استخلاص عامل التلزن (اللكتين) من بكتريا لخلايا Enterococcus faecalis EM1 وتأثير العوامل البيئية المختلفة عليه ودوره في تلزن أنواع من البكتريا السالبة لملون غرام

أثير احمد مجيد
قسم علوم حياة- كلية العلوم
جامعة بغداد

الخلاصة

استخلص عامل التلزن من E. faecalis EM1 بعد تكسير الخلايا بعدة طرق واختيار الطريقة التي تعطي اعلى قيمة تلزن والترسيب بالكحول الاثيلي ، واجري فحص التلزن وقياسه للمستخلص مع انواع من البكتريا السالبة لملون غرام تضمنت Escherichia coli و Klebsiella pneumoniae و Serratia marcescens و Pseudomonase aeruginosa و Salmonella typhi ، بينت النتائج ان اعلى نسبة تلزن للمستخلص تكون مع بكتريا K. Pneumonia حيث بلغت ٧٧ % مقارنة بالسيطرة ٦٦.٥ % ، واوطا قيمة للتلزن مع S. typhi . درست بعض خصائص عامل الالتصاق (تلزن) بكتريا E. faecalis EM1 مع خميرة Saccharomyces cerevisiae ، اذ تم تعريض مستخلص البكتريا (الحاوي على عامل التلزن) لظروف مختلفة تضمنت درجات حرارة وارقام هيدروجينية مختلفة وخزنه لمدة ١٠ ايام بدرجة حرارة الغرفة.

عومل المستخلص بانواع مختلفة من الكربوهيدرات قبل مزجه مع البكتريا السالبة لملون غرام لغرض التعرف على خصوصيته ، ادت هذه المعاملة الى انخفاظ قيم التلزن عموما. كان الكالكتوز اكثرها تاثيرا وكانت اقل قيم تلزن هي مع البكتريا P aeruginosa. ، اذ ادى الكالكتوز الى انخفاض نسبة التلزن الى ١٢% . تشير هذه النتائج الى ان عامل التلزن البكتريا E. faecalis EM**1** هو نوع من اللكتينات التي لها خصوصية عالية للارتباط بالمستلمات الحاوية على الكالاكتوز وان من E. faecalis EM**1** يمكن ان تنافس البكتريا الاخرى على الارتباط بمثل هذه المواقع.

Extraction of agglutination factor (lectin) from E. faecalis EM**1** and the effects of different environmantal factors on it and its role in agglutination some kinds of Gram negative bacteria

Atheer A. Majeed
Biology Department-Colleg of Science - Baghdad University

Abstract:-

Agglutination factor of E. faecalis EM1 was extracted by repturing the bacterial cell by many methods and precipitation with ethanol.
Agglutination assay of E. faecalis EM1 extract was performed with different kinds of gram negative bacteria included Eschriechia coli , Klebsiella pneumonia , Serratia marcesence , Pseudomonase aeruginosa and Salmonella typhi .
The mximum agglutination valu appeared with K. Pneumonia it was 66.5% for control and 77.5% for extract , the lowest value was for S. typhi .

Some characters of adhesion (agglutination) factor of E.faecalis EM1 cells with Saccharomyces cerevisiae were studied . E. faecalis EM1 extract was subjected to different environmantal factors included : pHs. temperatures, and storage at 10 days in room temperature.

The extract containg agglutination factor was treated with different kinds of carbohydrates befor mixing with the Gram negative bacteria to determine its specificity . This treatment reduced agglutination in general, galactose was more effective than others , minimum agglutination value appeared with P .aeruginosa , it reduced to 12% with galactose .
This results suggesting that E. faecalis EM1 agglutination factor is a kind of lectin which has high specificity to bind with galactose containing receptors , and E. faecalis EM1 may competes with other kinds of bacteria on binding with such kinds of receptors.

