----- مجلة علوم الرافدين، المجلد17، العدد9، خاص بعلوم الحياة، ص 9-18، 2006-----

فصل بروتينات الغشاء الخارجي لجرثومة *Moraxella catarrhalis* المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي بتقنية الهجرة الكهربائية SDS- PAGE

اسماعيل ابراهيم السنجري
الشركة العامة لصناعة الادوية والمستلزمات الطبية (NDI)

صبحي حسين الجبوري
كلية التمريض
جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 2004/10/30 ؛ تاريخ القبول 2005/2/20)

الملخص

أجريت الدراسة للكشف عن البروتينات الموجودة في الغشاء الخارجي لجراثيم *Moraxella catarrhalis* المعزولة من أخماج الجهاز التنفسي إذ تم تحضير بروتينات الغشاء الخارجي للسلالات MD-1، MB-16، MC-10، MD-181 وMA-68 باستخدام تقنية الهجرة الكهربائية Electrophoresis لفصل هذه البروتينات. بينت نتائج الدراسة امتلاك السلالات بروتينات مختلفة تمثلت في اختلاف عدد الحزم البروتينية للغشاء الخارجي وقدرت الاوزان الجزيئية لها بين (140-20) كيلو دالتون مقارنة مع الوزن الجزيئي للبروتينات القياسية. إذ اظهرت السلالة MD-1 (10) حزم بروتينية، السلالة MB-16 (8) حزم بروتينية، السلالة MC-10 (5) حزم، السلالة MD-181 (4) حزم والسلالة MA-68 (6) حزم بروتينية، وتعد هذه البروتينات عوامل ضراوة في امراضية الجرثومة مسببة اصابات في الجهاز التنفسي للانسان.

Detection of Outer Membrane Proteins of *Moraxella catarrhalis* Isolated from Infections Respiratory System by Electrophoresis Technique

Ismail I. Al-Sanjari
Ninevah Drug Industry(NDI)

Subhi H. Al-Jobury
College of Nursing
Mosul University

ABSTRACT

The study was conducted for the detection of outer membrane proteins of *Moraxella catarrhalis* strains MD-1, MB-16, MC-10, MD-181 and MA-68, isolated from infections Respiratory system. OMPs were separated by electrophoresis technique. SDS-PAGE revealed that those strains were differences in the bacterial outer membrane proteins

regarding number of proteins bands (4-10) and molecular weight (M-W) (20-140) Kda. These proteins were identified as virulence factors of *Moraxella catarrhalis* which caused infections for human respiratory system.

المقدمة

تعد جرثومة *Moraxella catarrhalis* جزءا من النبيت الجرثومي الطبيعي للجهاز التنفسي للانسان وتستوطن الجهاز التنفسي العلوي والاغشية المخاطية (Murphy et al., 1998; Karalus and Campagnari, 2000)، ولها دور مهم في حدوث اخماج الجهاز التنفسي كونها ذات طبيعة انتهازية مسببة اصابات عديدة وامراضاً خطيرة (Hager et al., 1987; Ejlerltsen, 1995).

