دراسة القدرة التمنيعية لمستضد جرثومة *Pasteurella multocida* على حيوانات التجارب

ضحى سعد صالح، سراب سلمان كاظم*، إسماعيل كاظم شبر*

قسم علوم الحياة- كلية العلوم- جامعة بغداد. بغداد ، العراق.

** وزارة العلوم والتكنلوجيا. بغداد, العراق.*

الخلاصة

صممت الدراسة الحالية لتقييم مستضد جرثومة *Pasteurella multocida* الكامل المقتول بالفورمالين والمحضر من عترة محلية معزولة من حالات مرضية (رئة مصابة من الأغنام والماعز) , إذ انه من الضروري معرفة الأنواع المحلية المنتشرة لغرض استخدامها في تحضير لقاح فاعل، وعدم استخدام العتر القياسية.

سعت الدراسة لتقييم القابلية التمنيعية لمستضد الجرثومة بدراسة تأثيراته المناعية في الحيوانات المختبرية وذلك بحقنة بالبريتون (0.5ml / moues) بواقع جرعتين ضمن جدول معين وتعريض الحيوانات الممنعة لجرعة التحدي *Challenge dose* الحاوية على الجرثومة الحية .كانت نسبة الحماية المتولدة في المجموعة الممنعة بمستضد جرثومة 65% *P. multocida* في حين هلكت حيوانات مجموعة السيطرة جميعها .

STUDY THE IMMUNO POTENCY OF *P. multocida* ANTIGEN ON EXPERIMENTAL ANIMALS

Abstract

The current study was designed to assess the immune potency of whole cell killed antigen of *Pasteurella multocida* prepared from 1ocal strains isolated from satisfactory cases (infected lung from sheep and goat), as it is necessary to know the local species deployed for use in the preparation of an effective vaccine, rather than vaccines prepared from standard isolates . The aim of this study is evaluate the immune potency of prepared antigen through its injection intraperitoneally in mice (0.5ml/moues) for two doses, protection being judged by the ability of immunized mice to survive challenge infection with virulent homologous microorganisms. Protective activity was achieved 65%, while the control group lost all animals.

المقدمة

نظرا للخسائر الاقتصادية الكبيرة التي تسببها جرثومة *Pasteurella . multocida* جراء ضراوتها في إحداث الإمراض في الإنسان والحيوانات والطيور , وبسبب تفشي الإمراض المتسببة عنها ففي الابقار والجاموس تسبب بكتريا *P. multocida* النوع المصلي E,B مرض عفونة الدم النزفية (Hemorrhagic Septicemia) [1]، أما النوع المصلي A فيعد المسبب المرضي لمرض حمى النقل (Shipping fever) والتهاب الضرع الشديد في الأبقار والجاموس .[2] تسبب جرثومة *P. multocida* حالات مرضية عديدة في الاغنام والماعز في معظم بلدان العالم وبأعمار مختلفة،تسبب الجرثومة مرض حمى النقل (Shipping fever) في الاغنـام وذات الرئـة (Enzootic pneumonia) في الاغنام والماعز . [3] وفي الدجاج والدجاج الرومي تسبب الجرثومة مرض كوليرا الدواجن (Fowl cholera) [4,5] أما الإصابة في الإنسان تحدث نتيجة للتعرض لعضات الكلاب وخدش القطط او انتقال الجرثومة عن طريق التماس مع حيوانات الحقل المصابة [6,7] , وكذلك قلة الدراسات التي أجريت حول مرض

