, from both sex,were randomally divided into three groups equally. the first group immunized subcutaneously with 0.0 5 micrometer / animal of Nocardia asteroids antigen and abooster dose of the same antigen was injected after week of the first dose. The second group was treated as the first group with *Salmonella typhimurium* antigen. .The third group was served as non-immunized control group. Delayed hypersensitivity and tube agglutination test were checked at 30 days post-immunization. By using Nocardin and Sallmonelin antigens.

The results revealed that the animals were immunized with Nocardia antigens given agood immune response against nocardin and sallmonelin and also those animal were immunized with Salmonella antigens showed immune response against nocardin and sallmonelin antigen ,this may be indicated across- protection between Nocardia andSalmonella antigen .

المقدمة

ان ظاهرة التمنيع المتبادل سجلت من قبل العديد من الباحثين حيث لهذه الظاهرة اثر واضح في رفع مستوى المناعه الخلويه في الجسم فلقد اوضح (1) وجود ظاهرة التمنيع المتبادل *بين Listeria monocytogenes و Salmonella typhimurium و Brucella abortus*

و بيـــّن (2) ان خنازيرغينا الممنعه بلقاح *Br.abortus strain 19* تقاوم الاصابه بجراثيم *Nocardia asteroids* كما اشار (3) بان الفئران المصابه بجراثيم*Listeria monocytogenes* غير الضاريه تعطي مناعه جيده ضد الاصابه بجراثيم *Rhodococcus equi* وكذلك لوحظ ان استخدام عتـــرة اللقـــاح*S.typhimurium* المضـــعفه والمعلمـــه بـــلkatA Catalas لجرثومـــة*Helicobacter poylori* تحفـز الاسـتجابه المناعيـه ضـد الاصـابه بجـراثيم *Helicobacter poylori* (4) كما بيـــّن (5) ان التمنيع بجرثومة اللستريا يعطي مناعه ضد الاصـابه بجرثومـة البروسـيلا المجهضـه وعصـيات السـل البقـري ومناعـه قليلـه ضـد جرثومـة

Salmonella typhimurium.لاحظ الباحثون ان الخلايا البلعميه الفعاله المعزوله من الفئران المصابه بطفيلي *Toxoplasma gondii* or *Corynebacterium parvum* *تمنع نمو جراثيم* *Nocardia asteroids* في المختبر واقترح ايضا بان هذه الخلايا تلعب دورا مهما في دفاع الجسم ضد الاصابه بتلك الجراثيم (6) .من خلال مراجعة المصادر المتوفرة لدينا لم نجد دراسه توضح العلاقه المناعيه المباشره بين جرثوميتي *Salmonella typhimurium* و *Nocardia asteroids* لذا صممت هذه الدراسه لتبيان ذلك في الفئران.

المواد وطرائق العمل

1-**العزل الجرثوميه**. لقد تم الحصول على جرثومة *Nocardia asteroids* وجرثومة *Salmonella typhimurium* من وحدة الامراض المشتركه كلية الطب البيطري /جامعة بغداد بعد التاكد من صفاتهما الحيويه والكيميائيه حسب طريقة.(7) وتم تحضير العالق الجرثومي وعد الخلايا الجرثوميه فيه حسب طريقة Miles & misra حيث كان العد الجرثوميه 1x10CFU لجراثيم السالمونيلا وجراثيم النوكارديا .

2-الاوساط الزرعيه المستخدمه. استخدم وسط اكار الدم و وسط اكار السالمونيلا-شكيلا وقد حضرا حسب تعليمات الشركة المنتجة.

3- المحاليل المستخدمه. المحلول الملحي الفسلجي المتعادل ومحلول الفورمالين بنسبة 4%

4-حيوانات التجربه. استخدم 18 من الفئران السويسريه البيضاء اللون بعمر 6 اسابيع وبمعدل وزن 20- 26 غم ,تم الحصول عليها من معهد المصول واللقاح في بغداد.قسمت الحيوانات عشوائيا الى ثلاثة مجاميع بالتساوي وكما يلي:

1-المجموعه الاولى وعدد حيواناتها 6 حيوان, منعت بمستضد جراثيم *Nocardia asteroids* بجرعة 0.5 مل تحت الجلد وبعد اسبوع اعيدت نفس الجرعه 0.5 مل.

