------مجلة علوم الرافدين، المجلد 22، العدد 4، ص 1-11،2011------

عزل وتشخيص حامض التيكويك الدهني Lipoteichoic acid من بعض الجراثيم الموجبة لصبغة كرام

تُقى مؤيد بكر الصواف أميرة محمود محمد الراوي

قسم علوم الحياة

كلية العلوم

جامعة الموصل

(تاريخ الاستلام 20/ 2 / 2011 ؛ تاريخ القبول 6 / 6 / 2011)

الملخص

أُستخدمت في هذه الدراسة جرثومتا *Staphylococcus aureus* و *Streptococcus viridans* المعزولتان محليا وعدتا مصدرا لحامض التيكويك الدهني Lipoteichoic acid (LTA) الذي عزل بتقنية استشراب الالفة Affinity chromatography.

أُجريت عدد من الفحوصات التشخيصية للتحري عن وجود LTA وتحديد نقاوته بقياس الامتصاصية للعينات بمدى من الطول الموجي تراوح بين 200-400 نانوميتر، وجرى التشخيص النوعي لعينات LTA بتقنية استشراب الطبقة الرقيقة Thin Layer Chromatography (TLC) وتحديد قيمة مسافة الجريان Rate of flow (Rf) التي بلغت 0.68.

كما شخصت بتقنية استشراب السائل ذي الأداء العالي High Performance Liquid Chromatography (HPLC) وحسب زمن الاحتباس Retention time الذي بلغ 2.03 دقيقة لـ *S.aureus* LTA -و 1.96 دقيقة لـ *St. viridans* - LTA .

الكلمات الدالة: حامض التيكويك الدهني، الجدار الخلوي للجراثيم الموجبة لصبغة كرام.

Isolation and Diagnosis of Lipoteichoic acid Isolated from some Gram Positive Bacteria

Tuka M. Al-Sawaf **Amera M. Al-Rawi**
Department of Biology
College of Science
University of Mosul

ABSTRACT

In this study, Locally isolated *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus viridans* are used as a source of Lipoteichoicacid (LTA) which was isolated by Affinity Chromatography.

Some diagnostic tests were done to detect the presence and purity of LTA after measuring the absorbance of the samples using 200-400 nm wavelength. LTA samples were diagnosed qualitatively by thin layer chromatography (TLC) by measuring the rate of flow which reached 0.68, then were diagnosed by high performance liquid chromatography (HPLC) by calculating the retention time, which reached 2.03 minutes for *S. aureus* - LTA and 1.96 minutes for *St. viridans*- LTA .

Key word: Lipoteichoic acid, Cell Wall of Gram Positive Bacteria.

المقدمة

حامض التيكويك الدهني (LTA) عبارة عن جزيئات كارهة للماء Hydrophobic محبة للدهون Lipophilic، يتكون من دهون مرتبطة مع الكاربوهيدرات Glycolipid، يشترك في الإمراضية، ويعد المسؤول عن حدوث التسمم الناجم عن الإصابة بالجراثيم الموجبة لصبغة كرام إذ يتواجد في معظم الجراثيم الموجبة لصبغة كرام. ولا تختلف فعاليته المناعية بين الجراثيم الممرضة وغير الممرضة. ثابت بالحرارة Heat-stable ، يتخلل ضمن الجدار الخلوي ويعد المسؤول عن تزويد الغشاء والجدار بالمرونة والمطاطية والمسامية ومقاومة الشد فضلا عن إعطاء الشحنة السالبة للخلية الجرثومية (Hennek *et al*., 2005; Nichterlein *et al*., 1997; Maurer and Mattingly,1991) .

يتركب (LTA) لجرثومة Staphylococcus من سلسلة مكونة من وحدات من الكليسيرول غنية بالفوسفات Polyglycerolphosphate الذي يمثل التركيب الأساسي للجزئية وتحمل وحدات من N-acetyl D-glucosamine و D-alanine، أما التركيب الأساسي لـ (LTA) في جرثومة Streptococcus فمكون من خمس وحدات متتالية مؤلفة من وحدة ريبتول Ribitol وأربع وحدات من السكريات Tetrasaccharide ويحمل التركيب الأساس وحدات من Phosphocoline و N-acetyl D-galactosamine (Draing *et al.*, 2006; Ameersfort *et al*., 2003).

