

## Passive protection of mice against the lethal challenge of *Citrobacter freundii*

### الوقاية المنفصلة للفئران ضد التحدي القاتل من جرثومة *Citrobacter freundii*

أ.م.د. ذكري عدنان جواد  
جامعة كربلاء / كلية العلوم

#### الخلاصة

تم استخلاص عديد السكريد الشحمي من جرثومة *C. freundii* بطريقة الفينول الساخن وتنقيته جزئياً بالترشيح الهلامي وحقنت الارانب به للحصول على المصل الممنعة وقدرت الاضداد النوعية له في تلك المصل و كانت بعبارة 1:1280 باستخدام تقنية التلازن المباشر وعبارة 1:640 عند استخدام تقنية التلازن الدموي المنفصل واستخدم المصل الممنع في وقاية الفئران ضد الجرعة القاتلة LD<sub>100</sub> من جرثومة *C. freundii* و اظهرت النتائج ان المصل الممنع غير المخفف (Neat) والتخفيف 3:1 يقي الفئران من الجرعة المهلكة LD<sub>100</sub> للعالق الجرثومي ولا يقيها عند تخفيفه إلى 10:1 و 30:1 و 100:1. وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة والموجبة.

#### Summary:

Rabbits were injected with lipopolysaccharide obtained from *Citrobacter freundii* by hot phenol extraction and partially purified by gel filtration technique, sera were collected and specific antibody titer was estimated. It was about 1:1280 and 1:640 by using direct agglutination and passive haemagglutination methods respectively. The immune sera were used in order to protect mice against LD<sub>100</sub> of *C. freundii*, it was seen that the neat and 1:3 dilution of the serum were protective where as other dilutions 1:10, 1:30 and 1:100 did not protect the experimental animals.

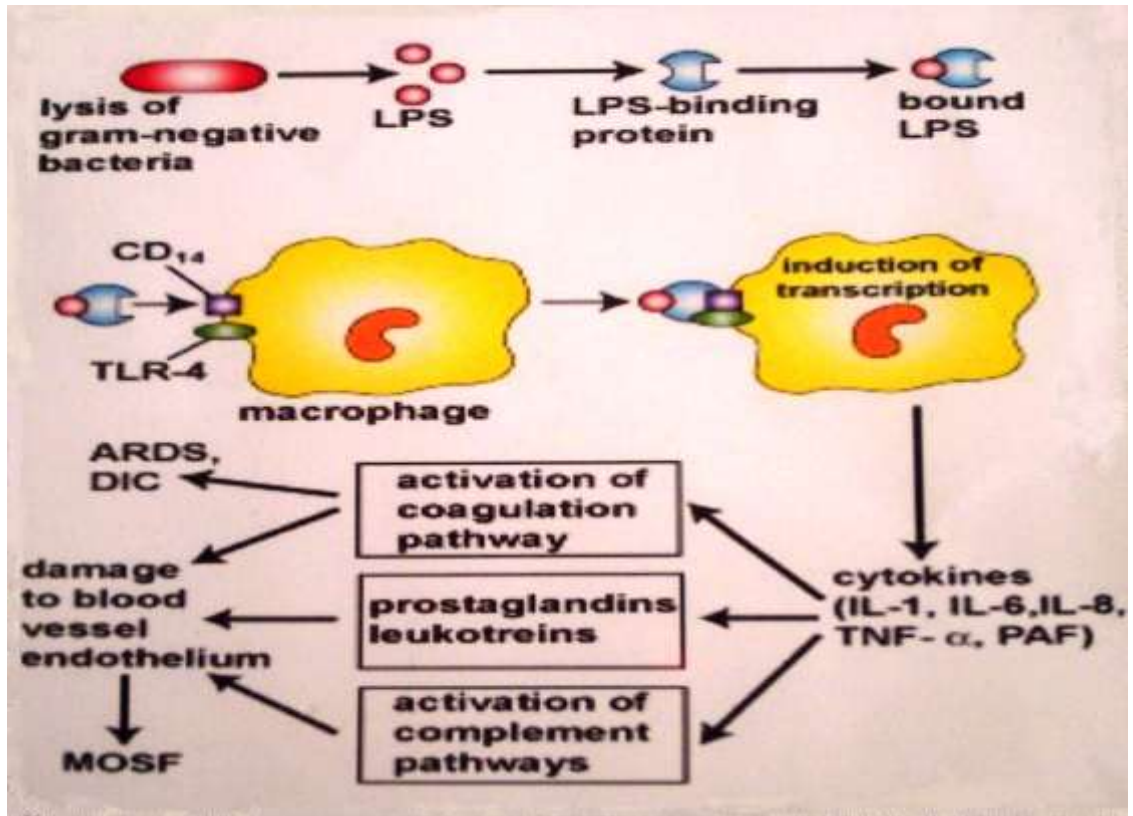
#### المقدمة :