وتكون امراضيتها بصورة مباشرة او بصورة غير مباشرة لحماية الجراثيم المرضية الاخرى المتعايشة معها، واهم الامراض التي تسببها امراض الانسداد الرئوي المزمن (Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD) (Murphy and Sethi, 1992) التهاب الاذن الوسطى الحاد (Acute Otitis Media, AOM) (Enright and Mckenzie, 1997) وذات الرئة (Pneumonia)، التهاب القصبات (Bronchitis)، التهاب البلعوم (Pharyngitis)، التهاب الحنجرة (Laryngitis) (Hol *et al.*, 1996; Forbes et al., 1998) فضلا عن حالات التجرثم الدموي (Bacteremia) وانتان الدم (Septicemia) (Porsson et al., 1998; Saito et al., 1988) وعدوى المستشفيات الوبائية (Ahmed et al., 1994). وتتميز هذه الجرثومة بامتلاكها تراكيب مستضدية وعوامل ضراوة مختلفة (Ahmed et al., 1996; Fitzgerald et al., 1999) ولهذه الجرثومة اهمية كبيرة في مقاومتها المضادات الحيوية وبذلك تسهم في مشاكل صحية وتعقيد العلاج في اختيار المضاد الاول (Ejlertsen et al., 1994; Miranda et al., 2001; Roberts, 2002). ونظراً لاهمية هذه الجرثومة في السنوات الاخيرة وتاكيد الدراسات والبحوث العلمية على زيادة انتشارها واستيطانها وامراضيتها خاصة الجهاز التنفسي ولعدم اجراء دراسات محلية بيوكيمياوية وعدم وجود دراسات على عوامل الضراوة والامراضية عليها محلياً فان الهدف من البحث هو دراسة بروتينات الغشاء الخارجي للسلالات المحلية والكشف عليها وتحديد اوزانها الجزيئية والتي تعد أحد عوامل الضراوة في امراضية الجرثومة.

طرائق العمل

تنمية وعزل السلالات:

تم تنمية السلالات الجرثومية *Moraxella catarrhalis* المعزولة من العينات السريرية القشع ومسحات الحلق والاذن في وسط Trypticase soya agar المضاف له 5% دم الانسان وحضنت في مناخ يحوي (5 %) ثاني اوكسيد الكاربون وبدرجة حرارة (37 ْم) لمدة (24) ساعة وشخصت السلالات

بواسطة نظام API-NH من شـركة Biomerieux (Barbe et al., 1904) فضـلاً عـن الفحوصـات البيوكيمياوية.

استخلاص وتحضير بروتينات الغشاء الخارجي:

جمعت المستعمرات وعلق (0.1) غم من الخلايا الجرثومية وزن رطب في (10) سم^3 من المحلول المنظم Tris – HCl buffer بتركيز (0.05) مولار ودالة حامضـية بمقـدار pH 7.8 الحـاوي علـى (EDTA) بتركيز (1) مولار بدرجة (4 ْم) حطمت الخلايا الجرثومية بجهاز الترددات فـوق الصـوتية Ultrasonic بتسليط 24000 ذبذبة/ثانية لمدة 30 ثانية كررت هذه العملية اربع مرات مع مـدة توقـف (15) ثانية لكل مرة ووضعت الخلايا المحطمة في انابيب الطرد المركزي. فصل الراشح عن الراسـب باستخدام جهاز الطرد المركزي الفوقي المبرد بسرعة 600 xg بدرجة (4 ْم) ولمدة 20 دقيقة.

اخذ الراشح ورسب بسرعة xg 1000 لمدة ساعة واحدة بدرجة (4 ْم) اذيب الراسب في (10) ملي مولار من المحلول المنظم ترس Tris الحاوي على (5) ملي مـولار ($MgCl_2$) مـع (2% Triton–X) لازالة الخلايا غير المتكسرة. اخذ الراشح ورسب مرة اخرى في جهاز الطرد المركزي الفوقي بسـرعة 10.000 xg بدرجة (4 ْم) ولمدة ساعة. اذيب الراسب في المحلول المنظم تـرس (Tris–HCl) بتركيـز (0.05) مولار ودالة حامضية 7.8 pH ثم جفدت باستعمال جهـاز التجفيـف بالتجميـد (Lyophilizer) (Harakeh and Matin, 1989; Kyd et al., 1998).

فصل البروتينات وتحديد الاوزان الجزيئية بطريقة الهجرة الكهربائية SDS-PAGE:

