تصنيع عدة تشخيصية محلية لجرثومةال *Salmonella typhimurium.*

زينب سامي حبيب
معهد المصول واللقاحات
وزارة الصحة -العراق

وامل ماجد الشاوي
فرع الاحياء المجهرية-كلية الطب
البيطري-جامعة بغداد-العراق

ومنعم مصطفى فتحي
مختبر الصحة المركزي
وزارة الصحة - العراق

تاريخ التسليم 17/06/2008
تاريخ القبول 25/11/2008

الخلاصة

تم تحضير بعض المستضدات الجرثومية الجسمية والسوطية من عترة معزولة من الانسان وعترة معزولة من الابقار ومنعت الارانب بها عن طريق الحقن في الوريد وبجرع تصاعدية حيث تم الحصول على المصول المضادة (Hyperimmune serum) وباستخدام عملية الامتصاص جعلت المصول المناعية المضادة المحضرة خاصة بالمستضد المحقون .

اظهرت نتائج معايرة الاجسام المضادة استجابة مناعية عالية حيث تم الحصول على معيار اجسام مضادة يساوي 2560/1 للمستضدات السوطية i لكلا المصلين, و 5120/1 للمستضدات الجسمية 4 , 5 لكلا المصلين .

كما تم لأول مرة تحضيرعدة تشخيصية من المستضدات الجسمية والسوطية لعتر *S.typhimurium* المعزولة من الانسان والابقار وحسب طريقة ويدال , فاعطت نتائج جيدة .

Preparation of Local Diagnostic Kit for *Salmonella typhimurium.*

Zainab Sami Habeeb, Serum & vaccines institution, Minstry of health, Iraq

Amal Majid Al-Shawi Dept. of microbiology, college of Vet. Med., Baghdad University, Baghdad -Iraq

and Muniem M. fathi health central lab., Minstry of health, Iraq

Summary

Some of somatic and flageller antgens from both the human and animal isolates were prepared, and were used to Immunize a group of rabbits by intravenous injections at an upgrading doses.The results of this immunization showed the gaining of an excellent hyperimmune serum. With the use of absorptions technique amonospecific antiserum was obtained for the specific injected antigenes, the standardization of the antibodies showed a highly immune response reading. 1: 2560 , 1: 5120 to H:I and O: 4.5 Antigens respectively for both antisera.

This study showed the report for the 1st time the preparation for diagnostic kit for somatic and flagellar antigens to *S. typhimurium* comparing this method to Widal test with a good results and Response

المقدمة

ان الاصابة بـال*Salmonella typhimurium* تعد احد اهم مسببات حالات التسمم الغذائي في الانسان (1) . وتعد هذه الاصابة من اهم المشاكل التي تواجه المجتمعات في جميع انحاء العالم بما في ذلك العراق, ومن اكثر الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان شيوعا(2).

وتسبب الاصابة بـال*Salmonella typhimurium* اصابة متوسطة او شديدة كما قد تؤدي الى نسبة من الهلاكات في الحيوانات الاقتصادية مما قد يؤدي الى خسائر اقتصادية وانتاجية في هذه الحيوانات (3) وهذا يستوجب الحد من انتشار هذه الجرثومة وذلك بسرعة التشخيص ومن ثم العلاج ولذا فقد استهدفت الدراسة تصنيع عدة تشخيصية محلية لهذه الجرثومة.

المواد وطرق العمل

المواد:

1-الامصال المستخدمة :

تم استخدام امصال لعشرة اشخاص مصابين بال*S.typhimurium* وامصال لعشرة اشخاص اصحاء , كما تم استخدام امصال لاربعة ابقار مصابة بال*S.typhimurium* وامصال لعشرة سليمة , وذلك لغرض تقييم العدة التشخيصية المحضرة حسب طريقة ويدال .

2- العتر الجرثومية المستخدمة في امتصاص المصول المضادة:

تم استخدام عترة جرثومية واحدة لكل من جرثومة *S.paratyphi-A* وجرثومة *S.paratyphi-B* المبينة مستضداتها الجسمية والسوطية (جدول 1) . وكذلك لغرض امتصاص الاجسام المضادة المشتركة في المصول المضادة المحضرة .

جدول (1): مستضداتها الجسمية والسوطية

النمط المصلي	المستضد الجسمي	المستضد السوطي	
		الطور الاول	الطور الثاني
S. paratyphi-A	1 , 2 , 12	a	-
S. paratyphi-B	1, 4, 5, 12	b	1, 2

3- العدد التشخيصية المستخدمة:

تم استخدام عدتي الويدال والروزبنكال في تقييم المصول المضادة المحضرة للمستضدين الجسميين 4 , 5 . والمستضد السوطي I .