ان لعديد السكريد الشحمي ( Lipopolysaccharide LPS ) وبحكم موقعه في الغشاء الخارجي لجدار الخلية الجرثومية له دوراً كبيراً في التداخلات الحاصلة بين الطفيلي والمضيف (Host-parasite interaction) اذ عند تحرره من الخلية الجرثومية فإنه يسهم في الامراضية والأعراض السمية للاخماج الجرثومية (1).  
هنالك العديد من الجزيئات سواء كانت مستقبلات على سطوح الخلايا أو بروتينات رابطة لعديد السكريد الشحمي (LPS- binding proteins (LBP)) لها اهمية بالغة في توسط التداخل الحاصل بين عديد السكريد الشحمي والخلية الهدف وعند تحرر الذيفان الداخلي من الخلايا الجرثومية المتحللة إلى مجرى الدم فإنه سيرتبط ببروتينات البلازما الرابطة (LBP) التي تنقله إلى المستقبلات الكائنة على سطوح الخلايا الوحيدة والبلاعم الكبيرة في الأنسجة والأنواع الأخرى من المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا المبطنه، يعمل بذلك الارتباط على استحثاث إنتاج السايوتوكينات (Cytokines) من تلك الخلايا مثل عامل النخر الورمي - ألفا ( Tumor necrosis factor (TNF-α) ) والانتريليوكينات (IL-1 , IL-6 , IL-8) وعامل تنشيط الأقراس الدموية (Platelet activating factor (PAF)) وهذه السايوتوكينات بدورها تحفز الوسائط الالتهابية القوية Leukotrienes and Prostaglandine مؤدية إلى الصدمة السمية (Septic shock) (1,2,3) وكما موضح في الشكل (1).  
ان من أهم التغيرات الوعائية الحاصلة بسبب عديد السكريد الشحمي هو تنشيط عامل تخثر الدم (Hageman factor) أو (Blood clotting factor XII) مما يؤدي إلى انتشار الخثرة الداخل وعائية (Disseminate intravascular clot (DIC)) وكذلك حدوث النزف الدموي. وكذلك يعمل LPS على تنشيط الـ Kinin مما يؤدي إلى انخفاض ضغط الدم (Hypotension) وينعش الذيفان الداخلي عملية التحلل السكري (Glycolysis) في العديد من أنواع الخلايا مؤدياً إلى انخفاض في نسبة السكر بالدم (Hypoglycemia) وبتراكم هذه التغيرات الوعائية مع الالتهابات والصدمة، يحدث منع تزويد الدم إلى

الأعضاء المختلفة كالكلية والرئة والقلب والكبد والدماغ وهذا يؤدي إلى تفاقم المشاكل الوعائية في تلك الأعضاء وتراكم الأحماض العضوية كحامض اللاكتيك في الأنسجة وحدوث حموضة أيضية عالية مما يؤدي إلى قتل العديد من الأعضاء (4,5).

إن عديد السكريد الشحمي المستخلص من جدران الجراثيم السالبة لملون غرام هو ممنوع (Immunogen) ويستحث عدداً من الاستجابات المناعية فضلاً عما ذكر فهو مقسم غير نوعي لخلايا B اللمفاوية (B lymphocytes)، وأنه مساعد مناعي (Adjuvant)، وكذلك يعمل على استحثات مقاومة غير نوعية للاخماج المختلفة (5,6).

يهدف البحث الى استخدام الاضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي المستخلص من الجراثيم السالبة لملون غرام في التمنيع والوقاية ضد الجرعة القاتلة 100 لها واستخدام الفئران كنموذج حيواني لتحقيق ذلك الهدف.



