استخدام مستضدات مستخلصة من البروسيلة المالطية الذرية REV1 في أنتاج لقاح آمن لمرض البروسيلات

Using of antigens that extracted from *Brucella melitensis* Rev1 to produce a safe vaccine against Brucellosis

اعداد

بشار صادق نومي الحديثي / طالب دكتوراه في قسم الاحياء الدقيقة / كلية الطب البيطري / جامعة البعث

د. سامر ابراهيم / استاذ مساعد في قسم الاحياء الدقيقة اختصاص / تشخيص مخبري / كلية الطب البيطري /

جامعة البعث

د. عزام كردي / استاذ في قسم الاحياء الدقيقة اختصاص / فيروسات / كلية الطب البيطري / جامعة البعث

الخلاصة

هدفت هذه الدراسة الى محاولة إنتاج لقاح آمن ضد مرض البروسيلات، ولهذا الغرض تم استخلاص مستضدات من البروسيلة المالطية الذرية Rev1 باستخدام طريقة حمض الخل ثلاثي الكلور. كما تم تحضير مستضدات خاصة بفحص البروسلين من نفس الذرية لاستخدامه كأداة في مقايسة المناعة المتوسطة بالخلايا . أظهرت الدراسة ان تركيز البروتين في المستضدات المناعية المستخلصة بلغ 63.2 ملغ /دل.، كما أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الاجار متعدد الاكريلاميد للمستضدات المستخلصة وجود ستة حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 21000–67000 دالتون.

استخدمت المستضدات المحضرة في الدراسة في تحصين خنازير غينيا وقد أظهرت نتائج التحصين أن معدل معيار الأضداد الناجم عن التحصين 266 باستخدام اختبار التراص في الأنابيب، أما فيما يخص اختبار البروسلين الجلدي فقد كان معدل قطر احمرار الجلد لحيوانات التجربة 14ملم ومعدل الزيادة في سماكة طية الجلد 2.08 ملم بعد 24 ساعة من الحقن، في حين كان معدل قطر احمرار الجلد لحيوانات التجربة 12ملم ومعدل الزيادة في سماكة طية الجلد 1.78 ملم بعد 48 ساعة من الحقن . كما أظهرت نتائج اختبار التحدي قدرة المستضدات المحضرة على حماية خنازير غينيا من الإصابة بالبروسيلة المالطية اعتماداً على العزل الجرثومي من الأحشاء .

Abstract

The aim of this study was to prepare a safe vaccine against brucellosis. For this purpose antigens were extracted by using acetic acid trichloride method, As well as antigen was prepared for brucillen test. The study reveals that the concentration of protein in vaccine antigens was 63.2 mg/dL ,and the SDS polyacrylamide gel electrophoresis showed presence of six protein bands in molecular weight between 21000-67000 Dalton . The extracted antigen used in vaccination of Guinea pigs ,and the results of vaccination revealed that the antibody titer range is 266 by tube agglutination test, while the result of brucellin test appeared that the range of redness diameter is 14m and an increase in thickness of skin fold 2.08m after 24h from injection, while the range of redness diameter is 12m and increase in thickness of skin fold is 1.78m after 48h from injection, The challenge test revealed the ability of prepared antigen in protection of Guinea pigs against *Brucella melitensis* infection

.

1- المقدمة

يعرف داء البروسيلات بأنه مرض جرثومي معدي مشترك واسع الانتشار في العالم، يسبب المرض ضرراً كبيراً على الصحة العامة، وخسائر اقتصاديه كبيرة متمثله بإجهاض الحيوانات الحوامل وتأخر الإخصاب والعقم الدائم أو المؤقت في الذكور، فضلاً عن تكاليف العلاج أو الذبح في بعض برامج السيطرة (21,11,23).

يحدث المرض نتيجة الإصابة بجراثيم تعود لجنس البروسيله Brucella وهنالك تسعة أنواع مسجله عالمياً أربعه منها لديها القدرة على إصابة الإنسان (34).

أما فيما يخص جراثيم البروسيلة المسببة لداء البروسيلات فهي جراثيم سلبية الغرام يبلغ طولها (1.5 – 2.0) ميكرون وعرضها (0.5 – 0.7) ميكرون، تظهر بشكل عصيات مكورة أو عصيات قصيرة، تنتظم بشكل مفرد أو أزواج أو سلاسل قصيرة، لا تملك محفظه ولا اسواط ولا خمل، غير متبوغه وغير متحركة، هوائيه ألا أن البعض منها يحتاج إلى غاز ثاني اوكسيد الكربون CO_2 عند العزل الأولي (38,39،26،31). ومن الجدير بالذكر أنها جراثيم غير صامدة للحمض لكنها تقاوم إزالة التلون بالحوامض الضعيفة لذلك تصطبغ باللون الأحمر عند صبغها بطريقه زيل نلسن المعدلة (2،13).

يتكون جدار جراثيم البروسيلة من عديد السكريد الشحمي Lipopolysucchari والدهون المفسفره Phospholipids والبِبْتِيدُوغليكان Peptidoglycan والبروتينات Proteins (48).

أن اللقاحات المستخدمة لتحصين الحيوانات ضد داء البروسيلات إما أن تكون لقاحات مقتولة أو لقاحات حية مضعفة، وان أهم الصفات التي يجب أن تتوفر في اللقاح الحي هو أن لا يسبب المرض عند الحيوانات المحصنة، ويوفر حماية لمدة طويلة، وان لا تتداخل الاستجابة المناعية المتكونة من التحصين مع الاستجابة المناعية المتكونة في حالة الإصابة الطبيعية أثناء إجراء الفحوصات المصلية، وان تكون الذرية المستخدمة في التحصين ثابتة، ولا تنتقل من حيوان إلى آخر، وغير ممرضة للإنسان، ولا تطرح في الحليب واللحم (1).

يعد لقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1 من أهم اللقاحات المستخدمة لتحصين الأغنام والماعز هو حيث استطاع العالمان Elberg و Faunce في عام 1957 أنتاج لقاح Rev1 من ذرية حية ناعمة مضعفة

ومطفرة ومقاومة للستريبتومايسين من البروسيلة المالطية، وهي مشتقة من الذرية الأبوية الممرضة (6056) لجرثومة البروسيلة المالطية، ويستخدم هذا اللقاح في تحصين الأغنام والماعز ضد داء البروسيلات (19) .

يعطى هذا اللقاح للأغنام والماعز بجرعة مقدارها 1 مل تحت الجلد وفق تركيزين هما الجرعة الكاملة ومقدارها 1×10^9 وحدة مكونة للمستعمرات أو الجرعة المخفضة ومقدارها 1×10^4 – 10^6 وحدة مكونة للمستعمرات (9،3).