الباستورلوسز Pasteurellosis في الأغنام إذا ما قورنت بالدراسات التي أجريت حول نفس المرض في الأبقار والجاموس ,وخاصة فيما يتعلق بدراسة الخواص المميزة للجراثيم المعزولة في الأغنام , وخواصها الاستضدادية [8] للتعرف على مدى اختلاف العتر المعزولة بعضها عن بعض لما لذلك من أهمية بالغة في تعيين العتر الممكن استعمالها للتمنيع ضد المرض .وللأسباب المذكورة أعلاه ارتأينا في الدارسة الحالية استخدام عتر محلية معزولة من حالات مرضية في الأغنام والماعز واستخدامها في تحضير مستضد الجرثومة الكامل ,إذ من الضروري جدا معرفة الأنواع المحلية المنتشرة لغرض استخدامها في تحضير لقاح فاعل ,وعدم استخدام العتر القياسية , وان الكثير من البحوث أوضحت عدم وجود حماية تصالبية Cross protection) بين أنواع . *P . multocida* [9] لذلك سعت الدراسة لتحضير مستضد لقاحي تجريبي ضد الإصابة بجرثومة *P . multocida* في الحيوانات الحقلية (الأغنام والماعز)من عزلات محلية وقد تضمنت المحاور الرئيسية آلاتية :-

1. تحضير مستضد الجرثومة الكامل المقتول بالفورمالين .
2. تقييم القدرة التمنيعية للمستضد المحضر وذلك بدراسة تأثيراته المناعية في الحيوانات المختبرية وذلك بحقنه ضمن جدول معين وتعريض الحيوانات الممنعة لجرعة التحدي challenge dose

طرائق العمل Methods

العترة المستخدمة في تحضير المستضد

تم الحصول على عترة نقية من جراثيم *P. multocida* معزولة محلياً من حيوانات حقليه مصابه بالجرثومه(الاغنام والماعز) .[10] تم التأكد من نقاوة العزلة وكونها *P. multocida* بأستخدام نظام api E20 [11] جرت إدامة العترة الجرثومية بأعادة زرعها على وسط أغار نقيع القلب والدماغ المضاف اليه الدم مرة خلال 10-15يوماً ، ولإدامة فوعة (Virulence)الجرثومة جرى حقنها في فئران بيضاء نوع Balb/c بعمر (6-8)أسابيع تزن الواحده(20-25) غم، مرة كل ثلاثة الى أربع أسابيع وإعادة استنباتها من دم القلب المسحوب عند احتضار الحيوان او موته.

طريقة تحضير المستضد

حضر مستضد جرثومة *P. multocida* الكامل المقتول بالفورمالين بحسب طريقة Mukker,et al,1979 [12]اختيرت احدى العزلات الجرثومية لتحضير المستضد والتي كانت الأكثر ضراوة لحيوانات التجارب :-

1- نميت الجراثيم المعزولة على مرق نقيع القلب والدماغ ، وحضنت لمدة 24-18 ساعة بدرجة 37م ^{o}.

2- رسبت الخلايا الجرثومية بجهاز المنبذ على سرعة 5000 دوره/ دقيقه لمدة 15 دقيقة .وعلق الراسب بكمية مناسبة من دارئ الفوسفات الملحي الحاوي على الفورمالين بنسبة 0.3 % ووضع في أنبوبة زجاجية نظيفة ومعقمة .

3- حضن العالق الجرثومي لمدة 24 – 18ساعة بدرجة 37م لقتل الجراثيم .

4- تم التأكد من قتل الجرثومة وعدم تلوث المستضد بجراثيم أخرى وصلاحيته للاستعمال بأجراء فحص العقامة (Sterility) بعدها فصلت الجراثيم المقتولة باستخدام جهاز المنبذ المبرد وبسرعة 5000 دوره/ دقيقه ولمدة ساعة .

5- التخلص من الراشح،ثم غسلت الجراثيم المترسبة ثلاث مرات بمحلول الملح الفسلجي وبمساعدة جهاز المنبذ المبرد وبسرعة 5000 دوره/ دقيقه ولمدة نصف ساعة لكل مرة .

7.إعادة تعليق راسب الخلايا في محلول دارئ الفوسفات الملحي ذو باء هاء 7.2بحسب التخفيف المطلوب من العالق الجرثومي الذي تم تحديده بوساطة مقياس الطيف الضوئي على طول موجي 600 نانوميتر وقراءة قياسها 0.25لتعادل تركيز 3×10^{8}جرثومة / مل [13, 14]تم حفظ المستضد المحضر تحت درجة 20 - لحين الاستعمال.