الشكل (1): الاستجابة المناعية لعديد السكريد الشحمي للجراثيم السالبة لملون غرام مقتبس من (3)

LPS: Lipopolysaccharide

IL-1, IL6, IL8: Interleukins

: Tumor Necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )

PAF: Platelet activating factor

ARDS: Acute respiratory distress syndrome

DIC: Disseminated intravascular coagulation

MOSF: Multiple organ system failure

### المواد وطرائق العمل:

#### 1- استخلاص عديد السكريد الشحمي:

تم استخدام عديد السكريد الشحمي والذي استخلص من عزلة محلية من جرثومة *C. freundii* بطريقة الفينول الساخن (7) .

#### 2- تنقية مستخلص عديد السكريد الشحمي.

تمت تنقية عديد السكريد الشحمي بالترشيح الهلامي اذ تمت موازنة عمود هلام السيفاروز (Sepharese 6-B) بواسطة محلول دارى الترس (Tris buffer) ذي الرقم الهيدروجيني 8.1 وضبطت سرعة الجريان (Flow rate) إلى 1 ملليتر/دقيقة وقدر الحجم الميت للعمود باستعمال محلول صبغة الديكستران الأزرق اذ تم قياس الكثافة البصرية

أجزاء الصبغة النافذة من الهلام على طول موجي 600 نانوميتر، أن الحجم الميت للهلام (Void volume) ( $V_0$ ) يمكن الحصول عليه من رقم الأنبوب الذي أعطى أعلى امتصاصية مضروباً بالحجم الذي تم جمعه في كل أنبوب. أذيب 15 مليغرام من مسحوق عديد السكريد الشحمي الخام في 3 مليلتر من محلول الترس ذو الرقم الهيدروجيني 8.1 وأضيف إلى سطح الهلام بهدوء مع مراعاة أن تكون الإضافة على جدران العمود، وتم الاسترداد بمحلول الترس ذي الرقم الهيدروجيني 8.1 وتمت متابعة الأجزاء النافذة وجمعها كما في اعلاه.

### 3- تأثير عديد السكريد الشحمي في عدد خلايا الدم البيض (WBCs) للفئران:

قسمت الفئران المخصصة لهذه التجربة إلى 4 مجاميع بواقع 6 فئران لكل مجموعة، وحقنت ثلاثة فئران من كل مجموعة بـ 125 مايكروغرام/0.5 مليلتر لكل فأرة من عديد السكريد الشحمي في حين حقنت الفئران المتبقية من كل مجموعة بدائري الفوسفات الملحي كسيطرة وتم حساب عدد خلايا الدم البيض (WBCs) لفئران المجموعة الأولى بعد مرور 24 ساعة من الحقن وفئران المجموعة الثانية بعد مرور 48 ساعة وفئران المجموعة الثالثة بعد مرور 72 ساعة وفئران المجموعة الرابعة بعد مرور 96 ساعة تم عد خلايا الدم البيض على وفق طريقة (8).

### 4- تحضير المصل الممنعة لعديد السكريد الشحمي

قبل البدء بعملية التمنيع تم سحب الدم من الأرانب بواسطة طعنه القلب للحصول على المصل ما قبل التمنيع (Preimmune) وذلك للتأكد من خلوص الأرانب من الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي لجرثومة الـ *C. freundii*. تم الحصول على المصل الممنعة لعديد السكريد الشحمي بطريقة (9) إذ تم في اليوم الأول حقن أرنيين تحت الجلد بـ 50 مايكروغرام/1 مليلتر لكل أرنب من عديد السكريد الشحمي مع 1 مليلتر من مساعد فروند الكامل Complete Freund's Adjuvant وفي اليومين 14 و24 تم حقنهما بجرعتين منشطتين متماثلتين، في حين حقن أرنب السيطرة بدائري الفوسفات الملحي، وفي اليوم 42 تم سحب الدم من الأرانب بواسطة طعنه القلب. وبعد الحصول على المصل تم إبطال المتمم بوضع المصل في حمام مائي بدرجة حرارة 56م مدة 30 دقيقة حفظت بعدها بوضعها في عيوب ذات أحجام صغيرة ووضعت بدرجة 20-م لحين الاستعمال.

