

## تقييم كفاءة عديد السكريات المحفظي المستخلص من بكتريا *Proteus vulgaris* في تحفيز الجهاز المناعي وكمضاد مايكروبي

د.ميادة فرحان درويش  
د.نوفل حسين الدجيلي  
م. نبراس يحيى  
كلية العلوم-جامعة الكوفة  
كلية العلوم-جامعة الكوفة

Email : Miadaa-75@yahoo.com

### الخلاصة:

تضمن البحث الحالي محورين ، المحور الاول دراسة التأثير المحتمل لبكتريا *P. vulgaris* على نمو بعض انواع البكتريا المرضية *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonase aeruginosa* ، وتضمن المحور الثاني تقييم كفاءة مستضد عديد السكريات المحفظي CPS المحضر من البكتريا في رفع الاستجابة المناعية في الفئران المخبرية المحقونة بالمستضد . حضر مستضد عديد السكريات المحفظي من بكتريا *P. vulgaris* ، ثم حضرت سلسلة من التراكيز المخففة لكل من العالق البكتيري والمستضد بالاعتماد على قيمة الجرعة القاتلة النصفية لكل منهما والتي كانت  $1 \times 10^5$  cfu/ml للعالق البكتيري و  $1 \times 10^8$  cfu/ml للمستضد عديد السكريات المحفظي ، ثم حققت بمقدار 0.1 مللتر داخل غشاء البريتون للفئران . قيمت بعض جوانب الاستجابة المناعية باستخدام الفحوص الاتية : ( معامل البلعمة ، تفاعل آرثس ، فرط الحساسية الأجل و معدل الخلايا المكونة للويحات ومعامل التشكل الزهري الثاني ) بأستخدام قيمة LD50 للعالق البكتيري و قيمة LD50 0.1 , LD50 للمستضد ( لتقييم التركيز الاكفا في تحفيز الاستجابة المناعية ) في ثلاث حيوانات لكل اختبار بالإضافة الى مجموعة سيطرة والتي حققت بالمحلول الملحي المتعادل .

اثبتت نتائج الدراسة الحالية ان البكتريا تملك تأثير مثبت لنمو بكتريا الدراسة وكانت مناطق التثبيط 28 mm for *S.aureus* and 23 mm for *P.aeruginosa* ، كما اظهرت النتائج ان مستضد عديد السكريات المحفظي كان معززا لفعالية الجهاز المناعي وكان التركيز  $1 \times 10^7$  cfu/ml هو الاكفاء حيث اعطى اعلى معدل لمعامل البلعمة ، معامل التشكل الزهري الثاني ، و فرط الحساسية الأجل اما بالنسبة للمناعة النوعية والتي قيست من خلال معدل الخلايا المكونة للويحات و تفاعل آرثس فقد كانت الزيادة عالية المعنوية لنفس التركيز . نستنتج ان بكتريا *P.vulgaris* لها تأثير كمضاد مايكروبي وكمحفز مناعي.

### المقدمة

تعد بكتريا *Proteus* احدى اجناس العائلة المعوية Enterobacteriaceae ويضم هذا الجنس مجموعة من الأنواع اهمها *P.mirabilis* و *P.vulgaris* وأن 90% من الأصابات الناتجة عن جنس *Proteus* تعود النوع الأول *P.mirabilis* (Sarlowsky et al.,2003). يتواجد النوع البكتيري قيد الدراسة (*P.vulgaris*) بصورة طبيعية في التربة والماء الملوث واللحم النيء وقنوات الجهاز الهضمي والنفايات على السطوح الغير حية وخصوصا في المستشفيات لذا يعد من المسببات الرئيسية للأصابات المكتسبة من المستشفيات (Ruden et al , 1997) .

