# عزل وتوصيف المسبب المرضي لكوليرا الدجاج في العراق وتحضير لقاحات ضد المرض
# 2- تحضير لقاحات مختلفة ضد مرض كوليرا الدجاج

حاتم مجيد مهنا* أثير كامل كسّاب* إسماعيل كاظم شبر**

* جامعة بغداد / كلية الطب البيطري / فرع الامراض والدواجن.

** منظمة الطاقة الذرية العراقية / دائرة البحوث الزراعية والبايولوجية. ص.ب 765 بغداد.

## الخلاصة

حضرت ثلاثة انواع من المستضدات اللقاحية للباستوريلا ملتوسيدا المعزولة محلياً والتي هي مستضد الجرثومة الكاملة المكسرة ومستضد الجدار الخلوي ومستضد متعدد السكريد الشحمي. كل نوع من هذه المستضدات استخدم بثلاثة تراكيز وقد كانت $10^7$ و $10^9$ و $10^{11}$ وحدة مولدة للمستعمرة/طير لمستضد الجرثومة الكاملة المكسر و250 و 500 و 750 مايكروغرام/طير لمستضدي الجدار الخلوي ومتعدد السكريد الشحمي. لاختبار كفائتها التمنيعية حقن كل تركيز بمجموعة من امهات دجاج اللحم لمرتين بعمر 10 و18 اسبوعاً تحت الجلد اما مجموعة السيطرة فقد حقنت بالمحلول الملحي الوظيفي وتمت مراقبة تطور الاستجابة المناعية من خلال اختبارات التلازن الدموي المنفعل والانتشار المناعي في هلامة الاكار وفرط الحساسية الاجل ومن ثم اجري التحدي بعمر 23 اسبوعاً واظهرت النتائج افضلية مستضد الجرثومة الكاملة المكسر في توفير الحماية وكانت افضل جرعة $10^9$ وحدة مولدة للمستعمرة /طير يليه مستضد الجدار الخلوي وبجرعة 500 مايكروغرام/طير وادناها مستضد متعدد السكريد الشحمي وبجرعة 750 مايكروغرام / طير.

# Isolation and identification of the causative agent of fowl cholera in Iraq and preparation of vaccines against the disease

## 2- Preparation of different vaccines against fowl cholera disease

Hatem M .Mhanam* Ather K. Kassab* Esmail K. Shubber**

## Summary

Three types of locally isolated *Pasteurella multocida* antigenes namely the whole sonicated bacteria (WSB) the bacterial cell wall (BCW) and the lipopolysaccharide (LPS) of bacteria were prepared as a vaccine . Each type of antigenes was used in 3 concentrations that are $10^7$, $10^9$ and $10^{11}$ Colony Forming Units / bird for WSB and 250,500 and 750 µg/bird for BCW and LPS. Each of the prepared concentrations was injected subcutaneously into a group of

broiler breeder chickens and one group was left as a control . The groups were vaccinated 2 times at 10 and 18 weeks. The progress of immune response was monitered throughout a passive haemagglutination, an agar gel immunodiffusion, delayed type hypersensitivity and challenge tests. The results demonstrated that the WSB antigens provided better protection and the concentration of $10^9$ was the superior of all. The BCW antigen was next and the concentration of 500 µg/bird was the best among these antigenes, followed by LPS antigen and the best concentration among them was the 750 µg/bird.

## المقدمة

يعد مرض كوليرا الدجاج من الامراض ذات الانتشار الواسع بالعالم ويصيب عدداً غير قليل من المضائف شاملاً تقريباً جميع انواع الطيور مسبباً هلاكات عالية وخسائر اقتصادية . اطلقت تسمية باسترلوسز الدجاج على هذا المرض اعتماداً على المسبب المرضي الذي هو *Pasteurella multocida* [1] .

يعد التلقيح من اهم طرائق السيطرة والتي يمكن من خلالها تلافي حدوث المرض وتجنب الخسارات الناجمة عنه[2] . تقسم اللقاحات بصورة اساسية الى لقاحات حية ولقاحات مقتولة ولكل واحد من هذين النوعين عدد من المزايا والعيوب [3].