### 5- تقدير الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في المصل الممنعة

تم إجراء اختبار الانتشار المناعي في هلام الاكاروز باتباع طريقة اوخترلوني Ouchterlony وفقاً لما ذكره Pier وزملائه (10) للكشف عن وجود الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في المصل الممنعة ولتقدير تلك الأضداد تم إجراء اختبار التلازن المباشر Direct agglutination test واختبار التلازن الدموي المنفصل Passive haemagglutination test.

### 6- الوقاية المنفصلة للفئران من الجرعة المهلكة ( $LD_{100}$ ) من العالق الجرثومي

أجريت هذه التجربة لمعرفة إمكانية استعمال مصل الأرنب الممنع بعديد السكريد الشحمي في وقاية الفئران ضد الجرعة المهلكة ( $LD_{100}$ ) أو التحدي القاتل من جرثومة الـ *C. freundii* وأجري الاختبار على وفق طريقة (11) وكما يلي: قسمت الفئران إلى 7 مجاميع بواقع 5 فئران للمجموعة الواحدة. حضر المصل الممنع والمبطل بتخفيف 3:1، 10:1، 1:10، 1:30، 1:100. وحقنت مجاميع الفئران داخل البريتون بالمصل الممنع وكما يلي: المجموعة الأولى: حقنت بـ 0.5 مليلتر من المصل الممنع بدون تخفيف لكل فأرة. المجموعة الثانية: حقنت بـ 0.5 مليلتر من التخفيف 3:1 من المصل الممنع لكل فأرة. المجموعة الثالثة: حقنت بـ 0.5 مليلتر من التخفيف 10:1 من المصل الممنع لكل فأرة. المجموعة الرابعة: حقنت بـ 0.5 مليلتر من التخفيف 30:1 من المصل الممنع لكل فأرة. المجموعة الخامسة: حقنت بـ 0.5 مليلتر من التخفيف 100:1 من المصل الممنع لكل فأرة. المجموعتان السادسة والسابعة: حقنت بـ 0.5 مليلتر من دارئ الفوسفات الملحي لكل فأرة.

وبعد مرور 30 دقيقة حقنت فئران المجاميع (الأولى - السادسة) بـ 0.5 مليلتر من عالق جرثومة الـ *C. freundii* ( $10^9 \times 1$ ) خلية جرثومية لكل فأرة في حين تركت المجموعة السابعة بدون تحدي جرثومي كمجموعة سيطرة. وبعد مرور خمسة أيام تم حساب عدد الفئران الميتة والحية لكل مجموعة.

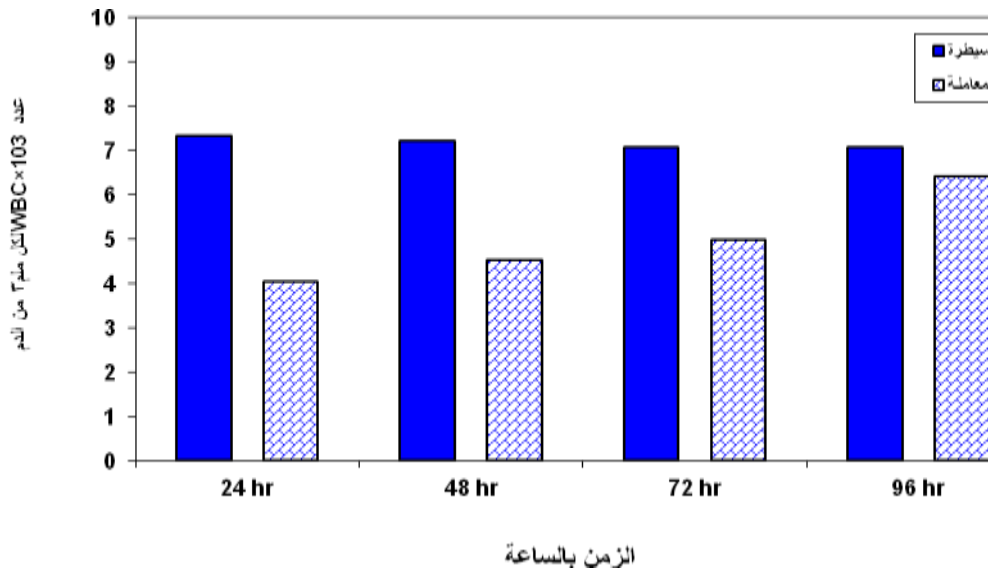
### 7- التحليل الإحصائي

تم تحليل النتائج وفق التصميم العشوائي الكامل باستخدام اختبار T للاستدلال على المعنوية حيث تم تحديد الوسط الحسابي والخطأ المعياري لهذه البيانات.