تمتلك البكتريا عدد من العوامل المرضية كالأهداب والتي تمكن البكتريا من الألتصاق بالموقع الخاص بها , كذلك فأن وجود الأسواط المحيطية الشعرية Peritrichous flagella يجعل البكتريا متحركة بشكل فعال , كما تعد بروتينات الغشاء الخارجي (Outer membrane protein OMP) عوامل الضراوة المهمة التي لها دور في التصاق هذه البكتريا بالخلايا الطلائية المبطنة لنسيج المضيف (Riestchel et al,1982) . ان معظم الأصابات الناتجة عن هذا الجنس هي التهاب المجاري البولية UTI والتهاب الحروق وأن كانت معظم الأصابات المتسببة عن هذا الجنس تعود الى النوع *P.mirabilis* , وتعتبر بكتريا *P.vulgaris* من الممرضات الانتهازية وترتبط بحالات تجرثم الدم وذات الرئة وتعد سبب شائع لالتهاب الجيوب واصابات الجهاز التنفسي, كذلك يتميز هذا النوع البكتيري بأنتاجه انزيم اليوريز Urease والذي يشطر اليوريا الى ثاني أوكسيد الكاربون وأمونيا وربما يسبب تكون حصوة الكلية renal stones , وتنتج بكتريا *P.vulgaris* انزيم hemolysin وكذلك انزيم L-asparaginases والذي اظهر بان له تاثير مضاد للاورام (Baron,1996; Coker et al .,2000), كما تنتج هذه البكتريا انزيم chondroitinases II والذي يؤثر على الغضاريف مثل الغضاريف الموجودة في اقرص الحبل الشوكي كما يؤثر هذا الانزيم على الجسم الزجاجي للعين كما يعمل على حل سلاسل متعدد السكريات الجانبيه في البروتينات السكرية دون ان يؤثر على البروتين (Sato,1994).

تمتلك هذه البكتريا O-Polysaccharides المماثل لما موجود في البكتريا المرضية *Rickettsie Prowazekii* ويعمل هذا التركيب ( O-Polysaccharides ) كأنتجين يحفز الجهاز المناعي على انتاج الأضداد في الإنسان , وهكذا فأن الأصابة ببكتريا *P.vulgaris* والتي هي في اغلب الحالات غير ممرضة يسبب نفس الاستجابة المناعية عند الأصابة ببكتريا *Rickettsia* والتي تعد بكتريا ذات امراضية عالية (Sarlowsky et al.,2003). كما ان لعديد السكريات الشحمي (LPS) لهذه البكتريا تأثير كبير في الجهاز المناعي, اذ انه يرتبط على سطوح الخلايا التائية والبائية من خلال 80 KD Protein الموجود على سطح هذه الخلايا حيث يعمل LPS كبدائى لتمايز خلايا B-cells الى خلايا فارزة للأضداد وان تحفيز الخلايا البائية دون التائية ربما يعود الى وجود مستقبلات خاصة للـ LPS تساعده في التداخل مع اغشيتها الخلية (Chiller.,1993) ، فضلا عن دوره في تنشيط المتمم بكلا المسلكين التقليدي والبديل ( Kaca et al .,2000) .

## طرائق العمل \* جمع العينات

تم الحصول على العينات من مختبر الصحة المركزي والتي تمثلت بمسحات مأخوذة من السطوح الغير حية لمكانات مختلفة من مستشفى الصدر ومستشفى الحكيم في النجف الاشرف وتم اجراء الاختبارات الكيموحيوية الخاصة بالعيانة البكتيرية لتشخيص النوع البكتيري والذي تضمن مجموعة اختبارات منها انتاج انزيم ureas وظاهرة النمو الزاحف swarming growth وانتاج حلقة الأندول والذي يعتبر اختبارا مهما في تحديد النوع البكتيري اذ ان *P. vulgaris* فقط تعطي نتيجة موجبة لهذا الاختبار وكذلك اختبار انتاج السترات وغيرها من الاختبارات الأخرى.

## \* دراسة الفعالية التضادية للبكتريا

بعد اجراء الاختبارات التشخيصية للتأكد من نوع البكتيريا تمت تنمية البكتريا على وسط (BHI) brain heart infusion لمدة 48 ساعة بعدها اخذ العالق البكتيري ووزع في انابيب الطرد المركزي وطرده مركزيا بسرعة 3000 دورة /الدقيقة لمدة عشرة دقائق ثم اخذ الجزء الرائق ورشح باستخدام مرشحات (0.45) mele pore في ظروف معقمة ثم اخذ الراشح واختبرت فعاليته التضادية بطريقة الانتشار بالأكار بواسطة الحفر (Egrove , 1985) اذ نشر 0.1 من العالق البكتيري بتركيز  $1 \times 10^6$  cfu/ ml ( لكل نوع من انواع البكتريا قيد الدراسة) على وسط Muller-hinton ثم عمل 3 حفر باقطار متساوية على الوسط الصلب وبقطر 6 ملم بواسطة الثاقب الفليني (Corkborer) وتمثل هذه الحفر الثلاثة كمكررات لكل تجربة وأضيف 0.1 مل من راشح البكتريا المحضر مسبقا لكل حفرة ومن ثم تركت الأطباق لمدة 4-5 ساعات لانتشار الراشح في الوسط الزراعي ثم حضنت بدرجة 37 م لمدة 24 ساعة قرأت النتائج بقياس منطقة التثبيط Inhibiton zone بواسطة المسطرة المدرجة .