يوجد عدد من الدراسات التي تناولت استخدام اجزاء من الخلية الجرثومية كمستضدات لغرض انتاج اللقاحات وهذا ما يسمى Subcellular Vaccines وأحد هذه المستضدات هو متعدد السكريد الشحمي Lipopolysacharride الذي يعد جزءاً رئيسياً من جدار الخلية الجرثومية وله دور مهم في التصنيف ويعد من المستضدات ذات الوزن الجزيئي القليل والثابتة بالحرارة ولا تتأثر بالفينول [4]. ومن المستضدات الاخرى مستضد الجدار الخلوي والذي يزيد على تركيب متعدد السكريد الشحمي باحتوائه على البروتين [5] .

ان الحماية التصالبية بين عتر الباستوريلا ملتوسيدا المسببة لكوليرا الدجاج ضعيفة لذا فان التمنيع بنوع معين لا يوفر الحماية ضد النوع الآخر لذا يفضل في تحضير اللقاحات ان تحضر من العترة الحقلية ويفضل ان تحضر لقاحات تحوي اكثر من نوع من العتر [6]. ولوجود تفاوت في الاستجابة المناعية للمستضدات المختلفة للباستويلا ملتوسيدا [7] تم اللجوء الى تناول اكثر من مستضد في هذه الدراسة.

## المواد وطرائق العمل

**تحضير المستضدات اللقاحية**

تم استخدام اربع عزلات عزلت من اصابات حقلية احدها تعود الى العزلة SE-190 والثانية تعود الى العزلة SE-077 اما الاثنتان الاخر فلم تكن معرفة.

مستضد الجرثومة الكاملة المكسر

1. تم انماء الجراثيم بزرعها بمرق نقيع القلب والدماغ وحضنها لمدة 18–24 ساعة بدرجة 37ºم.

2. تم حساب عدد الجراثيم وتم جمعها بترسيبها بجهاز المنبذ وحل الراسب بكمية مناسبة من دارئ الفوسفات الملحي.

3. كسرت الجراثيم باستخدام الجهاز الباعث للامواج فوق الصوتية Sonicator .

ووزع في ثلاث عبوات اعتماداً على الجرعة وكما يأتي :–

- الجرعة الاولى: تحوي $10^{11}$ وحدة مولدة للمستعمرة (C.F.U) / طير.
- الجرعة الثانية: تحوي $10^{9}$ وحدة مولدة للمستعمرة (C.F.U) / طير .
- الجرعة الثالثة: تحوي $10^{7}$ وحدة مولدة للمستعمرة (C.F.U) / طير.

ومزج مع مادة الالراسيل الزيتية الحاملة وحفظت لحين الاستعمال.

مستضد الجدار الخلوي

حضر هذا المستضد حسب طريقة Srivastava وجماعته (1970)[8]

و قسم في ثلاثة عبوات اعتماداً على الجرعة اللقاحية وكما يأتي:

الجرعة الاولى 750 مايكروغرام/طير.

الجرعة الثانية 500 مايكروغرام/طير.

الجرعة الثالثة 250 مايكروغرام/طير.

ومزج مع مادة الالراسيل الزيتية الحاملة واجرى عليه اختبارات اللقاح وحفظ لحين الاستعمال.

متعدد السكريد الشحمي

استخلص مستضد متعدد السكريد الشحمي حسب طريقة Galanose *et al.*,(1965)[9]

وحضر المستضد بثلاث عبوات اعتماداً على الجرعة وكما يأتي:

- الجرعة الاولى 750 مايكروغرام / طير.
- الجرعة الثانية 500 مايكروغرام/ طير.
- الجرعة الثالثة 250 مايكروغرام / طير.

ومزج مع مادة الالراسيل الزيتية الحاملة وحفظ لحين الاستعمال.

**اختبارات اللقاح**

اجريت اختبارت اللقاح لجميع انواع المستضدات وهذه الاختبارات تشمل :

1. اختبار الامان Safety test.
2. اختبار العقامة Sterility test.
3. اختبار القدرة Potency test.

وحسب Rhoades (1992) [10] .