المقدمـة

هنالك العديد من انواع البكتريا التي يمكنها ان تستوطن البيئات الحية مثل انسجة الجسم وتجويف الفم ويتم ذلك بالتصاقها اولا على سطوح هذه المواد بعد افرازها مواد لاصقة التي ترتبط مع مستلمات مخصصة موجودة على سطوح الخلايا اوالمواد ، وهذه المواد اللاصقة قد تحتوي على عديد السكريات او حوامض شحمية (Lipotechoic acid) وانزيمات معينة مثل(glycosyl transferase) ، وبروتينات ترتبط بالكاربوهيدرات Carbohydrate-binding proteins وتسمى

باللكتينات(lectins) وتوجد مثل هذه المواد ضمن محتويات جدار الخلية او مرتبطة مع التراكيب الخلوية مثل fimbiria ,fibrils ,capsule [1]
لذا يلعب اللكتين دورا دفاعيا مهما ضد الاحياء المجهرية الممرضة للحيوان أي انه يشكل نوع من البروتينات الضد مكروبية (antimicrobial proteins) وله القدرة على تلزن كريات الدم الحمراء للارنب، السالبة لملون غرام مثل E.coli و Proteus morganii وكذلك البكتريا الموجبة لملون غرام مثل E. faecalis [٢].
من المعروف ان هناك انواع من البكتريا السالبة والموجبة لملون غرام تحتوي جدرانها او سطوحها على مواد تساعدها في الالتصاق بالمواد الحية وغير الحية، وتكوين الغشاء الحيوي (biofilm) ويؤدي ذلك الى تلف المواد او احداث اصابة خمجية فضلا عن زيادة مقاومة مثل هذه البكتريا للظروف المحيطية (3)، وتتمكن المكورات المعوية (Enterococci) من الالتصاق بسطوح الخلايا واستيطانها وتكوين الاغشية الحيوية ومواد خارجية من السكر المتعدد (exopolysaccharid matrix)، ويؤدي ذلك الى تحلل خلايا العائل وانتشار الاصابة (٤).
لوحظ ان سلالات من بكتريا E. faecalis المعزولة من اخماج الجهاز البولي والقلب لها القدرة على الالتصاق بالخلايا الطلائية (epithelical cells) وغيرها من الخلايا وتتباين قدرة الخلايا على الالتصاق باختلاف انواع الخلايا ، ويلعب هذا الالتصاق دورا مهما في احداث الاصابة ، ويعد احد عوامل الفوعة (virulence factor) (٥)، وتحتوي سطوح هذه البكتريا على مواد لاصقة يمكن الكشف عنها باختبار التلزن (agglutination assay) وتقل فعاليتها عند معاملتها بالانزيمات المحللة للبروتين (٦).
ونظرا لقلة الدراسات حول استخلاص عامل الالتصاق او التلزن لبكتريا E. faecalis فقد كان الهدف من هذه الدراسة هو استخلاص هذا العامل من احدى سلالات هذه البكتريا التي تعد من البكتريا المعوية التي توجد بشكل طبيعي في الامعاء وفي بيئات اخرى ، وقد تكون ممرضة للانسان والحيوان في حال اصابتها لاعضاء وانسجة معينة، واحتوائها على مواد لاصقة تساعدها في الاستيطان في بيئات مختلفة ومقاومتها للظروف غير ملائمة.
كما تهدف الدراسة الى التعرف على دورعامل التلزن المستخلص من البكتريا E. faecalis في التصاق انواع مختلفة من البكتريا السالبة لملون غرام الممرضة ، ودراسة العوامل المختلفة المؤثرة عليه للاستفادة منه في تشخيص الانواع البكترية وقدرته التلازنية في درجات حرارة التنمية البكترية والارقام الهيدروجينية للاوساط وكلقاحات مناعية ، من معرفة طبيعة الالتصاق وخصوصيته في الارتباط بانواع معينة من الكربوهيدرات.