2- المجموعه الثانيه وعدد حيواناتها 6 حيوان منعت بمستضد جراثيم *Salmonella typhimurium* بنفس الجرعه والطريقه للمجموعه الاولى وبعد اسبوع اعطيت نفس الجرعه كتقويه.

3-المجموعه الثالثه وتشمل 6 حيوانات اعتبرت حيوانات سيطره حقنت بجرعه 0.5 مل من المحلول الفسلجي المتعادل المعقم تحت الجلد.

تحضير المستضدات الجرثوميه

1- تم زرع جرثومتي *Salmonella typhimurium*, *Nocardia asteroids* على اكار الدم واكار السالمونيلا-شكيلا على التوالي لمدة 4 ايام للاولى و24 ساعه للثانيه للتاكد من حيويةالجراثيم وقابليتها على النمو.

2- اخذت نماذج من الزرع الجرثومي وصبغت على شرائح زجاجيه وصبغت بصبغة كرام للتاكد من نقاوتها وحيويتها.

3- حصدت الجراثيم باستخدام المحلول الملحي الفسلجي المتعادل وتم اجراء العد الجرثومي حسب ماذكر سابقا وكان 1×10^4 CFU في المليتر الواحد ثم اضيف اليها الفورمالين بتركيز4% وتركت في درجة حرارة الغرفه لمدة 24 ساعه ثم غسلت بالمحلول الفسلجي المعقم ثلاث مرات للتخلص من الفورمالين ثم استخدم الجهاز المركزي الطارد وبسرعه 3000 دورة/ دقيقة ولثلاث مرات لعزل الخلايا المقتوله

4- كسرت الجراثيم بجهاز التكسير بالامواج فوق الصوتيه Ultrasonication نوع MES بسعه موجبه 3 وبقوه تعضيد متوسطه وتذبذب بمعدل 13 مايكروسبوت ولمدة 50 دقيقه متقطعه وقد وضعت بحمام ثلجي بجهاز تكسير الامواج فوق الصوتيه ثم فصلت الخلايا المتكسره بالطرد المركزي المبرد بدرجه 4 مئويه وبسرعه 10000 دوره/ دقيقة ولمدة 30 دقيقة.

5- رشح المحلول الطافي باستخدام مرشح زايتر وبحجم 0.45 ملي مايكرون لجرثومة النوكارديا و0.25 ملي مايكرون لجرثومة السالمونيلا ثم حسب تركيز البروتين في المستضدين وكان 8ملغم/مل وبعد ذلك حفظت المستضدات بالثلاجه يدرجه 4 مئويه لحين الاستخدام.

6- تم اجراء فحص النقاوه للتاكد من نقاوة المستضدات لكل من جرثومتي *Salmonella typhimurium and Nocardia asteroids* بعد عملية التكسير وذلك بزرعها على وسط اكار الدم ووسط اكار السالمونيلا-شكيلا وحضنها لمده 24و48 ساعه ولم يسجل أي نمو جرثومي.

قياس المناعه الخلويه

بعد شهر من التمنيع تم اجراء الفحص الجلدي حيث حقنت راحة القدم اليمنى لكل حيوان في المجموعه الاولى والثانيه بالنوكاردين والسالمونلين على التوالي وحقنت راحة القدم اليسرى لكل حيوان في المجموعه الاولى والثانيه بالسالمونلين والنوكاردين على التوالي بينما حقنت راحة القدم

اليمنى لحيوانات السيطره السالبه بالنوكاردين وراحة القدم اليسرى بالسالمونلين وبجرعه0.01 ملليلتر لكلا المستضدين ولكل المجاميع وتم اجراء قياس الفرق في سمك راحة القدم بعد 24و 48 ساعه.