أن أهم مساوئ هذا اللقاح هو إمكانية انتشار جراثيم البروسيلة (المستخدمة في التحصين)عبر الحليب والمسحات المهبلية والأجنة المجهضة بعد تحصين الحيوانات بجرعة 1×10^9 وحدة مكونة للمستعمرات (9). كما انه يحفز أنتاج أضداد خاصة بالسلسلة ـ O ـ لعديد السكريد الشحمي والتي تتماثل مع الأضداد المتكونة في حالة العدوى الطبيعية مما يؤدي إلى التداخل بين نتائج الاختبارات المصلية للحيوانات المحصنة والحيوانات المصابة(6).

كما أن هذا اللقاح يمكن أن يسبب الإجهاض عند الحيوانات المحصنة بالجرعة القياسية، وان أعلى نسبة إجهاض تحدث بعد 40 –60 يوماً من التحصين (9). أشار Jimenes وزملائه (1994) إلى أن حدوث الإجهاض بعد التحصين بلقاح الذريةRev1 يعتمد على مرحلة الحمل عند التحصين، فعند تحصين الأغنام الحوامل خلال الشهر الأخير من الحمل كانت نسبة الإجهاض اقل مقارنة مع تحصينها عند أول شهرين من الحمل، كما أن نسبة الإجهاض بلغت 80% عندما تحصين النعاج الحوامل خلال الشهرين الثاني والثالث من الحمل(25). إن هذا اللقاح مصنع من ذرية حية مضعفة لها القابلية على استعادة ضراوتها وإحداث الإصابة، بالإضافة إلى خطورة هذا اللقاح على الصحة العامة حيث سجلت العديد من حالات الإصابة في البشر والتي مصدرها إما التعامل مع اللقاح أو استهلاك منتجات الحيوانات المحصنة (9،36).

أما اللقاح المقتول(الذرية H38) فبالرغم من الأمان الذي يتميز به وإمكانية إعطائه لجميع الحيوانات وبكافة الأعمار وحتى الحوامل، غير انه يسبب تفاعلا موضعياً عند حقنه يؤدى إلى حدوث خراجات في مكان الحقن، كما انه لا يعطي مناعة يمكن الاعتماد عليها في برامج السيطرة (40).

أما اللقاحات المحضرة من الذرية الخشنة (RB51) فبالرغم من قدرتها على الحماية من الإصابة بداء البروسيلات غير انها لا توفر حماية للأغنام المعرضة للإصابة بداء البروسيلات، كون الذرية 2308 لا تتكاثر بالمقدار الهائل الذي يحدث في الأبقار والماعز مما يؤدي إلى الحاجة إلى جرعة معززة أخرى من اللقاح . (19،35،46)

ولغرض التخلص من مشاكل لقاحات البروسيلة ذات الذراري الحية وضعت عدة فرضيات منها استخدام لقاحات من ذراري ذات مستعمرات خشنة مثل استخدام لقاح BR51 (44). أو عن طريق استخدام طرق الهندسة الوراثية بدراسة المحتوى المورثي للجراثيم المستخدمة في تحضير اللقاح، وإزالة المورثات ذات العلاقة بالبروتينات المستخدمة في التشخيص دون التأثير في القابلية التمنيعية مثل إزالة المورث Cu–zn من البروسيلة المجهضة (12). أو استخدام فحوصات مصلية تميز بين الحيوانات المحصنة والمصابة مثل استخدام اختبار الاليزا التنافسي، أو استخدام لقاحُ جزيئي Subunit vaccine والذي يحوي مستضدات ذات فائدة مناعية مثل استخدام عديد السكريد ألشحمي الناعم S- Lps أو استخدام بروتينات الغلاف الخارجي (33،14) . أو استخدام لقاح محضر من الدنا DNA المحمول على البلازميد Plasmid (42،20،29).

جميع اللقاحات المستخدمة سجلت عليها سلبيات عديدة ولا يوجد لقاح آمن وفعال يمكن استخدامه للحماية من داء البروسيلات (18) لذلك فقد توجهت الأنظار إلى تصنيع لقاح من أجزاء من جراثيم البروسيلة لغرض استخدامها كأداة تمنيع، فقد استخلص Lopez وزملائه (1976) عديد السكريد الشحمي الناعم باستخدام الفينول وقد أعطى مناعة جيدة للفئران(30) . كما استخدمت طريقة التحليل الحمضي الخفيف Mild acid hydrolysis في روسيا لاستخلاص عديد السكريد الشحمي وقد أعطى نتائج جيدة في تحصين حيوانات التجارب (16) . كما استخدم الشحم A كمعزز مناعي للقاحات المنتجة من عديد السكريد الشحمي من خلال عمله كعامل Adjuvants في زيادة الاستجابة المناعية المتوسطة بالخلايا (43) .

كما استخلص Bosseray (1983) الببتايدوغليكان (البروتينات السكرية) من البروسيلة المالطية وجربه على الفئران ، وقد أعطى مستوى تحصين يضاهي لقاح الذرية S19 (10).

أشارت الدراسات إلى قدرة الببتايدوغليكان غير الذائب بالفينول في توفير حماية لخنازير غينيا ضد التحدي بالبروسيلة المجهضة (37). كما استخدمت بروتينات الخلية الجرثومية، وعديد السكريد المرتبط بالبروتين الرايبوسومي، وعديد السكريد الشحمي الخشن المرتبط ببروتينات الغلاف الخارجي لتحصين حيوانات التجارب وقد اعطت مستويات حماية جيدة (14،4) .

وفي دراسة أجرتها Hamzah (2010) تمكنت خلالها من تحضير مستضدات ذائبة من البروسيلة المالطية الذرية Rev1 بطريقة التكسير بالأمواج فوق الصوتية وأثبتت قدرة هذه المستضدات على حماية الفئران من الإصابة بجراثيم البروسيلة المالطية (24) .

وفي دراسة قام بها Alzubaidy وزملائه (2010) استطاعوا خلالها تحضير مستضدات من الذرية Rev1 والذرية S19 باستخدام حمض الخل ثلاثي الكلور واستخدموا القمم الناتجة عن التحليل بعمود الفصل في تحصين خنازير غينيا واثبت أن القمة الأولى للذرية Rev1 هي الأكفأ في تحفيز المناعة (5).

2- اهداف البحث

نظراً لأهمية المرض ولخطورته على الصحة العامة ولعدم وجود لقاح آمن وفعال فقد صممت الدراسة كالأتي :-

1- استخلاص مستضدات من البروسيلة المالطية الذرية Rev1 باستخدام طريقة حمض الخل ثلاثي الكلور .