4-الحيوانات المختبرية :

تم استخدام 4 أرانب بأوزان تتراوح بين 2.5 - 3 كغم وقد تم الحصول عليها من معهد المصول واللقاح / وزارة الصحة ، وتم التأكد من عدم حقنها مسبقاً واستعمال نظام تربية جيد من حيث استخدام الاعلاف المركزة مع ملاحظة عدم حدوث اصابات أو علامات سريرية غير مرغوب فيها ، وقد وضعت الارانب باقفاص منفصلة.

طرائق العمل :

1- تحضير المستضدات المناعية Preparation of Immunizing Antigens:

هيئت عتر نقية من جرثومة *S.typhimurium* المعزولة من الإنسان والعجول والمشخصة مصلياً . وتم زرع كل عزلة بصورة منفصلة حيث تم تحضير المستضدات المناعية لكلا العزلتين بصورة مستقلة . وقد تمت عملية الزرع في ظروف تعقيم عالية .

أ- تحضير المستضدات الجسمية**:** (Somatic Antigens) :

حضرت المستضدات الجسمية حسب طريقة(4)وتتلخص بما يلي:

- نميت العتر الجرثومية على الوسط المغذي (Nutrient agar) وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .
- تم فحص المزروع الجرثومي للتاكد من خلوه من التلوث بجراثيم اخرى وذلك باضافة 5 مل من دارئ الفوسفات الملحي الى الطبق المزروع عمل عالق جرثومي منه باستخدام الناقل المعدني ثم عملت لطخة صبغت بصبغة كرام للتاكد من عدم تلوثها. سحب العالق الجرثومي بواسطة سرنجة معقمة وتم اضافته الى قنينة معقمة حاوية على 20 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي ، مزج جيداً ثم تم توزيعه على فالكونات زجاجية بواقع 5 مل لكل فالكونه وقد تم استخدام 5 فالكونات لكل عزلة وذلك للحصول على نمو كثيف ، حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .
- تم عمل عالق جرثومي باضافة 20 مل من محلول دارئ الفوسفات الملحي الى كل فالكونه وفحصها بعمل لطخات تصبغ بصبغة كرام للتاكد من خلوها من التلوث بجراثيم اخرى. جمع الحاصل الجرثومي في دورق ووضع في حمام مائي بدرجة 100 م° لمدة ساعتين لقتل الخلايا الجرثومية والتخلص من الاسواط .

- في اليوم التالي تم اجراء فحص العقامة وذلك بزرع نماذج من الدورق على وسط الدم الصلب ، ووسط ماكونكي ، والمرق المغذي حضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة ، للتاكد من قتل الخلايا وكذلك التاكد من سلامة الحاصل الجرثومي وعدم تلوثه وتم فحصه بعمل لطخات صبغت بصبغة كرام.
- بعد التأكد من عدم ظهور نمو في الاوساط المزروعة اعلاه . تم ترسيب الخلايا الجرثومية بواسطة المنبذة المبردة بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة وعلق الراسب في دارئ الفوسفات الملحي وغسل مرتين ثم اعيد تعليقه مرة اخرى في الدارئ نفسه .

ب- تحضير المستضدات السوطية: - استخدمت طريقة(5) وتتلخص بما يلي :

- اختيرت المستعمرات النشطة الحركة بعد تنقيتها على الوسط نصف الصلب الخاص بالحركة والمحضر من وسط المرق المغذي مضافاً اليه 0.2% من الاكار .
- تم تلقيح 500 مل من وسط نقيع القلب والدماغ السائل بـ 1 مل من المزروع الجرثومي النشط الحركة وبعمر 18 ساعة ، حضنت بدرجة 37 م° لمدة 18 ساعة .
- اضيف له حجم مساو من دارئ الفوسفات الملحي الذي يحتوي على 0.4% فورمالين بتركيز 40% لتثبيت الاسواط على سطح الخلايا.
- في اليوم التالي تم اجراء فحص العقامة كما في الفقرة 1-أ
- تم ترسيب الخلايا الجرثومية بواسطة المنبذه المبردة بسرعة 10000 دورة/دقيقة لمدة 10 دقائق وغسلها بدارئ الفوسفات الملحي واعادة تعليقها .