النتائج والمناقشة :

1- تأثير عديد السكريد الشحمي في عدد خلايا الدم البيض للفئران

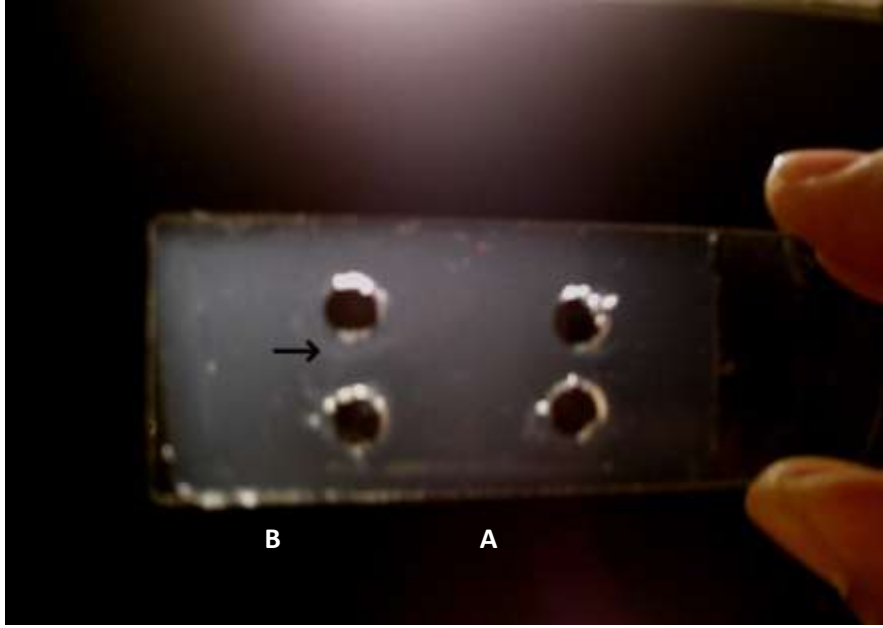
حققت الفئران بتركيز 125 مايكروغرام/مليلتر لكل فأرة من عديد السكريد الشحمي وتم حساب عدد خلايا الدم البيض WBCs في دماء الفئران بعد مرور 24 و48 و72 و96 ساعة، وبإجراء التحليل الإحصائي (اختبار T) لوحظ وجود فرق معنوي عالٍ ( $p < 0.001$ ) في عدد خلايا الدم البيض بعد مرور 24 ساعة من الحقن مقارنة بالسيطرة، الشكل (2) إذ بلغ عدد خلايا الدم البيض  $4.06 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>3</sup>، في حين بلغت للسيطرة  $7.35 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>3</sup>، وبعد ذلك بدأت خلايا الدم البيض بالازدياد في الفترات 48 و72 و96 ساعة إذ بلغ العدد أقصاه  $6.41 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>3</sup> مقارنة بالسيطرة التي بلغت  $7.09 \times 10^3$  خلية/ملم<sup>3</sup>. إن هذه النتائج متوافقة نوعاً ما مع ما ذكره (12) في أن الإصابة بالجراثيم السالبة لملون غرام تؤدي إلى حالة تجرثم دموي مصحوب بنقص عدد خلايا الدم البيض في الدم Leukopenia.



