Clinical and immunological study of vaccines prepared from *Staphylococcus aureus* against mastitis in awassi ewes

Summary

This study aims for studding the immune response through at preparing two vaccines (Live attenuated and killed vaccines) from *Staphylococcus aureus* (*S.aureus*) bacteria isolated from ewes infected with mastitis to protect udder against *S. aureus* mastitis.

The study included two parts:

The first part was carried out to determine the percentage of *Staphylococcus* mastitis in 100 lactating Awassi ewes located around Baghdad. A total of 194 milk samples were collected, samples were subjected to physical tests, California mastitis test (CMT) as well as Somatic cell count (SCC), bacteriological examination, and the isolates were tested to antimicrobial sensitivity test.

The percentage of infection with clinical and subclinical Staphylococcal mastitis was found to be 2.06% and 7.692% respectively. Antibacterial susceptibility showed that 17 isolates of *S.aureus* were highly sensitive to cefotaxime (100%), Erythromycine (100%),Ciprofloxacin (100%), Amikacin (94.1%), Ceftriaxone(88.2%), Oxacillin(88.2%), Cephalexin(76.4%), Kanamycine (52.9%), while less sensitive to others like, Pencillin G, Ampicillin ,Optochin, Amoxicillin, (17.6%),(23.5%),(29.4%),(35.2%) respectively.

The second part included preparation of live attenuated and killed vaccines from isolated *S.aureus*. Safety and sterility testes were done on vaccines preparation.

The safety test was done by using 5 groups of rabbits (5 animal in each group), The first and second groups were injected subcutaneously with two volume (0.5 ml and 0.2 ml) of live attenuated vaccine, the third and fourth groups were injected with killed vaccine in the same way and the fifth group served as

control group. Rabbits were monitored for one week to record morbidity and mortality rates.

In the immunization study, fifteen Awassi ewes were randomly divided into three equal groups.

Group-A:- Ewes were inoculated with one ml of a live attenuated vaccine (containing $1x10^{1o}$ CFU) S/C near supra mammary lymph node, twice at 2 weeks intervals. at first month of lactation.

Group-B:- Ewes were inoculated with killed vaccine twice , two weeks interval, at the same dose , route and time as previously described in group-A.

Group-C: - Served as control receiving one ml of PBS.

Clinical examination had been carried out in all animals pre and post vaccination. Moreover Blood samples were collected for (Phagocytic index, and Leukocyte inhibition factor (LIF) tests. Serum and milk serum was used for measuring antibody by Elisa test at 0, 14, 28, 42, 56 and 63 days. Delayed type hypersensivity -skin test was done after 21 days after the second vaccination. Furthermore Milk samples were examined bacteriologically and cytologically.

All animals were challenged after 6 weeks from the 2nd dose of vaccination with 100 CFU/ml of virulent *S. aureus* by intramammary rout. All ewes examined clinically post challenge and milk samples were collected at day 0,2,4,6,10,20 and 30 for bacteriological and cytological testing,

Animals show normal clinical signs pre vaccination. Nevertheless, moderate increase in body temperature, respiration, pulse rates in vaccinated groups, however the control group show normal systemic reaction pre and post vaccination.

The vaccines induced humoral immunity, group-A revealed higher significant ($P \leq 0.05$) antibody titers in serum (4.74±0.136) and milk whey (2.55 ±0.15) as compared with group-B which exhibited antibody titers in serum (3.68±0.153) and whey (1.74±0.062) attained at day 42 post- vaccination and thereafter, a

decline in titers was observed towards the termination of the study. While control group showed low titers and antibody.

A significant increase at (P≤0.05) of skin thickness after 48 hours in group A (5.18± 0.058 mm) more than in group B (4.1± 0.07 mm), results showed also a significant variation (P≤0.05) between vaccinated groups (A and B) and the control group.

Phagocytic indics were increased significantly (P≤0.05) in vaccinated groups the indics (40 ± 1.14) and (21.6 ± 1.2) in group (A and B) respectively as compared with the control (9.8 ± 0.86).

Lecuocytic inhibition factors (LIF) recorded a significant response reaction at (P≤0.05) in vaccinated groups as compared with control group which showed a very limited inhibition of leucocyte at the same antigen concentration. Higher response recorded in group A with low concentrated antigens 5×10^5 CFU / ml (0.406 ± 0.0144) and high concentrated antigens 5×10^{10} CFU/ml (0.192 ± 0.01) when compared with killed vaccine group (0.672 ± 0.007) and (0.502±0.007) in low and high concentrated antigens respectively. while control group showed large area of leucocyte migration.

