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

الوقاية المنفعلة للفئران ضد التحدي القاتل من جرثومة *Citrobacter freundii*

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

الخلاصة

تم استخلاص عديد السكريد الشحمي من جرثومة *C. freundii* بطريقة الفينول الساخن وتنقيته جزئيا بالترشيح الهلامي وحقنت الارانب به للحصول على المصول الممنعة وقدرت الاضداد النوعية له في تلك المصول و كانت بعيارية 1280:1 باستخدام تقنية التلازن المباشروبعيارية 640:1 عند استخدام تقنية التلازن الدموي المنفعل,واستخدم المصل الممنع في وقاية الفئران ضد الجرعة القاتلة LD_{100} من جرثومة *C. freundii* واظهرت النتائج ان المصل الممنع غير المخفف (Neat) والتخفيف 3:1 يقي الفئران من الجرعة المهلكة LD_{100} للعالق الجرثومي ولا يقيها عند تخفيفه إلى 10:1 و30:1 و100:1. 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_{100} 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 (Lipoppolysacharide 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 فأنه يسهم في الامراضية والأعراض السمية للاخماج الجرثومية (1).

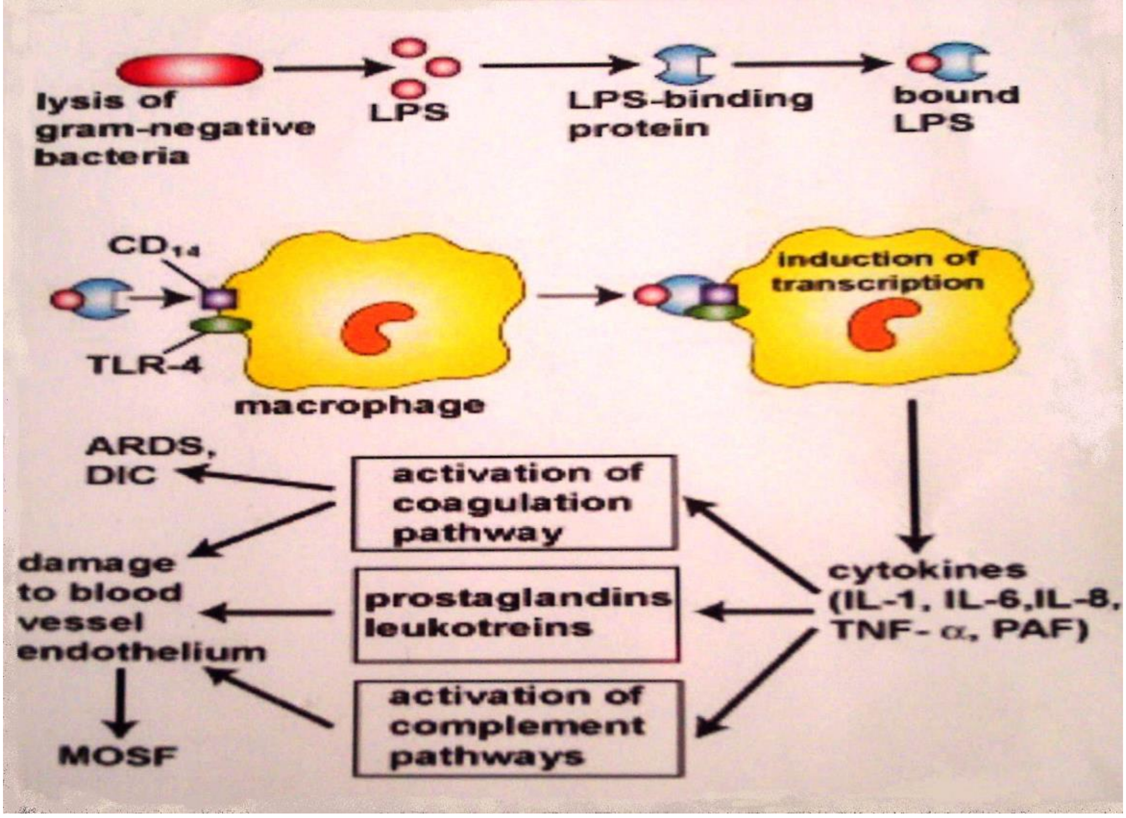
هنالك العديد من الجزيئات سواء كانت مستقبلات على سطوح الخلايا أو بروتينات رابطة لعديد السكريد الشحمي (LPS-binding proteins (LBP)) لها اهمية بالغة في توسط التداخل الحاصل بين عديد السكريد الشحمي والخلية الهدف وعند تحرر الذيفان الداخلي من الخلايا الجرثومية المتحللة إلى مجرى الدم فأنه سيرتبط ببروتينات البلازما الرابطة (LBP) التي تنقله إلى المستقبلات الكائنة على سطوح الخلايا الوحيدة والبلاعم الكبيرة في الأنسجة والأنواع الأخرى من المستقبلات الموجودة على سطوح الخلايا المبطنة، يعمل بذلك الارتباط على استحثاث إنتاج السايتوكينات (Cytokines)من تلك الخلايا مثل عامل النخر الورمي - ألفا ((Tumor necrosis factor ($TNF-\alpha$)) والانترليوكينات (IL_{-1} , IL_{-6} , IL_{-8}) وعامل تنشيط الأقراص الدموية ((Platelet activating factor (PAF)) وهذه السايتوكينات بدورها تحفز الوسائط الالتهابية القوية Leukotrines and Prostaglandine مؤدية إلى الصدمة السمية (Septic shock) (1,2,3) وكما موضح في الشكل (1).