2-تحضير العدة المناعية التشخيصية :

تم تحضير العدة المناعية التشخيصية حسب طريقة(6). حيث تم استخدام المستضدات المناعية المحضرة في الفقرة- 1- واضيفت صبغةGention violet الى المستضدات الجسمية ، وصبغة Safranin الى المستضدات السوطية ، وتركت قليلاً على جهاز التحريك المغناطيسي لكي يتجانس صبغ المستضدات . وحفظت في الثلاجة الى اليوم التالي . حيث تم تحرير المستضدات من الصبغة الزائدة باستعمال المنبذه المبردة (10000) دورة/دقيقة لمدة (10) دقائق ثم خففت بنسبة 1:30 باستعمال دارئ الفوسفات الملحي الحاوي على 0.03% فورمالين ثم تضاف له مادة المرثايوليت الى الحافظة بتركيز 0.01%.

3- تحضير المصول المضادة :

اتبعت الطريقة التي وصفها(7) في عملية تحضير المصول المناعية حيث استخدمت 4 ارانب وحقن كل ارنب باحد المستضدات المحضرة في الفقرة -1- المأخوذة من الإنسان والحيوان كلاً على حده .

طريقة العمل:

أ-الحقن :

- ضبط تركيز الخلايا الجرثومية في العالق وفق طريقة ماكفرلاند ليعطي تركيز للخلايا مقداره (18×10^{8}) خلية/مل .
- وضعت الارانب في اقفاص منفصلة,وفحصت عينات دم منها للتاكد من عدم تعرضها سابقاً لهذه الجراثيم أو مستضداتها التي سيتم حقنها وذلك باخذ المصل ثم اجراء اختبار التلازن على الشريحة الزجاجية ضد المستضدات التي سيتم حقنها.
- تم حقن الارانب بالمستضدات بجرع تصاعدية عن طريق الوريد الخافي الاذني (Margenal ear ven)(الجدول 2) .

جدول (2):طريقة تمنيع الارانب ضد مستضدات جرثومة *S.typhimurium*

اليوم	موقع الحقن	كمية الجرعة (مل)	الملاحظات
(0)	-	-	تم سحب كمية قليلة من الدم قبل التمنيع
1	الوريد الحافي الاذني	0.2	-
5	الوريد الحافي الاذني	0.5	-
10	الوريد الحافي الاذني	1	-
15	الوريد الحافي الاذني	1.5	-
20	الوريد الحافي الاذني	2	-
30			سحب دم من قلب الارنب

ب-جمع الدم :

- تركت الارانب بدون غذاء باستثناء الماء لمدة 12 ساعة قبل اجراء عملية سحب الدم.
- تم اجراء عملية سحب الدم بعد مرور 10 ايام من اخر حقنه بالمستضد.
- تم سحب الدم من القلب مباشرة ووضع في انابيب خاصة بجهاز النبذ المركزي .

جـ-فصل وحفظ المصول المضادة:

- تركت الانابيب في الحاضنة لمدة نصف ساعة قبل اجراء عملية النبذ المركزي لاتمام عملية التخثر.
- نبذت عينات الدم بواسطة المنبذه بسرعة 2500 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة.
- اعيدت هذه العملية مرتين للتخلص من كريات الدم الحمراء الباقية.
- اضيفت مادة المرثايوليت الحافظة (0.01%) الى المصل.
- وضعت المصول في قناني ذات سدادات محكمة وحفظت في الثلاجة بدرجة 4 م°.

4- امتصاص المصول المضادة :

اتبعت الطريقة الموصوفة من قبل(8) للحصول على المصول المضادة الخاصة بالنوع .

طريقة العمل:

- حددت بعض العتر الجرثومية لاجراء عملية الامتصاص مع كل مصل من المصول المناعية المضادة وكل على حدة. وقد شملت العتر الجرثومية : *S. paratyphi A* و *S. paratyphi B* .
- نميت هذه العتر على الوسط المغذي الصلب وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة .
- حصد المزروع باستعمال دارئ الفوسفات الملحي الحاوي على 0.5% فورمالين لقتل الخلايا الجرثومية .
- بعد 24 ساعة تم التأكد من قتل الخلايا وعدم تلوثها وذلك بزرع نموذج من الحاصل

الجرثومي على وسط الدم الصلب ووسط ماكونكي ومرق نقيع القلب والدماغ . وحضنت بدرجة 37 م° لمدة 24 ساعة . كما تم عمل لطخات صبغت بصبغة كرام وفحصت مجهرياً للتأكد من عدم التلوث .