2- قياس تركيز البروتين باستخدام طريقة بايوريت

3- معرفة الأوزان الجزيئية للبروتينات الموجودة في المستضدات المحضرة باستخدام طريقة الرحلان الكهربائي في هلامة الاجار متعدد الاكريلاميد

4- تحضير مستضدات من البروسيلة المالطية الذرية Rev1 لاستخدامها كأداة لاختبار البروسلين الجلدي

5- تجربة المستضدات المستخلصة على خنازير غينيا وذلك بتحصينها بجرعتين تحت الجلد مقدارها 1مل وبفارق زمني قدره 15 يوماً

6- قياس المناعة الخلطية لحيوانات التجربة باستخدام اختبار التراص في الأنابيب والمناعة المتوسطة بالخلايا باستخدام اختبار البروسلين الجلدي وذلك بعد 15 يوماً من التحصين الثاني

7- إجراء اختبار التحدي بإعطاء حيوانات التجربة جرعة مقدارها 60 خلية جرثومية من ذرية حقلية ممرضة وذلك بعد 30 يوماً من الجرعة الثانية للتحصين ، وتم مراقبة الحيوانات خلال هذه الفترة وملاحظة الزيادة في الوزن ودرجة الحرارة واستهلاك العلف والنفوق

8- قتل حيوانات التجربة بعد30 من اختبار التحدي ومحاولة العزل الجرثومي من الأحشاء الداخلية لحيوانات التجربة بهدف معرفة قدرة اللقاح على حماية الحيوانات من الإصابة بجراثيم البروسيلة المالطية

3- طرائق العمل

3-1- تنمية الذرية الجرثومية

تم إذابة محتويات العبوة اللقاحية (والحاوية على جراثيم البروسيلة المالطية الذرية Rev1 والمحضرة من قبل شركة جوفاك الأردنية) باستخدام المحلول الملحي النظامي ، ثم زرعت على وسط أغار الصويا المائل وحضنت بدرجة 37 م^0 لمدة 5 أيام، وبعد ذلك تم حصد النمو الجرثومي باستخدام 5 مل من المحلول الملحي النظامي ورجت الأنابيب بشكل يسمح بنزع المستعمرات الجرثومية، ثم جمع الحصاد الجرثومي في زجاجات معقمة وفحصت نقاوة المعلق الجرثومي باستخدام صبغة غرام ، وصبغة زيل نلسن المعدلة ، بعد ذلك تم الإكثار باستخدام زجاجات معقمة (حوجلة مفاغرة) Roux flask سعة 500 مل تحوي اغار الصويا الصلب، وزرعت بصب 5 مل من المعلق الجرثومي وبعدها تركت لمدة 30 دقيقه لضمان حدوث الالتصاق ثم صب المعلق الجرثومي الزائد، ووضعت زجاجات الزرع بشكل مقلوب في الحاضنة بدرجة 37 م^0 لمدة 5 أيام، تم حصاد النمو الجرثومي بإضافة 10 مل من المحلول الملحي النظامي إلى أوساط الزرع ، وتركت لمدة 10 – 15 دقيقة وحركت بشكل هادئ لضمان نزع المستعمرات ثم جمع الحصاد الجرثومي في زجاجات معقمة (3).

بعد ذلك درست الصفات الشكليائية وأجريت الاختبارات الكيماحيوية وذلك حسب Quinn وزملائه (2002) (39) وقد عد هذا المعلق الجرثومي نواة العمل لتحضير المستضدات اللقاحية والمستضدات المستخدمة باختبار البروسلين الجلدي .

3-2- تحضير المستضدات اللقاحية

تم التعامل مع المعلق الجرثومي كالآتي

1- ثفل المعلق الجرثومي بواسطة المثفلة المبردة بسرعة 3000 دورة/دقيقة وبدرجة 4 م^0 ولمدة 30 دقيقة.
2- تم اخذ الراسب وأضيف له الماء المقطر بنسبة 1:40 W : V وضبط الباهاء عند 9.6 باستخدام 0.5 نظامية من ماءات الصوديوم، ووضع المعلق في محم مائي بدرجة 100 م^0 لمدة ساعتين ثم تُرك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة
3- أعيدت عملية التثفيل المبرد بدرجة 4 م^0 للمعلق بسرعة 3000 دورة /دقيقة ولمدة 30 دقيقة
4- تم اخذ الراسب وأضيف له حمض الخل ثلاثي الكلور Acetic acid tri chloride بتركيز 40% وبنسبة 10:1 V/V وترك بدرجة حرارة الغرفة لمدة 16 ساعة
5- أعيدت عملية التثفيل المبرد بسرعة 3000 دورة / دقيقة لمدة 30 دقيقة واخذ الراسب وغسل مرتين بمحلول الفينول (0.5% فينول) والمضاف له كلوريد الصوديوم بنسبة 5% لحين

الوصول إلى باهاء (2.6 ± 0.1) وبعد ذلك تم أخذ الراسب وغسل بالمحلول الملحي وثقل بسرعة 3000 دورة /دقيقة لمدة 30 دقيقة

6- استخدمت أنابيب الديلزة لتنقية المستضدات ولمدة 5 أيام وبتبديل الماء لثلاث مرات على الأقل يوماً (7)

7- ثم اخذ الراسب وجفف بالحاضنة لمدة 24 ساعة وحفظ بدرجة 4 م^{0} لحين استخدامه كلقاح.

3-3- الرحلان الكهربائي

أجريت عملية الرحلان الكهربائي باستخدام جهاز الرحلان الكهربائي Protein – II XI cell والمجهز من شركة Bio – Rad pac 1000 الأمريكية وحسب طريقة Smith(1994) (41). وباستخدام جل متعدد الاكريلاميد بتركيز 12% .

4-3- المستضدات الخاصة باختبار البروسلين الجلدي :-

اتبعت الطريقة التي وصفها D–Massi وزملائه 2005 (15) وتتلخص بالخطوات الاتية :-

1- قتل المعلق الجرثومي للبروسيلة باستخدام محم مائي بدرجة حرارة 70 م ^{0} ولمدة 90 دقيقة ، ثم ترك ليبرد بدرجة حرارة الغرفة .

2- ثقل المعلق الجرثومي تثفيلاً مبرداً بدرجة 4 م^{0} وبسرعة 3000 دورة /دقيقة ولمدة 30 دقيقة واخذ الراسب وأضيف له الماء المقطر بنسبة 1:40 V: W تم ضبط الباهاء عند 9.6 باستخدام 0.5 نظامية من ماءات الصوديوم وترك لمدة ساعة وبعدها وضع في الموصدة لمدة 120 دقيقة

3- برد المعلق الجرثومي ثم ثقل تثفيلا مبرداً بسرعة 3000 دورة/دقيقة ولمدة 30 دقيقة ، واخذ الراسب، وأضيف له حمض الخل ثلاثي الكلور بتركيز 40% وبنسبة 10:1 V:V وحفظ بدرجة حرارة الغرفة لمدة 24 ساعة .

4- غسل الراسب مرتين بمحلول 0.5 % فينول والمضاف له كلوريد الصوديوم بنسبة 0.5% لحين الوصول إلى باهاء 2.6 ± 1 ثم أعيدت عملية التثقيل واخذ الراسب وأضيف له دارئة الفوسفات الملحي وقدرت نسبة البروتين فيه اعتماداً على طريقة بايوريت ، وحفظ في البراد لحين استخدامه .