اختبار المستضد المحضر

1- فحص السلامة : Safety test

حقنت 4 فئران بيضاء نوع Balb/c بعمر (6-8) أسابيع بالمستضد المحضر بجرعة مضاعفة في البريوتون ، وفي نفس الوقت حقنت مجموعة السيطرةوالتي كانت بنفس نوع ووزن المجموعه الاولى بمحلول الملح الفسلجي وبنفس طريقة الحقن ، وتمت مراقبة الفئران المحقونة مدة 7 أيام للتأكد من سلامة المستضد وصلاحيته للاستعمال.

2- فحص العقامة : Sterility test

تم زرع عينة من المستضد البكتيري المحضر على عدد من الاوساط الزرعية، وسط الماكونكي ، ووسط المرق المغذي الاعتيادي ووسط آغار نقيع القلب والدماغ المضاف إليه الدم بنسبة 5%، ووسط آغار الدم ، حضنت الاوساط المزروعة

تحت الظروف الهوائية والاهوائية (باستخدام حاضنه لاهوائيه مجهزة ب CO_2) بدرجة 37c لمدة (24-48 ساعة) ، للتأكد من نقاوة المستضد، وخلوه من الجراثيم الحية، وعدم تلوثه.

3-اختبار التحدي : Challenge Test

أ -تحضير حيوانات التجربة

تم الحصول على حيوانات التجربة من شركة الكندي لإنتاج المصول واللقاحات، وكانت عبارة عن فئران بيضاء نوع Balb /c عمرها (6-8) أسابيع، تزن الواحدة (20-25) غم جميعها من الذكور، وضعت في اقفاص خاصة، وتم تغذيتها عليقة جافة ووضعت في غرفة تربية تحت ظروف ملائمة.

ب-حساب الجرعة القاتلة لنصف عدد الحيوانات

Lethal dose 50 (LD50) :

تم تعيين الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحيوانات اعتمادا على [23] ومثلما يأتي: -

1- **تحضير حيوانات التجربة :-** استخدم ستة و ثلاثون فأرا ابيض نوع Balb/c عمرها(8 -6) أسابيع تزن الواحدة (20-25)غم وجميعها من الذكور قسمت الى ستت اقفاص، كل قفص يحوي (6) فئران.

2- حضر عالق من الجرثومة المعزولة ، في محلول دارئ الفوسفات الملحي ذو أس هايدروجيني 7.2 PH وبأستخدام جهاز قياس الطيف الضوئي على طول موجي 600 نانوميتر وقراءة قياسها 0.25 لتعادل التركيز المطلوب من العالق الجرثومي والحاوي على 3×10^8 خلية /مل .

3- حضرت تخافيف عشرية متسلسلة من العالق الأصلي الحاوي على 3×10^8 خلية / مل ، ابتداء من 10^{-1} الى 10^{-9}.

4- اخذت خمس تخافيف ابتداءً من 10^{-5} الى 10^{-9}، وتم حقن كل تخفيف في مجموعة مكونة من 6 فئران، وبجرعة مقدارها 0.5 مل في البريتون . (Intraperitoneal) وحقنت مجموعة السيطرة بمحلول الملح الوظيفي (Normal slain) .

5- مراقبة الحيوانات بعد الحقن مدة اسبوع، سجلت خلالها عدد الهلاكات لكل مجموعة لتحديد التخفيف الذي سبب قتل 50% من الحيوانات.

6- عزل الجرثومة وتشخيصها من الحيوانات النافقة للتأكد منها، وذلك بفحص المسحات المصبوغة بصبغة غرام وصبغة المثلين الازرق، واجراء الفحوصات الكيموحيوية على الجرثومة المعزولة .