تنتهي سلسلة التركيب الأساس لكل من Staphyl ococcus-LTA و Streptococcus- LTA بسلسلتين مـن الأسايل Acyle، تتمثل الأولى بحامض البالميتيك Palmitic acid والثانية بحامض الاوليك Oleic acid (Kim *et al.*, 2005 ; Ameersfort *et al.*, 2003)، وتعمل سلسلتا الأسايل على ربط جزيئه LTA علـى الـدهون السكرية Glycolipid [Glc2-DAG] للغشاء السايتوبلازمي للجرثومة والتي تعمل غلافاً لـ LTA ويطلـق عليه Lipid B أسوة مع مثيله Lipid A في تركيب LPS (Grundling and Schneewind, 2007; Jones *et al.*, 2005; Morath *et al.*, 2002). يختلف محتوى LTA من الفوسفات باختلاف النوع الجرثـومي إذ يكـون فـي جرثومـة Staphylococcus أكثـر بكثيـر مـن محتـواه فـي Streptococcus (Kim *et al.*, 2005).

أوضح الباحث Draing *et al.*, (2006) والباحث Han *et al.*, (2003) أن الفعالية البيولوجيـة لـ LTA تعزى إلى وجود D-alanine، لذلك يعد Staphylococcus- LTA أقوى من الناحيـة البيولوجيـة والمناعية من Streptococcus-LTA فضلاً عن دور سلسلتي الأسايل المهم في الفعالية البيولوجية لـ LTA.

المواد وطرائق العمل

الجراثيم المستخدمة في الدراسة

استخدم في الدراسة نوعان من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وهما :-

Staphylococus aureus و *Streptococcus viridans* وتم الحصول عليها مشخصة من كلية العلوم قـسم علوم الحياة / جامعة الموصل.

عزل حامض التيكويك الدهني وتنقيته

تم استخدام طريقة الباحث (Kim *et al.*, (2005 في عزل LTA من الجراثيم الموجبة لصبغة كرام باستخدام تقنية استشراب الألفة Affinity chromatography والمذيبات العضوية. تم استخدام مزيج من مواد كيمياوية لها القابلية على عزل مركب معين بالاعتماد على المادة الأساس الموجودة ضمن مكونات المزيج إذ لهذه المكونات وظيفة وفعالية مشابهة لوظيفة مادة Sepharose التي تستخدم في عمود العـزل (Robyt and White, 1987)

تحضير عمود العزل لتقنية استشراب الألفة Affinity chromatography

أذيب 112 مايكروليتر من الحامض الدهني Oleic acid (المادة الأساس) في 5 سم^3 من Tris-HCl بتركيز 5 ملي مولاري، ثم أذيب في هذا المزيج 3.12 غم من الاكريلامايد، و0.236 غم من البزاكريلامايد ، ومن ثم أضيف اليها 0.100 غم من الرايبوفلافين و0.100 غم مـن Ammonium persulphate و 2 سـم^3 من N,N,N,N-tetra methyl ethylene diamine (TEMED) ، ووضع الخليط فـي عبـوة زجاجيـة ذات غطاء محكم وعرض للضوء مباشرة وبمعزل عن الاوكسجين لمدة 24 ساعة حيث أصـبح المـزيج بـشكل جيلاتين، ثم سحق في الهاون الخزفي إلى أن أصبح بشكل حبيبات صغيرة، وضعت الحبيبات في عمود العزل

(سرنجة بحجم 10 سم^3 بديلاً للعمود) غسلت بالدارئ Tris-HCl، وضعت في الثلاجة بدرجة 4 م^o لحين الاستخدام.