اضيف (50) مايكروليتر من البروتين المذاب في محلول Tris وبرقم هيدروجيني pH:6.8 وبتركيز (2) ملغم/سم^3 مع (10) مايكروليتر من SDS (10%) مع (3) مايكروليتر مـن 2-Mercaptoethanol. سخن المزيج في حمام مائي مغلي لمدة (3) دقائق بعدها اضيف للمزيج حجم مسـاو لـه مـن (20%) سكروز و(10) مايكروليتر من صبغة البروموفينول الزرقاء بتركيز (0.005%). اخذ (25) مايكروليتر من هذا المحلول ووضع على اسطوانات الهلام المتكون مـن (7.5%) هـلام الفصـل Separating gel و(3.5%) من الهلام الاولي Staking gel والمحضر حسب طريقة (Laemmli, 1970) تم توصيل التيار الكهربائي بمقدار (6) ملي امبير/انبوب واستمرت العملية إلى ان وصلت صبغة البروموفينول إلى نهايـة الانبوب . اوقف مرور التيار الكهربائي. وقد استخدم في هذه العملية جهاز الهجرة الكهربائية Vertical disc من نوع Quicki fit England Instrumentation.

ثبتت الاسطوانات بغمرها في محلـول (20%) مـن Trichloro acetic acid (TCA) وصـبغت بصبغة Coomasie brilliant blue R250 وغسلت (5) مرات بالماء المقطر. أجريت نفس التجربة على البروتينات القياسية المعلومة الوزن الجزيئي اذا استخدمت البروتينات فوسفاتيز (140) البـومين مصـل الابقار (67)، الفا امايلز (58) البومين البيض (45) و سايتوكروم (12.5) كيلو دالتون.

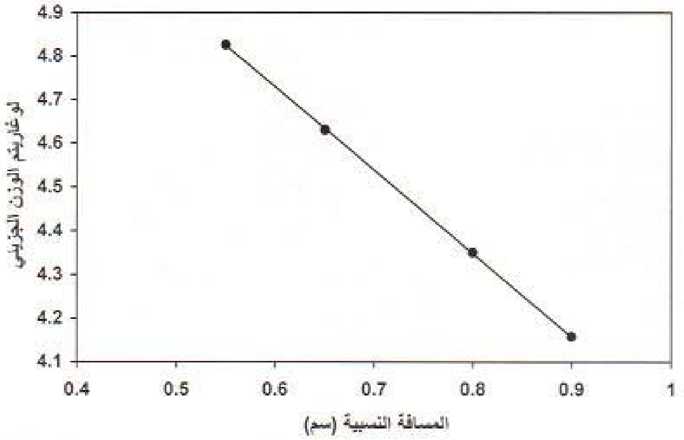
تم احتساب الوزن الجزيئي التقريبي لبروتينات الغشاء الخارجي للسلالات المدروسة بتسقيط المسافة النسبية التي قطعتها هذه البروتينات على المنحنى القياسي (Robyt and White, 1987).

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج فصل بروتينات مستخلصات الغشاء الخارجي للسلالات المدروسة وجود اختلافات في عدد الحزم البروتينية لبروتينات الغشاء الخارجي وقدرت الاوزان الجزيئية لها بين (140-20) كيلو دالتون بالاعتماد على المنحنى القياسي للبروتينات المعلومة الوزن الجزيئي وكما هو مبين في الجدول (1) والموضح في الشكل (1).

الجدول 1: العلاقة بين الوزن الجزيئي والمسافة المقطوعة للبروتينات القياسية المستخدمة.

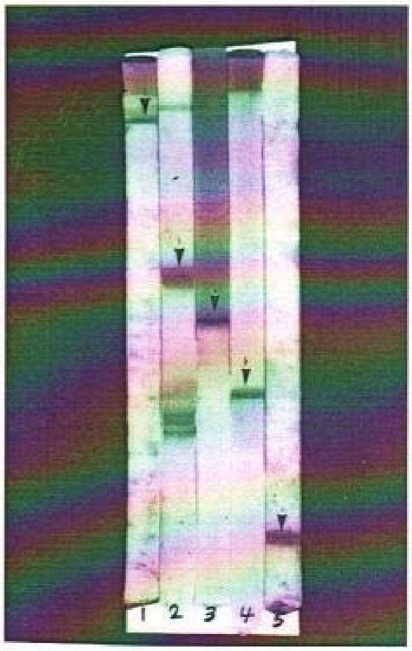
البروتين	الوزن الجزيئي للبروتين		المسافة النسبية (سم)
	كيلودالتون	اللوغاريتم	
الفوسفوتيز	140	5.14	0.8
البومين مصل الابقار	67	4.82	3.4
الفا امايليز	58	4.76	4.3
البومين البيض	45	4.65	5.1
سايتوكروم C	12.5	4.09	9.1



الشكل 1: المنحني القياسي لتعيين الوزن الجزيئي بتقنية SDS-PAGE.