- تم نبذ الحاصل الجرثومي بجهاز النبذ المركزي 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة .
- اخذ الراسب واضيف له المصول المضادة على النحو الاتي :

أ-اضيف المصل المضاد للمستضدات السوطية الى مستضدات جرثومة*S. paratyphi B* للحصول على الضد H:i .

ب-اضيف المصل المضاد للمستضدات الجسمية الى مستضدات جرثومة*S. paratyphi A* للحصول على الاضداد O : 5 , 4 .

- وضع المزيج في الحاضنة لمدة ساعة . ثم وضع في الثلاجة بدرجة 4 م° الى اليوم التالي .
- نبذ المزيج في المنبذه 10000 دورة/دقيقة لمدة 15 دقيقة . ثم اهمل الراسب واخذ الرائق واعيدت العملية مرة اخرى للتخلص من بقية المستضدات.
- رشح المصل بواسطة المرشح 0.22 ملي مايكرون .
- تم اجراء فحص التلازن على الشريحة الزجاجية وكذلك التلازن بواسطة الانابيب للتأكد من استمرار قابلية تلازن هذه المصول مع المستضدات المماثلة لها.
- تم التأكد من التخلص من الاجسام المضادة للمستضدات المشتركة وذلك باجراء اختبار التلازن مع مستضدات عدة الويدال والتأكد من عدم اعطاء تلازن مع مستضداتها عدا*S. paratyphi (B-O)* وذلك لاحتواءها على المستضدات المشتركة , 5 , 4 .

5- قياس المعيار الحجمي للاجسام المضادة بطريقة التلازن في الانابيب Tubes Agglutination test **:**

استعمل هذا الاختبار لمعايرة الاجسام المضادة للمستضدات المحقونة وكل على حدة ، وحسب الطريقة الموصوفة من قبل(9) وعلى النحو الاتي:

- تم تهيئة 12 انبوباً صغيراً لاجراء هذا الفحص وقد خففت المصول تخفيفاً مضاعفاً باستعمال دارئ الفوسفات الملحي ذي الاس الهيدروجيني 7.2 .
- وضع في الانبوب الاول 0.9 مل من دارئ الفوسفات الملحي اما بقية الانابيب فأضيفت اليها 0.5 مل من هذا الدارئ.

اضيفت كمية (0.1) مل من المصل المراد فحصه الى الانبوب الاول ومزجت جيداً ثم نقل 0.5 مل الى الانبوب الثاني وهكذا حتى الانبوب رقم 12 حيث اهملت اخر 0.5 مل ، وبذلك اصبح التخفيف من 1:10 في الانبوب الاول الى 1:20480 في الانبوب (12).

- حضر عالق المستضد الذي استعمل في التمنيع واضيفت منه كمية 0.5 مل الى كل الانابيب ، مزجت جيداً ووضعت في الحاضنة بدرجة 56 م° لمدة 4-18 ساعة للمستضدات السوطية و 18 ساعة للمستضدات الجسمية (10)حيث سجلت النتائج بعدها وكانت النتيجة موجبة عند ملاحظة تكتل في قعر الانبوبة بشكل شبكي مع صفاء السائل الذي يعلوها أو بوجود تعكر بسيط مع تكتل في قعر الانبوبة والذي يبدو اوضح عند تحريكه بلطف.
- يحدد المعيار الحجمي للاجسام المضادة على انه معكوس اخر تخفيف للمصل يعطي نتيجة موجبة مع المستضد .

السيطرة:

1-السيطرة الموجبة : عبارة عن انبوب يحتوي على المصل المضاد وعالق المستضد فقط .

2-السيطرة السالبة: عبارة عن انبوب يحتوي على دارئ الفوسفات الملحي وعالق المستضد فقط

النتائج

1- تقييم العدة التشخيصية المحضرة حسب طريقة ويدال :

تم تقييم هذه العده باستخدام المصول المضادة القياسية المتعددة والخاصة بالنوع حيث اعطت نتائج موجبة معها ، وكذلك تم استخدام امصال لاشخاص ثبت من خلال تشخيص الزرع الجرثومي انهم مصابون بـ *S.typhimurium* كما استخدمت امصال لاشخاص اصحاء كسيطرة . ونفس الشيء بالنسبة لامصال العجول والابقار وكما موضح في الجدول (جدول 3) . وكانت نتيجة فحص التلازن موجبة مع امصال المصابين وسالبة مع امصال السيطرة . ولكنها اعطت نتيجة موجبة مع امصال الاشخاص المصابين بحمى التيفوئيد نتيجة لوجود المستضدات المشتركة .