3-5- تقدير نسبة البروتين في المستضدات اللقاحية ومستضدات اختبار البروسلين الجلدي

اعتمد طريقة بايوريت Biuret method باستخدام عتيدة مجهزه من شركة Bio Systemالاسبانية، من اجل تقدير كمية البروتين الموجوده في المستضدات المحضرة

3-6- تحضير المستضدات المستخدمه في الدراسة

1- المستضدات اللقاحية :- حضرت بإذابة 2 ملغ من المستضد لكل 1 مل من دارئة الفوسفات (8) واستخدمت بجرعة1 مل تحت الجلد لكل حيوان .

2- اللقاح :- استخدم لقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1 المجهز من شركة جوفاك الأردنية حيث تم إذابته باستخدام المحلول الملحي النظامي وحددت الجرعة عند 28×10^8 وحدة مكونة للمستعمرات (47) والذي استخدم كشاهد ايجابي

3- المستضدات المستخدمة في اختبار البروسلين الجلدي :- خفف المستضد باستخدام دارئة الفوسفات بحيث يكون تركيز البروتين 100 مكروغرام في 0.1 مل من محلول دارئة الفوسفات واستخدم بجرعة 0.1 مل في الجلد لكل حيوان(3).

3-7- تمنيع الحيوانات

تم استخدام 16 خنزير غينيا بعمر 3-5 شهر وقسمت الحيوانات إلى ثلاثة مجاميع وكالاتي :-

أ- المجموعة الأولى (ستة خنازير غينيا) :- حقنت تحت الجلد بجرعة مقدارها ١ مل من مستضد البروسيلة المحضر وأعيد الحقن بعد 15 يوماً من الحقن الأول .

ب- المجموعة الثانية (ستة خنازير غينيا):- حقنت باستخدام لقاح البروسيلة المالطية Rev1 بجرعة مقدارها 28×10^8 (47). وأعيد الحقن بعد 15 يوماً وأعتبرت هذه المجموعة كشاهد ايجابي .

ت- المجموعة الثالثة (أربعة خنزير غينيا):- حقنت تحت الجلد بـ ١ مل من المحلول الملحي وأعيد الحقن بعد 15 يوماً وعدت هذه المجموعة كشاهد سلبي .

وبعد 15 يوماً من الحقن الثاني تم جمع الدم من الحيوانات الخاضعة للتجربة لغرض إجراء اختبار التراص في الأنابيب لمقايسة الاستجابة المناعية الخلطية، كما اجري على الحيوانات اختبار البروسلين الجلدي لمقايسة المناعة المتوسطة بالخلايا .

3-8- فحص الاستجابة المناعية

3-8-1-اختبار التراص في الأنابيب :-

اجري الاختبار باستخدام عتيدة مجهزة من شركة موركانفيل الامريكية Morganville وحسب الطريقة التي وصفها Alton وزملائه 1988 (3) .

3-8-2- **اختبار البروسلين الجلدي:-**

تم إجراء اختبار البروسلين الجلدي على جميع حيوانات التجربة باستخدام مستضد البروسلين المحضر في هذه الدراسة حيث تمت حلاقة الشعر في منطقة الخاصرة وتم قياس سماكة الجلد باستخدام المسطرة المنزلقة Vernia ثم حقن 0.1 مل من المستضد المحضر والحاوي على 100 ميكروغرام / مل ، وتم قراءة النتائج بعد 24 و48 ساعة اعتماداً على قطر منطقة الاحمرار والزيادة في سماكة طية الجلد.

3-9- **اختبار التحدي :-**

عرضت حيوانات التجربة لجرعة من جراثيم البروسيلة المالطية الحقلية الممرضة (المعزولة من حالات إجهاض أغنام) مقدارها 50-60 جرثومة بروسيلة حية وذلك بحقنها تحت الجلد وتم مراقبة الحيوانات من حيث درجة الحرارة والوزن واستهلاك العلف وحدوث النفوق، وبعد 30 يوماً من اختبار التحدي قتلت الحيوانات وقيمت كفاءة الحماية اعتماداً على عزل جراثيم البروسيلة المالطية من الأحشاء الداخلية (الكبد ،الكلية ، القلب ، الرئة) (47).

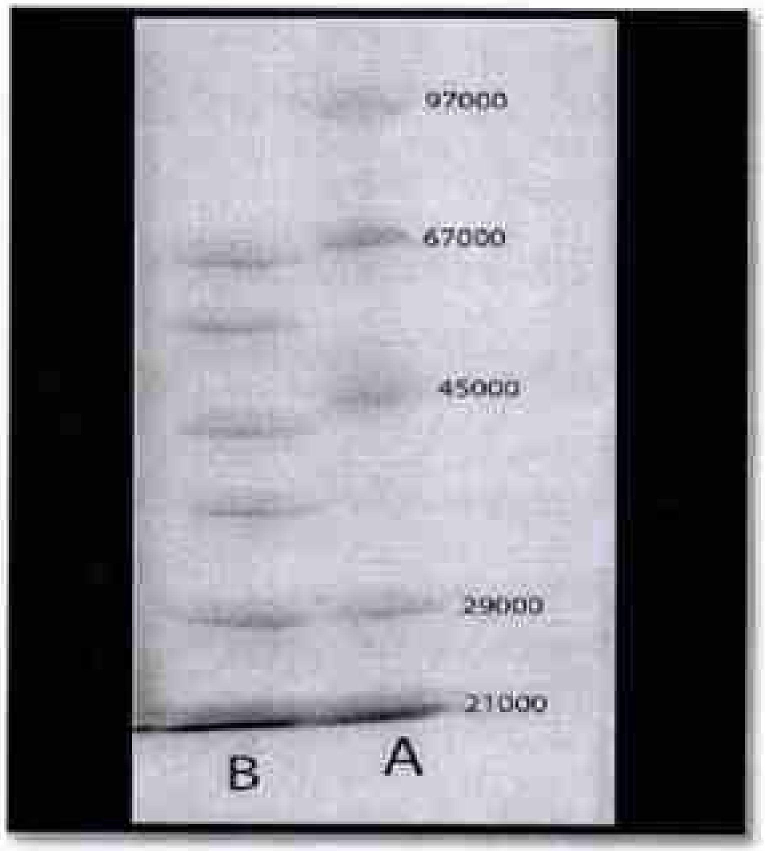
4- النتائج

4-1- قياس تركيز البروتين الموجود في المستضدات المحضرة

وجد باستخدام طريقة بايوريت أن تركيز البروتين في المستضدات اللقاحية كان 63.2 ملغ /دل، في حين كان تركيز البروتين في المستضدات المستخدمة لاختبار البروسلين الجلدي 37.4 ملغ / دل