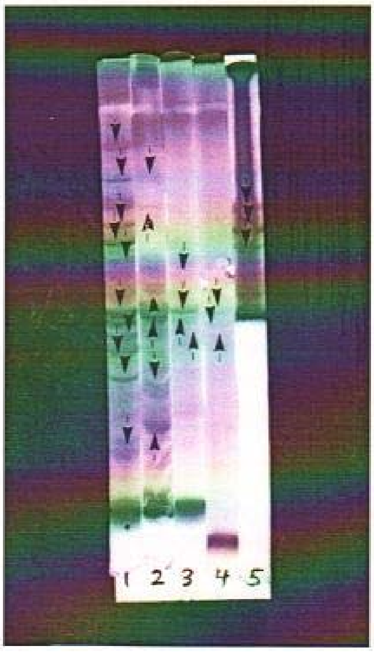
توضح الصورتان (1) و (2) الحزم البروتينية للبروتينات القياسية وبروتينات الغشاء الخارجي للسلالات الجرثومية. ويشير الرقم (1) في الصورة (2) إلى وجود (10) حزم بروتينية للسلالة MD-1 قدرت اوزانها الجزيئية بين (140–20) كيلو دالتون وبذلك نلاحظ اختلافا في الاوزان الجزيئية من حزمة إلى اخرى . الرقم (2) يبين وجود (8) حزم بروتينية للسلالة MB-16، في حين يشير الرقم (3) إلى وجود (5) حزم بروتينية مختلفة الاوزان الجزيئية للسلالة MC-10 والرقم (4) إلى وجود (4) حزم للسلالة MD-181 واخيرا يظهر الرقم (5) للسلالة MA-68 وجود (6) حزم بروتينية اوزانها الجزيئية بين (85–45) كيلو دالتون.

بينت النتائج احتواء الغشاء الخارجي لسلالات جرثومة *M. catarrhalis* على انواع مختلفة من البروتينات اذ تمكن كل من Murphy و Bartos (1989) من تحديد ثمانية انواع من المجاميع البروتينية OMPs من (H–A) ذات اوزان جزيئية بين (21–98) كيلو دالتون. وبذلك تتقارب نتائج الدراسة الحالية مع تلك النتائج اذ قدر الوزن الجزيئي الاعلى (98) كيلو دالتون مقارنة بالوزن الجزيئي الاعلى 140 للدراسة الحالية في حين تتقارب الاوزان الجزيئية الدنيا. ان احد انواع بروتينات الغشاء الخارجي لجرثومة *M. catarrhalis* هو البروتين CopB ويعرف ايضا بروتين OMP. B_2 وزنه الجزيئي (80) كيلو دالتون وهذا البروتين يحدد التغيير المستضدي لسلالات الجرثومة (Helminen et al., 1993). كما لاحظ كل من Sethi و Murphy (1995) ان لهذا البروتين اهمية في الاستجابة المناعية للمضيف عند إصابته بهذه الجرثومة ووجود الأضداد لهذا البروتين يدل على الإصابة بها وظهور الأضداد الخاصة لبروتين CopB في مصل الحيوانات المختبرية لها أهمية في المناعة المكتسبة إذ لوحظ وجود حالة ترويق Clearance لجرثومة *M.catarrhaslis* في رئة الحيوان المصاب . ويعتقد ان لهذا البروتين أهمية اساسية في ضراوة Virulence هذه الجرثومة (Helminen et al., 1993) هناك نوع اخر من البروتينات للغشاء الخارجي OMPCD وزنه الجزيئي (46) كيلو دالتون (Murphy et al., 1993). وهو يشابه البروتين OMPF الموجود في الجراثيم لانواع جنس Pseudomonas المرضية وله وظيفة مشابهة لبروتين البورين (Porin) الموجود في الجدار الخلوي ولهذا البروتين الاخير اهمية في المقاومة للمضادات الحيوية (Hsiao et al., 1995). وقد وجد Murphy وجماعته (1998) عند تمنيع الحيوانات المختبرية بهذا البروتين ظهرت زيادة في ترويق الرئة وبذلك له اهمية في عملية الاستجابة المناعية عند الاصابة بجرثومة *M. catarrhalis* ومن الممكن الاستفادة من هذه الخاصية في انتاج اللقاح وهذا ما اشارت اليه الدراسات (Murphy et al., 1999; Yang et al., 1997). يوجد نوع اخر من بروتينات الغشاء الخارجي نوع OMPE قدر وزنه الجزيئي (47) كيلو دالتون (Bhusham et al., 1997). واظهرت دراسة كل من Karalus و Campagnari (2000) ان وظيفة هذا البروتين مشابهة لوظيفة البروتين بورين OMPF الموجود في جرثومة *Escherichia coli*.



