مجله میکرب شناسی پزشکی ایران
سال ۵ شماره ۷، زمستان ۱۳۹۰، صفحات ۱۳- ۷

استخراج و تخلیص لیپوپلی ساکارید *سالمونلا اینتریتیدیس* و ارزیابی فعالیت تب زایی در خرگوش

اکرم ملک پور[۱]، دکتر مهدی هدایتی[۲]، دکتر حمید رضا احمدی آشتیانی[۳] ، دکتر محمد رهبر[٤]، دکتر حسین رستگار[٥]

۱- گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، ایران
۲- مرکز تحقیقات پیشگیری و درمان چاقی، پژوهشکده علوم غدد درن ریز و متابولیسم، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۳- - گروه بیوشیمی و تغذیه دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشجوی دوره دکترای تخصصی بیوشیمی بالینی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران- ایران
٤- بخش میکروب شناسی- آزمایشگاه مرجع سلامت -تهران ایران
۵- مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا ودارو وادارهکل آزمایشگاههای غذا ودارو-وزارت بهداشتو درمان -تهران -ایران

نویسنده مسئول:دکتر حسین رستگار
دکترای تخصصی بیوتکنولوژی دارویی، دانشیار و هیئت علمی مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
آدرس: تهران خیابان امام خمینی نرسیده به تقاطع ولی عصر اداره کل و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو
تلفن همراه: ۰۹۱۲۵۱۳۵۲٤۷ محل کار: ٦٦٤۹٦۱۵۲-۰۲۱ دورنگار: ٦٦٤۰٤۳۳۰
پست الکترونیک (Email): mhrastegar@yahoo.com

چکیده:

زمینه و اهداف : باکتری سالمونلاجزو خانواده آ نتروباکتریاسه و باسیل های گرم منفی تاژه دار است که اکثر سروتیپ های آن توانایی حرکت دارند. لیپوپلی ساکارید (LPS)، عامل اصلی تعیین کننده ویرولانس باکتری است که با اتصال به سطح سلول پیوند شده و فقط در هنگام لیز شدن باکتری آزاد می شود، به آن اندوتوکسین نیز می گویند. هدف از این مطالعه استخراج LPS با روش متانول کلروفرم و آزمایش تب زایی این ترکیب در خرگوش میباشد.

روش بررسی: استخراج LPS از باکتری سالمونلا اینتریتیدیس به روش متانول – کلروفرم انجام گردید. طی فرآیند استخراج سه لایه تشکیل گردید: لایه رویی حاوی ترکیب LPS در متانول، لایه وسطی حاوی سلولهای تخریب شده در آب، و لایه سوم حاوی ترکیبات چربی در کلروفرم بود. سپس لایه های حاوی متانول و کلروفرم به لوله دیگری منتقل شده و در زیر هود تبخیر گردید. آنچه باقی ماند، LPS استخراج شده باکتری بود. خلوص ترکیب استخراج شده با LPS استاندارد در ژل ۱۲٪ آگارز الکتروفورز گردید و با رنگ آمیزی نیترات نقره بررسی شد. نهایتا میزان تب زایی LPS استخراج شده در خرگوش مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها : بررسی باندهای الکتروفورز شده نمونه LPS استخراج شده خلوص مشابهی با نمونه استاندارد را نشان داد. در ضمن تب زایی ۰/٦ درجه در خرگوش ایجاد نمود.

نتیجه گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان داد روش استخراج متانل – کلروفرم قادر به استخراج LPS با درجه خلوص مشابه LPS استاندارد می باشد. پیروژن بودن ترکیب استخراج شده حاکی از حفظ ساختار و عملکرد آن می باشد.

واژگان کلیدی: استخراج، لیپوپلی ساکارید، سالمونلا اینترتیدیس، آزمون تب زایی در خرگوش

مقدمه:

باکتری سالمونلا یکی از اعضاء خانواده آنتروباکتریاسه است که به صورت باسیل های گرم منفی تاژه دار هستند و اکثر سروتیپ های آن توانایی حرکت دارند. این جنس به صورت هوازی و یا بی هوازی اختیاری است و شرایط رشد بهینه آن، دمای ۳۷ درجه سانتیگراد با pH=۶-۸ می باشد(۱). جنس سالمونلا اغلب در مواد غذایی شامل گوشت، مرغ و محصولات لبنی فاقد تیمار حرارتی همانند سس مایونز، کرم ، خامه و بستنی یافت می شود(۲). در حرارت بالا به دلیل فاسد شدن گوشت و مرغ ، احتمال فعالیت جنس سالمونلا در آنها زیاد شده که با مصرف این گونه مواد غذایی سالمونلا از طریق دهان به روده انسان راه پیدا کرده و به سلول های اپتلیوم روده کوچک متصل شده و مسمومیت غذایی[1] ایجاد می کند(۳).مسمومیت ایجاد شده توسط سالمونلا اغلب با اسهال، استفراغ ، تب و گاهی وجود خون در مدفوع همراه است(٤). پوشش سلولی باکتری های گرم منفی یک ساختمان چند لایه ایی بسیار پیچیده است که از داخل به خارج به ترتیب عبارتند از غشای سیتوپلاسم (غشای داخلی) ، غلاف نازکی از پپتید و گلیکان و غشای خارجی می باشد. لیپوپلی ساکارید ملکولی آمفی پاتیک است که با استفاده از پیوند های هیدروفوبی به غشاء خارجی اتصال یافته است. سطح خارجی LPS باعث ارتباط بین باکتری و محیط اطرافش می شود و ساختار آن در پایداری نفوذ پذیری انتخابی غشاء خارجی۲ دخالت دارد(۵). لیپوپلی ساکارید درغشای بیرونی باکتری های گرم منفی مثل Salmonella ، Neisseria، Haemophilus، E.coli، Pseudomonas، Shigella. وجود دارد و از دو قسمت عمده لیپیدی و پلی ساکاریدی تشکیل شده است و نام دیگرش اندوتوکسین باکتریایی می باشد. ایمونوژن بودنLPS هم به علت بخش پلی ساکاریدی آن می باشد. لیپوپلی ساکارید عامل اصلی تعین کننده ویرولانس در باکتری گرم منفی است و از آنجاکه با اتصال محکمی به سطح سلول پیوند شده و فقط در هنگام لیز شدن سلول باکتری آزاد می شود به آن اندوتوکسین گویند (۵) و تمام خصوصیات سمی اندوتوکسین در ارتباط با لیپید A می باشد و منولایر خارجی در غشاء خارجی باکتری های گرم منفی را تشکیل می دهد(۱). ترکیب لیپوپلی ساکارید می تواند سلول های تک هسته ای از جمله ماکروفاژها و منوسیت ها را تحریک کند(٦) و به عنوان یک فاکتور بیماری زای اصلی توسط باکتری گرم منفی در نظر گرفته می شود و باعث فعال کردن سلول های تنظیم کننده ایمنی به وسیله اتصال یافتن به رسپتورهای (TLR) Toll – Like که در ماکروفاژها و سلول های اندوتلیال وجود دارد، می شود و به دنبال این فرایند سنتز حد واسط های گوناگون التهابی مانند TNF-α و IL-1B تحریک می شود(۷و۸). لیپوپلی ساکارید از اجزاء سمی دیواره سلولی باکتری های گرم منفی بوده و به طور وسیعی در لوله های گوارش انسان و حیوانات وجود دارد. در طی عفونت انسان دائماً در معرض سطح پایین لیپوپلی ساکارید قرار دارد. مشکلات و استرس های معده ای- روده ای[3] و مصرف الکل، اغلب باعث افزایش نفوذ پذیری لیپوپلی ساکارید از لوله های گوارشی به جریان خون و ایجاد شوک سپتیک می شود که از علائم آن می توان به بی قراری، سر درد، حالت تهوع، استفراغ، کاهش فشار خون و افزایش ضربان قلب اشاره کرد(۹). ورود لیپوپلی ساکارید به بدن معمولاً با بروز لوکوپنی اولیه همراه است و لوکوپنی ثانویه بعداً رخ می دهد. لوکوپنی اولیه با بروز تب همزمان است که به رهایی اینترلوکین ۱ مربوط می شود(۱). لیپوپلی ساکارید خالص به تنهایی می تواند واکنش های التهابی قوی را القاء کند. سلول های فاگوسیت از دسته ماکروفاژ- منوسیت، حد واسط های مهم ویژه ای به این پاسخ ها هستند. منوسیت ها به لیپوپلی ساکارید بسیار حساس می باشند و در سطح بسیار پایینی از لیپوپلی ساکارید می توانند محصولات پروتئینی التهابی شامل تومور نکروزیز فاکتور آلفا٤ و اینترلوکین1B را تولید کنند. این پروتئین ها نقش های مهمی در دفاع از میزبان بر علیه عفونت های