جدول (3) :نتائج اختبار تقييم العدة التشخيصية المحضرة حسب طريقة ويدال

الامصال	العدد	نتيجة فحص التلازن مع المستضدات الجسمية	نتيجة فحص التلازن مع المستضدات السوطية
مصل الانسان المصاب *S. typhimurium*	10	+	+
مصل الانسان المصاب بحمى التيفوئيد	10	+	+
مصل الانسان السليم (السيطرة)	10	-	-
مصل الابقار المصابة *S. typhimurium*	4	+	+
مصل الابقار السليمة	10	-	-

2- امتصاص المصول المضادة :

امتصت المصول المضادة المحضرة مع عدد من المستضدات الجرثومية القريبة لها (Related antigens) وبذلك تم ازالة الاجسام المضادة المشتركة (Related antibodies) واختزل أي تفاعل تصالبي (cross reaction) ممكن حدوثه فاصبحت المصول المناعية المضادة المحضرة خاصة بالنوع .

3- تقييم المصول المضادة الخاصة المحضرة :

أ- اختبار التلازن على الشريحة الزجاجية :

تم اختبار قابلية المصول المضادة المحضرة على التلازن مع المستضدات المماثلة لها (Homologous antigen) ووجد أن كل نوع مستضدي قد اعطى تلازن واضح مع المصل المضاد له . حيث اظهرت النتائج تلازن واضح للمصل المضاد H : i مع المستضدات السوطية لجرثومة الـ *S.typhimurium* كما اظهر المصل المضاد O: 4,5 تلازن واضح مع المستضدات الجسمية لجرثومتي الـ *S. typhimurium* و *S.paratyphi B* .

كما فحصت المصول المضادة المحضرة بالمستضدات غير المماثلة (Heterologous antigen) لجراثيم S.typhi ، S.paratyphi B ، S.paratyphi A ووجد بانها لا تعطي أي تلازن معها . ومن اجل المزيد من الدقة فقد استخدمت نماذج لمستضدات بعض الجراثيم التي قد تعطي تفاعل مشترك مع الامصال المضادة المحضرة في هذه الدراسة مثل Brucella ، Proteus فاعطت نتائج سالبة مما يدل على خصوصية هذه الامصال . وكما موضح في الجدول (جدول4) .

جدول (4) : نتائج اختبار التلازن للمصول المضادة الاحادية المحضرة مع بعض المستضدات ذات العلاقة

المصل المضاد	*المستضدات*					
	S.para-typhi A	*S.para- typhi B*	*S.typhi*	*S.typhim- uium*	*Proteus*	*Brucella*
H: I	-	-	-	+	-	-
O: 4,5	-	+	-	+	-	-

ب- اختبار التلازن في الانابيب :

تم قياس المعيار الحجمي للمصول المضادة المحضرة كل على حدة حيث كان المعيار الحجمي للاجسام المضادة للمستضد السوطي H:i هو 2560/1 . لكلا المصلين المحضرين من العزلة الحيوانية والعزلة البشرية .

اما الامصال المضادة للمستضدين الجسميين (5,4) فكان معيارها الحجمي 5120/1 لكلا المصلين المحضرين من العزلة البشرية والعزلة الحيوانية.

المناقشة

ان الحيوانات المصابة سواء كانت منتجة للحليب أو من مجاميع حيوانية اخرى يجب أن تشخص بالسرعة الممكنة لكي يتم عزلها عن بقية الحيوانات وبذلك يمكن السيطرة على انتشار المرض. فعند تفشي الاصابة في حيوانات المزرعة أو في محطات التربية تسبب تكاليف مادية ملحوظة وفي بعض الحالات يؤدي الى غلق مؤقت للحقل(11). مما دعانا الى تحضير العدة التشخيصية المنجزة حسب طريقة ويدال للكشف عن الاجسام المضادة في مصول الحيوانات المصابة وهذه الطريقة اسرع من طريقة الزرع المختبري للبراز وبذلك يمكن الاسراع في اتخاذ التدابير اللازمة للوقاية والحد من انتشار المرض . ان هذا الفحص تم استخدامه لاول مرة في جرثومة *S.typhimurium* واعطى نتائج جيدة .