**تحضير المستضد :** نمت البكتريا على وسط brain heart infu لمدة 24 ساعة بعدها اخذ العالق البكتيري ووزع في انابيب الطرد المركزي وطرده مركزيا بسرعة 6000 دورة /الدقيقة لمدة عشرة دقائق وغسلت مرتين بالمحلول الملحي المتعادل ثم اعيد ترسيبها بتركيز  $1 \times 10^9$  cfu/ ml . حضر مستضد عديد السكريات المحفظي باستخدام طريقة (Wary et al.,1986) ونقي باتباع طريقة ( Garvey et al.,1977) وتم تقدير تركيز الكربوهيدرات حسب طريقة ( Bishop et al.,1985) . تم تحديد مقدار الجرعة القاتلة النصفية ( $LD_{50}$  %) للعالق البكتيري وللمستضد حسب طريقة (Wary et al.,1986) .

**تصميم التجربة :** من المعروف ان سبب الامراض المختلفة له علاقة وثيقة بالحالة المناعية للمصاب فعند حدوث خلل في احدى آليات النظام المناعي او دفاعات الجسم فأن ذلك يؤدي بشكل حتمي الى احداث الخمج وخاصة المتسبب عن الممرضات الانتهازية بالاضافة الى ظهور المقاومة لمضادات الحياة ، لذلك فقد اتجهت العديد من الدراسات لتطوير لقاحات ضد البكتريا ومنها *P. vulgaris* المسببة للعديد من الامراض، لذا صممت التجربة لتقييم الكفاءة المناعية (في الزجاج) لمستضد عديد السكريات المحفظي المعزول من بكتريا *P. vulgaris* في الفئران المختبرية ، وكذلك قدرة المستضد في تحوير الاستجابة المناعية وتم ذلك من خلال اجراء عدد من الاختبارات المناعية والتي شملت :

- 1- معامل البلعمية : تم قياس الفعالية البلعمية على الخلايا البلعمية المستخلصة من السائل البريتوني للفئران المختبرية ، حسب طريقة (Metcalf., 1986) .

- 2- تفاعل أرثس : بعد اتمام البرنامج التمنيبي . حقن باطن القدم اليسرى داخل الجلد بـ 0.05 ml من 10 % كريات الدم الحمراء للخروف ، بينما يحقن باطن القدم اليمين بـ 0.05ml من المحلول الملحي المتعادل . بعد 4 ساعات تم قياس سمك كلا القدمين باستخدام القدمة ويمثل الفارق معدل تفاعل أرثس. حسب طريقة (Triolo et al., 1989) .

- 3- فرط الحساسية الأجل : معدل فرط الحساسية الأجل نفذ كما في تفاعل أرثس ولكن بعد 24 ساعة من التمنيبي (Triolo et al., 1989) .

- 4- الخلايا المكونة للويحات : تم قياس معدل الخلايا المكونة للويحات باستخدام الخلايا للمفاوية المعزولة من طحال الفئران بعد اكمال برنامج التمنيبي لفرط الحساسية وتفاعل أرثس ، حسب طريقة (Myers., 1995) .
- 5- معدل التشكل الزهري الثاني : اتبعت طريقة (Makenzie,1998) في قياس الخلايا للمفاوية المكونة للتشكل الزهري

التحليل الاحصائي : تم التحليل الاحصائي باستخدام اختبار (T-test) وتعتبر  $P \leq 0.05$  فرق عالي المعنوية ، وقد جمعت البيانات ( المعدل  $\pm$  الانحراف المعياري ) لكل المجموع التجريبية ولثلاث مكررات لكل مجموعة ( الراوي وجماعته ، 1986) .