إن 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 كالكلى 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 فشل العديد من الأعضاء (4,5).

إن عديد السكريد الشحمي المستخلص من جدران الجراثيم السالبة لملون غرام هو ممنع (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 استحثاث مقاومة غير نوعية للاخماج المختلفة (5,6).

يهدف البحث الى استخدام الاضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي المستخلص من الجراثيم السابة 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 α (TNF – α)
PAF: Platelet activating factor

ARDS: Acute respiratory distress syndrome
DIC: Disseminated intravascular coagulation
MOSF: Muliple 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 (Sepharose 6-B) بوساطة محلول دارئ الترس (Tris buffer) ذي الرقم الهيدروجيني 8.1 وضبطت سرعة الجريان (Flow rate) إلى 1 مللتر/دقيقة وقدر الحجم الميت للعمود باستعمال محلول صبغة الدكستران الأزرق اذ تم قياس الكثافة البصرية

لأجزاء الصبغة النافذة من الهلام على طول موجي 600 نانوميتر، أن الحجم الميت للهلام (V_0) (Void volume) 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 ملليتر 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 ملليتر لكل فأرة من عديد السكريد الشحمي في حين حقنت الفئران المتبقية من كل مجموعة بدارئ الفوسفات الملحي كسيطرة وتم حساب عدد خلايا الدم البيض (WBCs) لفئران المجموعة الأولى بعد مرور 24 ساعة من الحقن ولفئران المجموعة الثانية بعد مرور 48 ساعة ولفئران المجموعة الثالثة بعد مرور 72 ساعة ولفئران المجموعة الرابعة بعد مرور 96 ساعة.تم عد خلايا الدم البيض على وفق طريقة (8) .

4- تحضير المصول الممنعة لعديد السكريد الشحمي

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

5- تقدير الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في المصول الممنعة

تم اجراء اختبار الانتشار المناعي في هلام الاكاروز باتباع طريقة اوخترلوني Ouchterlony وفقا لما ذكره Pier وزملائه (10) للكشف عن وجود الاضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في المصول الممنعة ولتقدير تلك الاضداد تم اجراء اختبار التلازن المباشرDirect agglutination test واختبار التلازن الدموي المنفعلPassive haemagglutination test.

6- الوقاية المنفعلة 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 الاختبارعلى وفق طريقة(11) وكما يلي:
قسمت الفئران إلى 7 مجاميع بواقع 5 فئران للمجموعة الواحدة. حضر المصل الممنع والمبطل بتخافيف 3:1، 10:1، 30:1، 100:1. وحقنت مجاميع الفئران داخل البريتون بالمصل الممنع وكما يلي:
المجموعة الأولى: حقنت بـ 0.5 ملليتر من المصل الممنع بدون تخفيف لكل فأرة.
المجموعة الثانية: حقنت بـ 0.5 ملليتر من التخفيف 3:1 من المصل الممنع لكل فأرة.
المجموعة الثالثة: حقنت بـ 0.5 ملليتر من التخفيف 10:1 من المصل الممنع لكل فأرة.
المجموعة الرابعة: حقنت بـ 0.5 ملليتر من التخفيف 30:1 من المصل الممنع لكل فأرة.
المجموعة الخامسة: حقنت بـ 0.5 ملليتر من التخفيف 100:1 من المصل الممنع لكل فأرة.
المجموعتان السادسة والسابعة: حقنت بـ 0.5 ملليتر من دارئ الفوسفات الملحي لكل فأرة.