المعلق الجرثومي وجمع الخلايا الجرثومية

لقحت جرثومة *St. viridans* في 500 سم^3 من وسط نقيع القلب - الدماغ السائل Brain heart infusion broth كما لقحت جرثومة *S. aureus* في 500 سم^3 من وسط Tryptic soy broth والحاوي على 0.1 % مستخلص الخميرة Yeast extract. حضنت الأوساط الملقحة بالجراثيم بدرجة 37 م^o ولمدة 72 ساعة (Seo *et al.*, 2006) . تم ترسيب الخلايا الجرثومية بجهاز الطرد المركزي 3000 دورة / دقيقة لمدة 4 دقائق،جمع الراسب وتم تعليق الخلايا بإضافة 9 سم^3 من محلول خلات الصوديوم Sodium acetate 0.05مولاري عند pH (4) لكل 1 سم^3 من الراسب ثم رسبت الخلايا مرة أخرى بجهاز الطرد المركزي 3000 دورة / دقيقة لمدة 4 دقائق، جمعت الخلايا المترسبة في أنبوب زجاجي نظيف ومعقم (Kim *et al.*, 2005).

تكسير الخلايا الجرثومية

أخذ الراسب الخلوي وتم تكسير الجدران الخلوية وتحرر مكونات الخلية للخارج باستخدام جهاز الموجات فوق الصوتية بتردد 24 كيلو هيرتز لمدة دقيقتين في حمام ثلجي مع فترات توقف كل 30 ثانية لتبريد المحلول والحفاظ على درجة الحرارة (Kim *et al.*, 2005).

عزل الـ LTA

أخذ الناتج المستحصل عليه من الفقرة السابقة وأضيف 29 سم^3 من محلول كلوروفورم-ميثانول-الماء بنسبة (9:10:10) سم^3 لكل 1 سم^3 من المستخلص الخلوي ثم صب في عمود العزل المحضر أهمل المحلول النازل من العمود، وأضيف للعمود 10 سم^3 من خلات الصوديوم بتركيز 0.05 مولاري عند pH 4.7 يحوي على 15% n-Propanol ثم أضيف إليه أيضا 10 سم^3 من كل (45،35،20) % من محلول n-Propanol ثم جمع الناتج ووضع في غشاء الديلزة ضد الماء المقطر بنسبة 1:9 (ماء مقطر:المستخلص) لمدة 24 ساعة لغرض التخلص من الشوائب والمحاليل. ولغرض عزل أفضل أضيف ناتج الديلزة لعمود العزل مرة أخرى ومن ثم أضيف للعمود 10 سم^3 من محلول كربونات - بيكاربونات عند pH 9.5 يحوي على 30% n-Propanol كما أضيف 2 سم^3 من تراكيز الملح NaCl لغرض فك ارتباط جزيئات LTA المرتبطة مع الحامض الدهني والذي يعد المادة الأساس في المزيج وإنزالها من العمود، وتم جمع الناتج في أنابيب نظيفة وجافة وأضيف إليها حجم مساوٍ لها من الكحول الأثيلي بتركيز 70% لترسيب البروتين الملوث للعينة، تم جمع الراشح وأهمل الراسب، تم تركيز العينات بجهاز تركيز العينات Sample concentrator بضخ النتروجين الخامل على العينات للتخلص من المذيبات والمحاليل الموجودة بالعينة (Kim *et al.*, 2005).

الاختبارات التشخيصية لعينات LTA

التشخيص النوعي لـ LTA بتقنية استشراب الطبقة الرقيقة

تم الكشف عن وجود LTA في المستخلص المحضر بتقنية TLC إذ استخدمت رقائق الألمنيوم المغطاة بمادة Silica gel بسمك 0.2 وبأبعاد 20 x20 سم والتي تم تنشيطها في الفرن الكهربائي عند درجة 100 م° ولمدة ساعة، حملت العينات المستخلصة من كلا الجرثومتين على احد طرفي اللوح وعلى بعد 2 سم من بداية الصفيحة وبهيئة بقع على امتداد خط البداية إذ تم تحميل العينات بواسطة الأنبوبة الشعرية وبحجم 20 مايكروليتر وأعيد تحميل العينات على الصفيحة بعدد متساوي للعينتين بحدود 5 مرات، وبعد جفاف العينات وضع اللوح في الحاوية الخاصة بمحلول الفصل Tank بشكل عمودي بحيث تكون النهاية التي تم تحميلها بالعينات في الأسفل وملامسة لمحلول الفصل والذي يتكون من مزيج من 104 سم^3 كلوروفورم و 40 سم^3 ميثانول و 6 سم^3 ماء حيث أصبح الحجم الكلي 150 سم^3 (Morath *et al*., 2001)، غطيت الحاوية في الغطاء الخاص بها وتركت في درجة حرارة المختبر لحين اكتمال صعود محلول الفصل إلى النهاية الأخرى من اللوح بما يقارب 5 ساعة بعد ذلك تم رفع اللوح من الحاوية وترك أفقيا في ظروف المختبر ليجف، وبعد تمام جفافه تم التأكد من الخطوط المفصولة وتظهيرها باستخدام مصدر للأشعة الفوق البنفسجية UV والمجهز من شركة Hanovia (England)، إذ تم تحديد مواقع الخطوط العينات عن طريق حساب معدلات مسافة الجريان Rate of flow(RF) لكل عينة مفصولة من المستخلص واستخدمت المعادلة الآتية لقياس سرعة الجريان :