4-2- نتائج الرحلان الكهربائي للمستضدات اللقاحية :-

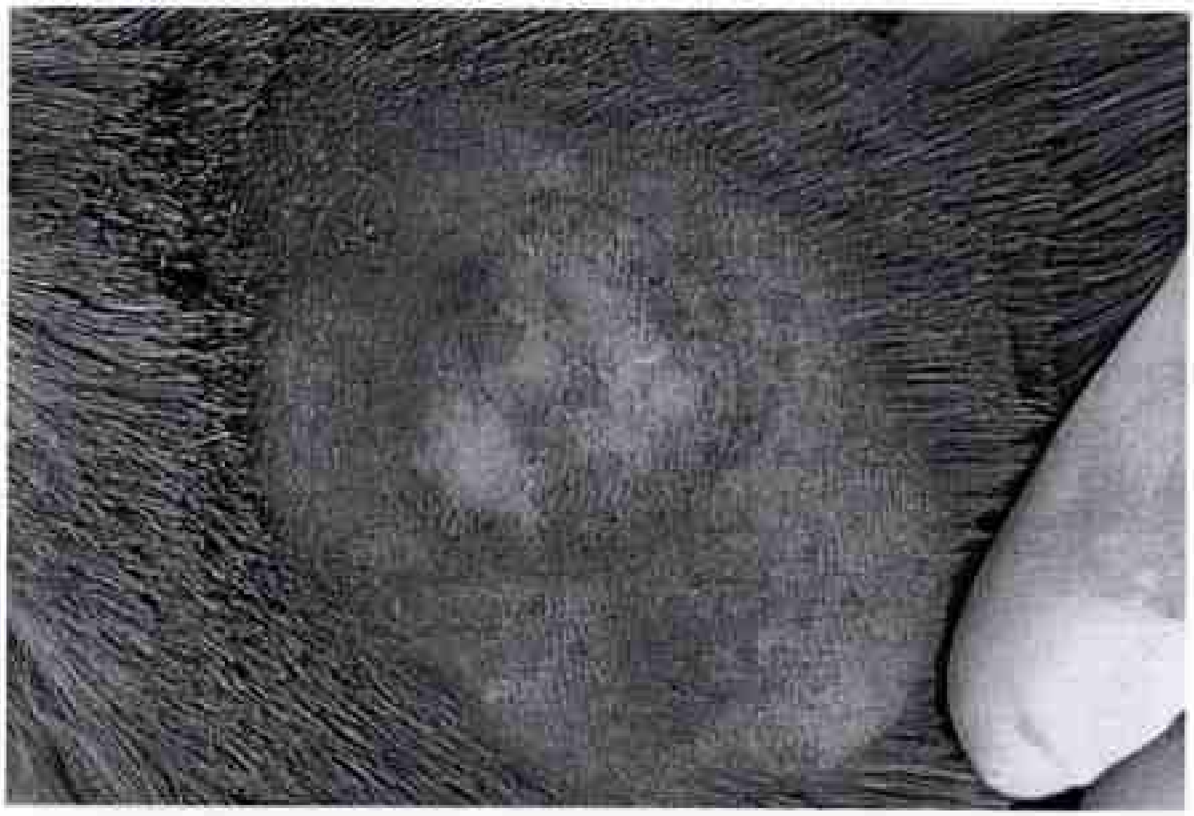
أظهرت نتائج الرحلان الكهربائي للمستضدات اللقاحية المحضرة وجود ستة حزم بروتينية تراوحت أوزانها الجزيئية بين 21,000 دالتون إلى 67000 دالتون، كما يظهر ذلك في الصورة رقم (1)



صورة رقم (1) تبين نتائج الرحلان الكهربائي على هلامة الاجار متعدد الاكريلاميد للبروتينات المستخلصة بطريقةحمض الخل ثلاثي الكلور (العمود A – البروتين الواسم العمود B- المستضدات المحضرة في الدراسة)

4-3- نتائج اختبارات الاستجابة المناعية واختبار التحدي لحيوانات التجربة

أظهرت نتائج المقايسة المناعية لحيوانات التجربة الممنعة بالمستضدات المحضرة في هذه الدراسة ارتفاعاً واضحاً في معيار الأضداد تراوح بين 160-320 وبمعدل266 باستخدام اختبار التراص في الأنابيب، أما فيما يخص الاستجابة المناعية المتوسطة بالخلايا فلوحظ أن قطر احمرار جلد الحيوانات الممنعة تراوح بين 13-16 ملم وبمعدل 14ملم ، وسماكة طية الجلد تراوح بين 1.7- 2.5 ملم وبمعدل 2.08 ملم بعد 24 ساعة من الحقن (صورة رقم 2) في حين تراوح قطر احمرار جلد الحيوانات الممنعة بين 11-13 ملم وبمعدل 12 ملم ، أما الزيادة في سماكة طية الجلد فتراوحت بين 1.7-1.9 ملم وبمعدل 1.78 بعد 48 ساعة من الحقن، كما كانت جميع الحيوانات سالبة للعزل الجرثومي، والجدول رقم (1) يبين هذه النتائج.



صورة رقم (2) تبين قطر الاحمرار والزيادة في سماكة طية الجلد

جدول رقم (1): قطر الاحمرار و معدل الزيادة في سماكة طية الجلد (مقدرة بالمليمتر) ومعيار الأضداد (بعد 15 يوماً من التحصين) ونتائج العزل الجرثومي (بعد شهر من حقن الحيوانات بجرعة تحدي) لخنازير غينيا الممنعة بمستحضر البروسيلة المالطية المحضرة في الدراسة

رقم الحيوان	الفحص بعد 24 ساعة		الفحص بعد 48 ساعة		معيار الأضداد باستخدام اختبار التراص في الأنابيب	نتائج العزل الجرثومي
	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد		
1	14	2.2	12	1.8	320	--
2	15	2.4	13	1.9	320	-
3	13	1.7	12	1.8	320	.
4	13	2.0	11	1.6	160	-
5	16	2.5	13	1.8	160	-
6	13	1.7	11	1.7	320	-
المعدل	14	2.08	12	1.78	266	-

علماً أن معدل سماكة طية الجلد للخنازير غينيا قبل الحقن 3-4 مليمتر، ولم تسجل حالة نفوق

وبالمقابل فقد أظهرت نتائج المقايسة المناعية لحيوانات التجربة الممنعة بالبروسيلة المالطية الذرية Rev1 ارتفاعاً في معيار الأضداد بلغ 320، أما فيما يخص الاستجابة المناعية المتوسطة بالخلايا فنلاحظ أن معدل قطر احمرار جلد حيوانات التجربة 14.5 ملم، ومعدل الزيادة في سماكة طية الجلد 2.15 ملم بعد 24 ساعة من الحقن. في حين كان معدل قطر احمرار جلد حيوانات التجربة 12.5 ملم ، ومعدل الزيادة في سماكة

طبقة الجلد 1.95 ملم بعد 48 ساعة من الحقن بمستضد البروسلين. كما كانت جميع الحيوانات سالبة للعزل الجرثومي بعد إجراء اختبار التحدي . والجدول رقم (2) يبين هذه النتائج.