شكل (2) تأثير مستخلص LPS المنقى في عدد خلايا الدم البيض للفئران

2- التمنيع بعديد السكريد الشحمي وتقدير نواتج الاستجابة المناعية

بعد تمنيع الأرانب بعديد السكريد الشحمي تم الحصول على المصل المنع، وقدرت الأضداد كنواتج للاستجابة المناعية لهذه الحيوانات، وتم التقدير النوعي للأضداد بطريقة الانتشار الثنائي في هلام الاغاروز، تم حصول خط ترسيب واحد بين مستضد عديد السكريد الشحمي والمصل المنع، وكان ظهور الخط الترسيبي للمصل المضاد المركزة مع التخفيف 4:1 و8:1 من عديد السكريد الشحمي وبالعكس للمصل المخفف 4:1 و8:1 مع عديد السكريد الشحمي المركز ولم يظهر أي خط ترسيب للسيطرة المتمثلة بمصل حيوانات السيطرة والمصل ما قبل التمنيع وداري الفوسفات الملحي، (الشكل 3) إن ظهور الخط الترسيبي دليل على التفاعل النوعي بين عديد السكريد الشحمي والأجسام المضادة النوعية في المصل المنع وهذا الترسيب يعتمد على عدة عوامل كالتركيب الكيميائي والوزن الجزيئي وكذلك الشحنات الكهربائية للمستضد (15) وأن ظهور خط ترسيبي واحد يدل على وجود مستضد واحد متفاعل مع الضد النوعي له، إذا ازداد عدد المستضدات في الحفر زاد عدد الخطوط الترسيبية (16). وتم تقدير عيارية الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في المصل المنع باستعمال طريقة التلازن المباشرة Direct agglutination مع العالق الجرثومي، فكانت عيارية الأضداد 1:1280.



شكل (3) تفاعل الانتشار المناعي التثاني  
 ← خط الترسيب النوعي بين مستضد عديد السكريد الشحمي المنقى جزئياً والمصل المضاد  
 A السيطرة  
 B تفاعل المصل الممنع مع المستضد

أما عند استعمال طريقة التلازن الدموي المنفعل (Passive hemagglutination) لتقدير الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي فقد وجد أن تركيز المستضد الأمثل للامتزاز على سطوح خلايا الدم الحمر للأغنام هو 25 مايكروغرام/مليتر أما عيارية الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي فكانت 1:640، وكذلك استعمل (17) طريقة التلازن الدموي المنفعل لتقدير الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة ضد جرثومة *P. aeruginosa* وعديد السكريد الشحمي المستخلص من خلاياها، ووجد من خلال ذلك أن التمنيع بكلا المستضدين أعطى العيارية نفسها للأضداد، في حين وجدت الكرخي (18) إن عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة بجرثومة *Acinetobacter baumannii* هي 160:1 ووجد مالك، (19) أن عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي المستخلص من جرثومة *Proteus mirabilis* هو 1:640 مع الإشارة إلى أن كلتا الباحثين استعملت طريقة التلازن الدموي المنفعل في تقدير عيارية الأضداد.

إن العيارية العالية للأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة عزاءها بعض الباحثين إلى وجود أجسام مضادة أخرى استحث إنتاجها بوساطة التعرض الطبيعي للجرثومة نفسها أو جراثيم أخرى مما أدى إلى حدوث التفاعل التصالبي، أو بسبب وجود النبيت الطبيعي لهذه الحيوانات (20,21)، ولكن تم التأكد من عدم وجود هذه الأجسام المضادة إذ لم تعط المصول قبل التمنيع (Preimmune sera) أي تلازن يذكر في كلا الاختبارين.

إن ما زاد من عيارية الأضداد هو استعمال المساعدات المناعية كمساعد فروند الكامل CFA إذ وجد الباحث Ivanova وزملائه (22) أن تمنيع الحيوانات بخلايا جرثومة *P. mirabilis* مع استعمال مساعد فروند الكامل CFA أدى إلى زيادة عيارية الأضداد لعديد السكريد الشحمي إلى 1:800 في حين أعطى التمنيع بدون استعمال مساعد فروند الكامل عيارية 1:160 للأضداد.

### 3- الوقاية المنفصلة للفئران ضد الجرعة المهلكة LD<sub>100</sub> من جرثومة *C. freundii*

تم التحري عن قابلية مصول الأرانب الممنعة (Immune sera) الحاوية على الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي على وقاية الفئران ضد الجرعة القاتلة LD<sub>100</sub> من جرثومة *C. freundii* وذلك عن طريق حقن الفئران بالمصول الممنعة والعالق الجرثومي بتركيز 10<sup>9</sup> خلية/مليتر لكل فأرة، إذ أن هذا التركيز كافٍ لقتل جميع الفئران خلال 24 - 48 ساعة.