وبعد مرور 30 دقيقة حقنت فئران المجاميع (الأولى – السادسة) بـ 0.5 ملليتر من عالق جرثومة الـ *C. freundii* (1×10^9) 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.

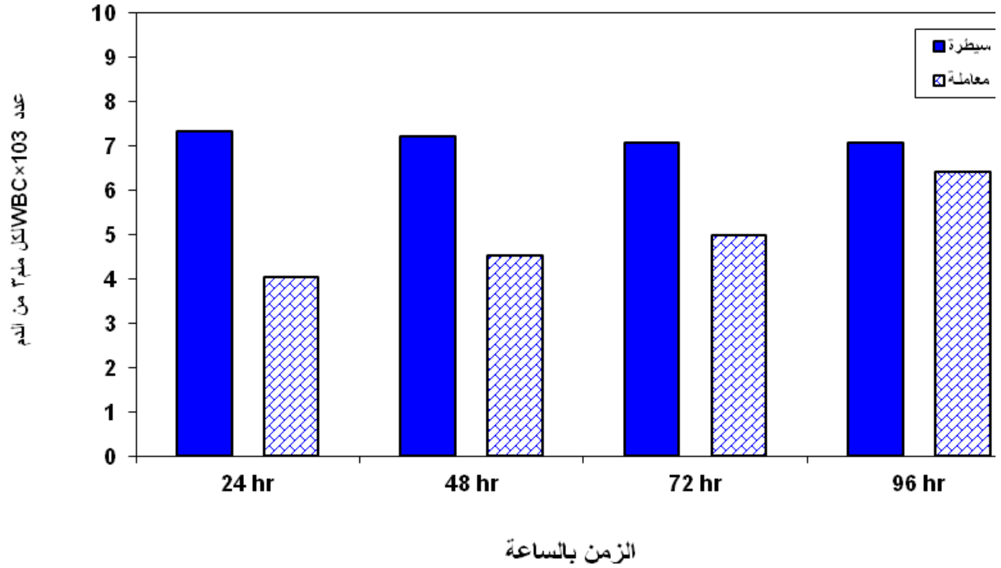
7- التحليل الإحصائي

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

حقنت الفئران بتركيز 125 مايكروغرام/ملليتر 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 4.06×10^{3} خلية/ملم^{3}، في حين بلغت للسيطرة 7.35×10^{3} خلية/ ملم^{3}، وبعد ذلك بدأت خلايا الدم البيض بالازدياد في الفترات 48 و72 و96 ساعة إذ بلغ العدد أقصاه 6.41×10^{3} خلية/ ملم^{3} مقارنة بالسيطرة التي بلغت 7.09×10^{3} خلية/ ملم^{3}. 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.