**التربية والتلقيح**

**أفراخ التجربة**

جلب 100 فرخ ذكراً و350 فرخ انثى بعمر يوم واحد من سلالة امهات دجاج اللحم نوع فاوبرو احتوت كل مجموعة على 10 ذكور و 40 انثى وكانت 30 من الطيور معاملة بالمستضد و20 طير غير معاملة بالمستضد أي ان المجموعة العاشرة كانت موزعة ضمن المجاميع التسعة.

مجاميع التجربة

قسمت الافراخ الى عشر مجاميع اعتماداً على نوع المستضد اللقاحي.

والجرعة اللقاحية وكما يأتي:

1. المجموعة الاولى: اعطيت مستضد الجرثومة الكاملة المكسر وبجرعة $10^{11}$ C.F.U./ طير.
2. المجموعة الثانية: اعطيت مستضد الجرثومة الكاملة المكسر وبجرعة $10^{9}$ C.F.U./ طير.
3. المجموعةالثالة: اعطيت مستضد الجرثومة الكاملة المكسر وبجرعة $10^{7}$ C.F.U./ طير.
4. المجموعة الرابعة: اعطيت مستضد الجدار الخلوي وبجرعة 750 مايكروغرام / طير.
5. المجموعة الخامسة: اعطيت مستضد الجدار الخلوي وبجرعة 500 مايكروغرام / طير
6. المجموعة السادسة: اعطيت مستضد الجدار الخلوي وبجرعة 250 مايكروغرام / طير
7. المجموعة السابعة:اعطيت مستضد متعدد السكريد الشحمي وبجرعة750 مايكروغرام/ طير.
8. المجموعة الثامنة:اعطيت مستضد متعدد السكريد الشحمي وبجرعة500 مايكروغرام/ طير.
9. المجموعة التاسعة:اعطيت مستضد متعدد السكريد الشحمي وبجرعة250 مايكروغرام/ طير.
10. المجموعة العاشرة: اعطيت محلول ملحي (مجموعة سيطرة).

برنامج لقاح الكوليرا

تم اجراء هذا البرنامج باعطاء جرعة اللقاح الاولى بعمر 8 اسبوع وتم سحب الدم لاجراء الاختبارات المناعية بعمر 12 اسبوع ثم اعيد التلقيح بعمر 18 اسبوع وسحب الدم بعمر 22 اسبوع لاجراء الاختبارات المناعية وفي نهاية هذا الاسبوع تم اجراء اختبار فرط الحساسية الاجل . في الاسبوع 23 تم اجراء اختبار التحدي.

**التحليل الاحصائي**

تم استخدام برنامج ANOVA في التحليل الاحصائي للنتائج واستخدم فحص اقل فرق معنوي Least significant difference ( LSD ) لبيان الفروقات بين المعدلات.

## النتائج

**اللقاحات والتلقيح**

**اللقاح المحضر**

- اختبار الامان

عند اعطاء الجرعة المضاعفة الى الدجاج لم تظهر أي تأثيرات او اعراض جانبية قوية عدا احمرار خفيف بمكان الحقن.

- اختبار العقامة

بعد حضن الاوساط الزرعية السائلة والصلبة المزروعة باللقاح في الحاضنة بدرجة 37°م باجواء هوائية ولا هوائية لم يظهر أي نمو جرثومي على هذه الاوساط.

- اختبار القدرة

بعد اعطاء التحدي للدجاج الملقح وغير الملقح اظهرت النتائج هلاك جميع الدجاج غير الملقح. اما الدجاج الملقح فكان عدد الدجاج الناجي منه يختلف بين المستضدات حيث كان عدده في المجموعة التي اعطيت مستضد الجرثومة الكاملة المكسرة 10/7 وفي مجموعة الجدار الخلوي 10/5 وفي مجموعة متعدد السكريد الشحمي 10/5.

**الاختبارات المناعية**

اختبار الانتشار المناعي في هلامة الاكار

اظهرت النتائج بعد التلقيح الاول والثاني ان جميع المجاميع الملقحة اظهرت زيادة معنوية ($P<0.01$) عن مجموعة السيطرة واظهرت المجاميع الثلاثةالاولى معدلات اعلى من بقية المجاميع وكانت المجموعة الثانية ذو اعلى معدل ثم تلتها المجاميع الاخرى وكما موضح في الجدول (1).