قياس المناعه الخلطيه

بعد مرور 32 يوما من التمنيع تم قتل جميع حيوانات التجربه وسحب الدم منها وذلك لاجراء فحص التلازن الانبوبي لمعرفة مستوى الاجسام المضاده في الحيوانات الممنعه حيث فصل المصل عن الدم بواسطة الطرد المركزي لمده 15 دقيقة وبسرعه 3000 دورة/دقيقة وحفظ المصل بالمجمدة لحين الاستخدام استخدم مستضد النوكاردين والسالمونلين ضد مصل الحيوانات الممنعه بالنوكاردين والسالمونلين .

النتائج

نتائج الاستجابه المناعيه الخلويه باستخدام فحص الحساسيه المتاخر

يبين الجدول (جدول1) نتائج الفحص الجلدي للمجموعه الممنعه بعد شهر من التمنيع بمستضد النوكارديا حيث كان المعدل الحسابي لفرق التثخن في راحة القدم,0.95و 1.1 ملم بعد 24و 48 ساعه على التوالي من الفحص الجلدي تجاه مستضد السالمونلين و 0.71و 0.81ملم بعد 24و 48 ساعة على التوالي من الفحص الجلدي تجاه النوكاردين. بينما كان المعدل الحسابي لتثخن راحة القدم في الحيوانات الممنعه بمستضد السالمونيلا0.98و 1.01ملم بعد 24و 48 ساعه على التوالي من الفحص الجلدي تجاه السالمونلين و 0.65و 0.83ملم على التوالي بعد الفحص الجلدي تجاه النوكاردين (جدول 2). ولم يسجل أي تفاعل جلدي في حيوانات السيطره السالبه.

قياس مستوى المناعه الخلطيه

توضح الجداول (4,3) المعيار الحجمي للاجسام المضاده في الحيوانات الممنعه بمستضد جراثيم *Nocardia asteroides*وجراثيم*Salmonella typhimurium* باستخدام النوكاردين والسالمونلين فلقد لوحظ ان الحيوانات الممنعه بمستضد جراثيم النوكارديا اظهرت معيارا حجميا تجاه السالمونلين بمعدل 213.3 وكذلك تجاه النوكاردين بمعدل1066.6 اما الحيوانات الممنعه بمستضد جراثيم السالمونيلا فلقد كان معدا معيار الاجسام المضاده533.3 تجاه النوكاردين و693.3 تجاه السالمونلين. لم تعطي حيوانات مجموعة السيطره أي تفاعل في الفحص الجلدي وفحص التلازن الانبوبي .

جدول (1): نتائج فحص التحسس الاجل في الفئران الممنعه بمستضدجراثيم *Nocardia astroides* والمقاسه بالنوكاردين والسالمونلين

رقم الحيوان	معدل فرق التثخن(ملم)			
	مستضد السالمونلين		مستضد النوكاردين	
	بعد 24ساعه	بعد 48ساعه	بعد 24ساعه	بعد 48ساعه
1	1	1	0.5	0.5
2	0.5	1	0.5	1
3	1.5	1.5	1	1
4	0.6	1	0.9	0.9
5	1	1	0.4	0.5
6	1.1	1.1	1	1
المعدل	0.95	1.1	0.71	0.81
الخطأ القياسي	0.23	0.27	0.18	0.20

جدول (2): فرط التحسس الاجل في الفئران الممنعه بمستضد جراثيم *Salmonella typhimurium* والمقاسه بمستضد النوكاردين والسالمونلين

رقم الحيوان	معدل فرق التثخن(ملم) تجاه			
	السالمونلين		النوكاردين	
	بعد24ساعه	بعد48ساعه	بعد24ساعه	بعد48ساعه
1	1	1	0.5	0.5
2	1.4	1.4	1	1
3	1.4	1.4	0.8	1
4	0.6	0.6	0.7	0.7
5	1	1	0.8	0.8
6	0.5	1.	0.5	1
المعدل	0.98	1.06	0.65	0.83
الخطأ القياسي	0.24	0.26	0.18	0.20