[1] -Food born disease-FBD
[2] -Outer membrane
[3] -Gastrointestinal
[4] -TNF-α

گرم منفی بازی می کنند و همچنین این پروتئین ها به عنوان حد واسط های کلیدی شوک سپتیک هستند(۱۰). ارگانل های متعددی تحت تاثیر لیپوپلی ساکارید دچار اختلال می شوند. به عنوان مثال از ارگان هایی که بیشترین حساسیت را به التهاب سیستمیک ایجاد شده توسط لیپوپلی ساکارید دارا می باشد می توان به کبد اشاره کرد. اختلال عملکرد کبد بعد از سپسیس یکی از رخدادهای متداولی است که با از دست دادن عملکرد سنتتیک و نکروز سلول های کبدی۵ بروز می کند(۹).

هدف از این مطالعه استخراج لیپوپلی ساکارید از دیواره باکتری گرم منفی سالمونلا اینتریتیدیس و بررسی مقایسه آن با لیپوپلی ساکارید استاندارد سالمونلا اینتریتیدیس می باشد.

مواد و روش ها :

استخراج لیپوپلی ساکارید سالمونلا اینتیرتیدیس

باکتری سالمونلا اینتریتیدیس(تهیه شده از آزمایشگاه مرجع سلامت) را که در محیط کازو براث به صورت سوسپانسون کشت شده بود را به لوله های آزمایش انتقال داده و نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در rpm ۳۰۰۰ –۲۵۰۰ سانتریفوژ شدند. سپس بر روی لوله ها ی حاوی رسوب باکتری ۲میلی لیتر الکل ۹۵٪ ریخته و ورتکس شدند.سپس لوله ها در rpm ۲۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و رسوب باکتری مجدداً با الکل شستشو داده شد و سپس ورتکس صورت گرفت. لوله های ورتکس شده مجدداً با rpm ۲۰۰۰ سانتریفوژ شدند و مجدداً محلول رویی را برداشته و رسوب باکتری با الکل شستشو داده شد و ورتکس نمودیم. مجددا لوله های ورتکس شده را در همان دور و زمان سانتریفوژ کرده و بعد از سانتریفوژ دوباره همان مراحل بالا را انجام دادیم. در انتها لوله های حاوی رسوب را یکی کرده و برای بار آخر در rpm۲۰۰۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و بعد الکل ها را خارج کرده و سپس لوله را به طور در باز در زیر هود قرار دادیم تا مابقی الکل ها نیز بخار شود.

باکتری خشک شده همراه با ۱ میلی لیتر ۱۰٪EDTA مخلوط شده و درون لوله های اپیندورف ریخته شد و سپس sonicate شدند. سپس به نسبت ۱:۲ متانول و کلروفرم به لوله جداگانه ایی وارد کرده تا اشباع شوند. سپس ۱ میلی لیتر از این محلول اشباع به محلول حاوی باکتری و EDTA اضافه شد و در لوله با پارافیلم بسته شد و به مدت ۲ ساعت بر روی شیکر قرار داده شد و بعد از این زمان لوله در rpm ۲۰۰۰به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سه لایه تشکیل شد لایه رویی متانول، لایه وسطی توده باکتری باقیمانده که حاوی لیزات سلولی می باشد و دور ریخته می شود و لایه سوم کلروفروم . توسط سمپلر لایه رویی که حاوی متانول می باشد را جدا کرده و در یک لوله آزمایش وارد و سپس کلروفرم را که در لایه زیرین قرار دارد را برداشته و در لوله دیگری وارد کردیم و هر دو لوله را در زیر هود قرار دادیم تا متانول و کلروفرم تبخیر شود و آنچه باقی می ماند LPS باکتری می باشد که آنرا استخراج نمودیم(۱۱).