اختبار التلازن الدموي المنفعل

اظهرت النتائج ان المجاميع الملقحة كانت معدلاتها اعلى معنوياً ( $P<0.05$ ) عن مجموعة السيطرة . كما وان المجاميع الثلاثة الاولى كانت ذو اعلى معدلات وكانت المجموعة الثانية صاحبة اعلى معدل تلتها المجاميع الاخرى وكما موضح في الجدول (2).

**الجدول(1) نتائج اختبار الانتشار المناعي في هلامة الاكار لمصول مجاميع التجربة بعد التلقيح.**

| المستضد | التركيز | المجموعة | بعد التلقيح الاول | بعد التلقيح الثاني |
|---|---|---|---|---|
| **الجرثومة الكاملة C.F.U./طير** | **$10^{11}$** | **1** | **cd A 0.098±0.43** | **f B 0.085±1.26** |
| | **$10^{9}$** | **2** | **e A 0.104±0.76** | **g B 0.085±1.44** |
| | **$10^{7}$** | **3** | **d A 0.094±0.52** | **cd B 0.079±1.32** |
| **الجدار الخلوي µg/طير** | **750** | **4** | **d A 0.094±0.51** | **cd B 0.091±0.54** |
| | **500** | **5** | **c A 0.104±0.39** | **bcd B 0.135±0.8** |
| | **250** | **6** | **bc A 0.098±0.3** | **cd B 0.135±0.48** |
| **متعدد السكريد الشحمي µg/طير** | **750** | **7** | **c A 0.047±0.42** | **cd B 0.104±0.55** |
| | **500** | **8** | **bc A 0.069±0.27** | **bc B 0.085±0.36** |
| | **250** | **9** | **b A 0.063±0.18** | **b B 0.075±0.3** |
| **سيطرة** | **0** | **10** | **a A 0±0.0** | **a A 0±0.0** |

الارقام تمثل المعدل اللوغارتمي لمعيار الاضداد ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة – وجود فروق معنوية ($P<0.001$) بين التلقيحات عند اختلاف الحروف.

الحروف الصغيرة – وجود فروق معنوية ( $P<0.01$ ) بين المجاميع عند اختلاف الحروف.

**الجدول(2) نتائج اختبار التلازن الدموي المنفعل لمصول مجاميع التجربة بعد التلقيح**

| *المستضد* | التركيز | المجموعة | بعد التلقيح الاول | **بعد التلقيح الثاني** |
|---|---|---|---|---|
| الجرثومة الكاملة C.F.U./طير | $10^{11}$ | 1 | **f A 0.088±1.71** | **e B 0.101±2.22** |
| | $10^{9}$ | 2 | **f A 0.158±1.8** | **f B 0.101±3.72** |
| | $10^{7}$ | 3 | **f A 0.094±1.74** | **e B 0.079±2.85** |
| الجدار الخلوي µg/طير | 750 | 4 | **e A 0.091±1.74** | **cde B 0.063±2.61** |
| | 500 | 5 | **e A 0.107±1.41** | **e B 0.069±2.73** |
| | 250 | 6 | **bc A 0.063±1.08** | **cd B 0.063±2.58** |
| متعدد السكريد الشحمي µg/طير | 750 | 7 | **cde A 0.113±1.26** | **cd B 0.079±2.58** |
| | 500 | 8 | **bc A 0.088±1.11** | **c B 0.344±2.37** |
| | 250 | 9 | **b A 0.088±0.83** | **b B 0.117±2.01** |
| سيطرة | 0 | 10 | **a A 0±0.0** | **a A 0±0.0** |

الارقام تمثل المعدل اللوغارتمي لمعيار الاضداد ± الخطأ القياسي

الحروف الكبيرة – وجود فروق معنوية ($P<0.05$) بين التلقيحات عند اختلاف الحروف.

الحروف الصغيرة – وجود فروق معنوية ( $P<0.05$ ) بين المجاميع عند اختلاف الحروف.

**اختبار فرط الحساسية الاجل**

تشير المعدلات الى تفوق المجاميع الملقحة عن مجموعة السيطرة وبفرق معنوي ( $P<0.01$ ) كما وتشير الى تفوق المجاميع الثلاثة الاولى عن بقية المجاميع وكانت المجموعة الثانية صاحبة اعلى معدل في حين اظهرت المجاميع الاخرى معدلات اقل وكما موضح في الجدول (3).