وبعد مرور خمسة أيام لوحظ أن المصل الممنع غير المخفف (Neat) والتخفيف 1:3 بقي الفئران من الجرعة المهلكة LD<sub>100</sub> للعالق الجرثومي ولا يقبها عند تخفيفه إلى 1:10 و 1:30 و 1:100. وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة والموجبة الموضحة في جدول (1).

جدول (1) الوقاية المنفصلة للفئران ضد الجرعة المهلكة 100 (LD<sub>100</sub>) من جرثومة *C. freundii*، باستعمال مصل الأرنب الممنوع

| تخفيف المصل           | عدد الفئران الكلي | عدد الفئران الحية | عدد الفئران الميتة |
|-----------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| المصل بدون تخفيف Neat | 5                 | 5                 | 0                  |
| 1/3                   | 5                 | 3                 | 2                  |
| 1/10                  | 5                 | 1                 | 4                  |
| 1/30                  | 5                 | 0                 | 5                  |
| 1/100                 | 5                 | 0                 | 5                  |
| سيطرة 1               | 5                 | 0                 | 5                  |
| سيطرة 2               | 5                 | 5                 | 0                  |

حقن الفئران بـ PBS + 10<sup>9</sup> خلية جرثومية/ فأرة  
 حقن الفئران بـ PBS. سيطرة 1  
 سيطرة 2

إن نتائج هذا البحث كانت مقارنة نوعاً ما لدراسات عديدة أخرى، فقد أثبتت Pier وزملائه (17) أن المصل الممنوع ضد عديد السكريد الشحمي بدون تخفيف يقي الفئران ضد الجرعة المهلكة 100% من عديد السكريد الشحمي. وتوجهت الدراسات إلى استخدام عديد السكريد الشحمي (LPS) كعلاج للاخماج المتسببة عن الجراثيم السالبة لملون غرام لكونه الأقوى سمية والمركب المستضدي بين المكونات الأخرى (23) واستخدمت الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي للوقاية ضد الاخماج الحاصلة بسبب الجراثيم السالبة لملون غرام.

وكذلك ذكر (1) أن الفعالية السمية لعديد السكريد الشحمي يمكن كبحها في القوارض باستخدام الأضداد وحيدة النسيلة (IgG (Monoclonal antibodies).

وقد تعيق أو تمنع (Block) الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي عملية الالتصاق الجرثومي بالطبقة المخاطية المبطنة للأمعاء (24) وقد يكون لها فعل قاتل للجراثيم (Bactericidal) التي استخلص منها عديد السكريد الشحمي أو غيرها (25). وهناك إشارة إلى أن المصنوع المضاد لعديد السكريد الشحمي تساعد في تحرير الذيفان الداخلي من الخلية الجرثومية عن طريق تحليلها بمساعدة المتمم (complement) (2).

#### 4-المصادر

- 1- Rietschel, E.Th.; Brade, H.; Holst, O.; Brade, L.; Muller-Leonnies, S.; Mamat, U.; Zahringer, U.; Beckmann, F.; Seydel, U.; Brandenburg, K. and others. (1996). Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition host response and immunological detoxification. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*216: 39-81.
- 2- Luchi, M. and Morrison, D. (2000). Comparable endotoxic properties of lipopolysaccharides are manifest in diverse clinical isolates of gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 68(4): 1899-904.
- 3- Kaiser, G. (2001). Microbiology lecture guide. (Internet).
- 4- Atlas, R.M. (1995). Principles of microbiology. 1<sup>st</sup> ed. Mosby-Year Book, USA.
- 5- Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical microbiology. 22<sup>nd</sup> ed. Appelton and Lange, U.S.A.
- 6- Todar, K. (2002). Bacteriology home page: mechanisms of bacterial pathogenicity: Endotoxins. (Internet).
- 7- Johnson, K.G. and Perry, M.B. (1976). Improved techniques for the preparation of bacterial lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol.* 22: 29-34.
- 8- Shaw, S.T. and Benson, E.S. (1974). Renl function and its evaluation. pp. 124-125. In: Davidsohn, I and Henry, J.B. (Editors). Todd-Sanford clinical diagnosis by laboratory methods. 15<sup>th</sup> ed. W.B. Saunders company. Pheladelphia, London.
- 9- Dooley, J.S.G.; Lallier, R.D.H. and Trust, T.I. (1985). Electrophoretic immunochemical analysis of the lipopolysaccharides from various strains of *Aeromonas hydrophila*. *J. Bacteriol.* 164(1): 263-9.