آنالیز خلوص:

SDS-PAGE:

الکتروفورزلیپوپلی ساکارید استخراج شده با لیپوپلی ساکارید استاندارد تهیه شده از سیگما،L6011-100MG با شماره 088K4014 در ژل ۱۲% SDS-PAGE انجام گرفت و سپس با روش نیترات نقره رنگ آمیزی شدند(۱۲و۱٤). در روش الکتروفورز جهت تهیه ژل آکریل آمید ۱۲٪ از ۲۰ میلی لیتر آکریل ۳۰٪، ۵ میلی لیتر TBE(10X)، ٦۰۰ لاندا AMS ، ۳۰ لاندا TEMED (N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine)، ۲٤/۵ میلی لیتر آب مقطر استفاده گردید.

آزمایش تب زدایی در خرگوش:

توصیف آزمایش تب زائی در ساده ترین شکل عبارت است از اندازه گیری افزایش دمای بدن پس از تزریق وریدی آنتی ژن لیپو پلی ساکارید می باشد.در این بررسی ٦ خرگوش نژاد نیوزلندی (موسسه انستیتو پاستور کرج) انتخاب شدند. آزمایش تب زایی در خرگوش با ۳۰ میکروگرم بر میلی لیتر لیپوپلی ساکارید سالمونلا اینتریتیدیس به صورت درون صفاقی انجام گرفت. دمای

---

[5] -Hepatocellular

نرمال بدن خرگوش ها قبل از تزریق و هر نیم ساعت تا ۱ساعت پس از تزریق توسط رکتومتر مورد سنجش قرار گرفت .

شکل شماره ۱: ژل الکتروفورز لیپو پلی ساکارید استخراج شده و لیپو پلی ساکارید استاندارد از باکتری سالمونلا اینتریتیدیس پس از رنگ آمیزی نیترات نقره

یافته ها:

همانطور که در شکل شماره یک آورده شده است، به منظور بررسی خلوص لیپوپلی ساکارید استخراج شده، در روش الکتروفورز در چاهک های او۲(سمت چپ)۰/۰۰۳ گرم از نمونه لیپو پلی ساکارید استخراج شده و در چاهک های ۳و ٤ همین مقدار با نمونه لیپوپلی ساکارید استاندارد از باکتری سالمونلا اینتریتیدیس در ژل ۱۲٪ آکازر الکتروفورز و سپس با نیترات نقره رنگ آمیزی شدند . باندهای مربوط به نمونه استخراج شده از باکتری سالمونلا بسیار شبیه به نمونه لیپوپلی ساکارید استاندارد می باشد و این نشان دهنده بازدهی و کاارایی بالای روش استخراج لیپوپلی ساکارید با روش متانول- کلروفرم می باشد.

برای بررسی خاصیت تب زا بودن لیپوپلی ساکارید استخراج شده آزمون تب زایی در خرگوش با تزریق ۳۰ میکرو گرم از آن به بدن خرگوش انجام گرفت. چنانچه افزایش گرمای بدن یک خرگوش بیش از ۰/٦ درجه سانتی گراد و یا مجموع افزایش گرمایی بدن خرگوش های یک گروه نسبت به قبل از تزریق بیش از ۱/٤ سانتی گراد باشد، نتیجه آزمون پیروژنی مثبت بوده و نمونه ما تب زا می باشد. نتایج این آزمون حاکی از تب زا بودن لیپوپلی ساکارید می باشد زیرا یکی از تاثیرات بیولوژیکی این ترکیب خاصیت تب زا بودنش می باشد که با انجام این آزمایش صحت ودرستی استخراج لیپوپلی ساکارید از

باکتری سالمونلا اینتریتیدیس تائید گردید و نتایج آن در جدول ۱ مشخص شده است.

جدول شماره ۱: اندازه گیری دمای رکتال خرگوش ۳۰ دقیقه و ۱ ساعت پس از تزریق ۳۰ میکروگرم بر کیلوگرم لیپوپلی ساکارید استخراج شده از سالمونلا اینتریتیدیس

دمای اولیه	دما پس از ۳۰ دقیقه	دما پس از ۱ ساعت
۳۸/۵	۳۹	۳۹/۱
۳۸/٦	۳۹/۲	۳۹/۲
۳۸/۷	۳۹/٤	۳۹/۳
۳۸/۵	۳۹/۱	۳۹/۲
۳۸/۸	۳۹/٤	۳۹/۵
۳۸/۷	۳۹/٤	۳۹/٤

بحث:

سالمونلا دسته بزرگی از باسیل های گرم منفی با خصوصیات آنتروباکتریاسه هستند که از راه دهان وارد روده انسان ، پستانداران و پرندگان می شوند و سبب تب های روده ای و مسمومیت های غذایی یا عفونت خون می شوند. این باکتری ها از حیث خواص بیوشیمایی و ساختمان آنتی ژنی و بیماری زایی با یکدیگر قرابت زیادی دارند. اولین بار سالمون(salmon) میکروب شناس امریکایی در سال ۱۸۸۵ باکتری مولد وبای خوکی (S. choleraesuis) را که جزء این دسته می باشند را کشف کرد لذا واژه سالمونلا برای نامگذاری این جنس برگزیده شد. سالمونلا دارای سه دسته مهم آنتی ژنی به نام های Vi،H،O میباشند. آنتی ژن O یا سوماتیک از جنس فسفولیپید و پروتئین و پلی ساکارید ها می باشند. حرارت ۱۰۰ درجه را به مدت چند ساعت تحمل می کنند و در برابر الکل نیز مقاومت دارند.آنتی زن H یا فلاژنر مخصوص تار لرزان سالمونلا ها هستند و فقط در انواع متحرک آنها وجود دارند و از جنس پروتئین می باشند و دارای خاصیت آنتی زنیک می باشند و الکل و اسید آنها را خراب می کند و آنتی ژن آخر در برخی از سالمونلا ها مانند سالمونلا تیفی موریوم و پارا تیفی وجود دارد. ساختمان شیمیایی این آنتی ژن شبیه آنتی زن o می باشد ولی مقاومتش در برابر فنل و حرارت واسید خیلی کمتر از آن می باشد. سالمونلا ها دارای یک اندوتوکسین قوی می باشند که از لیپو پلی ساکارید تشکیل شده است و منشاء آن دیواره باکتری می باشد.سم پس از اتولیز باکتری ها آزاد می شود. این ماده نسبت به حرارت پایدار است.

در این بررسی لیپوپلی ساکارید سالمونلا اینتریتیدیس به روش متانول- کلروفرم استخراج گردید و خلوص محصول مورد بررسی قرار گرفت. همچنین الکتروفورز و آزمون تب زایی نیز برای برسی آن با نمونه استاندارد از همین گونه باکتری نیز انجام گرفت. طبق بررسی های انجام شده توسط موریسون ویلف مشخص گردید که روش استخراج فنلی موجب تخریب شدید سلولها و لیپوپلی ساکارید می شود(۱۲). ولی در این روش لیپوپلی ساکارید باکتری بخوبی استخراج می شود. الگوی الکتروفورزی لیپوپلی ساکارید سالمونلا اینتریتیدیس با نمونه استاندارش نشان داد که باند های لیپوپلی ساکارید استخراج شده بسیار شبیه به باندهای لیپو پلی ساکارید نمونه استاندارد می باشد. همچنین آزمون تب زایی در خرگوش نیز نشان دهنده صحت ودر ستی نحوه استخراج لیپوپلی ساکارید می باشد. نبود. باشد.

همانطور که اشاره شد روش های مختلفی با استفاده از آب،فنل،تری کلرواستیک برای جداسازی لیپوپلی ساکارید

از باکتری گزارش شده است. ترکیب مذکور شامل سه بخش اساسی لیپیدA، تنه پلی ساکارید و زنجیره اختصاصی می باشد.تزریق اندوتوکسین به انسان و حیوان سبب بروز تب، لکوپنی،هیپوگلیسمی،هیپوتانسیون، پیدایش حالت شوک، انعقاد درون رگی و بلاخره مرگ می شود.اندوتوکسین دارای فعالیت های ایمونولوژیکی مانند واکنش های فوری ، تاخیری ، تحمل و فعالیت پادتنی باشد. در واکنش فوری اتصال اندوتوکسین باعث پیدایش کمپلکس آنتی ژن – آنتی بادی می گردد که باعث تثبیت مکمل و بروز تظاهرات سمی او.لیه اندوتوکسین شامل تب و عوامل موثر بر انعقاد خون می شود(۱و۱۳). در تحقیقات پاک و همکارانش در سال ۲۰۰۰ با به کار گیری کیت های استخراج RNA توانستند لیپوپلی ساکارید را از دیواره باکتری گرم منفی استخراج کنند آنها با استفاده از تیوساینیت گوانیدین که در کیت موجود بود دیواره باکتری ها را تخریب نمودند و با این روش حرارت دان باکتری ها لازم نبود. (۱۵)