جدول (3) : المعيار الحجمي للاجسام المضاده باستخدام فحص التلازن الدموي المباشر في الفئران الممنعه بمستضد جراثيم *N.asteroides* والمقاسه بمستضد النوكاردين والسالمونلين

	معيار الاجسام المضاده	
	النوكاردين	السالمونلين
1	640	80
2	640	80
3	1280	320
4	1280	160
5	1280	320
6	1280	320
المعدل	1066.6	213.3
الخطأ القياسي	260.24	52.064

جدول(4): المعيار الحجمي للاجسام المضاده باستخدام فحص التلازن الدموي المباشر في الفئران الممنعه بمستضد جراثيم*Salmonella typhimurium* والمقاس باستخدام مستضد السالمونلين والنوكاردين

رقم الحيوان	معيار الاجسام المضاده	
	السالمونلين	النوكاردين
1	640	320
2	128	640
3	640	640
4	320	320
5	640	640
6	640	640
المعدل	693.3	533.3
الخطأ القياسي	86.59	130.12

المناقشه

اوضحت نتائج فحص فرط التحسس الآجل والمعيار الحجمي للاجسام المضادة بأن مستضد جرثومة *Nocardia asteroides* وجرثومة *Salmonella typhimurium* حفزا استجابة مناعية خلوية وخلطية في الفئران بعد 30 يوماً من تمنيعها بتلك المستضدات . ان مستضد السالمونيلا حفز استجابة مناعية خلوية تجاه السالمونيلين والنوكاردين أكثر مما سجل في الحيوانات الممنعة بمستضد النوكارديا بينما حفز مستضد جرثومة النوكارديا استجابة مناعية خلطية تجاه النوكاردين أكثر مما سجل في الحيوانات الممنعة بمستضد السالمونيلا تجاه السالمونيلين ، في الحيوانات الممنعة تلتهم

المستضدات من قبل البلاعم الكبيرة وتحطمها داخل الخلية بعدها تنقل اجزاء صغيرة من هذا الحطام الى جدار الخلية حيث تحمل على البروتين السطحي

Major histocompatability complex II وتنتج البلاعم الكبيرة المدورات الخلوية مثل IL_1, IL_{12}, IL_{10} .

ان الخلايا اللمفية الثابتة نوع CD_{4+} تتفاعل مع المستضد المعروف MHC. II وبوجود IL1 فأنها تتكاثر وتتغاير الى خلايا الذاكرة المناعية Memory CD_{4+} Cell والخلايا المؤثرة T-helper Cell والتي تنتج العديد من المدورات الخلوية IL_2, IL_8 وكذلك الانترفيرون كاما الذي يعمل على تحفيز وتنشيط البلاعم الكبيرة (8) .

ان IL_{12} ينشط ايضآ الخلايا القاتلة الطبيعية Natural Killer Cells لانتاج αIFN_9 الذي ينشط البلاعم الكبيرة وكذلك يحفز الخلايا اللمفية نوع Th.0 على الانقسام والتمايز الى CD_{4+}- Th_1 حيث تنتج العديد من المدورات وخاصة IFN المسؤولة عن الاستجابة المناعية الخلوية وفرط التحسس الجلدي (9) .