**الجدول (3) معدل نتائج اختبار فرط الحساسية الاجل ( الدلايات ) لمجاميع التجربة بعمر 22 اسبوع.**

| *المستضد* | التركيز | المجموعة | الزيادة النسبية لسمك الدلايات (ملم) | |
|---|---|---|---|---|
| الجرثومة الكاملة .C.F.U/طير | $10^{11}$ | 1 | 0.063±1.78 | f |
| | $10^{9}$ | 2 | 0.069±2 | g |
| | $10^{7}$ | 3 | 0.069±1.74 | f |
| الجدار الخلوي µg/طير | 750 | 4 | 0.063±1.3 | e |
| | 500 | 5 | 0.088±1.43 | e |
| | 250 | 6 | 0.085±1.2 | cd |
| متعدد السكريد الشحمي µg/طير | 750 | 7 | 0.088±1.18 | c |
| | 500 | 8 | 0.044±0.9 | b |
| | 250 | 9 | 0.041±0.74 | b |
| سيطرة | 0 | 10 | 0.14±0.28 | a |

الارقام تمثل المعدل ± الخطأ القياسي

الحروف الصغيرة – وجود فروق معنوية ( $P<0.01$ ) بين المجاميع عند اختلاف الحروف.

اختبار التحدي

تم اجراء اختبار التحدي باعتماد جرعة $LD_{50}$ 100 بعد حساب الجرعة القاتلة لنصف عدد الطيور والتي كانت $57\times10^{9}$ وتم اعتماد جرعة $57\times 10^{11}$ كجرعة تحدي واعطيت حقناً بالوريد. وبدأت الهلاكات في اليوم الاول واستمرت الى اليوم الثالث ويوضح الجدول (4) عدد الطيور الناجية بعد التحدي لكل مجموعة اذ اظهرت المجاميع الثلاثة الاولى اعلى نسبة حماية وكانت المجموعة الثانية ذو اقل عدد من الهلاكات. تلت هذه المجاميع المجاميع الرابعة والخامسة والسادسة، واظهرت المجموعة الخامسة ومن بينهم اقل عدد من الهلاكات.

**الجدول (4) نتائج اختبار التحدي لمجاميع التجربة بعمر 23 اسبوع.**

| المستضد | التركيز | المجموعة | الدجاج الناجي / العدد الكلي | المجموع لكل لقاح |
|---|---|---|---|---|
| الجرثومة الكاملة C.F.U./طير | $10^{11}$ | 1 | 10/7 | 30/22 |
| | $10^{9}$ | 2 | 10/8 | |
| | $10^{7}$ | 3 | 10/7 | |
| الجدار الخلوي µg/طير | 750 | 4 | 10/5 | 30/16 |
| | 500 | 5 | 10/6 | |
| | 250 | 6 | 10/5 | |
| متعدد السكريد الشحمي µg/طير | 750 | 7 | 10/5 | 30/12 |
| | 500 | 8 | 10/4 | |
| | 250 | 9 | 10/3 | |
| سيطرة | 0 | 10 | 10/0 | 10/0 |

جرعة التحدي : $57 \times 10^{11}$ C.F.U. /طير.

## المناقشة

في عملية تحضير المستضدات اللقاحية والتلقيح ضم اللقاح اربع عزلات مختلفة لعدم وجود حماية تصالبية بين عتر الباستوريلا ملتوسيدا [11] كما و تم اختيار ثلاثة انواع من المستضدات لتوفير حماية اكثر وتم اختيار طيور التجربة من السلالات الثقيلة وهي امهات دجاج اللحم من نوع فاوبرو كون هذه السلالات اكثر استعداداً للخمج بكوليرا الدجاج من غيرها[12].

اعتمدت اختبارات الانتشار المناعي في هلامة الاكار والتلازن الدموي المنفعل والتي تقيس الاستجابة المناعية الخلطية بصورة اساسية واختبار فرط الحساسية الاجل في الدلايات او ما يسمى باختبار الدلايات والذي يقيس الاستجابة المناعية الخلوية بصورة اساسية، واعتمد اختبار التحدي والذي يعد المقياس الامثل للحماية المتكونة جراء استخدام اللقاح سواء كانت هذه الحماية ناتجة من استجابة مناعية خلطية او خلوية[13].