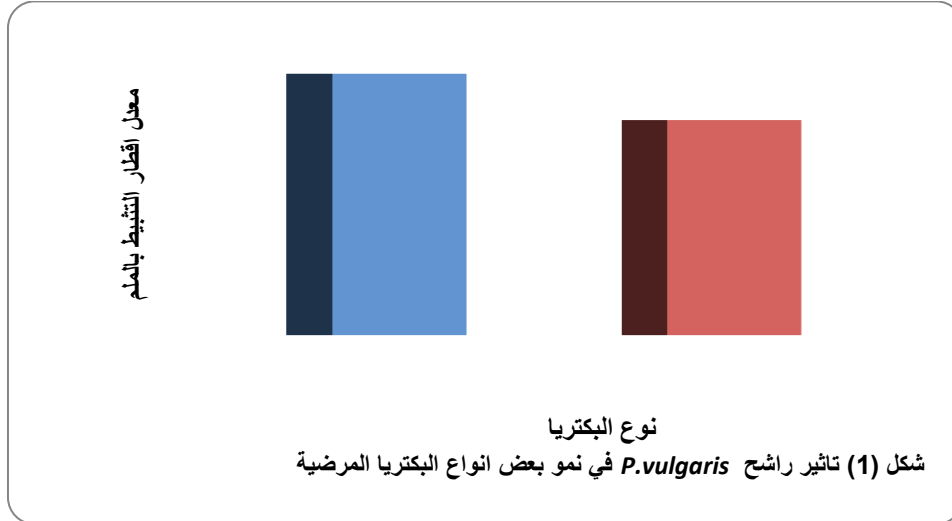
النتائج والمناقشة

اظهرت الاختبارات المظهرية الكيموحيوية خصائص تنطبق على خصائص وصفات بكتريا *P. vulgaris* جدول رقم (1) (MacFadin.,2000) .

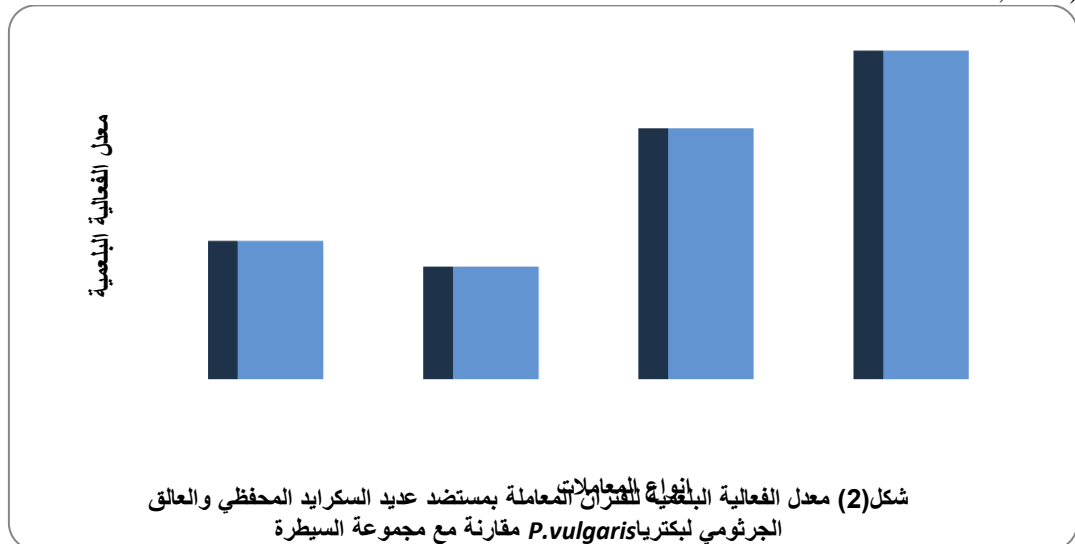
جدول (1) الاختبارات الكيموحيوية لبكتريا *P. vulgaris* .

Characteristic	<i>P. vulgaris</i>
Gram stain	-
Urease	+
Indole	+
Citrate	-
MR	+
VP	-
Swarming growth	+