$$\text{سرعة الجريان Rf} = \frac{\text{المسافة التي قطعتها العينة المفصولة}}{\text{المسافة التي قطعها المذيب}}$$

(Plummer,1978).

وبعد أن تم الكشف عن وجود LTA في المستخلصات وتحديد خطوط ترسيب العينات تم قشط منطقة العينة scraping من الواح TLC ووضعت على ورق الترشيح ثم نقلت إلى قنانٍ صغيرة وأذيبت بقطرات من محلول كلوروفورم + ميثانول + ماء ، وأكمل الحجم إلى 2 سم^3 بالمحلول نفسه، ورسبت العينة، واخذ الراشح فقط وأهمل الراسب (Morath *et al*., 2001).

قراءة امتصاصية عينات الـ LTA

تم قراءة امتصاصية العينات عند طول موجي 200-400 باستخدام جهاز المطياف الضوئي Spectrophotometer وباستخدام خلية UV (Kim *et al*., 2005).

تشخيص LTA بتقنية استشراب السائل ذي الأداء العالي(HPLC)

استخدمت العينات المستحصل عليها وشخصت بواسطة جهاز (HPLC) Shmadzu-LC (Japan)، وباستخدام عمود فصل نوع C18 (ods25 Mm 25 × 0.46) والمجهز من شركة Waters (Germany)، في الشركة العامة لصناعة الأدوية والمستلزمات الطبية/ نينوى، إذ أن مادة الفصل في العمود (الطور الثابت) هي Octadycyl silane المرتبطة كيمياويا مع Silica gel وقطر جزيئات 30-50 مايكروميتير وطول العمود 250 ملم وقطره 4.6 ملم وبدرجة حرارة الغرفة ومقدار الضغط 15 بار. استخدم الاسيتونترايل Acitonitril بتركيز 50% (الطور المتحرك Mobile phase) بعد أن تم ترشيحه وطرد الغازات منه باستخدام جهاز الترددات فوق الصوتية Sonicater وبمعدل جريان flow rate (RF) =1 سم^3/دقيقة وعند الطول الموجي 200-400 نانوميتر، تم الحقن بحجم 20 ماكروليتر من العينة (Josephson *et al*., 1986).

النتائج والمناقشة

عزل حامض التيكويك الدهني وتنقيته

أثبتت طريقة الباحث Kim *et al*., (2005) كفاءة في عزل LTA اعتمادا على نتائج طرائق التحري عن LTA ونقاوته، إذ تم استخدام جهاز الترددات فوق الصوتية لتكسير الخلايا الجرثومية للحصول على المستخلص الخلوي، وتعتمد طريقة العزل على استخدام المذيبات العضوية الكلوروفورم والميثانول واللذين يعملان على ترسيب جزيئات الأحماض النووية والكاربوهيدرات الموجودة في العينة وهذا ما أكده الباحث Josephson *et al*., (1986) وتمت عملية العزل بالاعتماد على تقنية Affinity chromatography ومكونات العمود المحضر مختبريا، إذ يعمل كل من الاكريلامايد والبز أكريلامايد على تكوين شبكة معقدة بوجود الجذور الحرة (TEMED) والعوامل المساعدة الرايبوفلافين و Ammonium persulphate، وبوجود الضوء الذي يعمل على بدء التفاعل بمعزل عن الاوكسجين، تعمل هذه المكونات على بلمرة مكونات المزيج وتحويله من الشكل السائل إلى الشكل الصلب وبهيئة الهلام (Robyt and white,1987).