ان IL_{10} يحفز الخلايا اللمفية $Th._0$ على الانقسام والتمايز الى Th_2 والتي تنتج المدورات IL_5 و IL_4 وهذه المدورات تحفز الخلايا البائية B- cells على التكاثر والتمايز الى خلايا البلازما وانتاج الاجسام المضادة (10) . مما يشير بأن مستضد السالمونيلا حفز البلاعم الكبيرة على انتاج IL_{12} بمستوى اعلى مما انتج من تلك الخلايا المحفزة بمستضد النوكارديا لذا كانت الاستجابة المناعية الخلوية اعلى من الحيوانات الممنعة بمستضد السالمونيلا وكذلك ربما يكون انتاج IL_{10} من قبل البلاعم الكبيرة المحفزة بمستضد النوكارديا اعلى مما حفز استجابة مناعية خلطية اعلى من الحيوانات الممنعة بمستضد النوكارديا . بينت النتائج ان مجموعة الحيوانات الممنعه بمستضد جراثيم النوكارديا اعطت تفاعل موجب مع السالمونلين وكذلك مجموعة الحيوانات الممنعه بمستضد السالمونيلا ايضا اظهرت تفاعل موجب تجاه النوكاردين سواء في فحص فرط التحسس الاجل او في قياس المعيار الحجمي للاجسام المضاده في كلتا المجموعتين مما يشير الى وجود تفاعل(متصالب) مناعي بين مستضد جراثيم *Nocardia asteroides* و *Salmonella typhimurium* ان سبب ذلك لربما يعود اما الى التحفيز المناعي غير المتخصص او ان هنالك تشابه بين مستضدات جرثومة السالمونيلا وجرثومة النوكارديا مما ادي الى تحفيز استجابه مناعيه متخصصه ضد اللسترين والنوكاردين .ان هذه النتيجه توافقة مع نتائج سابقه للباحثين (11) و(12) حيث سجلوا تصالب مناعي بين جراثيم

Listeria monocytogenes,Brucella abortus and *Mycobacterium tuberculosis*

وعللوا ذلك بسبب وجود تشابه في بعض المستضدات بين هذه الجراثيم كذلك بين (13) ان استخدام

مزيج من مستضد جراثيم النوكاريا مع مستضد البروسيلا المجهضه حفز استجابه مناعيه افضل من استخدام مستضد البروسيلا المجهضه لوحده هنالك دراسات اشارت الى وجود تصالب مناعي بين جراثيم والبروسيلا المجهضه والنوكارديا (2) وهذه الدراسات تدعم نتائج الدراسه الحاليه.ان وجود تصالب مناعي بين جراثيم السالمونيلا والنوكارديا يمكن الاستفاده منه في انتاج اللقاحات المركبه التي تحفز استجابه مناعيه افضل من اللقاحات المنفرده.لقد بينت الدراسات على الحيوانات التجريبيه ان التمنيع باللقاحات المتعدده hetrologus vaccines هي طريقه فعاله وامينه في الحصول على استجابه للاجسام المضاده في المخاط والمصل ضد جراثيم السالمونيلا المستخدمه كحامل للمستضدات المتعدده لها القدره على تحفيز الاستجابه المناعيه الجهازيه والاستجابه المناعيه في الطبقه المخاطيه بصوره كبيره من خلال تحفيز المناعه الخلويه (14). على العموم ان ظاهرة التمنيع المتبادل تستند على رفع مستوى المناعه الخلويه في الجسم من خلال تنشيط البلاعم الكبيره وتزيد قدرتها على قتل الجراثيم داخل الخليه,لقد وضح (15) ان البلاعم المنشطه بلقاح BCG في الجسم تمنع تكاثر الجراثيم ضمن الخليه وذلك من خلال زيادة افرازها لمادة بيروكسيد الهيدروجين القاتل للجراثيم. ان اللقاحات المستخدمة ضد جراثيم السالمونيلا ، اما ان تكون مقتولة وهي ذات قابلية محدودة لتمنيع المضيف او تستخدم اللقاحات الحية المضعفة وهذه اللقاحات لها القابلية على استعادت ضراوتها (16) و(17) . ولذا يمكن الاستفادة من مستضدات جرثومتي النوكارديا والسالمونيلا من برامج اللقاحات المستخدمة ضد هذه الجراثيم .

ان جراثيم السالمونيلا وجراثيم النوكارديا هي جراثيم ضمن الخليه تنتقل من منطقة الاصابه بواسطة الخلايا البلعميه الى العقيدات اللمفيه الموضعية ومنها الى المجرى الدموي لتستقر في خلايا الجهاز الشبكي البطاني وتتكاثر هناك بالنسبه للسالمونيلا وتحدث الاصابه (17) او تنتشر الى جميع الاعضاء الداخليه بالنسبه لجراثيم النوكارديا (18)، لذا فان مقاومة الجسم لهذه الجراثيم تعتمد بالاساس على الاستجابه المناعيه الخلويه(19).