جدول رقم (2): قطر الاحمرار و معدل الزيادة في سماكة طية الجلد (مقدر بالمليمتر) ومعيار الأضداد (بعد 15 يوماً من التحصين) ونتائج العزل الجرثومي (بعد شهر من حقن الحيوانات بجرعة تحدي) لخنازير غينيا الممنعة بلقاح البروسيلة المالطية الذرية Rev1

رقم الحيوان	الفحص بعد 24 ساعة		الفحص بعد 48 ساعة		معيار الأضداد	نتائج العزل الجرثومي
	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد		
1	15	2.2	13.	2.1	320	
2	14	2.1	12	1.9	320	
3	16	2.3	14	2.2	320	
4	13	2.1	11	1.8	320	
5	14	2.1	12	1.8	320	
6	15	2.1	13	1.9	320	
المعدل	14.5	2.15	12.5	1.95	320	

علماً أن معدل سماكة طية الجلد للخنازير غينيا قبل الحقن 3-4 مليمتر ، ولم تسجل حالة نفوق

لم تظهر نتائج المقايسة المناعية لحيوانات مجموعة الشاهد السلبي أي ارتفاع في مستوى الأضداد، ولم يلاحظ حدوث احمرار في منطقة حقن مستضد البروسلين، في حين لوحظ حدوث زيادة طفيفة في سماكة طية الجلد لحيوانات مجموعة الشاهد السلبي، اختفت بعد 48 ساعة من الحقن ، كما كانت جميع الحيوانات موجبة للعزل الجرثومي بعد إجراء اختبار التحدي . والجدول رقم (3) يبين هذه النتائج

جدول رقم(3): قطر الاحمرار و معدل الزيادة في سماكة طية الجلد (مقدرة بالملمتر) ومعيار الأضداد (بعد 15 يوماً من التمنيع) ونتائج العزل الجرثومي (بعد شهر من حقن الحيوانات بجرعة تحدي) لخنازيرغينا المحقونة بالمحلول الملحي

رقم الحيوان	الفحص بعد 24 ساعة		الفحص بعد 48 ساعة		معيار الأضداد	نتائج العزل الجرثومي
	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد	قطر الاحمرار	الزيادة في سماكة طية الجلد		
1	0.0	0.2	0.0	0.1	0	+
2	0.0	0.2	0.0	0.0	0	+
3	0.0	0.2	0.0	0.1	0	+
4	0.0	0.2	0.0	0.1	0	+
المعدل	0.0	0.2	0.0	0.05	0	+

علماً أن معدل سماكة طية الجلد للخنازير غينيا قبل الحقن 3-4 مليمتر، ولم تسجل حالة نفوق

5- المناقشة

استهدفت الدراسة إنتاج لقاح آمن وفعال ضد داء البروسيلات باستخدام طريقة حمض الخل ثلاثي الكلور، وقد أظهرت الدراسة أن تركيز البروتين في المستضدات المحضرة بلغ 63.2 ملغ / دل. وقد ارتفع هذا التركيز عن تركيز البروتينات في المستضدات التي حضرتها (Hamza,2010) والبالغة 39.4 (24). ويعود هذا الفرق إلى الطريقة المتبعة في الاستخلاص حيث استخدمت الباحثة طريقة التكسير بالأمواج فوق الصوتية، كما قد يعود الاختلاف في التركيز إلى اختلاف نوع الذرية الجرثومية المستخدمة في الدراسة حيث استخدمت الباحثة البروسيلة المجهضة .

كما اختلف هذا التركيز عن التركيز الذي سجله Alzubaidy (2006) والبالغ 21 (4) ويعود السبب إلى اختلاف الطريقة المتبعة في التحضير حيث استخدم الباحث الفينول كمرسب للبروتين. وفي دراسة اجريت لاستخلاص البروتين من البروسيلة بثلاث طرق مختلفة بوساطة الترشيح باستخدام الايثانول وأخرى باستخدام سلفات الامونيوم، والثالثة باستخدام حمض الخل ثلاثي الكلور، اثبتت ان حمض الخل ثلاثي الكلور هو الأعلى قدرة على ترسيب البروتينات(45) . وأن كمية البروتينات الموجودة في المستضدات المستخلصة تعتمد على طريقة الاستخلاص (24).

وعند إجراء الرحلان الكهربائي للمستضدات المستخلصة بطريقة حمض الخل ثلاثي الكلور فقد أظهرت الدراسة وجود 6 حزم من البروتينات تراوحت أوزانها بين 21000-67000 دالتون ، وقد قاربت معدلات الأوزان

الجزيئية التي حصل عليها Jonse وزملائه (1973) والتي تراوحت بين 21000-50000 دالتون (27)، في حين اختلفت نتائج دراستنا عن النتائج التي سجلها (2006) Alzubaidy حيث ذكر أن جراثيم البروسيلة المالطية تمتلك بروتينات تتراوح أوزانها بين 28100-141000 دالتون(4). وقد يعود هذا الاختلاف إلى اختلاف ذرية البروسيلة المالطية ،واختلاف طريقة الاستخلاص .

اثبت Duclose وزملائه (1989) وجود ثلاث مجاميع كبيره من البروتين في الغشاء الخارجي لعائلة البروسيلة، المجموعه الأولى تتراوح أوزانها الجزيئيه بين (88-94 KDa) والمجموع الثانية تتراوح أوزانها الجزيئيه بين (35-40 KDa) والمجموعه الثالثة تتراوح أوزانها الجزيئية (25-40- KDa).(17)

أشارت الدراسات إلى أن تراكيب البروتينات الموجودة في المستضدات المستخلصة من حيث أوزانها الجزيئية تعتمد على طريقة الاستخلاص (5،8،24) .

أظهرت هذه الدراسة حدوث استجابة مناعية واضحة بعد التحصين بالمستضدات المحضرة وكذلك بالذرية اللقاحية، ففيما يخص المستضدات المستخلصة بطريقة حمض الخل ثلاثي الكلور فكانت الاستجابة المناعية متوافقة مع الدراسات التي أشارت إلى قدرة الببتيدوغليكان وعديد السكريد ألشحمي وبروتينات الغلاف الخارجي على إحداث استجابة مناعية في الحيوانات المحصنة بهذه الأجزاء من جراثيم البروسيلة (5،14،20،22،30،32،43،45،48) .

أما عند مقارنة مقدار الاستجابة المناعية بعد التحصين بالمستضدات المحضرة مع الدراسات الأخرى فقد كانت الاستجابة عن طريق مقايسة الأضداد أعلى من نتائج الدراسة التي قام بها (2006) Alzubaidy. وقد يعود هذا الارتفاع إلى ارتفاع تركيز البروتين، واستخدامنا لمستضد البروسلين الجلدي المحضر من نفس الذرية المحضر منها المستضدات المناعية(4).

كما اختلفت نتائج دراستنا عن النتائج التي توصل إليها (5،24) كونهم استخدموا قمم بروتينية مفردة في التمنيع.

أما فيما يخص الحيوانات الممنعة بالذرية اللقاحية فقد أظهرت الدراسة استجابة مناعية واضحة، وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره El-idrissi وزملائه (2001) حيث أشاروا إلى أن النعاج المحصنة بجرعة مقدارها 1.73×10^{8} وحدة مكونة للمستعمرات أصبحت موجبة لاختبار وردية البنغال وتثبيت المتممة بعد مرور أسبوعين من التحصين ووصلت الاستجابة المناعية إلى ذروتها بعد 4 أسابيع واختفت الأضداد بعد 40 أسبوعاً (19).