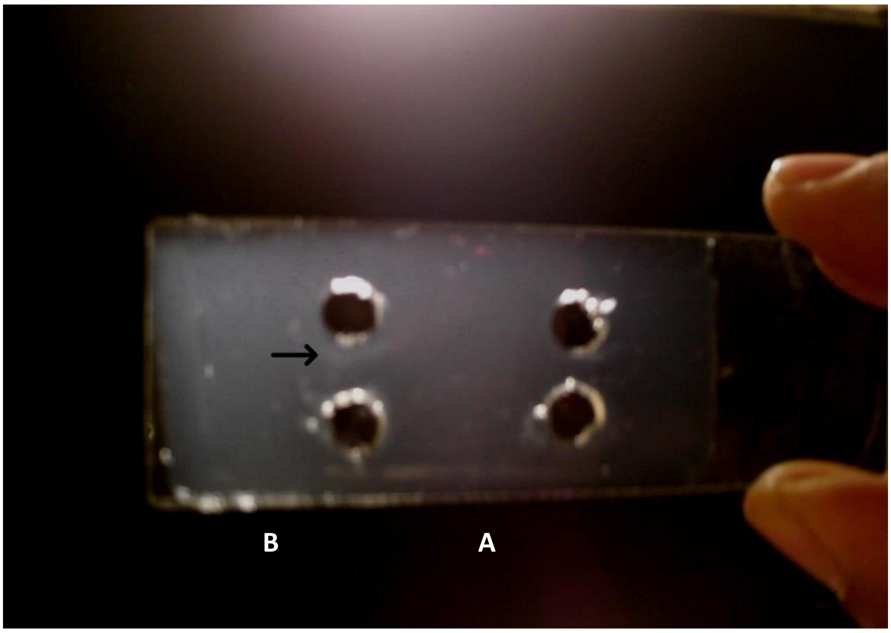


شكل (2) تأثير مستخلص LPS المنقى في عدد خلايا الدم البيض للفئران

2- التمنيع بعديد السكريد الشحمي وتقدير نواتج الاستجابة المناعية

بعد تمنيع الأرانب بعديد السكريد الشحمي تم الحصول على المصول الممنعة، 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 والمصول الممنعة، وكان ظهور الخط الترسيبي للمصول المضادة المركزة مع التخافيف 4:1 و8:1 من عديد السكريد الشحمي وبالعكس للمصول المخففة 4:1 و8:1 مع عديد السكريد الشحمي المركز ولم يظهر أي خط ترسيب للسيطرة المتمثلة بمصول حيوانات السيطرة والمصول ما قبل التمنيع ودارئ الفوسفات الملحي، (الشكل 3) إن ظهور الخط الترسيبي دليل على التفاعل النوعي بين عديد السكريد الشحمي والأجسام المضادة النوعية في المصول الممنعة وهذا الترسيب يعتمد على عدة عوامل كالتركيب الكيمياوي 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 المصول الممنعة باستعمال طريقة التلازن المباشرة Direct agglutination مع العالق الجرثومي، فكانت عيارية الأضداد 1280:1.



شكل (3) تفاعل الانتشار المناعي الثنائي
← 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/ملليتر أما عيارية الأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي فكانت 640:1، 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 640:1 مع الإشارة إلى أن كلتا الباحثتين استعملت طريقة التلازن الدموي المنفعل في تقدير عيارية الأضداد.

إن العيارية العالية للأضداد النوعية لعديد السكريد الشحمي في مصول الحيوانات الممنعة عزاها 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 800:1 في حين أعطى التمنيع بدون استعمال مساعد فروند الكامل عيارية 160:1 للأضداد.

3- الوقاية المنفعلة للفئران ضد الجرعة المهلكة LD_{100} 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_{100} من جرثومة *C. freundii* وذلك عن طريق حقن الفئران بالمصول الممنعة والعالق الجرثومي بتركيز 10^9 خلية/ ملليتر 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 3:1 يقي الفئران من الجرعة المهلكة LD_{100} للعالق الجرثومي ولا يقيها عند تخفيفه إلى 10:1 و30:1 و100:1. وذلك بالمقارنة مع السيطرة السالبة والموجبة الموضحة في جدول (1).

جدول (1) الوقاية المنفعلة للفئران ضد الجرعة المهلكة 100 (LD_{100}) من جرثومة *C. freundii*، باستعمال مصل الأرنب الممنع

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

سيطرة 1 حقن الفئران بـ PBS + 10^9 خلية جرثومية/ فأرة

سيطرة 2 حقن الفئران بـ PBS.

إن نتائج هذا البحث كانت مقاربة نوعاً ما لدراسات عديدة أخرى، فقد أثبتPier وزملائه (17) أن المصل الممنع 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 الأخماج 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 (Bactercidal) التي استخلص منها عديد السكريد الشحمي أو غيرها (25). وهنالك إشارة إلى أن المصول المضادة 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. 1st ed. Mosby-Year Book, USA.

5- Brooks, G.F.; Butel, J.S. and Morse, S.A. (2001). Jawtez, Melnick and Adelberg's Medical microbiology. 22nd 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 lipoplysaccharide. *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. 15th 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. 15th ed. USA.

13- Portner, A.; Peter-Katalinic, J.; Brade, H.; Unland, F.; Buntemeyer, 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. 2nd ed. Belin, Heidlberg, 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 baumanni* 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 eldery 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^+ 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). Pathogensis 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 *Escherrichia coli* O_{157} and other lipopolysaccharides in healthy children and adults. *Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10*(5): 797-801.