اشارت نتائج اختبارات الانتشار المناعي في هلامة الاكار والتلازن الدموي المنفعل الى كون معدل الاضداد في المجاميع الملقحة بمستضد الجرثومة الكاملة المكسرة اعلى منه في المجاميع الملقحة بالمستضدين الجدار الخلوي و متعدد السكريد الشحمي. وكان معدل الاضداد للمجاميع الملقحة بمستضد الجدار الخلوي اعلى منه في المجاميع الملقحة بمستضد متعدد السكريد الشحمي والحالة نفسها مع اختبار فرط الحساسية الاجل في الدلايات. وقد يعود سبب التفوق في حالة مستضد الجرثومة الكاملة المكسرة الى ان كمية البروتين في هذا المستضد اعلى من المستضدين الآخرين ويعد البروتين من اكفأ المركبات قدرة

على احداث تحفيز الاستجابة المناعية[14]. فضلاً عن احتواء هذا المستضد على عدد اكبر من المحددات الاستضدادية اذ يحتوي جميع المحددات الموجودة في المستضدين الاخيرين كون الاخيران اجزاء من تركيب الخلية الجرثومية فضلاً عن كون الوزن الجزيئي لمستضد الجرثومة الكاملة اعلى منه لبقية المستضدات التي هي اجزاء من الجرثومة. والوزن الجزيئي يتناسب طردياً مع التحفيز المناعي [15]. كما وان التكسير بالامواج فوق الصوتية ساهم باظهار بعض المستضدات الكامنة مما يجعل الاستجابة المناعية اكثر كفاءة متفقاً مع ما حصل عليه Avakian وجماعته ( 1985 )[16].

كذلك لوحظ ان الجرعة $10^9$ وحدة مولدة للمستعمرة / طير كانت صاحبة اعلى معدلات في كل الاختبارات المناعية وهذه الجرعة هي الجرعة الموصى بها حسب Rhoudes, 1992 [10]. اما المجاميع الملقحة بمستضد الجدار الخلوي وفرت استجابة مناعية اقل من مجاميع الجرثومة الكاملة واعلى من مجاميع متعدد السكريد الشحمي ويعود سبب تفوقه على المستضد الاخير الى احتوائه عدد اكبر من المحددات الاستضدادية واحتوائه كمية بروتين اكبر وان وزنه الجزيئي اعلى اذ ان متعدد السكريد الشحمي جزء من الجدار الخلوي والمتكون بصورة اساسية من متعدد السكريد الشحمي والبروتين[17] وللاسباب السابقة نفسها من عدد المحددات الاستضدادية وكمية البروتين والوزن الجزيئي كانت المجاميع الملقحة بمستضد متعدد السكريد الشحمي صاحبة ادنى استجابة مناعية اذ يكاد يكون البروتين معدوم في هذا المستضد والمتكون بصورة اساسية من الدهون Lipid ومتعدد السكريد Polysaccharide [18].

وتعد الدهون من المركبات ضعيفة الكفاءة في تحفيز الجهاز المناعي فبالتالي يعتمد التحفيز المناعي بهذا المستضد بصورة كاملة تقريباً على متعدد السكريد والذي مهما كانت كفاءته على تحفيز الجهاز المناعي فهي اقل من البروتين[19].

استخدم اختبار التحدي كحكم نهائي على الحماية المتوفرة من كل مستضد واظهرت نتائج هذا الاختبار أن مستضد الجرثومة الكاملة المكسر هو الاكفأ في توفير الحماية باعطائه اقل عدد من الهلاكات في المجاميع الملقحة بهذا المستضد تلاه مستضد الجدار الخلوي ثم متعدد السكريد الشحمي ونلاحظ ان نسب الحماية هذه تتناسب مع نتائج الاختبارات المناعية السابقة والتي تعطي مؤشراً على الاستجابة المناعية اذ ان زيادة الاستجابة المناعية جراء استخدام اللقاح توفر حماية اكبر ضد التحدي [20] كما ان المجموعة التي اخذت جرعة $10^9$ جرثومة كاملة مكسرة لكل طير كانت صاحبة اقل عدد من الهلاكات واعلى حماية. وهذه النتائج تشير الى افضلية مستضد الجرثومة الكاملة وان احسن جرعة منها كانت $10^9$ جرثومة كاملة مكسرة لكل طير.