تعمل مكونات المزيج على فصل المادة المراد فصلها اعتماداً على المادة الأساس الموجودة ضمن مكونات المزيج وهي الحامض الدهني حامض الأوليك Oleic acid والذي يعد أحد مكونات سلسلتي الأسايل الموجودة في تركيب LTA إذ يحدث ارتباط بين الحامض الدهني وسلسلتي الاسايل في LTA مما يسبب ادمصاصه في العمود عند إضافة المستخلص الخلوي الحاوي عليه، وعند استخدام الدارئ الحامضي خلات الصوديوم الحاوي على 15 % n-Propanol يعمل على فك الارتباط بين LTA والحامض الدهني وباستخدام تراكيز من n-Propanol يسبب نزول LTA من العمود.

تم إجراء عملية الديلزة ضد الماء المقطر للتخلص من الملوثات والشوائب والمادة الأساس والمحاليل الموجودة في العينة وهذا ماأكده الباحثون (Hasty *et al*., 2006 ; Kim *et al*., 2005) .

وفي الخطوة الثانية من العزل تم استخدام الدارئ القاعدي محلول الكاربونات بيكاربونات الحاوي على n-Propanol %30 والذي يعمل على فصل المعقد المادة الأساس-LTA ، وباستخدام تراكيز من ملح الطعام NaCl يعمل على فك الارتباط بين المادة الأساس-LTA وفصل LTA وإنزاله من العمود.

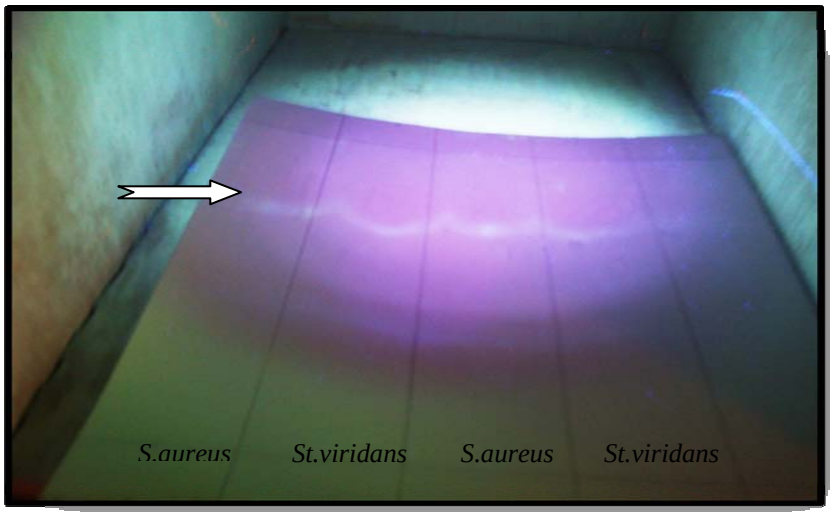
أكد الباحث Kim *et al.*, (2005) على الخطوة الثانية من العزل بوصفها خطوة مهمة في التنقية والتخلص من الملوثات المستحصل عليها في الخطوة الأولى، وأكد على دور الدالة الحامضية للدارئ في الخطوة الثانية إذ أثبت الباحث أن أفضل قيمة للدالة الحامضية للدارئ هي 9.5 إذ لها دور مهم في الحفاظ على سلسلتي الاسايل دون تحطم، كما بين الباحث أن قيمة الدالة الحامضية عند 10.5 تؤدي إلى فقد سلسلة حامض الاوليك من سلسلتي الاسايل.

تم تأكيد الحصول على النتيجة الموجبة اعتماد على نتائج الفحوصات التشخيصية للـ LTA.

الفحوصات التشخيصية لعينات LTA

التشخيص النوعي لـ LTA باستخدام تقنية استشراب الطبقة الرقيقة (TLC)

استخدمت تقنية الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography technique (TLC) كخطوة أولى في تشخيص LTA، أظهرت نتائج فصل صفائح الطبقة الرقيقة بعد فحصها باستخدام جهاز الأشعة فوق البنفسجية UV فصل مركب LTA من العينات وذلك بالاعتماد على تحديد قيمة Rf والتي كانت 0.68 وكما مبين في الصورة (1).