المواد وطرق العمل

- عزلات البكتريا اخذت عزلات البكتريا المستعملة في هذه الدراسة من قسم علوم الحياة كلية العلوم- جامعة بغداد ، وتضمنت E. faecalis EM1 ، Escherichia coli ، Klebsiella pneumonia ، Serratia marcescens ، Pseudomonase aeruginosa ، Salmonella typhi وخميرة Saccharomyces cerevisiae. نميت هذه البكتريا والخميرة على وسط الاكار المغذي (nutrient agar) ووسط (Yeast extract agar) للتاكد من نقاوتها وصفاتها المزرعية وحفظت على مائل وسط الاكار المغذي بدرجة ٤ مْ لحين الاستعمال. نشطت العزلات قبل استعمالها بزرعها في وسط مرق نقيع القلب والدماغ (Brain heart infusion broth) وحضنها بدرجة ٣٧ مْ لمدة ١٨-٢٤ ساعة .

- استخلاص عامل التلزن من بكتريا E. faecalis EM1

استعملت سلالة البكتريا E. faecalis EM1 التي تم اثبات قدرتها على تلزن كريات الدم الحمراء للانسان وخلايا خميرة Saccharomyces cerevisiae في دراسة سابقة (٧).

تم استخلاص عامل التلزن من خلايا البكتريا بعد تكسيرها بعدة طرق كما ياتي :-

حضرت مزرعة سائلة لبكتريا E. faecalis EM1 بعمر ١٨ ساعة ونبذت بسرعة ١٠٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ٢٠ دقيقة بدرجة ١٠ مْ ، وفصلت الخلايا (الراسب) من الطافي (supernatante) ثم

طريقة(١):- علقت في محلول Tris-Hcl الدارئ (pH7، 0,05M) بنسبة ١:١ (حجم :حجم) ، اضيف ٢.٤ غرام من الكرات الزجاجية المعقمة الى ١٠ مول من الطافي ومزجت جيدا بالمازج الكهربائي (vortex) لمدة ١٥ دقيقة (متقطعة) ، تم نبذ العالق واخذ الطافي (المستخلص) واهمل الراسب .

طريقة (٢):- علقت الخلايا بمحلول فوسفات الصديوم الدارئ (pH7، 0,05M) بنسبة ١:١ (حجم :حجم) اضيف ٢.٤ غرام من الكرات الزجاجية المعقمة الى ١٠ مول من الطافي ومزجت جيدا بالمازج الكهربائي (vortex) لمدة ١٥ دقيقة (متقطعة) ، تم نبذ العالق واخذ الطافي (المستخلص) واهمل الراسب ، رشح ثلاث مرات بورق الترشيح (what man No1) ، ونبذ الراشح لمدة ٥ دقيقة وفصل الراسب بمحلول فوسفات البوتاسيوم الدارئ (pH7، 0,05M) بنسبة ١:١ (حجم :حجم)، اضيف له مادة SDS بتركيز M٠.٠٤| ومزج الخليط لمدة ٩٠ دقيقة بالمازج المغناطيسي ووضع بعدها بحمام مائي بدرجة ١٠٠ مْ لمدة ١٥ دقيقة ، ثم نبذ وذوب الراسب باقل مقدار من محلول فوسفات الصديوم الدارئ.

رسب مستخلص عامل التلزن الناتج من الطريقتين باضافة الكحول الاثيلي (٩٦%) المبرد الى الطافي على شكل نسب متدرجة (١:١ ،١:٢، ١:٣، ١:٤) الى الطافي التكسير تدريجيا مع التحريك في ظروف مبردة تم نبذ بسرعة ٣٠٠٠ دورة / دقيقة لمدة ١٥ دقيقة بدرجة ١٠مْ ، واخذ الراسب واهمل الطافي ذوب الراسب في كمية

قليلة من المحلول الدارئ واجريت لـه عمليـة الميز الغشـائي (dialysis) مقابل المـاء المقطر للتخلص من الكحول.