نتیجه گیری:

استخراج لیپوپلی ساکارید با روش متانول- کلروفرم روشی بسیار ساده و کم هزینه می باشد در ضمن نسبت به روشهای استفاده از فنل ایمنی بیشتری دارد. با انجام آزمایش الکتروفورز بر روی لیپوپلی ساکارید استخراج شده از باکتری سالمونلا اینتریتدیس و مقایسه با نمونه استاندارد از همین باکتری، باندهای دو نمونه بسیار شبیه یکدیگر بوده و این امر حاکی از خلوص و درستی نحوه استخراج لیپوپلی ساکارید از باکتری مذکور می باشد. همچنین با انجام آزمون تب زایی در خرگوش پیروژن بودن ترکیب استخراج شده نشاندهنده حفظ ساختار و عملکرد آن می باشد.

فهرست منابع:

۱- جاوتز، ارنست، ملینگ، جوزف. میکروبیولوژی پزشکی. ترجمه نوروزی جمیله. چاپ اول .تهران، انتشارات حیان، ۱۳۸۱،صص ۱۶۹تا ۱۷۰، ۲۸۳ تا۲۸۶.

2- Radkowski M. Occurrence of salmonella spp. In consumption eggs in poland. International Journal of food microbiology 2000; **64**: 18.

3- Liebana E, Garcia-Migura L, Clouting C, Cassar A, Clifton-Hadley F, Lindsay E. Investigation of the genetic diversity among isolates of salmonella enterica serovar Dublin from animals and humans from England. *J. of Applied Microbiology* 2002; **93**: 732-44.

4- Molla B, Alemayehu D, Salah W. Sources and distribution of salmonella serotypes isolated from food animals, slaughterhouse personnel and retail meat products in ethiopia. *Ethip J Health Dev* 2002; **17(1)**: 63-70.

5- Patric R. Murray, Ken S. Rosenthal. General Microbiology. 4th ed.2005

6- Sanlioglu S, Williams C, Samavati L, Butler N, Wang G,McCray P and et al. LPS induceds Racl dependent reactive oxygen species (ROS) formation and coordinates TNf-α secretion through IKK

regulation of Nf – KappaB. *JBC Pap*er 2001,1-65.

7- Kim DY, Jun JH , Lim Lee H, Mi Woo K, Mo Ryoo H, Shik Kim G and et al. N-acetylcysteine prevents LPS induced pro–inflammatory cytokines and MMP2 production in gingival fibroblast. *Arch Pharm Res* 2007, **30(10)**, 1283 - 1292.

8- Venegas GG, Frias SM,Granados AO,Cardenas PK. Role of p 38 in nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression, and nitric oxide and PGE2 synthesis in human gingival fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides. *Life Sciences* 2005; 20; **77(1)**:60-73.

9- Wang H, xu DX , LU Jw. N-acetylcysteine attenuates lipopolysaccharid induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice,*acta pharmacologica sinica* 2007; **28(11):**1803-1809.

10- Dedrick RL, Conlon PJ. Prolonged expression of lipopolysaccharide (LPS) induced inflammatory genes in whole blood requires continual exposure to LPS. *Infection and immunity*1995; **63(4),**1362–1368.

11- Mossman T. Rapid clororimetric assay for growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay. *J Immunol meth* 1983,**65**:55-63.

12- Golding B, Hoffman T, Frasch C. Lipopolysaccharide from Brucella abortus is less toxic than from E.coli, suggesting the possible use of B.abortus as a carrier in vaccines. *Infect Immun* 1992, **60(4).**1385-1389.

13- Axelsson F, Sorin M.L.(1997).Transia salmonella technical Hand Book .Back a Bergogata 5, S-446 Hisings Bacha,Sweden.

14- Tsai M C, Frasch EC. A sensitive silver stain for detecting lipopolysaccharides in polyacrylamide agels. *Analytical Biochemistry* 1982, **119(1)**: 115-9.

15- Yi Ec, Hachett M. rapid isolation method for lipopolysaccharid and lipid A from gram- negative bacteria. *Analyst* 2000; **125(4)**, 651-656.