الصورة 1: منطقة فصل عينتي LTA لجرثومتي *S.aureus* و *St.viridans*

جاءت نتائج الدراسة مطابقة لدراسة الباحث Morath *et al*., (2001) والذي بين أن منطقة فصل مادة LTA المعزولة من جرثومة *S.aureus* هي 0.68 كما أكد الباحث Doran *et al*., (2005) هذه النتيجة.

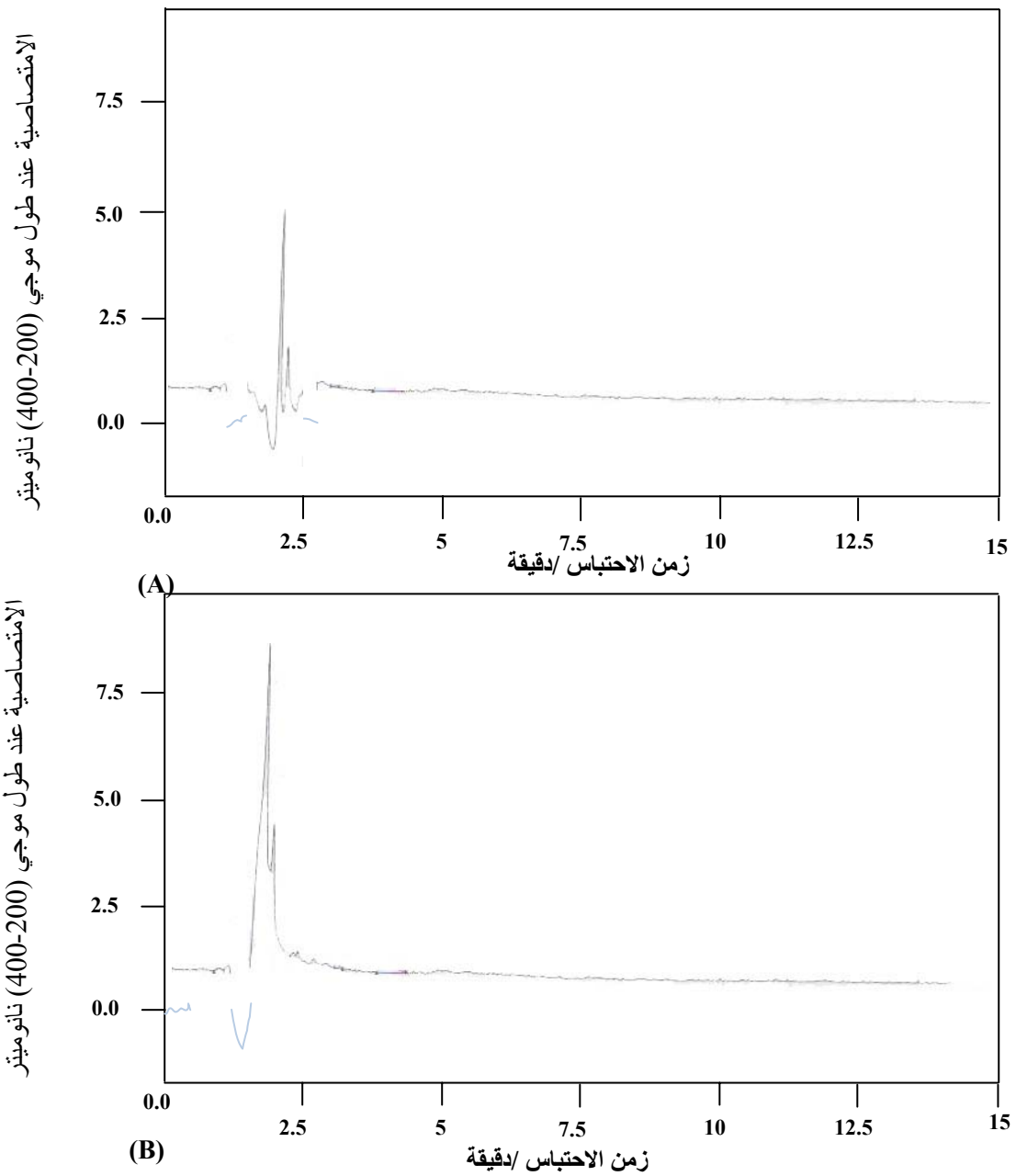
امتصاصية عينات الـ LTA

تمت قراءة امتصاصية العينات عند طول مـوجي 200-400 باسـتخدام جهـاز المطيـاف الـضوئي Spectrophotometer وباستخدام خلية UV، إذ لم تظهر أي قراءة عند الطول الموجي 260 و280 نانوميتر وهذا يؤكد عدم احتمالية تلوث العينات بالأحماض النووية والبروتينات على التوالي. وهذا ما أكد عليه الباحث Kim *et al*., (2005).

تشخيص LTA بتقنية استشراب السائل ذي الأداء العالي (HPLC)

اعتمدت تقنية HPLC بوصفها خطوة رئيسة لتشخيص LTA . لقد تطورت تقنيـة الـسائل ذي الأداء العالي في منتصف السبعينات وأثبتت فعاليتها بسرعة من خلال تطور مواد تعبئة العمود والإضافات الملائمة للكواشف. في الثمانينات استخدمت تقنية HPLC بشكل واسع لتشخيص وفصل المركبات الكيمياوية بوصـفها الأفضل من التقنيات الأخرى. إن حركة الجزيئات خلال عمود الفصل تحدد مدى التداخلات الكيمياوية بـين الطور المتحرك والعينة، فالجزيئات ذات الألفة الأكثر مع الطور المتحرك أقوى من الطور الثابـت، سـوف تظهر من العمود أسرع فيكون زمن الإحتباس لها أقل والعكس صحيح (Robyt and white,1987).