قياس التلزن

اجري هذا القياس لخلايا E. faecalis EM1 ولمستخلصها على وفق طريقة (٨). ولبكتريا E. faecalis EM1 حضرت عوالق لانواع البكتريا السالبة لملون غرام ، بعد فصل الخلايا المنماة في وسط نقيع القلب والدماغ بالنبذ المركزي المبرد وغسلها عدة مرات بمحلول الفوسفات الدارئ وعلقت بـالمحلول نفسه . مزجت حجوم معينـة من عـالق خلايـا E. faecalis EM1 او مستخلصـها مـع عوالـق البكتريـا السـالبة لملون غرام واستكملت بقية خطوات الطريقة المذكورة وتم حساب نسبة التلزن(%)

تاثير العوامل المختلفة عل تلزن عامل التلزن لبكتريا E. faecalis EM1

- درجات الحرارة و pH

عملـت ثـلاث مكـررات مـن محلـول الفوسـفات الـدارئ مختلفـة الارقـام الهيدروجنيـة (٥,٧,٩) وذوب بهـــا المســـتخلص لعامـــل التلـــزن ثـــم مزجـــت بـــالخميرة S. cerevisiae

وحضـنت بـثلاث درجـات حراريـة مختلفـة (١٥، ٣٧، ٤٥ مْ) لمـدة سـاعة ثـم قـيس التلزن.

- الخـــزن:-

خـزن عامـل التلـزن المسـتخلص تحـت درجـة حـرارة الغرفـة لمـدة ١٠ ايـام ، وقـيس التلزن مع الخميرة S. cerevisiae.

- استخدام الكاربوهيدرات لتعيين عامل التلزن

حضـرت محاليل للسكريات (galactose ، starch ،glucose و lactose maltose)، بتركيز ٢% ومزجت حجوم متساوية منها مع المستخلص الحاوي علـى عامل التلزن وحضـنت لمدة سـاعة بدرجـة ٣٧مْ ثـم مـزج حجم معين منـه مـع عـالق انواع البكتريا السالبة وبعدها حسبت نسبة التلزن لكل معاملة.

النتائج والمناقشة

- قدرة خلايا E. faecalis EM1 على تلزن انواع البكتريا السالبة لصبغة كرام

استطاعت خلايا E. faecalis EM1 من التلزن مـع انـواع البكتريـا السـالبة لملـون كـرام المسـتعملة فـي هـذه الدراسـة ولكـن بنسـب مختلفـة كـان اعلاهـا مـع بكتريـا K.pheumonia حيث بلغت نسبة التلـزن ٦٦.٥% ، امـا اوطـأ قيمـة للتلـزن فكـان لبكتريا S.typhi (شكل ١) ، وربما يعود هذا التبـاين الـى اختـلاف مكونـات جدران هذه البكتريا او بمعنى اخر اختلاف تركيب المستلمات او المستقبلات (receptors)

الموجودة على اسطح هذه البكتريا الخاصة بالارتباط مع عامل التلزن لبكتريا E. faecalis .

ان قدرة E. faecalis على تلزن الانواع الاخرى من البكتريا يساعدها في المنافسة على استيطان بيئات معينة . ويمكن منع استيطان البكتريا الممرضة في الامعاء بوساطة انواع من البكتريا التي تنافسها على مواقع الارتباط . وقد لوحظ ان هنالك سلالات من المكورات المعوية E. faecalis لها القدرة على منع التصاق E.coli الممرضة بالغشاء المخاطي المبطن عن لامعاء الدقيقة للخنازير الصغيرة (piglet) وهذا الالتصاق متخصص ، ويمكن ان يعد ذلك احد انواع المعززات الحياتية (probiotics) (٩) .

بينت نتائج احدى الدراسات ان E. faecalis يمكن ان تشكل احدى وسائل المعدلات المناعية (immunomodulators) الرئيسة ، ويمكن لهذه البكتريا ان تنظم الاستجابة الخمجية (inflamatory respouse) عن طريق عوامل معينة ويشترك في ذلك ايضا الكربوهيدرات الموجودة على سطح الخلايا التي تساهم في ارتباط البكتريا مع جدران الامعاء (١٠) .