(-) negative reaction; (+) positive reaction

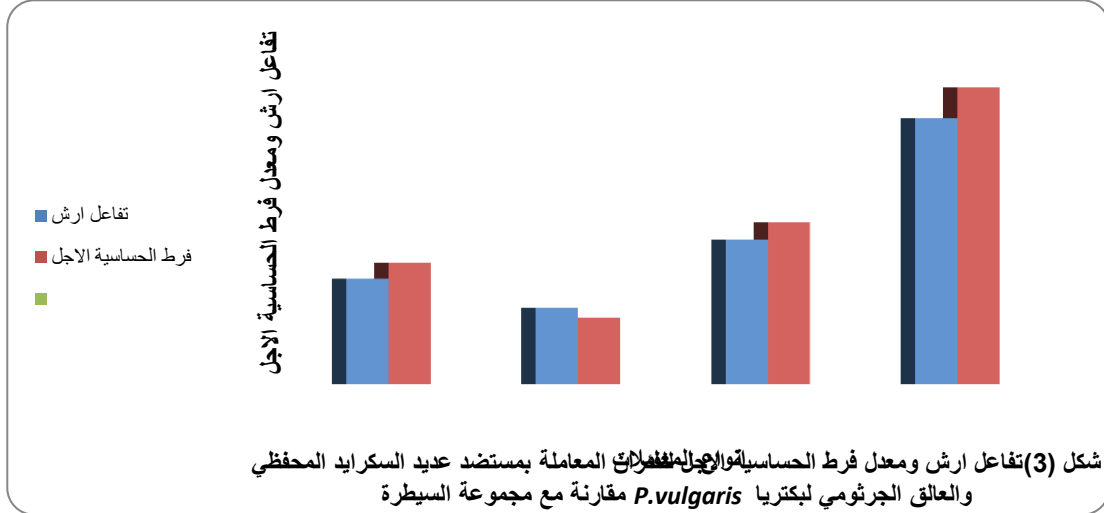


كما أظهرت نتائج دراسة الفعالية التضادية ان راسح بكتريا *P. vulgaris* أعطى فعالية تضادية ضد بكتريا المرضية المختبرة وكانت بكتريا *S. aureus* اكثر تحسسا للراسح اذ بلغ معدل التثبيط 28mm في حين ان بكتريا *Pse. aeruginosa* كانت اقل تحسس معدل قطر التثبيط 23mm كما موضح في شكل رقم (1) وقد تعزى الفعالية التضادية لبكتريا *P. vulgaris* الى انتاج انزيم lipases والذي يعمل على تحطيم الدهون الموجودة في الجدار الخلوي كذلك انتاج انزيم proteases والذي يعمل على تحطيم ومسح البروتينات الموجودة في الخلية البكتيرية ; (O'Hara et al.,2000 ; Mills and Jean ,2002)

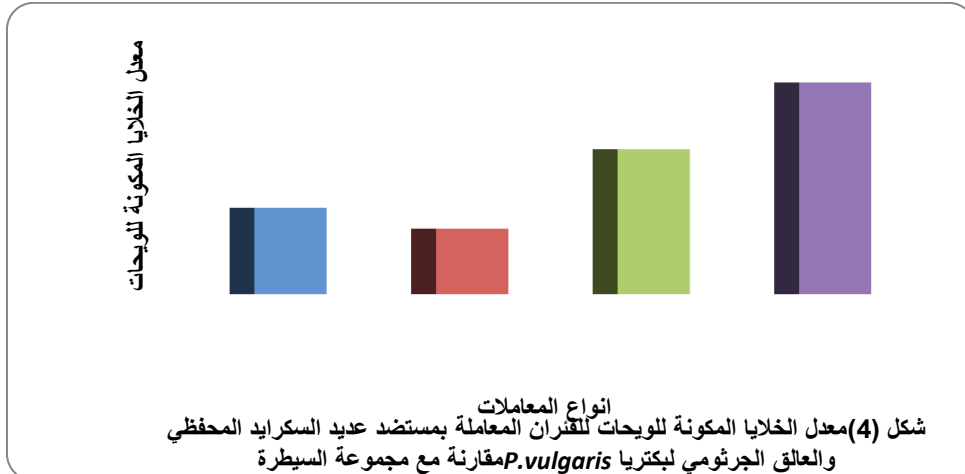


اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (2) الى ارتفاع معدل الفعالية البلعمية لمجموعة الفئران المحقونة بتركيز  $1 \times 10^8$  cfu/ml من المستند وكانت الزيادة عالية المعنوية للمجموعة المحقونة  $1 \times 10^7$  cfu/ml من المستند في حين ادى حقن الفئران بالعالق الجرثومي الى حصول انخفاض معنوي للفعالية البلعمية . ان لعديد السكرايد المحفظي تأثير كبير في الخلايا البلعمية الكبيرة اذ انه يرتبط مع بروتينات الدم ويكون معقد يحفز CD 14 receptor الموجود على سطحها مما