الصورة 1: الحزم البروتينية للبروتينات القياسية للوزن الجزيئي وتمثل:

1. فوسفاتيز
2. البومين مصل الابقار
3. الفا اميليز
4. البومين البيض
5. سايتوكروم C



الصورة 2: الحزم البروتينية للبروتينات الغشاء الخـــارجي لـــسلالات جرثومـــة *Moraxella catarrhalis* :

1. السلالة MD-1
2. السلالة MB-16
3. السلالة MC-10
4. السلالة MD-181
5. السلالة MA-68

نستنتج من الدراسة الحالية ان وجود الانواع من هذه البروتينات في الغشاء الخـــارجي لـــسلالات جرثومة *M. catarrhalis* وبالاوزان الجزيئية المحددة لها تلعب دورا مهما في الامراضية وتعـــد هـــذه البروتينات من عوامل الضراوة التي تمتلكها هذه الجرثومة ولها أهمية في الاصابات المرضية في الجهاز التنفسي وهذا يتوافق مع ما أكدته الدراسات (Faden et al., 1994; Murphy et al., 1997) . إذ تبين من البيانات في الدراسة الحالية ان السلالة MD-1 معزولة من قشع أنثى عمرها (18) سنة مصابة بالتهـــاب

الشعبي القصبي Bronchopulmonary infection وهذا يتوافق مع ما وجده كل مــن Murphy و Sethi (1992) و Ejlertsen (1995) و Al-Rikaby (1996).

ووجد ان السلالة MB-16 المعزولة من حلق طفلة بعمر سنة واحدة انها مصابة بالتهاب الحنجــرة والقصبات الحاد والسلالة MA- 68 المعزولة من نفس الموقع والمرض لطفل عمره (10) سنوات يتوافق مع ما توصل اليه Schalen وجماعته سنة (1980) و (1982). والسلالة MD-181 عزلت من عينة قشع لانثى عمرها (61) سنة مصابة بذات الرئة. وهذا يتوافق مع ما تؤكده الدراسات ان هذه الجرثومة مسببة لهــذا المــرض (Nicorta et al., 1986; Hager et al., 1987; Wright et al., 1990 Dipersio et al., 1998). واظهرت البيانات ان هذه السلالات مقاومة للمضادات الحيويــة وخاصــة لانــواع البنســلينات والسيفالوسبورينات. وهذا يوافق مــا اشــار اليــه (Jacoby, 1994 : Richter et al., 2000; Roberts, 2002).