## *References*


1. Rimler, R.B. and Glisson, J.R.(1997) .Fowl cholera .In: Disease of poultry 10th ed Edited by Calnek, B.W.; Barnes, H.J.; Beard, C.W.; Mcdougald, L.R. and Saif, Y.M. :143-160.
2. Pih, H.H. (1987). Proplems and solutions releated to vaccination of poultry in the developing countries. In: Avian Immunology: Basis and practice. 1st ed. Edited by Toivanen, A. and Toivanen, P. V.2:160-167.
3. Cullen, G.A. (1992). General information In: Manual of standards or diagnostic tests and vaccines. 2nd ed. Edited by Blancou, J. and Truszczynsk: 1-10.
4. Conard, R.C., Galanos, C. and Champlin, F. R. (1996). Biochemical characterization of Lipopolysaccharides extracted from a hydrophilic strain of Pasteurella multocido. Vet. Res. Comm. 20:195-204.
5. Holmes, B.(1998). Actinobacillus, Pasteurella and Eikenella in : Topley and Wilson's Microbiology 9th ed. Edited by collser, L., Balows, A. and Sussman, M.: 2. 1199-2-1203.
6. Aini,I (1993).Control of poultry disease in Malaysia. Animal industry in Malaysia:147-150.
7. Maslog, F.S.(1997). Fractionation of Pasteurella multocida group A for active mouse protection tests for swine plague and fowl cholera vaccine production. The Philippine .J.I. biotech 8(1): 21-29.
8. Srivastava, K.K.; Foster, J.W.; Dawe, D.L.; Brown,J. and Davis, R.B.(1970). Immunization of mice with components of Pasteurella multocida. Appl. Microb. 20(6).951-956.
9. Galanose. C.O.; Luderitze and Westohal, O. (1965). A new method for the extraction of rough lipopoly saccharride. Europ. J. Biochem. 9:245-249.
10. Rhoades, K.R.(1992). Fowl cholera In: Manual of Standards or diagnostic test and vaccine. 2nd ed Edited by Blancou .J. and Truszczynsk:593-600.
11. Gillespie, J.H. and Timoney, J.F. (1984). The genus of pasteurella In: Hagan and Bruner infections diseases of domestic animals: 105-111.
12. Nestor, K.E. Saif, Y.M.; Anderson, J.W.; Patterson, R.A. and Li, Z. (1999)a. Variation in resistance to Pasteurella multocida among turkey lines. Poult. Sci. 78:1377-1379.
13. خليفة ، خليفة احمد (1991). اسس علم المناعة . مطابع التعليم العالي / جامعة الموصل.
14. Tortora, G. J.; Fuke, B.R. and case C.L.(1992). Practical application of immunology In: Microbiology, an Introduction. 6th ed :486-505.
15. Borne, P.M. and comte, S. (2001). Factors affecting Vaccination. In : Vaccines and vaccination in poultry production. 1st ed. :80-98.
16. Avakian,A.P.; Dick, J.W.; Derieux, W.T. and Henry, C.W.(1985). Comparison of various antigens and their ability to detect protective

antibodies against *Pasteurella multocida* using enzyme-linked Immunosorbent assay. Av. Dis. .30(3):527-535.
17. Madelyn F. (1996). Bacterial attachment in aquatic environments: A diversity of surface and adhesion strategies In: Bacterial adhesion, molecular and ecological diversity. 1st ed. Edited by Madelyn F:79-84.
18. Ryan, J.A (1994). Endotoxins and cell culture. Costar Inc. Technical publication Tc-c1: 559.
19. Fahey and York, J.J. (1987). Cytotoxic activity of avian lymphoid tissues. In: Avian immunology: Basis and practice. 1st. ed. V.1: 179-190.
20. Borne, P.M. and comte, S. (2001). Laboratory analysis and their uses. In : Vaccines and vaccination in poultry production. 1st ed. :100-128.