ـ تلزن العامل المستخلص مع البكتريا السالبة لملون كرام

من اجل التعرف على المادة او العامل المسؤول عن التلزن منفصلا عن الخلية البكتيرية فقد تم استخلاصه بعد تكسير الخلايا بعدة طرق وتم اختيار طريقة التكسير بالكرات الزجاجية التي اعطت افضل نتائج من طريقة استخدام مادة SDS ، ثم الترسيب بالكحول الاثيلي الذي اعطت النسبة (١:٤) نتائج اعلى من النسبة (١:٣) اما النسب الباقية اهملت لعدم تاثيرها ، وعند معاملة هذا المستخلص بخلايا البكتريا السالبة تم استبعاد S .typhi لقلة تلزنها مع خلايا البكتريا لعدم تميزها لعامل التلزن على سطح البكتريا. (11)

اظهرت النتائج الموضحة في الشكل (٢) قدرة العامل المستخلص على تلزن انواع البكتريا المستعملة بنسب اعلى من تلزن الخلايا وكانت K .pneumonia اعلاها نسبة (٧٧%) عند الترسيب بنسبة (١:٤) و٧٢% عند الترسيب بالنسبة (١:٣) من الكحول وهذه النتيجة متوافقة مع نتائج تلزن الخلايا ، ويمكن تفسير ارتفاع نسب التلزن هذه الى ان عملية الاستخلاص ادت الى تحرير عامل التلزن من الخلايا وتعريضه الى مساحة سطحية اكبر من خلايا البكتريا الاخرى أي تعريضه لعدد اكبر من المستلمات الموجودة على اسطح هذه الخلايا .

ان ترسيب عامل التلزن باضافة الكحول الاثيلي الى مستخلص الخلايا بعد تكسيرها يؤدي الى تركيز المواد المستخلصة (بروتينات وكربوهيدرات) ، وبالتالي زيادة فاعليتها قياسا بالمحاليل المخففة وهذا يفسر ايضا زيادة نسبة التلزن المستخلص E. faecalis EM1 مع البكتريا السالبة لملون غرام بعد هذه الخطوة.

تاثير العوامل المختلفة على القدرة التلازنية للعامل التلزن:-

- درجات الحرارة و الارقام الهيدروجينية

بينت نتائج الشكل (٣) اعلى قيم تلازنية للمستخلص مع الخميرة S. cerevisiae كانت تتراوح بين الدرجات الحرارية (٣٧ – ٤٥ مْ) عند الارقام الهيدروجنية بين (٧ – ٩) واقل نسبة تلزن ظهرت في درجة حرارة ١٥ مْ والرقم الهيدروجيني ٥.

هذه النتائج تدل على ان تلزن العامل يحدث في مدى كبير من درجات الحرارة والارقام الهيدروجنية وذلك لطاقته التحملية العالية) ، لذا ممكن استخدامه في الكشف عن كثير من الانواع البكترية مختلفة درجات حرارة التنمية وفي اوساط مختلفة التراكيب دون التاثير على تركيب الجزيئي او الكيميائي للعامل او عمله التلازني وهذه صفة اللكتينات كعوامل لاصقة (١٢).

اظهرت الدراسات وهو احد العوامل الضراوة التي تمتلكها البكتريا والتي جعلت منها ذات قابلية لتحمل العوامل المجهدة مثل ارتفاع درجات الحرارة الى ٦٠مْ و pH 9.6 ومادة SDS .(١٣)

- الخزن

خزن مستخلص عامل التلزن لمدة ١٠ ايام في درجة حرارة الغرفة ، وكانت قيمة التلزن مع خلاياS cerevisiae قد انخفضت بمقدار قليل من (٧٧% - ٧٥%) وهذا بسبب متانة تركيبه الداخلي لاحتوائه على اواصر قوية مثل (disulphate) (١٢) وكلما زادت مدة الخزن قلت القدرة التلازنية.