يوجد انواع اخرى من بروتينات الغشاء الخارجي تــدعى UspA ذات الــوزن الجزيئــي العــالي OMPs–HMP يقدر (350–240) كيلو دالتــون والتــي تكــون بنــوعين $UspA_1$ و $UspA_2$ وكــل منها له وظيفة محددة في امراضية الجرثومة وهذا ما تؤكده الدراسات العالميــة (Aebi et al., 1998; McMichael et al., 1998; Chen et al., 1999) ولم تظهر هذه البروتينات في الدراسة الحالية ويتوقــع السبب في عدم ظهورها مع حزم البروتينات بعدم تحسس الجهاز المتوفر لدينا عند اجراء التجربة فضلا عن اختلاف طبيعة السلالات المحلية والموقع الجغرافي عن تلك السلالات.

المصادر الاجنبية

Aebi, C., Lanfontaine, E.R., Cope, L., Latimer, J.L., Lumbley, S.L., McCracken, G.H. and Hansen, E.J., 1998. Phenotypic Effect of Isogenic UspA1 and UspA2 Mutations on *Moraxella catarrhalis* O35E. Infection and Immunity, Vol.66, No. 7, pp.3113-3119.

Ahmed, K., Masaki, H., Dai, T.C., Ichinose, A., Utsunomiya, Tao, M., Nagatake, T. and Matsumoto, K., 1994. Expression of Fimbriae and Host Response in *Branhamella catarrhalis* Respiratory Infections. Microbiol. Immunol., Vol. 38, pp.767-771.

Ahmed, K., Matsumoto, K., Rikitomi, N. and Nagatake, T., 1996. Attachment of *Meraxella catarrhalis* to Pharyngeal Epithelial Cells is Mediated by Aglycosphingolipid Receptor FEMS. Microbiol. Lett., Vol.135, pp.305-309.

Al-Rikaby, E.H., 1996. *Branhamella catarrhalis* in Broncopulmonary Infections in Adults. M.Sc. Thesis, Medical Saddam College, Saddam University.

Barbe, G., Babolat, M., Boeufgras, J.M., Monget, D. and Freney, J., 1994. Evaluation of API-NH a New 2-Hour System for Identification of Neisseria and Haemophilus Species and *Moraxella catarrhalis* in Arotine Clinical Laboratory. J. Clin. Microbiol., Vol. 32, No.1, pp.187-9.

Bhusham, R., Kirkham, C., Sethi, S. and Murphy, T.F., 1997. Antigenic Characterization and Analysis of the Human Immune Response to Outer Membrane E of *Branhamella catarrhalis*. Infec. Immun., Vol.65, No. 7, pp.2668-2675.

Chen, D., McMichael, J.C. and Van Der Meid, K.R., 1999. Evaluation of Purified UspA from *Moraxella catarrhalis* as a Vaccine in a Murine Model after Active Immunization. Infect. Immun., Vol.64, pp.1900-1905.

Dipersio, J.R., Jones, R.N., Barrett, T., Doern, G.V. and Pfaller, M.A., 1998. Fluroquinolone-Resistant *Moraxella catarrhalis* in Patient with Pneumonia: Report from the Sentry Antimicrobial Surveillance Program. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., Vol.32, No. 2, pp.131-135.

Edebrink, P., Jansson, P.E., Rahman, M.M., Widmalm, G., Holme, T. and Rahman, M., 1995. Structural Studies of the O-Antigen Oligosaccharides from two Strains of *Moraxella catarrhalis* Serotype C. Carbohydrate Research, Vol.266, pp.237-261.

Ejlertsen, T., Schonheyder, H.C. and Thisted, E., 1994. Beta-Lactamase Production in *Branhamella catarrhalis* Isolated from Lower Respiratory Tract Secretion in Danish Children. An Increasing Problem. Infection, Vol.19, No. 5, pp.328-300.

Ejlertsen, T.M., 1995. *Branhamella catarrhalis*: Prevalence and Immunologic Response in Children. Antimicrobial Resistance Among Isolates from Children. Ph.D. Thesis, University of Aarhus, Denmark.

Enright, M.C. and Mckenzie, H., 1997. *Moraxella (Branhamella) catarrhalin*-Clinical and Molecular Aspects of Ordiscoverd Pethogen. J. Med. Microbiol., Vol.46, pp.360-371.