استخدمت تقنية HPLC وأخذت العينات بعد قشطها من ألواح الطبقة الرقيقة بعد أن شخصت على أنها LTA بدلالة مسافة الجريان Rf وكشف عنها بواسطة الأشعة فوق البنفسجية وبعد إذابتها حقنت العينات فـي جهاز HPLC، إذ تم احتساب زمن الاحتباس Retention time (بالدقيقة) في عمود الفصل للعينات والـذي أعطى قمة امتصاص واحدة استغرقت 2.03 دقيقة في *S.aureus*-LTA و 1.96 دقيقـة فـي -*St.viridans* LTA للمرور بعمود الفصل وكما مبين في الشكل (1، A-B).



الشكل 1: زمن احتباس عينات LTA مقاسه بجهاز HPLC لجرثومتي (A) *S.aureus* و *St.viridans* (B)

جاءت نتائج الاختبار مقاربة لدراسة الباحث Josephson *et al.*, (1986) إذ بين الباحث أن قمة الامتصاص لمركب LTA المعزول من جرثومة *S.aureus* ظهرت عند 2.9 دقيقة، وبين الباحث أن المعاملات المختلفة التي تتم على المستخلص الخلوي لغرض عزل LTA جميعها تؤثر على نتيجة التحري عن LTA بتقنية HPLC حيث بين انه يمكن أن تظهر أكثر من قمة امتصاص واحدة للمركب وهذا بسبب

تحطم جزء من أجزائه أو أكثر، كما أن طول العمود المستخدم للفـصل وكـذلك درجـة الحـرارة وكميـة المستخلص الموضوعة في العمود أيضا تؤثر على قيمة زمن الاحتباس .

المصادر الأجنبية

Amersfoort, E. S. V.; Berkel, T. J. C. V. ; Kuiper, J. (2003). Receptors, mediators, and mechanisms involved in bacterial sepsis and septic shock. *J. Clin. Microbiol. Rev.*, **16**(3), 379-414.

Doran, K. S.; Engelson, E. J.; Khosravi, A.; Maisey, H. C.; Fedtke, I.; Equils, O.; Michelsen, K. S.; Arditi, M.; Peschel, A. ; Nizet, V. (2005). Blood-brain barrier invasion by group B Streptococcus depends upon proper cell-surface anchoring of Lipoteichoic acid. *J. Clin. Invest.* **115**, 2499-2507.