حساب الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحيوانات وذلك بأستخراج قيمة (Proportional distance)، وتم حساب لوغاريتم التخفيف الذي سبب قتل نصف العدد من الحيوانات وذلك بتطبيق قوانين خاصة وارده في [15]وكما ياتي :-

Proportional distance=
50% - mortality at dilution next below\(mortality next above)–(mortality next blow)

Log LD50 =log of lower dilution + Proportional distance x (log of higher dilution - log of lower dilution) x log of dilution increment

LD50 dosage =cells/ml of original culture x LD50 dilution x volume injected

Number of infectious unit/ml orig. =avg. plat ct. /vol. plated x dilution factor

جـ .العد البكتيري : Bacterial count

اتبعت طريقة التخفيف المتسلسلة (serial dilution) في العد الجرثومي التي استخدمت في حساب الجرعة القاتلة لتحديد العدد الجرثومي الذي سبب قتل 50%من الحيوانات (No. Of infections units/ml) وكما يأتي:-

1- زرعت جراثيم *P. multocida* على مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth)وحضن لمدة 24 ساعة بدرجة 37م.

2- حضرت سلسلة من تخافيف عشرية لعشرة تخافيف من التركيز الأصلي للعالق الجرثومي الحاوي على 3×10^8 خلية /مل .

3- زرع 0.1 مل من العالق للتخافيف الخمسة الأخيرة ابتداءً من(10^{-5} – 10^{-9}) وهي نفس التخافيف التي حقنت بها فئران التجارب لاستخراج التخفيف الذي سبب قتل 50%من الحيوانات (حيث زرع من كل تخفيف ثلاثة أطباق وحضنت لمدة 24ساعة بدرجة 37م°) . احتسبت عدد الجراثيم اللازمة لقتل 50% من الحيوانات اعتماداً على المعادلة الآتية بحسب ما ورد في.[15]

$$\text{عدد الجراثيم /مل} = \frac{\text{معدل عدد الجراثيم للاطباق الثلاثة} \times \text{معامل التخفيف}}{\text{حجم العالق الجرثومي الذي تم زرعه}}$$

طريقة اجراء أختبار التحدي : Challenge test

استخدم 40 فأر ابيض نوع Balb\ c بعمر (6–8) أسابيع يزن الواحد 20-25 غم ,وكانت جميعها من الذكور قسمت الفئران عشوائياً على مجموعتين كل مجموعة تضم 20 فأر :-

المجموعة الاولى (A): - حقنت بمستضد جرثومة *P. multocida* المقتولة بالفورمالين في البريتون بجرعة 0.5

مل حاوية على $10^8 \times 51$.جرثومة لكل فأر، ثم اعطيت الحيوانات جرعة اخرى وجرعة تقوية (Boosting Dose)من المستضد مقدارها 0.5 مل /فأر في البريتون حاوية على 1.5×10^8جرثومة /مل بعد مرور اسبوعين من اعطاء الجرعة الاولى وكما موضح في جدول رقم (1) .

المجموعة الثانية (مجموعة السيطرة B) :- حقنت محلول دارئ الفوسفات الملحي ذا أس هايدروجيني PH 7.2 وبطريقة وكمية الجرعة المعطاة نفسها للمجموعة الاولى.

اعطيت المجموعتين جرعة التحدي *Challenge dose* والمساوية لـ LD_{50} 100بعد مرور اسبوعين من جرعة التقوية (Boosting does)، حيث حقنت الحيوانات 0.5 ملم / فأر في البريتون من العالق الجرثومي الحي .وبعد التحدي وضعت الحيوانات تحت المراقبة مدة اسبوعين لتسجيل نسبة الهلاك والاحياء المتبقية منها.