Faden, H., Doern, G., Wolf et al., 1994. Antimicrobial Susceptibility of Nasopharyngeal Isolates of Potential Pathogens Recovered from Infants Before Antibiotic Therapy: Implication for the Management of Otitis Media. Pediatr. Infect Dis. J., Vol.13, pp.609-612.

Fitzgerald, M., Murphy, S., Muleahy, R., Keane, C., Coakley, D. and Scott, T., 1999. Tissue Culture Adherence and Haemagglutination Characteristics of *Moraxella (Branhammella) catarrhelis*, FEMS. Immunology and Medical Microbiology, Vol.24, pp.105-114.

Forbes, B.A., Sahm, D.F., Wessfeld, A.S. and Trevino, E.A., 1998. Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology 10th ed. Mosby, New York.

Hager, H., Verghese, A., Alvarez, S. and Berk, S.L., 1987. *Branhamella catarrhalis* Respiratory Infections. Reviews of Infectious Disease, Vol.9, No. 6, pp.1140-1148.

Harakeh, S. and Matin, A., 1989. Influence of Nutrient-Limited Growth on Pathogenesis as Sociated Outer Membrane Proteins of *Yersinia enterocolitica*. J. App. Bacteriol., Vol.67, pp.209-212.

Helminen, M.E., Maclver, I., Latimer, J.L., Cope, L.D., McCrackenjr, G.H. and Hansen, E.J., 1993. A Major Outer Membrane Protein of *Moraxella catarrhalis* is Target of Antibodies the Enhance Pulmonary Clearance of Pathogen in an Animal Model. Infect. Immun., Vol.61, pp.2003-2010.

Hol, C., Schalen, C., Uerdain, C.M., Van Oijke, E.M., Verhoet, J. and Van Dijk, H., 1996. *Moraxella catarrhalis* in Acute Laryngitis: Infection or Colonization. J. Infectious Diseases, Vol.174, pp.636-638.

Hsiao, C.B., Sechi, S.L. and Murohy, T.F., 1995. Outer Membrane CD of *Branhamella catarrhalis*: Sequence Conservation in Strains Recovered from Human Respiratory Tract. Microb. Pathol., Vol.19, pp.215-225.

Jacoby, G.A., 1994. Prevalence and Resistance Mechanisms of Common Bacterial Respiratory Pathogens. Clinical Infectious Disease, Vol.18, pp.951-957.

Karalus, R. and Campagnari, A., 2000. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. Microb. and Infection., Vol.2, pp.547-559.

Kyd, J.M., Cripps, A.W. and Murphy, T.F., 1998. Outer membrane antigen expression by *Moraxella catarrhalis* influences pulmonary clearance. Med. Microbiol., Vol.47, pp.159-168.

Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, Vol.227, pp.680-685.

Lafontaine, E.R., Cope, L.E., Aebi, C., Latimer, J.L., McCracken, G.H. and Hansen, E.J., 2000. The UspA protein a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. J. Bacteriol., Vol.182(5), pp.1364-1373.

McMichael, J.C., Fiske, M.J., Frendenburg, R.A., Chakrevarti, D.N., Vandermeid, K.R.. Barniak, V., Caplan, J., Bortell, E., Baker, S., Arumugham, R. and Chen, D., 1998. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. Infection and Emmunity, Vol.66(9), pp.4374-4381.

Miranda, B.L., Navales, M.G., Santos, F.S., Ocampo, L.O. and Gallardo, H.G., 2001. Prevalence of *Moraxella catarrhalis* colonization in asymptomatic carriers under six years of age. Salud Publica de Mexico, Vol.43(1), pp.1-4.

Murphy, S., Fitzgerald, M., Mulcaphy, R., Keane, C., Coakley, D. and Scott, T., 1997. Studies on haem. Agglutination and serum resistance status of strains of *Moraxella catarrhalis* isolated from the elderly. Gerontology, Vol.43, pp.277-282.