- 10- Pier, G.B.; Sidberry, H.F.; Zolyomi, S. and Sadoff, J. (1978). Isolated and characterization of high-molecular weight polysaccharide from the slime of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immune*. 22(3): 908-18.
- 11- Chomarat, M.; Ichiman, Y. and Yoshida, K. (1989). Protection of mice by pseudodiffuse strain of *Staphylococcus aureus* possessing polyvalent capsular type antigen. *J. Med. Microbiol*. 28: 129-136.
- 12- Jawetz, E.; Melnick, J.L. and Adelberg, E.A. (1982). Review of medical microbiology. 15<sup>th</sup> ed. USA.
- 13- Portner, A.; Peter-Katalinic, J.; Brade, H.; Unland, F.; Buntmeyer, H. and Muthing, J. (1993). Structural characterization of gangliosides from resting and endotoxin stimulated murine B-lymphocytes. *Biochemistry*. 32(47): 12685-93.
- 14- Lechner, A.J.; Velasquez, A.; Knudsen, K.R. and Tracy, T.F. (1998). Cholestatic live injury increase circulating TNF-alpha and IL-6 and mortality after *Escherichia coli* endotoxaemia. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med*. 157: 1550-8.
- 15- Thirkhill, C.E. and Kenny, G.E. (1974). Serological comparison of the arginine *Mycoplasma* species by two dimensional electrophoresis. *Infect. Immun*. 10: 624-32.
- 16- Nowotny, A. (1979). Basic exercises in immunochemistry. A laboratory manual. 2<sup>nd</sup> ed. Belin, Heidelberg, New York. (Cited by: 2001, الكرخي).
- 17- Pier, G.B.; Sidberry, H.F. and Sadoff, J.C. (1981). High molecular weight polysaccharide antigen from *Pseudomonas aeruginosa*, Immunotype 2. *Infect. Immun*. 34(2): 461-8.
- 18- الكرخي، منال خالد محمد. (2001). دراسة امراضية بكتريا *Acinetobacter baumannii* المعزولة محلياً، رسالة ماجستير، كلية العلوم - جامعة بغداد.
- 19- مالك، سلمى نصر الله. (2006). دراسة فعالية عديد السكريد الشحمي لبكتريا *Proteus merabilis* في الوقاية من خمج المسالك البولية في الانموذج الحيواني، رسالة ماجستير، كلية العلوم - جامعة بغداد.
- 20- Pluschke, G. and Achtman, M. (1985). Antibody to O-antigen of lipopolysaccharide are protective against neonatal infection with *E. coli* K1. *Infect. Immun*. 49(2): 365-75.
- 21- Nicolle, L.F.; Ujack, E.; Brunka, J. and Bryan, L.E. (1988). Immunoblott analysis of serologic response to outer membrane proteins of *Escherichia coli* in elderly individuals with urinary tract infection. *J. Clin. Microbiol*. 26(10): 2087-91.
- 22- Ivanova, E.; Kenarova, B. and Gumpert, J. (1993). Adjuvant activity of the *E. coli* WF<sup>+</sup> stable L-form cytoplasmic membrane. *Acta. Microbiol. Bul*. 29: 154-60. (Cited by: 2006, مالك).
- 23- Di-Padova, F.E.; Brade, H.; Barclay, G.R.; Poxton, I.R.; Liehl, E.; Schuetza, E.; Kocher, H.P.; Ramsay, G.; Schreier, M.H.; McClelland, D.B. and others. (1993). A broadly cross-protective monoclonal antibody binding to *E. coli* and *Salmonella* lipopolysaccharide. *Infect. Immun*. 61(9): 3863-72.
- 24- Proulx, F.; Seidman, E.G. and Karpman, D. (2001). Pathogenesis of shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome. *Pediatr. Res*. 50: 163-71.
- 25- Navarro, A.; Eslava, C.; Hernandez, U.; Navarro-Henze, L.; Aviles, M.; Garcia-dela Torre, G. and Cravioto, A. (2003). Antibody response to *Escherichia coli* O<sub>157</sub> and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol*. 10(5): 797-801.