النتائج والمناقشة Results and Discussion

تحديد الجرعة القاتلة لنصف العدد من الحيوانات : LD_{50}

كانت قيمة الجرعة اللازمة لقتل نصف العدد من الحيوانات والتي حصلنا عليها 1.4×10^6خليه / مل وكانت هذه القيمة اقل من قيمة LD_{50} للعتره المعزوله من الانسان 3×10^6خليه / مل و المحسوبة من قبل [16] ، واقل من قيمة LD_{50} للعتره المعزوله من الدجاج المصاب بكوليرا الدواجن وكانت قيمتها 2.1×10^6خليه / مل والمحسوبة من قبل [5] ويعود سبب التفاوت بصورة رئيسية الى اختلاف ضراوة هذه العزلات فكلما زادت الضراوه قلة الجرعة اللازمة لقتل نصف العدد من الحيوانات [17,18] ، فالعتره المعزوله من الانسان سببت الهلاك للفئران خلال 12-24 ساعة [16] ، اما العتره المعزوله من الدجاج سببت الهلاك للفئران خلال 10-18 ساعه [5]، اما العترة المعزوله من الماعز والتي استخدمناها في هذا البحث سببت الهلاك للفئران خلال 6-8 ساعات ، وقد يرجع هذا التباين في ضراوة العزلات الى احتواء قسم من هذه العزلات للمحفظه فضلا على قدرة قسم من هذه العزلات على انتاج بعض البروتينات والسموم التي تساهم في زيادة ضراوة هذه العزلات [19] .

اختبار التحدي

اجري اختبار التحدي على مجموعتين من الحيوانات , حقنت المجموعتين بجرعة التحدي ,وأعطيت جرعةالتحدي إعتماداً على الجرعة القاتلة لنصف العدد [18,17] Lethal dose50 (LD_{50})، كانت قيمة الجرعة القاتلة لنصف عدد الحيوانات التي حصلنا عليها (1.4×10^6) خليه /مل ,وتشير معظم البحوث الى استخدام جرعة تحدي مساوية لمئة من الجرعة القاتلة النصفية LD_{50} 100تعطي حماية ضد الاصابة بـ *P. multocida* المسببة لعفونة الدم النزفية [20]، ولهذا تم اعتماد جرعة (1.4×10^8)خليه /مل كجرعة تحدي واعطيت بحقنها بالبريتون .عدد الحيونات التي تم تعريضها لجرعة التحدي (20) فارا من كل مجموعة ، المجموعة الممنعة (A) ومجموعة السيطرة (B) وكما موضح في جدول رقم (1) .

سجلت المجموعة الاولى (A)هلاك سبعة فئران ,اما المجموعة الثانية (B)فقد هلكت جميعها خلال 24 ساعة من حقن جرعة التحدي ,وكما موضح في جدول (2) ان استخدام اختبار التحدي هو الطريقة المثلى لتقييم المناعة المتولدة [21]،يعد هذا الأختبار من أهم الأختبارات المناعية المعتمدة في تقييم اللقاحات ومدى فاعليتها في توفير الحماية للمجاميع الملقحة مع المجاميع غير الملقحة، وذلك بعد إعطاء جرعة التحدي (challenge does)

وقد اوضحت النتائج التي تم الحصول عليها ان مستضد الجرثومة المقتول بالفورمالين وفر حماية 65% من الفئران مقارنة بمجموعة السيطرة صفر %. ان تحفيز الاستجابة المناعية في المجموعة الاولى (A)جراء استخدام مستضد جرثومة *P. multocida* وفر حماية اكبر ضد اختبار التحدي متفقين بذلك مع ماتوصل اليه الباحثون . [22,23] وقياسا مع دراسات عالمية اخرى فان استخدام جزء مفصول من الجرثومة مثل مستضد متعدد السكريد الشحمي (LPS)وفر حماية جزئية (25%)(partial protection)عند تمنيع الفئران المختبرية بهذا المستضد [24]، وقد يعود السبب كون مستضد الجرثومة الكامل يحوي جميع التراكيب الاستضدادية للجرثومة كبروتينات الجدار الخلوي و متعدد السكريد الشحمي (LPS) وغيرها، وقد لوحظ انه عند استخدام اختبار الانتشار المناعي في هلام الاغار (gel precipitation test)بين مستضد الجرثومة الكامل المقتول ومصل الحيوانات الممنعة بالمستضد ظهور عدة خطوط ترسيبية بينها دلاله على ان مستضد الجرثومة الكامل حفز استجابة مناعية لجميع التراكيب الاستضدادية التي تحويها الجرثومة الكاملة [25,26]أي ان استخدام مستضد الجرثومة الكامل وفر حماية مناعية أفضل

من استخدام جزء مفصول منها وهذا ما اكده الباحثون والمحافظة على الثروة الوطنية.