After Intramammary challenge with virulent *S.aureus*, vaccinated groups (A and B) after 36-48 hours showed slight increase in body temperature, Respiratory, Pulse Rates, While control group showed high increase in body temperature, Respiratory & Pulse Rates. One ewes in group (A) and two in group (B) showed slight swelling & redness in the udder. but in group (C), 3 of 5 ewes exhibited local sign's in the udder like swelling, hotness, painful & milk appear watery and other 2 ewes showed hard consistency of the udder and non-productive in the end of experiment (after 30 days). Somatic cell count (SCC) were increased in control group in compared with vaccinated groups.

دراسة سريرية، مناعية للقاح المحضر من المكورات العنقودية الذهبية ضد التهاب الضرع في النعاج العواسي

الخلاصة

تهدف هذه الدراسة ألى تحضير نوعين من اللقاح (اللقاح الحي المضعف واللقاح المقتول) من جراثيم المكورات العنقودية الذهبية *Staphylococcus aureus* المعزوله من ضرع الاغنام المصابة بالتهاب الضرع لتحفيز المناعه في النعاج لوقايتها من مرض التهاب الضرع .

الجزء الاول صمم لمعرفة نسبة الاصابة بالتهاب الضرع المتسبب بالمكورات العنقوديه الذهبية في 100 نعجة حلوبة في مناطق حول بغداد . تم جمع 194 نموذج حليب، خضعت النماذج للاختبارات الفيزيائية والكيميائية (اختبار كالفورنيا لالتهاب الضرع (CMT) واختبار حساب الخلايا الجسمية (SCC) والفحوصات الجرثومية وفحصت العزلات لفحص الحساسية للمضادات الحياتية .

شكلت نسبة الاصابة بالتهاب الضرع السريري وتحت السريري للمكورات العنقودية الذهبية 2.06 % و7.692 % على التوالي. واظهرت النتائج ان 17 عزلة من المكورات العنقودية الذهبية حساسية للمضادات الحيوية التاليه :

Cefotaxime (100%) , Erythromycine (100%), Ciprofluxacin (100%) , (94.1%) , Amikacin (94.1%),Ceftriaxone (88.2%), Oxacillin (88.2%), Cephalexin (76.4%), kanamycine (52.9%), Pencillin G, Ampicillin, Optochin,, Amoxicillin (17.6%), (23.5%), (29.4%), (35.2%) ,

على التوالي.

شمل الجزء الثاني تحضير اللقاح الحي المضعف واللقاح المقتول من جراثيم المكورات العنقودية الذهبية، فحص اللقاحات عن السلامة والنقاوة . اجري فحص السلامة على 5 مجاميع من الارانب (5 في كل مجموعة) ،المجموعة الاولى والثانية حقنت تحت الجلد بتركيزين مختلفين (0.2 مل و 0.5 مل) من اللقاح الحي المضعف ،المجموعة الثالثة

والرابعة حقنت باللقاح المقتول بنفس الطريقة والمجموعة الخامسة عوملت كمجموعة سيطرة . تمت مراقبة الارانب لمدة اسبوع لتسجيل نسبة الاصابة ونسبة الهلاكات .

في الدراسة التمنيعية ، تم استخدام خمسة عشر من ا لنعاج العواسي قسمت عشوائياً الى ثلاث مجاميع متساوية:المجموعة (أ): حقنت ب(1 مل) من القاح الحي المضعف يحوي

على 10^{10}خلية حية/مل تحت الجلد قرب الغدد اللمفية فوق الضرع مرتين كل اسبوعين في الشهر الاول للحلب.

المجموعة (ب) : حقنت باللقاح المقتول بنفس جرعة ووقت وطريقة الاعطاء في المجموعة أ.

المجموعة (ج) : استخدمت كمجموعة سيطرة حقنت ب (1 مل) من محلول داریء الفوسفات الملحي.