أشار Blasco (1997) إلى أن نتيجة اختبار البروسلين الجلدي تعتبر موجبة إذا كانت الزيادة في سماكة الجلد أكثر من 20% (9) .

أن سبب الاستجابة العالية في اختبار البروسلين الجلدي والتي تم تسجيلها في الدراسة قد يعود إلى استخدام مستضد من البروسيلة المالطية الذرية Rev1 والتي هي نفسها التي تم تصنيع المستضدات اللقاحية منها .

أن وجود المستضد المقدم بواسطة الخلايا المقدمة للمستضد Antigen presenting cell والتي تحمل المحدد المستضدي MHCII والذي يحفز الارتباط مع الخلايا التائية ذات المحدد المستضدي CD4 والتي بدورها تتطور إلى خلايا الذاكرة (Memory CD4 T-cell)، لذلك عند إجراء اختبار البروسلين الجلدي بنفس المستضد المستخدم في التحصين فأن ذلك يؤدي إلى سرعة تكاثر خلايا الذاكرة بفعل التحفيز السريع من قبل الخلايا المقدمة للمستضد، إن خلايا الذاكرة المحفزة تفرز العديد من الانترلوكينات والتي أهمها IL 2, IL4, IL8 والتي تعمل على جذب الخلايا الالتهابية وإلى زيادة نفوذية الأوعية الدموية في منطقة الحقن مما يسبب احمرار المنطقة وتثخنها بقدر يتناسب مع كمية المستضد المحقون ونوعه والاستجابة المناعية لذلك المستضد(28).

أظهرت الدراسة وجود توافق بين نتائج اختبار التراص في الأنابيب مع اختبار البروسلين الجلدي وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره Bercovich وزملائه (1992) حيث أشاروا إلى التوافق الشديد بين اختبار البروسلين الجلدي والاختبارات المصلية الأخرى(8).

كما أظهرت هذه الدراسة قدرة المستضدات المناعية واللقاح لحماية حيوانات التجربة ضد جرعة التحدي وقد اتفقت هذه النتيجة مع ما ذكره Zhao وزملائه (1989) حيث أشاروا إلى قدرة المستضدات المستخلصة من البروسيلة في حماية خنازير غونيا من الإصابة بالبروسيلة(47). كما أشار Martins وزملائه (2010) إلى قدرة المستضدات المستخلصة من البروسيلة في حماية الكباش من الإصابة بالبروسيلة الغنمية (32) .

أظهرت المستضدات المحضرة في الدراسة قدرة مشابهة للقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1 في حماية الحيوانات المستخدمة في التجربة من الإصابة بجراثيم البروسيلة المالطية، وبالرغم من أن الاستجابة المناعية المتكونة من التحصين بلقاح البروسيلة المالطية الذرية REV1 هي أكبر من الاستجابة المناعية المتكونة من التحصين بالمستضدات المستخلصة، كون اللقاح يحتوي على جراثيم البروسيلة كاملةً في حين أن المستضدات تحتوي على أجزاء من جراثيم البروسيلة، نوصي باستخدام المستضدات المستخلصة بطريقة حمض الخل ثلاثي الكلور في الأغنام وخاصة الحوامل منها كون المستضدات المحضرة تتميز بالأمان من حدوث الإجهاض والقدرة

على تحفيز المناعة، إضافةً إلى عدم تأثيرها على الصحة العامة من حيث طرح جراثيم البروسيلة في الحليب أو إصابة العاملين جراء عملية التحصين.

References -6

1- Adams LG. Development of live *Brucella* vaccines. In: Adams LG,ed. *Advances in brucellosis research.* Texas: A & M University Press 1990; pp. 205-76

2- Alton, G. G. and Forsyth, J. R. L. (1996). Brucella. In: Medical Microbiology. 4th ed. Churchill Living Stone. U.S.A.

3- Alton, G. G., Jones, L. M., Angus, R. D. and Verger, J. M. (1988). Techniques for the brucellosis laboratory. INRA, Paris..

4- Alzubaidy, I. A. (2006) Prepare and experimental antigen extracted from same brucella strain . ph D. thesis , collage of vet. Medicine , university of Baghdad .

5- Alzubaidy, I.A; Dhahir ,S, H.& Amean,M. K. (2010). Using of Brucellins and Their Fractionation Peaksin Immunization Against Brucellosis. Eng & Tech . J. Vol 28 (3):626-628 .

6- Banai, M; Abramson, M; Lern-Mayer; Chechik, K; Hoida, G; Zana, O; Bardenstein, S; Cogen, A. And Davidson, M.(1995). Problem associated with the persistence and possible horizontal transfer of *brucella melitensis* . CNEVA Alfort , France.PP:69-76.

7- Bercovich, Z.; Laak, E. A. ter, and Lipzigj, H. H. an. (1992). Detection of brucellosis in dairy herds after an outbreak of the disease using a delayed-type hypersensitivity test .Prev. Vet. Med. 13: 277-285.

8- Bercovich Z., Eger A., Dekker T. & Haagsma J. 1995.Production of *Brucella* allergens and evaluation oftheir biological activity in a guinea-pig bio-assay.*J Vet Med B*, 42, 19-27.

9- Blasco, J. M. (1997). A review of the use of *Br. melitensis* Rev. 1 vaccine in adult sheep and goats. Prev. Vet. Med. 31: 275-283.

10- Bosseray, N. (1983). Vaccine and serum – mediated protection against*Brucella* infection of mouse placenta.Br. J. Exp. Pathol. 64: 617-625.

11- CDC,center for disease Control and prevention (2008).public health consequences of a false-positive laboratorytest result for brucella-Florida ,Georgia, and Michigan,2005,MMWR.57(22):603.

12- Cheville N.F., Stevens M.G., Jensen A.E., Tatum F.M. & Halling S.M. 1993. Immune response and protection against infection and abortion in cattle experimentally vaccinated with mutant strains of *Brucella abortus. Am J Vet Res*, 54, 1591-1597.

13- Collee, J. C., Fraser, A. G., Marmion, B. P. and Simions, A. (1996). Mackie and McCartney Practical Medical microbiology. 4th ed. Churchill Livingstone. Inc., U.S.A.

14- Cox, J. C. and Coulter, A. R.(1997). Adjuvants - a classificationand review of their modes of action.Vaccine 15: 248-256.

15- D-Massi, F; Giovannini, B; Di-Emidio, G; Ronchi, M; Tittarelli, M; Diventura, D. And Gaporale G.(2005). Use of the complement fixation test and brucellin skin test to identify cattle vaccinated with B. abortus strain RB51 .Vet. Italiana ,41(4):291-299.