جدول رقم (1):-عدد الجرع المعطاة من مستضد الجرثومة المقتول للحيوانات المختبرية(الفئران) ومقدارها وطريقة اعطائها.

الجرع المعطاة	مقدار الجرعة لكل فأر	كمية الجرعة	طريقة الحقن
جرعة أولى	1.5×10^{8} خلية / مل	0.5 مل	في البريتون
جرعة ثانية(تقوية) بعد مرور أسبوعين من الجرعة الأولى	1.5×10^{8} خلية / مل	0.5 مل	في البريتون

جدول رقم (2) النسبة المئوية للاحياء المتبقية بعد اعطاء جرعة التحدي

المجموعة	عددها	عدد الاحياء المتبقية بعد اعطاء جرعة التحدي	النسبة المئوية للاحياء المتبقية
مجموعة الحيوانات المحقونة بالمستضد (A)	20	13	65%
مجموعة السيطرة (B)	20	صفر	صفر

[13,18]وأن نتائج اختبار التحدي معتمدة في تقييم اللقاحات ومدى فاعليتها في توفير الحماية للمجاميع الملقحة مع المجاميع غير الملقحه [27] .

لقد أوضحت الدراسة الحالية كفاءة المستضد المحضر من عترة محلية في تمنيع الحيوانات ،وقد تكون هذه النتيجة مؤشرا ايجابيا في الاتجاه الذي يمكن الباحثون من تحضير لقاح محلي فاعل والذي قد يمثل احد الحلول المناسبة للحد من انتشار المرض