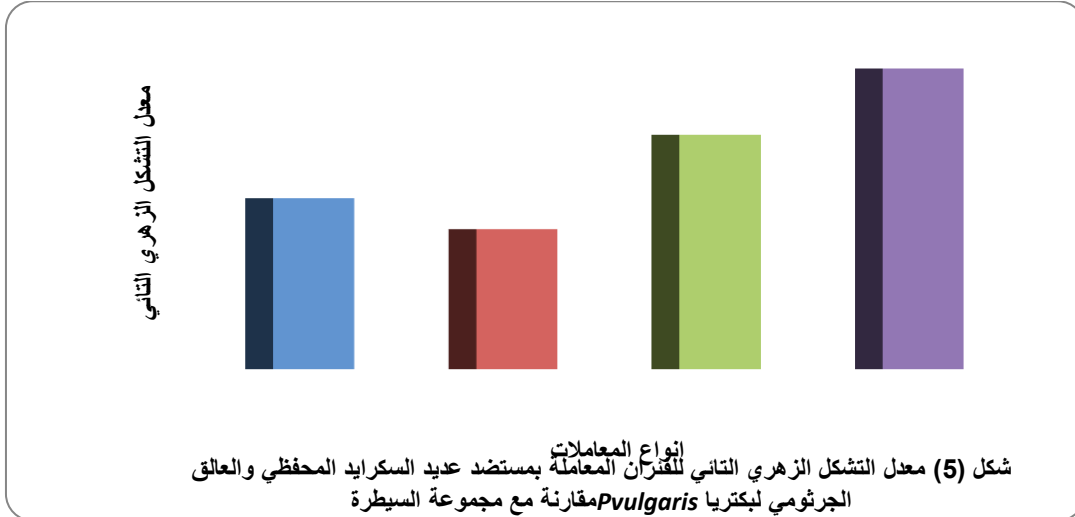
يحفزها على إنتاج عامل تحفيز اللويحات PAF والسايٲوكينات مثل IL-8, IL-6, IL-1 والتي يلعب دور في عملية البلعمة كما يحفزها على إنتاج اوكسيد النترك الذي يعد ساما للكائنات المجهرية (Swierzko *et al.*,2000). كما بينت النتائج انخفاض معامل البلعمة في المجموعة المحقونة بالعالق الجرثومي ويعود سبب انخفاض قدرة الخلايا البلعية على التهام الجراثيم لزيادة تراكيز المواد السامة والانزيمات الحالة التي تنتج من الخلية نفسها والتي تكون سامة لتلك الخلايا (Lock *et al.*,1990).



تشير النتائج الموضحة في الشكل (3) الى ارتفاع كلا من تفاعل ارش ومعدل فرط الحساسية الأجل لمجاميع الفئران المحقونة بالمستضد وكانت الزيادة عالية المعنوية للمجموعة المحقونة بتركيز  $1 \times 10^7$  cfu/ml كما بينت النتائج انخفاض كلا من تفاعل ارش ومعدل فرط الحساسية الأجل لمجموعة الفئران المحقونة بالعالق الجرثومي مقارنة مع مجموعة السيطرة. تشير النتائج الى ارتفاع تفاعل الحساسية الأجل وجاء ذلك متوافقا مع نتائج تفاعل ارش وان تفسير ذلك ربما يعود الى التأثيرات المحفزة للمستضد على الخلايا المنتجة للكلوبيولينات المناعية وعلى خلايا البلعم الكبير، مما ادى الى زيادة المعقدات المناعية وتحفيز نضام المتمم، مع زيادة في هجرة خلايا البلاعم الكبيرة الى موقع التفاعل مما يؤدي الى تجمع هذه الخلايا وبالتالي رفع معدل فرط الحساسية الأجل، وهذا يتفق مع (Loomes *et al.*, 1994) الذي وجد ان مستضد عديد السكريات المحفظي ادى الى زيادة إنتاج الكلوبولينات المناعية ولاسيما IgG وبالتالي زيادة في تفاعل ارش ومعدل فرط الحساسية الأجل.



اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (4) الى ارتفاع معدل الخلايا المكونة للويحات لمجموعة الفئران المحقونة بتركيز  $1 \times 10^8$  cfu/ml من المستضد وكانت الزيادة عالية المعنوية للمجموعة المحقونة بتركيز  $1 \times 10^7$  cfu/ml من المستضد في حين ادى حقن الفئران بالعالق الجرثومي الى حصول انخفاض معنوي فعالية الخلايا المكونة للويحات. اظهرت الدراسة الحالية من خلال قياس النسبة المئوية للخلايا المكونة للويحات بأن المستضد كان له تأثير في المناعة الخلطية من خلال تأثيره على الخلايا اللمفية في الطحال المنتجة للضد النوعي الخاص بخلايا الدم الحمر للخروف حيث ادى المستضد الى زيادة الكلوبولينات المناعية وهذا يؤكد تأثر الوظيفة المناعية للطحال.