16- Dranovaskaya ,E. (1991). New approach to brucellosis vaccination of people with high risk of infection in: Tumbay E. Hilimi S. Ang.O.(eds) Bruclla and brucellosis in man and animal Turkish microbiology society 16:87-100 .Ege University press .Izmir

17- Duclose, P. J.; Bentejac, M. C.;Serre, A. and Bascoul,

S.(1989). Skin test reaction to a phenol-soluble antigen of *B. abortus* among veterinary students, Lyon, France, International. J. Epidemol. 18 (2):446-450.

18- Duerden, B. I.; Old, D. C.; Hasting, J. G. M. & Towner, K. J. (1997). Vaccines against bacterial zoonoses. J. Med. Microbiol., 64(4): 267-269.

19- El-Idrissi, A. H.; Benkirane, A.; El-Maadoudi, M.; Bouslikhane, M.; Berrada, J. & Zerouali, A. (2001). Comparison of the efficacy of *Brucella abortus* strain RB51 and *Brucella melitensis* Rev1 live vaccine against experimental infection with *Brucella melitensis* in pregnant ewes. Rev. Sci. Tech. off. int. Epiz., 20(3):741-747

20- FAO-Brucellosis, (2003). International Research Confere including the 56th Brucellosis Research Conference.

21- FAO/OIE/ WHO (1997). 1995 Animal Health Yearbook, FAO Animal production and Health Series. FAO, Rome, Italy.

22- Gamazo C, Vitas AJ, Moriyon I, Lopez- Goni I, Diaz R. *Brucella* group 3 outer membrane proteins contain a heatmodifiable protein. *FEMS Microbiol Lett.* 1993; 112: 141-

23- Gillespie, J. H. and Timoney, J. F. (1981). Hagan and Bruner's infectious diseases of domestic animals. 7th ed. Comstock Publishing Associates. London. pp. 127-138.

24- Hamzah,A. M.(2010) A Trying to produce an safety vaccine against Brucellosis.J. Anbar foe vet science.No1 (3) :10-17.

25- Jimenes de Bagües, M. P.; Elzer, P. H.; Blasco, J. M.; Marin, C. M.; Gamazo, C. & Winter, A. J. (1994). Protective immunity to *Brucella ovis* in BALB/c mice following recovery from primary

infection or immunization with subcellular vaccine. Inf. Immun., 62(2):632-638.

26- Joklik,W. And Amos, Z. (1984). Microbiology , 8[th] ed. Appleton century crofts , Norwalk-Connecticut.

27- Jonse, L. M; Diaz, R. And Taylor, A. G. (1973). Characterization of allergens prepared from smooth and rough strain of *Brucella melitensis* . Br. J. Exp. Path. 54:492-508.

28- Kuby, J.(1992). Immunology freeman and company U.S.A.

29- Kurar, E. & Splitter, G. A. (1997). Nucleic acid vaccination of *Brucella abortus* ribosomal L7/L12 gene elicits immune response, Vaccine., 15(17-18):1851.

30- Lopez, M. A.; Asselineau, J.; Serre, A.; Roux, J.; Bascouf, S. & Lacave, C. (1976). Immunization by an insoluble fraction from *Brucella melitensis* immunological and characterization of the active substances. Inf. Immun., 31:311-321

31- Marin, C. M., Alabart, J. L. and Blasco, J. M. (1996). Effect of antibiotics contained in two brucella selective media on growth of *Brucella abortus, Br. melitensis* and *Br. ovis*. J. Clin. Microbiol. 34: 426-428.

32- Martins , R.D; Irache, J. M; Blasco , J. M; Munoz, M. C.*et al* (2010) Evaluation of particule celluler vaccine against *Brucella ovis* infection in ram. Vaccine J. 2010. (28):3038-3046.

33- Murillo ,M; Grillo, M; Rene ,J; Marin, c . et al .(2001) *Brucella ovis* antigenic complex bearing poly –epsilon –caprolactone micropartical confer protection against experimental brucellosis in mice . vaccine 2001:19(30) 4099-106

34- OIE Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals,5th edition, 2004 part 2, section 2.3, chapter 2.3.1

35- Olsen S.; Stoffregen W.S.(2003) . Essential role of vaccines in brucellosis control and eradication programs for livestock. Expert Rev Vaccines 2005; 4: 915-28.

36- Onurdag, F. K.; Degim, T.; Değim, Z.; Kutlu, I.; Gunes, G. & Abbasoglu, U. (2008). The humeral immune response of mice to liposomes containing *Brucella melitensis* outer membrane fragments.7(8):991-995.

37- Protocol Institute Merieux (1986).Vaccine against Brucellosis for human use Lyon

38- Quinn, P. J., Carter, M. E., Markey, B. and Carter, G. R. (1999). Clinical Veterinary Microbiology. 1st ed. Elservier Ltd. London, pp: 78-79.

39- Quinn, P. J., Markey, B. K., Carter, M. E., Donnelly, W. J. C. and Leonard, F. C. (2002). Veterinary Microbiology and Microbial Disease. 1st ed. Blackwell Science Ltd., London. p. 163-167.

40- Ryke , J. (1993). The QC vaccine against brucellosis ,FAO. Animal production & healthy paper 116:81-110.

41- Smith, B. J. (1994). SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein in: methods in molecular biology , vol. 32:Basic protein and peptides protocol ,P:23-34. Humana press , Totowa .

42- Strugnell, R. A; Drew, D; Mercieca, J; Dinatale, S; Firez, N; Dunstan, S. J; Simmons, C.P. And Vadoles , J. (1997). DNA vaccine for bacterial infection. Immunology celluler biology .75:364-369.

43- Tabatabai, L. B.; Pugh, Jr. G. W.;Stevens, M. G.; Phillips, M. andMcDonald, T. (1992).Monophosphoryl lipid A-inducedimmune

enhancement of *Brucella abortus* salt-extractable protein and lipopolysaccharide vaccines in BALB/c mice. Am. J.Vet. Res. 53:1900-1907.

44- Winter AJ, Verstreate DR, Hall CE, *et al*.Immune response to porin in cattle immunized with whole cell, outer membrane, and outer membrane protein antigens of *Brucella abortus* combined with trehalose dimycolate and muramy ldipeptide adjuvants. *Infect Immun*. 1983;42: 1159-67.

45- Woodard, L. F. and Toone, N.(1980). Allergic activity and biochemical analysis of three soluble antigen preparations from *Brucella abortus* strain 45/20. Am. J. Vet. Res. 41 (1): 114-116

46- World Health Organization(WHO) (1998). The development of new/improved Brucellosis vaccines:report of a WHO meeting 11-12December 1997, Geneva, WHO,Geneva 19-21.

47- Zhao,W, R; Hasi, Wendoso , Qin, Wang weng & S.L.L.U.(1989). Selection of brucella vaccine strain of low residual virulence by chemical mutagenesis .Med. microbial -vol. 30 :143-148.

48- Zygmunt, M. S.; Gilbert, F. B. & Dubray, G. (1992). Purification, Characterization and seroactivity of a 20-kilodalton protein antigen. J. Clin. Microbiol., 30(10): 2662-2667.