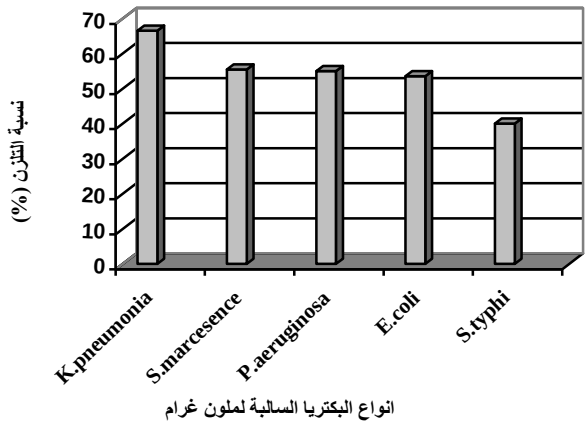
تعين طبيعة عامل الالتصاق بالكاربوهيدرات

عومل المستخلص الحاوي على عامل التلزن لبكتريا E. faecalis EM1 بانواع مختلفة من الكربوهيدرات للتعرف على خصوصية العامل الذي اثبت انه عامل تلزن بدراسة سابقة (٧) ، وبينت النتائج (شكل ٤) ان معاملته بالكالكتوز يختزل نسبة التلزن الى(١٢ – ٣٢ %) والكربوهيدرات الاخرى يتبعها اللاكتوز الذي ثبط التلزن من (٣٤ -٤٤ %) قياسا بالسيطرة (٦٥.٥ -٧٩.٥%) عند تلزنه البكتريا السالبة لملون غرام ، ولوحظ ان التلزن مع وبعدها ثبط التلزن مع بكتريا P.aeruginosa ينخفض الى ادنى مستوياته عند معاملة المستخلص بالكلاكتوز واللاكتوز والنشا.

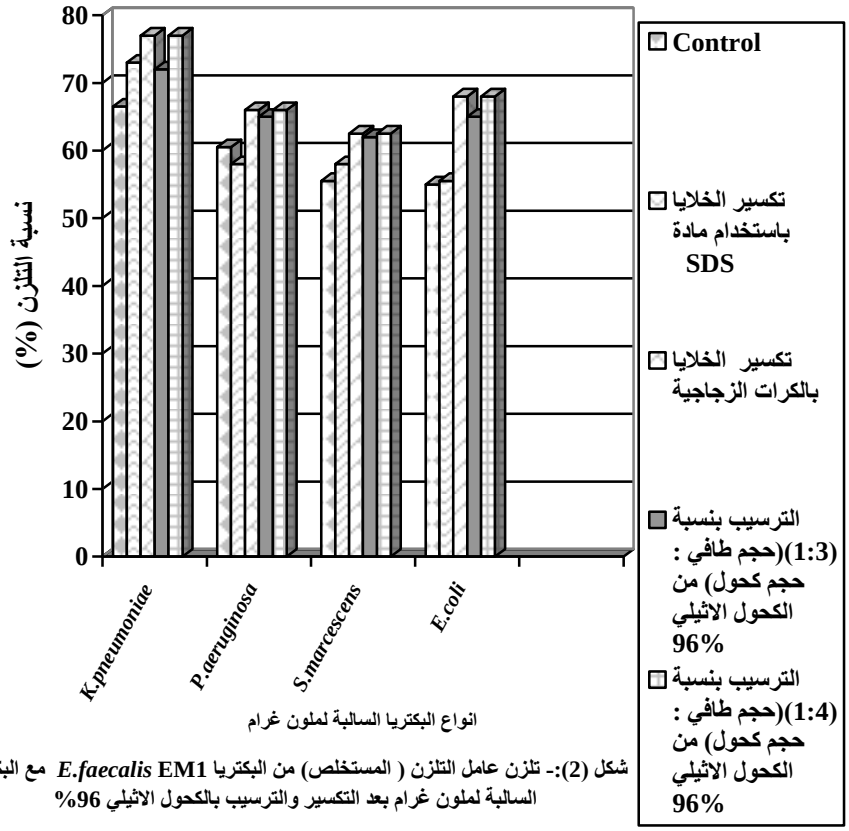
يتضح من النتائج ان عامل التلزن لبكتريا E. faecalis EM1 من اللكتينات ذات الخصوصية للارتباط بالكالكتوز وقليلا مع اللاكتوز لانه سكر ثنائي يحوي في تركيبه على سكر الكالكتوز، واثبتت الدراسات ان مثل هذه الخصوصية تنطبق على بروتينات اللاصقة العائدة الى البروتينات السطحية لعائلة (LraI) الخاصة بلواصق streptococcal ، ويسمى هذا اللكتين (عامل التلزن) بـEfaA (E.faecalis dhesion A) وهو عامل له الخصوصية لربط البكتريا مع الانواع البكترية الاخرى فقط (١٣).