المصادر

1-Krick J A and Remington J S . Resistanc and with Nocardia asterodes. J. .Dis;(1975).131:665-675 .

2-Alwan M J .(1996).Study of some aspects of Nocardia asteroids in Iraq, Ph.D. Thesis, College of Vet.Medicie,University of Baghdad.

3- سعيد، ماجده عبدالله (1999) . دراسة بعض اوجه امراضية جرثومتي Listeria monocytogenes و Rhodococcus equi وتاثير التمنيع المتبادل بينهما. رسالة ماجستير،كلية الطب البيطري ، بغداد.

4-Liao W,Chen N,Zhu, Zhoughua Y and Zhi Z.(2001)Construction of attenuated Salmonella typhimurium vaccine strains expressing Helicobacter pylori catalase and observation on its protective immunity Vaccin.;81:613-626.

5-الجبوري،نغم محمد(2002). تاثير التمنيع المتبادل باللستيريا مونوساينوجين على مرضية جراثيم داخل الخليه الاخرى.رسالة ماجستير،كلية الطب البيطري، بغداد.

6-Gregory A F,Beaman B L and Remingiten J S.(1980)Effect of activated macrophages on Nocardia asteroids.Infect.Immun.;27:643-645.

7-Qunin P J,Crter M E,Markey B and Carter C R.Clinical Vet.Microbiol. 1994;156-169 M Wolfe.London.

8-Taylor,G.A.;Freng,G.C and Sher, A.(2004) Regulators of immunity & intracellular pathogens .Nat.Rev. Immunol. ;4:100-109 .

9-Bregenholt,S.;Berche,P. and Disanto,J.D.(2001). Conventional α,β T- cells are sufficient for innate and alaptive immunity against enteric *Listeria monocytogenes* . G. Immuno.; 166:1871-1876 .

10- Velikovsky,C.A.;Cassataro, J.(2002);Giambartolomie, G.H.; Goldbaum, F.A. and Spitz,M. A DNA vaccine encoding Iumazine synthase protective immunity in BALB/Cmic. Klent. Immun. ;70 :2507-2511 11-Elberg S S , Schneider F and Frong J .Cross-immunity betweBrucella melitensis and Mycobacterium tuberculosis.Intracellular behavior of brucella melitensia in monocytes from vaccinated animals.J.Exp.Med. 1957;106:545-554.

12-Minden P , McClatch J K and Farr R S(1972).Shared antigens between hetwerologous bacterial species.Infect.Immun.;6:574-582.

13-Khalifa K A , Amin A and Jergees J I(1994).Effect of Nocardia on the immune response to brucella.Iraq,J.Micro.;6:6-23.

14-Holger R , Emeka II , Saur J , Hardt W, Wubert A and Geginat G .(2001) Protection against Murine listeriosis byoral vaccination withRecombinant Salmonella expressing Hybrid Yersinia type III proteins.J.Immunol. ;167:357-365.

15-Beaman B L and SSmathers M.(1976)Interaction of Nocardia asterodies with cultural rabbit alveolar macrophages.Infect.Immun.;13:1126-1131.

16-Masteronie, J.A .; Harrison, C. E . and Hormaeache , A.(1994) Natural resistance and acquired immunity to *Salmonella* .Fundamental and clinic. Immunol, ; 2:83-94 .

17-Sebastian G,Blais V,Veronique S U and Stevenson M.(2002) Host immune response to Salmonella enterica serovar typhimurium infection in mice from Wild strains.Infect.Immunol.;70:1997-2009.

18-Beaman B L,Burnside J,,Edward B and Causely W(1976).Nocardial infection in the unite state 1972-1974.J.Infect.Dis.;134:286-290

19-Chollin F(1974).Vaccins and cell mediated immunity,.Bacteriol.Rev.; 38:371-402.