Murphy, T.F. and Bartos, L.C., 1989. Surface-exposed and antigenically conserved determinations of outer membrane proteins of *Branhamella catarrhalis*. Infec. and Immun., Vol.57, pp.2938-2941.

Murphy, T.F. and Sethi, S., 1992. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease. Am. Rev. Respir. Dis., Vol.146, pp.1067-1083.

Murphy, T.F., Kirkham, C. and Lesse, A.J., 1993. The major heat-modifiable outer membrane protein CD is highly conserved among strains of *Branhamella catarrhalis*. Mol. Microbiol., Vol.10, pp.87-97.

Murphy, T.F., Kirkham, C., Dewardin, E. and Sethi, S., 1999. Analysis of antigenic structure and human immune response to outer membrane protein CD of *Moraxella catarrhalis* Infection and Immunity, Vol.67(9), pp.4578-4585.

Murphy, T.F., Kyd, J.M., Jhon, A., Kirkham, C. and Dripps, M.W., 1998. Enhancement of pulmonary cleavence of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* following immunization with outer membrane protein CD in a mouse model. J. Intect. Dis., Vol.178, pp.1667-1675.

Nicorta, B., Rivera, M., Luman, I. and Wallace, R.J., 1986. *Branhamella catarrhalis* as a lower respiratory tract pathogen in patients with chronic lung disease. Arch. Intern. Med., Vol.146, pp.890-893.

Porsson, B., Haraldsdottir, V. and Kristjiansson, M., 1998. *Moraxella catarrhalis* bacteremia. A report on 3 cases and a review of literature. Scand. J. Infect. Dis., Vol.30.

Richter, S.S., Winkur, P.L., Brueggemann, A.B., Huynh, H.L., Rhomberg, P.R., Wingert, E.L. and Doern, G.V., 2000. Molecular characterization of the □-lactamase from clinical isolates of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* obtained from 24 U.S. medical centers during 1994-1995-1997-1998. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Vol.44(2), pp.444-446.

Roberts, M.C., 2002. Antibiotic toxicity, interactions and resistance development. Periodontology, Vol.28, pp.280-297.

Robyt, J.F. and White, B.J., 1987. Biochemical techniques theory and practice. 1st ed., Brooks / Cole, Montery, California.

Saito, H., Anaissie, E.J., Khardor, N. and Bodey, G.P., 1988. *Branhamella catarrhalis* septicemia in patients with leukemia. Cancer, Vol.61, pp.2315-2317.

Schalen, L., Anderson, K., Becker, K., Bergendel, B., Christensen, P., Fex, S., Kemme, C., Klingvall, B., Paterrson and Schalen, C., 1982. Acute laryngitis in adults. Etiological and phoniatric aspects. Acta Otolaryngol., Vol.386, pp.203-205.

Schalen, L., Christensen, P., Kamme, G., Miorner, H., Petterson, K.I. and Schalen, C., 1980. High isolation rate of *Branharrmella catarrhalis* from nasopharyn in adults with acute laryngitis. Scand. J. Infect. Dis., Vol.12, pp.277-280.

Sethi, S.L. and Murphy, T.E., 1995. Serum antibodies to outer membrane (OMPS) of *Moraxella (Branhamella) catarrhalis* in patients with bronchiectasis: identification of OMP B1 as an important antigen. Infect. Immun., Vol.63, pp.1516-1520.

Wald, E.R., 1992. Sinusitis in infants and children. Ann. Otol. Rhinollaryngol, Vol.101, pp.37-41.

Wright, P.W., Wallace, R.J. and Shepherd, J.R., 1990. A descriptive study of 42 case of *Branhamella catarrhalis* pneumonia. Am. J. Med., Vol.88(supp; 5A), pp.25-85.

Yang, Y.P., Myers, L.E., McGuinness, U., Chong, P. and Kwok, Y., 1997. The major outer membrane protein CD, extract from Moraxella (Branhamella) catarrhalis is a potential vaccine antigen that induce bactericidal antibodies FEMS. Immunol. Med. Microbiol., Vol.17, pp.187-199.