فحصت النعاج سريريا (حرارة ونبض وتنفس وملاحظة الشهية والفحوصات الاخرى العامة)، جمعت عينات الدم لفحص البلعمة وفحص تثبيط هجرة الخلايا البيضاء ، واستخدم مصل الدم ومصل الحليب لغرض قياس مستوى الاجسام المضادة بواسطة فحص الأليزا في الايام 63,56,42,28,14,0. وعمل اختبار الحساسية الجلدي المتاخر بعد 21 يوم من التلقيح الثاني . وفحص عينات الحليب بكتريولوجيا وخلويا.

أعطيت جميع الحيوانات جرعة التحدي داخل الضرع بعد الاسبوع السادس من الجرعه الثانية للتلقيح ب 100 خلية / مل من جراثيم المكورات العنقودية الذهبية دا خل الضرع ، وفحصت النعاج بعد التحدي سريريا وجمعت عينات الحليب في 0, 2, 4, 6, 10, 20, 30يوم لاجراء الاختبارات البكتريولوجية ،الخلوية والسيرولوجية.

لم تظهر الحيوانات قبل التلقيح علامات سريرية . وبعد التمنيع لوحظ ارتفاع في درجة الحرارة والتنفس والنبض في الحيوانات الممنعة بينما لم يظهر اي تغير في هذه المعايير بالنسبة لحيوانات السيطرة . حفز اللقاح المناعة الخلطية حيث اظهرت المجموعة أ ارتفاعا ملحوظا في مستوى الاجسام المضادة في مصل الدم (4.74 ± 0.136) ومصل الحليب(0.15 ± 2.55) بالمقارنة مع المجموعة ب والتي كان فيها مستوى الاجسام المضادة

(3.68± 0.153) في مصل الدم ومصل الحليب على التوالي في اليوم 42 بعد التمنيع. بعد ذلك اظهرت هاتين المجموعتين انخفاضا في مستوى الاجسام المضادة حتى نهاية التجربة.

اظهر فحص الحساسية الجلدي المتاخر زيادة معنوية بمستوى ($P\leq0.05$) بعد 48 ساعة في المجموعة أ (5.18± 0.058) اكثر من المجموعة ب (4.1± 0.07) كذالك اضهرت النتائج وجود فروقات معنوية ($P\leq0.05$) بين المجاميع الملقحة (أ وب) وبين مجموعة السيطرة .

أعطى قياس البلعمات زيادة معنوية ($P \leq 0.05$) في المجاميع الملقحة .حيث كان (40 ± 1.14) و(21.6 ± 1.2) في المجاميع أ و ب على التوالي بالمقارنة مع مجموعة السيطرة والتي كانت (9.8 ± 0.86).وقد سجل اختبار تثبيط هجرة الخلايا البيضاء (LIF) استجابة ملحوضة ($P\leq0.05$) في المجاميع الملقحة بالمقارنة مع مجاميع السيطرة والتي اظهرت تثبيطا محدودا جدا لهجرة الخلايا البيضاء لنفس تركيز الانتجين . وسجلت المجموعة أ استجابة عالية عند استخدام التركيزالواطئ 5×10^5 خلية \مل (0.406 ± 0.0144) وعند استخدام التركيز (5×10^{10}) كانت (0.192 ± 0.01) بالمقارنة مع استخدام اللقاح المقتول حبث كانت (0.672 ± 0.007) و (0.502±0.007) عند استخدام تركيز الانتجين العالي والواطى على التوالي ، بينما اعطت مجموعة السيطرة هجرة اوسع للخلايا البيضاء.

بعد اعطاء جرعة التحدي داخل الضرع باستخدام العترة الضارية للمكورات العنقودية الذهبية اظهرت المجاميع الملقحة (أ وب) ارتفاع بسيط في درجة الحرارة والتنفس والنبض بينما مجموعة السيطرة اظهرت ارتفاع ملحوضا في درجة الحرارة والتنفس والنبض ، واحدة من الاغنام في المجموعة أ او اثنان في المجموعة ب اظهرتا تورما طفيفأ واحمرارأ في الضرع . بينما اعطت ثلاثة من خمسة نعاج في مجموعة السيطرة علاما ت في الضرع مثلا التضخم والاحمرار والالم والحرارة ، وظهر الحليب مائي القوام واثنين من هذه النعاج كان ضرعها ذو قوام صلب وغير منتج في نهاية التجربة (بعد 30 يوم). وازدادت الخلايا الجسمية في مجموعة السيطرة مقارنة بالمجموعتين الملقحتين.