Draing, C.; Pfitzenmaier, M.; Zummo, S.; Mancuso, G.; Geyer, A.; Hartung, T.; Aulock, S. (2006). Comparison of Lipoteichoic acid from different serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem*., **281**(45), 33849-33859.

Grundling, A. ; Schneewind, O. (2007). Genes required for glycolipid synthesis and Lipoteichoic acid anchoring in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol*., **189**(6), 2521–2530.

Han, S. H.; Kim, J. H.; Martin, M.; Michalek, S. M. ; Nahm, M. H. (2003). Pneumococcal Lipoteichoic acid (LTA) is not as potent as Staphylococcal LTA in stimulating Toll-Like Receptor 2. *J. Infect. Immun*., **71**(10),5541-5548.

Hasty, D. L.; Meron-Sudai, S.; Cox, K. H.; Nagorna, T.; Ruiz -Bustos, E.; Losi, E.; Courtney, H. S.; Mahrous, E. A.; Lee, R. ; Ofek, I. (2006). Monocyte and macrophage activation by Lipoteichoic acid is independent of alanine and is potentiated by hemoglobin. *J. Immunol.*, **176**, 5567-5576.

Henneke, P.; Morath, S.; Uematsu, S.; Weichert, S.; Pfitzenmaier, M.; Takeuchi, O.; Muller, A.; Poyart, C.; Akira, S.; Berner, R.; Teti, G.; Geyer, A.; Hartung, T.; Trieu-Cuot, P.; Kasper, D.L. ; Golenbock, D.T. (2005). Role of lipoteichoic acid in the phagocyte response to group B Streptococcus. *J. Immunol*., **174**,6449-6455 .

Jones, K. J.; Perris, A. D.; Vernallis, A. B.; Worthington, T.; Lambert, P. A. ; Elliott, T. S. J. (2005). Induction of inflammatory cytokines and nitric oxide in J774.2 cells and murine macrophages by Lipoteichoic acid and related cell wall antigens from *Staphylococcus epidermidis* . *J. Med. Microbiol*., **54**, 315-321.

Josephson, S. L.; Stinson, M. W.; Millar, S. J. ; Cohen, R. E. (1986). Purification of Lipoteichoic acid by chromatography in water-organic solvent systems. *J. Infect. Immun.*, **51**(2), 378-384. .

Kim, J. H.; Seo, H.; Han, S. H.; Lin, J.; Park, M.; Sorensen, U. B. S. ; Nahm, M. H. (2005). Monoacyl Lipoteichoic acid from Pneumococci stimulates human cells but not mouse cells. *Infect. Immun*., **73**, 834-840.

Maurer, J. J. ; Mattingly, S. J. (1991). Molecular analysis of Lipoteichoic acid from *Streptococcus agalactiae*. *J. Bacteriol.*, **173**(2), 487-494.

Morath, S.; Geyer, A. ; Hartung, T. (2001). Structure–function relationship of cytokine induction by Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J. Exp. Med.*, **193**(3), 393-398. .

Morath, S.; Stadelmaier, A.; Geyer, A.; Schmidt, R. R. ; Hartung, T. (2002). Synthetic Lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* is a potent stimulus of cytokine release. *J. Exp. Med*., **195**(12),1635-1640.

Nichterlein, T.; Kretschmar, M.; Ruhland, G. J.; Fiedler, F. ; Hof, H. (1997). Lipoteichoic acid fractions from pathogenic and apathogenic Listeria species and *Staphylococcus aureus* induce similar amounts of macrophage derived cytokines. *J. Inflammopharmacol*., **5**,343-350.

Plummer, D. T. (1978). " An Introduction to Practical Biochemistry ". 2nd edn., McGraw-Hill book company, London.

Robyt, J. F. and White, B. J. (1987). "Biochemical Techniques Theory and Practice". Books/Cole company, U.S.A.

Seo, H. S.; Kim, J. H. ; Nahm, M. H. (2006). Platelet-activating factor-acetylhydrolase can monodeacylate and inactivate Lipoteichoic acid. *J. Clin. Vaccine Immunol*., **13**(4), 452-458.