افادت هذه الخصوصية لعامل التلزن (المستخلص) في هذه دراسة في الكشف عن انواع البكترية الممرضة التي استخدمت للكشف عن مدى الالفة التلازنية بينها وبين البكتريا E. faecalis EM1 لاستخدامه كعلاج ضد الامراض التي تسببها K pneumoniae. و البكتريا S. Marcescens بمنع استيطانها على انسجة الجسم . وكشفت الكثير من الدراسات ان القدرة التلازنية لبكتريا E. faecalis EM1 التي هي (human microflora) تجعل منها ذات القدرة على الالتصاق مع البكتريا المشابهة لها من انواع اخرى مثل البكتريا E .gallinarum وE. faecium التي تكون صديقة لجسم الانسان وتعمل بارتباطها معا حاجز وقائي في امعاء الانسان من المكروبات الممرضة (١٤) اضافة الى ارتباطها بهذه الممرضات ارتباط موجب تناسقي عكسي (positive coorsponding) كمضادات بكترية تمنع الخلايا من انتاج المواد المهيجة للالتهابات والمواد المهيجة للخلايا السرطانية (colon cell line) (١٠).

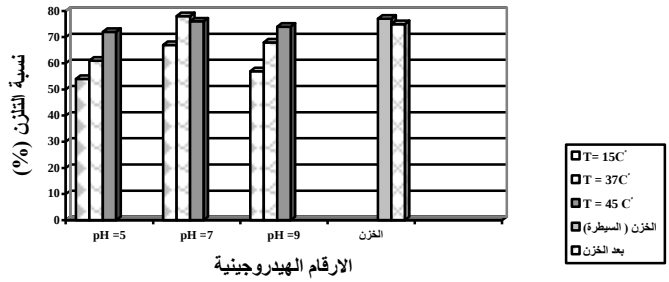
و تفيد هذه الخاصية في صنع لقاح محث للخطوط المناعية الاولية والاجسام المضادة للوقاية من هذه الممرضات [١٥]



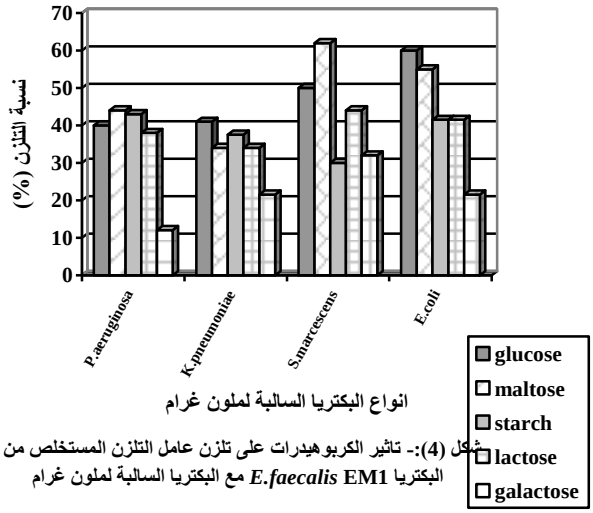
شكل (١):- تلزن *E.faecalis EM1* مع انواع البكتريا السالبة لملون غرام



شكل (2):- تلزن عامل التلزن (المستخلص) من البكتريا *E.faecalis* EM1 مع البكتريا السالبة لملون غرام بعد التكسير والترسيب بالكحول الاثيلي 96%



شكل (3) :- تاثير درجات الحرارة والارقام الهيدروجينية والخزن المختلفة على تلزن عامل التلزن المستخلص من البكتريا *E.faecalis EM1* مع الخميرة *S.cerevisiae*