References المصادر

1. Rhoad, K.R. **1992,** *Fowl cholera In: Manual of standards or diagnostic test and vaccine.* 2ed edited by Blanco. J. and Truszczynk: 593-600.
2. Allan , E. M.; Wiseman, A., Gibbs, H.A. and Selman , **1985**, l.E. *Pasteurella Species isolated from the Bovine Respiratory tract and their antimicrobial sensitivity patterns*: Veterinary Record, 117,629-631.
3. Barbour, E.K.; Nabbut, N.H., Hamadeh, S.K. and Al-Nakhli, H.M. **1997,** *Bacterial identity and characteristics in healthy and unhealthy respiratory tracts of sheep and Calves,* Vet. Res. Commun. 21(6):421-430.
4. Aviril, J.M. and Donnio,P.Y. **1995,** Pasteurellosis(editorial).ProsseMed.,24(11):516-518(abstract).
5. النعيمي،حاتم حميد **2002** ، *دراسة عن مرض الباستورلوسسز في الدواجن*.رسالة دكتوراه مقدمة الى مجلس كلية الطب البيطري/جامعة بغداد.
6. Liu,W.,Chemaly,R.F.,Tuohy;M.J.Lasalvia,M.M. and Procop, G.W. **2003,** *Pasteurella multocida urinary tract infection with molecular evidence of zoonotic transmission.* Infect.Dis. 36(4):58-60.
7. Lafeber, T.; Cantey, J. R.; Lutwick, L.; Talavera, F.; Glatt, A.; Mylonakis, E. and Cunha, B.A. **2002,** *Pasterella multocida* Infection . medicine. 2-1(ternet).
8. Alsultan, I.I., **1976,** *Pathology of some Bacterial Pneumonia in sheep in Iraq with special reference to Pasteurella infection.* (M.Sc.Thesis). Collage of veterinary Medicine University of Baghdad.
9. Hirsh, D.C.; Jessup, D.A.; Snipes, K.P.; Carpchter, T.E.;Hird , D.W. and Mccapes, R. H. **1990,** *Characteristics of Pasteurella multocida isolated from water fowl and assoiated avian species in California*. J.Wild life Dis. 26:204-209.
10. كاظم، سراب سلمان **2005**، *عزل وتشخيص جرثومة Pasteurella multocida ودراسة بعض صفاتها المناعية*.رسالة ماجستير مقدمة الى مجلس كلية العلوم / جامعة بغداد.
11. Collins,M.T.;Weaver,N.and Ellis,R.P. **1981,** *Identification of Pasteurella multocida and Pasteurella haemolytica by API 20E,Minitek, and Oxi/Ferm Systems.* J.of Clin. Micr.Bio.Vol.13,No.3:433-437
12. Mukkur, T. K. S. **1979,** *Immunogenisty of chatropically extract protection antigen (S) origin against experimental Pasteurellosis in mice.* J. General. Microlo. 113:37-43.
13. Avakian, A.P.;Dick,J.W.,Derieux,W.T. and Henry, C.W. **1985,** *Comparison of various antigens and their ability to dedect protection antibodies against Pasteurella multocida using Enzyme-Linked Immunosorbent* assy.Avian Dis.30(3):527-535.
14. Foryman, R. **1999,** *Antimicrobial Medication in domestic poultry In: poultry diseases,* 4th ed. Edited by Jordan, C.T.W. and paterson, M.:484-495.
15. Reed, L. J. and Muexch, H. **1938,** *A simple method of estimating fifty percent points.* The American Journal of Hygiene. 27(3): 490-508.
16. مبارك، سوسن سلمان عطية**2000**، *دراسة عن عزل جرثومة الباستوريلا من اصابات الحيوانات والانسان*. رسالة ماجستير مقدمة الى مجلس الطب البيطري /جامعة بغداد.
17. Hussin, A. A.; Chandrasekaran, S., Ong, G. H., Aminahkadariah, L., Harizam, M.Y. and Yeab, P.C. **1996,** *Infection with Pasteurella multocida and an a variant veterinary association Malaysia scientific Congress*:68-70.(Abstract).
18. Maslog, F. S. **1997,** *Fractionation of Pasteurella multocida group A for active mouse protection tests for swine plaque and Fowl cholera vaccine production.* The Philippine. J. I. Biotech. 8(1):21-29.
19. Rimler, R.B. and Glisson, J.R. **1997,** *Fowl cholera. In: Disease of poultry 10ed edited by calnek,* B.W., Barnes, H.J., Beard, C.W., Mcdougald, L.R and Saif, Y.M.: 143-160
20. Tabatabaei, M.; Liu, Z. and Finucane, A. **2002,** *Protective immunity conferred by attenuated aro A derivatives of Pasteurella multocida B:2 strains in a mouse model of Hemorrhagic Septicemia.* Inf. Immun. 70 (7): 3355-3362.
21. Chandrasekaran; S. and Karuppiah, A. **1996,** *Antibody response in cattle vaccinated with Hemorrhagic Septicemia vaccine.* The Eighth Veterinary Association Malaysia Scientific Congress. 158-160.
22. Borne, P. M. and Comte, S. **2001,** *Factors affecting vaccination in poultry production* 1st ed.: 80-98.
23. Effendy, A. W. M.; Saad, M. Z., Mohamad, M. and Omar, H. **2001,** *Vaccination of Sheep against pneumonic Pasteurellosis using anew Spray vaccine.* J. vet. Malaysia. 10(1): 45-49.

24. Muniandy, N.; Ramlan; M. and Mukker, T. K. S. **1996,** *Comparison of protein of Pasteurella multocida type. 6:B isolated by different techniques.* Proceeding of the 8th National Bio technology Seminar. 74-78.

25. الحرجان، فؤاد احمد **1979**، *دراسة مناعية لبعض المكونات المستضدية لعتر جراثيم* *P.multocida* . رسالة ماجستير مقدمة الى مجلس كلية الطب البيطري /جامعة بغداد.

26. السامرائي، اكرام عباس عبود **1998** ، *الاستجابة المناعية لمستضدات الباستوريلا مالتوسيدا في الحيوانات المختبرية* . رسالة ماجستير مقدمة الى مجلس كلية الطب البيطري / جامعة بغداد.

27. Rimler, R.B. **2000,** *Restriction endonuclease analysis using Hhal and Hpall to discriminate among group B Pasteurella multocida associated with haemorrhagic septicaemia*. J. Med. Microbiol. 49(1): 81-87.