لقد عد اختبار التلازن المصلي بالانابيب وعلى الشريحة الزجاجية ذا فائدة في تقييم الحالة الجماعية للحيوانات في القطعان الحقول او احد اختبارات المسح العام ولم تقتصر فحوصات التلازن على مصل الدم بل اجري الاختبار نفسه على شرش الحليب لتشخيص الاجهاض في الابقار نتيجة الخمج بجراثيم *S.typhimurium*(12).

ولغرض اجراء التشخيص المصلي الدقيق لعتر *S.typhimurium* المعزولة من حالات الاسهال في الانسان والعجول فقد تم تحضير المصل المضاد فائق المناعة Hyperimmune serum للمستضد السوطي i والمستضدين الجسميين 4، 5 .

وقد اظهر قياس المعيار الحجمي للاجسام المضاده في المصول المناعية المحضره من العتر المعزولة من الانسان والعجول على التوالي ولكل من المستضدين الجسميين والمستضد السوطي وكل على حده ان مستوى الاجسام المضاده كان مرتفعاً وهذا يشير الى الاستجابة المناعية العالية من الحيوانات المحقونة بالمستضدات ومن ثم انتاج للاجسام المضاده بهذا المعيار المرتفع مما يدل على ان مستضدات الجرثومة قيد الدراسة هي محفزات مناعية جيدة.

وقد تم الحصول على المصل المضاد الخاص باجراء عملية امتصاص المصول المناعية المحضرة مع الجراثيم التي تمتلك مستضدات مشتركة مع جرثومة الـ *S.typhimurium* مما ادى الى اختزال أي تفاعل تصالبي ممكن حدوثه وقد تم التأكد من ذلك باستخدام عدد من الجراثيم ذات المستضدات المشتركة ولم تعطي أي تلازن مع المصول المضاده المحضرة مما يدل على اختزال التفاعلات التصالبية وهذا يتفق مع ما اورده (8).

المصادر

1- Gallardo, F.; Ruiz, J.; Marco, F.; *et al*., (1999). Increase in incidence of resistance to ampicillin, chloromphenicol and trimethoprim in clinical isolates of *Salmonella* serotype *Tyhimurium* with investigation of molecular epidemiology and mechanisms of resistance, J. Med. Microbiol., 48: 367-374.

2- Tamada,Y.; Nakaoka, Y.; Nishimori, K.; *et al*., (2001). Molecular Typing and Epidemological Sudy of *Salmonella enterica* Serotype *Typhimurium* Isolates from cattle by Fluorescent

Amplified-Fragment Length Polymorphism Finger printing and Pulesed-Field Gel Electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 39: 1057-1066.
3- Wells, S.J.; Cray, F.; Dargatz, D.A., *et al*., (2001). Fecal shedding of *Salmonella* Spp. by dairy Cows on farm and at cull cow markets. J. Food. Prot. 64(1): 3-11.
4- Kwapiniski, J.B.G. (1972). Methodology of immunochemical and immunological research. New York London. John Wiley and Sons. Inc. pp.:37-39.
5- Campbell, D.h.; gravey, J. S.; Cremer, N.E., and Sussdorf, D.H. (1964). Methods in immunology. W.A. Benjamin, Inc. U.S.A pp. 118-120.
6- Widal, F. (1896). Serodiagnostic dela fiever typhoid. Bull Med. Hosp. Paris, 13:561-566.
7- Hellman, J.; Zanzoter, E.M.; Loiselle, P.M.; *et al*., (1997). Antiserium against *Esherichia coil* J5 contains antibodies reactive with outer membrane proteins of the heterologous Gram-Negative Bacteria. J. Infect. Dis. 176:1260-8.
8- Jawetz, E.; Melnick, J.L.; and Adelberg, E.A. (2001). Antigen and reactions In: Medical Microbiology 22ed. Hall International Inc. U.S.A.
9- Harley, J. P., and Prescott, L. M. (1995). Laboratory exercises in microbiology 2nd. ed. W. M. Brown puplisherd. Melbourne, Australia. Pp.198-200.
10- Carpenter, P.L. (1975). " Immunology and Serology third edition. Philadelphia London. Toronto W.S. Saunders company, P. 315.
11- Ewart, S.L., schott, H.C.; robinson, R.L., *et al*., (2001). Identification of sources of *Salmonella* organisms in a veterinary teaching hospital and evaluation of the effects of disinfectants on detection of *Salmonella* organisms on surface materials, J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 1145-1151.
12- Radostits, O. M., Blood, D.C. and Gay, C.C. (1994). Veterinary Medicine (8th ed.). Bailliere Tindal, London PP. 643-657.