شكل (4):- تاثير الكربوهيدرات على تلزن عامل التلزن المستخلص من البكتريا ***E.faecalis*** **EM1** مع البكتريا السالبة لملون غرام

References:-

1-Santos, R, P; Arruda T.P.; Cavalno, C.B.; Coarneir ,V.A.;Braga,L. Q.,Teixeira ,E.H; Arrnda, T..; Cavada, B. S.; Havd, A.; Oliveira J. M; Bezerra, G.A. and Freirc, V.V.(2008).Correlation between E .faecalis biofilm development stage and quantitative surface roughness using atomic force microscopy. Micro. S. Microanal.(3):1-9.

2-Riera, A.S; Daud, A.; Gallo,A.; Genta, S.; Aybar , M. and Sanchez, S. (2003).Antibacterial activity of lactose – binding lectiens from Bufo arenarum skin. Biocell. 27(1):37-46.

3- Budzik, J. M. and Schneewind ,D.(2006).Pili prove pertinent to enterococcal endocarditis .J. clin. Invest. (116):2382 –2584.

4- Guzman, C.A.; Lipira , G. and Calegari, L.(1989). Role of adherence in pathogenesis of Enteroccocuse faecallis urinary tract infection and endocarditis . Infection and Immunity .57(6): 1834-1838.

5- Tyriak, I. and Ljungh , S.(2003).Binding of extracellular matrix molecules by enterococci . Current Microbiology.46(6):435-442.

6- Sophie B., Sylviane Furlan and Pascale Serror(2006) C-treminal WXL domain mediates cell wall binding in E.faecalis and other gram negative bacteria. Journal of bacteriology .189(4):-9012-9194.

٧- حسن ، شذى سلمان ومجيد ، اثير احمد .(٢٠٠٩) تاثير الظروف المزرعية في عامل التلزن (اللكتين) لبكتريا Enteroccocuse faecalis مع خميرة Saccharomyces cerevisiae. المؤتمر العلمي الثالث لكلية العلوم- جامعة بغداد – ص ٩٤٢-٩٥١.

٨- Peng, X;Sun, J.; Jserentant, D.; Michiels,C and Verachter, H .(2001). "Flocculation & co flocculation of bacteria by yeast " Appl. Microbial. Biotechnol.55:777-781.
9- Jin, L.Z; Marquadt , D.; R.R. and Zhao, X.(2000). Astrain of E. faecalis (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic E.coli K88 to porcin small intestinal mucus. Appl. Euviron. Microbiol. .66 (10):4200-4204.
١٠- Wang, S; Ng, L.H.; Chow, W.L. and Lee ,X.K.(2008).Infant intestinal of E .faecalis down- regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines . World J.Gastroenternal.14(7):1067-1076
١١- Anne, Bishop ,Deborah, House, Timothy, Perkins, Stuphe , B.R.; A.; Kingsley and Gordon Dougan (2008).Interaction of S .typhi with epithelial cells :- roles of surface structures in adhesion and invasion. Society for General Microbiol. (154):-1914-1926.
12- Ajit Varki, Marilynn E. Etzler, Richard D. Cummings, and Jeffrey D. Esko(2009). Essentials of Glycobiology . Second Edition The Consortium of Glycobiology Editors, La Jolla, California New York
13 Guven Kayaoglu , Dag Orstavik and low (2003).Virulence Factors of Enterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Disease. Gazi University, Faculty of Dentistry, Department of Endodontics and Conservative Treatment, 15(5):- 308-320.
14- Fernondo, Carcia- Garrote, Emilia Ceraenado and Bouza.(2000) Evaluation of a new system,VITEK2 for identification and antimicrobial susceptibility testing of enterococci. Journal of clinical microbial. 38(6):- 2018 – 2111.
15- Patricia J.; Shorrock . Peter, A.; Lambert, Eileen, J.; Altchison, E.; Grace , Smith, Jam, D.; Farrell and Gutschik.(1990). Serological response in E. faecalis endocarditis determined by enzyme-linked immunosorbent assay. Journal of Clini. Microbiol.:-195-20