ان للخلايا للمفاوية التائية القدرة على الارتباط بكريات الدم الحمراء للخروف (SRBCs) نتيجة امتلاكها واسما سطحيا ( $CD_2$ ) لهذه الكريات ، لذا يمكن تميز هذه الخلايا من خلال قدرتها على الارتباط المباشر مع (SRBCs) عن طريق هذا الواسم ، فالخلية التي ترتبط بثلاث كريات دم حمراء فاكثرت تعتبر خلية لمفاوية تائية مكونة للتشكل الزهري (Roitte .,1988) لذا ربما كان مستضد تأثير في فعالية واسمات الخلايا التائية وقدرتها على الارتباط بـ SRBCs من جانب اوسبب قلة في ظهورها على السطح من جانب اخر ، ويعد فحص التشكل الزهري التائي احد الطرق البايولوجية التي تعكس قابلية الخلايا للمفاوية للارتباط بالمستضدات ( Birnbaum.,1955 )

المصادر:

المحمد ، نعيم ثاني . الراوي ، خاشع محمود يونس. المراني ، وليد خضير (1986) : مبادئ الاحصاء . دار الكتب للطباعة النشر . جامعة الموصل .

**Baron,s.**(1996) : Medical microbiology . 4<sup>th</sup> Edition . University Texas Medical Branch .

**Bishop,M.C.**; Dben-VonLaufer, J.L.;Fody,E.P. and Thirty three contributors .(1985) : Clinical chemistry principles , procedures and Correlations . The Mirray printing company . Philadelia ,pp:181-182.

**Chiller,J**.;Skidmor,B.;Morrison,D. and Weigle,W.(1993) : Relationship of the structure of bacterial lipopolysaccharide of its function in mitogenesis and adjuvanticity . Proc. Nat. Acad. Sci. USA.70(2): 2129-33 .

**Coker,C.**;;Poore,C.A.;Lin,X. and Mobley,L.T.(2000): Pathogenesis of *Proteus* urinary tract infection . Microbes Infect.2:1497-1505.

**Egorove,N.S.**(1985).Antibiotic Scientific Approach.Mirpublishers.Mosco

**Garvey,J.S.** ; Cremer,N.E. and Sussdoref,D.H.(1977) : Methods in Immunology.3<sup>th</sup> ed. W.A. Benjamin , Inc.Massachusetts . 518:356-359 .

**Kaca,W.** ; Swierzko,A.; Ziolkowski,A.; Amona,K.;Senchenkova,S.(1998): Seroloical studies of an acid-labile O-polysaccharide Of *Proteus vulgaris* O19 lipopolysacchrde using human and rabbit antibodies . Microbial . immunal.;42 :669-675.

**Karlwsky, J.A.** ; Jones,M.E.; Thornsberry, C.;Friedland,I.R. and Saham,D.F.(2003) : Trend in antimicrobial susceptibilities among Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in united states from 1980-2001. Antimicrobial agents and chemotherapy. 47(5) : 1672-80 .

**Lock ,R.** ; Dahlgren ,C. ;Linden , M. ; Stendahl , O.; Svensbergh , A.(1990) : Neutrophil killing two type 1bfimbrio-bearing E.coli strain : dependence on respiratory burest activation . Infec.and Imm. 58 : 37-42 .

**Loomes L.M.**; Kerr,M. and Senior , B.(1994) : The cleavage of immunoglobuline G in vitro an in vivo by capsuler polysaccharied of *Proteus vulgaris* : urinary tract pathogen . J.Med. Microbiol., 39 :225-32.

**MacFaddin , J.F.**(2000) : Biochemical test for identification of medical bacteria tested ; the Williams and Wilkins , U.S.A. baltimor .



- Mackenzie** , (1998) : Rosetting Techniques . In , P.J.Delves and I.M.Ristt, Encyclopedia of Immunology . Academic press . London
- Metcalf, J.A.**; Gallin, M.D.; Nauseef, M.D. and Root, R.K. (1986). Laboratory Manual of Neutrophil Function . Raven Press New York, U.S.A
- Mills ,G.L.** and Jean, M.W.(2002).The isolation and properties of protease from *Proteus vulgaris* .Courtauld Institute ,Middlesex Hospital Medical school ,London Great Britain.
- Myers,R. L.** (Editor) (1995). Immunology, a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> Editor. Wm. C. Brown Communications, Inc. U.S.A. Pp. 109-112.
- O'Hara,C.M.**;Brenner,F.W. and Miller, J.M.(2000): Classification , Identification ,and Clinical significance of *Proteus* ,*Providencia* and *Morganella* .Clin .Microbiol .Rev.(3:534-546).
- Riestchel,E.T.**; Galanos,C.; Luderitz,V. and Westphal,O .(1982) :Chemistry and biology of lipopolysaccharide and their lipids Acomponent. In.Immunopharmacology of leukocyte function .New York pp:183-229.
- Roitt, I.** ; Brostoff, J.and Male,D.(1998) : Immunology .5<sup>th</sup> edition, Mosby Ltd ., UK. PP : 288-343 .
- Rozalski, A.** (2010 ) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli *Microbiol Mol Biol Rev* 61:65-89
- Rüden ,H.**; Gastmeier, P.; Daschner, F.D.and Schumacher, M. (1997): Nosocomial and community-acquired infections in Germany. Summary of the results of the first national prevalence study (NIDEP) *Infection* .25:199–202 .
- Swierzko,A.** ;Kirikae,T.; Kirikae, F.; Hirata,M.; Cedzynski, M. ; Ziolkowski,A.and Nakano,M.(2000) : Biological activity of lipopolysaccharides of *Proteus* spp . and their interaction with polymyxin B and an 18-KD cationic antimicrobial protein ( CAP-18) derived peptide.*J.Med.Microbiol.*49:127-138 .
- Tetsuya, T.**; Ryujiro, S.; Kozo, Y.; Masatoshi, N. ; Katsuko, A. and Ichiro, C. (1971) [Journal List Appl Microbiol. v.22\(3\);](#)
- Triolo, A.J.** ; Osteholm, L. and Kratky, M.T. (1989): Enhancement of the Arthus and suppression of delayed type hypersensitivity (DTH) by bluronic f 68. A detergent frequently used to prepare perf carbon emulsion. *International Journal of Immunopharmacology* ,11:41-48.
- Wary ,S.K.**; Hull,S.L.; Cook,R.G.;Barish,J.and Hull,R.(1986) : Identification and characterization of auroepithelial cell adhesion from auropathogenic isolate of *proteus vulgaris*.*Inf.Immun.* 54(1):43-49.

## Summary

The current study including two parts : The first was determination antimicrobial effect of *Proteus vulgaris* on two type of pathogenic bacteria such as *S.aureus* and *P. aeruginosa* , the second was evaluate the effect of capsular polysaccharide antigen which extract from *Proteus vulgaris* to stimulate immune response in mice . CPS antigen from *P. vulgaris* was prepared, then series concentration of wild type of bathogenic bacteria and from CPS antigen were prepared depending on LD50 value which was;  $1 \times 10^5$  cfu /ml of wilde type and  $1 \times 10^8$  cfu/ ml of CPS antigens ,these concentration injected in 0.1 ml intraperetonal in mice . Immune response in mice evaluated by using the following assay: ( phagocytosis , Arthus reaction , delayed hypersensitivity , T-rossate formation and plaque forming cells ) by use two concentration LD50 and 0.1 LD50 which was(  $1 \times 10^8$  ,  $1 \times 10^7$  ) cfu/ ml in 0.1 ml from CPS antigens« to evaluate the best concentration in stimulate immune response» and bacterial



suspension in 3 mice to each test in addition to control group injected by normal saline . The results of this study confirmed that , the *P. vulgaris* was effective in inhibiting the growth of investigated bacteria , with inhibition zone 28 mm for *S.aureus* and 23 mm for *P.aeruginosa* , also the result show that the CPS antigen in  $1 \times 10^7$  cfu/ ml concentration after 14 days from injection is the best efficient and gave highest mean in phagocytosis , delayed hypersensitivity , T-rossate formation and, specific immunity in term of plaque forming cells and arthus reaction was significantly increase in  $1 \times 10^7$  cfu/ ml .It is concluded that efficient immune response can be obtained by CPS from *P. vulgaris* .