أستخلاص وتنقية حامض اللايبوتكوك جزئيا من بكتريا *Enterococcus faecalis* المعزولة محليا.

خمائل لطفي شاكر ، مي طالب فليح و لينة عبد الكريم
قسم علوم الحياة، كلية العلوم ، جامعة بغداد.

الخلاصة

جمعت 47 عزلة لبكتيريا *Enterococcus faecalis* من أصل 300 عينة (100 خروج و100 أدرار و 100 أصابات جلدية) و بنسبة 28% للخروج و 15% للادرار و4% لاصابات الجلد. أستخلص حامض اللايبوتكوك (LTA) من العزلـــة *E. faecalis* U 12 لكونها العزلة الاكثر مقاومة و ضراوة ما بين عزلات الادرار ، أذ تم الاستخلاص بطريقة الفينول الساخن و نقي جزئيا بطريقة كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي بوساطة هلام Sepharose CL-4B (1.6×65) سنتمتر، أمتدت قمة الـــ LTA من الجزء (16-27)، أذ بلغ تركيز الفوسفات 45.4 مايكرومول/ غرام و نسبة البروتين 1.2% من الـ LTA المجفد. تم الحصول على فعالية تحسسية قدرها 62.5 مايكروغرام/ مليلتر لمستخلص الـــ LTA و فعالية تحسسية قدرها 15.6 مايكروغرام/مليلتر للـــ LTA المنقى جزئياً ، في حين لم يتم الحصول على أي فعالية تحسسية لكريات الدم الحمر بوساطة الـــ dLTA.

الكلمات المفتاحية: استخلاص، حامض اللايبوتكوك، الفينول، dLTA.

المقدمة

عرفت المكورات المعوية في القرن العشرين كممرض فعال للانسان، و لكونها غير ضارية في الاشخاص الاصحاء بوصفها جزءا ˝ من النبيت الطبيعي لذا لم يتم توقعها كمسبب حقيقي للمرض، و تصبح ممرض منتهز مهم خصوصا في مرضى المستشفيات، أذ تسبب *Enterococcus faecalis* نسبة (80-90)% من هذه الحالات [1،2]. من الاصابات التي تسببها المكورات المعوية : ألتهاب المجاري البولية، و التهاب شغاف القلب، وتجرثم الدم، و أصابات الجهاز العصبي المركزي في المسنين و السحايا لحديثي الولادة، و أنتان داخل البطن، وألتهاب قزحية العين [3،4].

يعـرف الـــ LTA بأنـــه حامض التكويـــك المرتبـط بشحـــوم الغشـــاء، وهـــو الجـــزء المقـــابـل للـــــــ Lipopolysacchride للبكتيريا السالبة لملون كرام، المكون من بوليمرمن تكرار وحدات Glycerol-Phosphate مرتبط عرضيا بوساطة أصرة 1-3 Phosphdiester، يقترب LTA للمكورات المعوية بما فيه الكفاية من سطح الخلية حتى نهايتها البعيدة ليعمل كمستضد لهذه المجموعة المصلية (مجموعة D)، اذ يحفز تكوين أضداد IgM، وIgG، و IgA [5،6].

يعد الـــ LTA عاملا ˝ محفزا ˝ للاستجابة الالتهابية للمضيف و من ثم دوره في الصدمة الأنتانية للبكتيريا الموجبة لملون كرام، كما يمتلك الـــ LTA القدرة على الأرتباط بالخلايا المناعية و من ثم أنتاج Interleukines، و$TNF\ \alpha$، و $IFN\ \gamma$ و Nitric Oxide [7،8]. يعمل الـــ LTA تأزريا مع الببتيدوكلايكان كعامل محفز للاستجابة الالتهابية للمضيف، و ينتج عنها صدمة و فشل وظيفي للعديد من الأعضاء [9،10]. كما يمتلك الـــ LTA القدرة على تنشيط المتمم بالطريقة التقليدية و الطريقة البديلة [11]. ولهذا هدفت هذه الدراسة الى أستخلاص و تنقية جزئية لـــ LTA من بكتريا *E. faecalis* المعزولة محلياً و تحضير المصل المضاد للـــ LTA.

المواد وطرائق العمل

عزل عينات البكتيريا

جمعت العينات من أشخاص مراجعين و راقدين في مستشفى الكرخ و اليرموك و الكرامة في بغداد، للفترة 15-3-2004 ولغاية 15-11-2004. منها 100 عينة أدرار (صباحية، وسطية الجمع) مأخوذة من حالات التهاب المجاري البوليه، و 100عينة خروج، و 100عينات جلد تشمل (حروق، وجروح، والتهابات).

زرعت عينات خروج و ادرار و عينات الجلد على وسط KAA، حضنت الاطباق على درجة حرارة 45 م لمدة (18-24) ساعة. تم التاكد من عائدية العزلات لمجموعة D المصلية باستخدام الوسطين SF على درجة 45 م و KF على درجة 37 م.

أستخلاص الـــ LTA

أتبعت طريقة [12] مع بعض التحويرات و كما يلي:

حضر اللقاح بتلقيح 1500 مليلتر من مرق نقيع القلب والدماغ بالعزلة البكتيرية *E.faecalis* U12، حضنت على درجة 37° م لمدة 18 ساعة. حضر 15 لتر من وسط التنمية الخاص باستخلاص الـ ــ LTA [13]، وزع على دوارق سعة 500 مليلتر بواقع 400 مليلتر/ دورق، عقم بالموصدة. لقحت الدوارق بنسبة 10% من اللقاح، حضنت على درجة 37 م لمدة 18 ساعة في حاضنة هزازة (120 هزة/ دقيقة)، ثم وضعت الدوارق في الثلج وعرضت للنبذ المركزي المبرد بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة. علق الراسب (البكتريا) مباشرة بدارئ سترات الصوديوم (0.1) مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 3 و المبرد بنسبة 40 غرام وزن رطب للخلايا/ 100 مليلتر من الدارئ و كسرت الخلايا باضافة حجم مساوٍ من الكرات الزجاجية ذات قطر 2 مليلمتر الى العالق، استخدم المازج (Vortex) لمزجها لمدة 3 دقائق لمرتين (المدة الفاصلة بينهما دقيقة). غسلت الكرات الزجاجية بالدارئ نفسه ثم اضيفت فوق العالق. عدل الرقم الهيدروجيني الى 4.7 بوساطة NaHCO3 (1) مولاري.

أضيف حجم مساو من محلول الفينول المائي (Aqueous phenol) بتركيز 80% ومزج المستحلب علـى المحـــرك المغناطيســي ذي الصفيح ـــة الح ـــارة (Hot plate magnetic stirrer) على درجة 65 ْم لمدة ساعة.برد المستحلب ثم نبذ بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة. فصلت الطبقة المائية (Aqueous layer) عن الطبقة الفينولية (Phenol layer) بوساطة ماصة دقيقة. أعيد مزج الطبقة الفينولية والمواد المتبقية غير الذائبة مع حجم مساوي من دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري ذو الرقم الهيدروجيني 4.7 و أعيدت عملية النبذ كالسابق. فصلت الطبقة المائية المتكونة و أضيفت الى السابقة. تم ديلـزة الطبقـــة المائيـــة بوساط ـــة اكيـــاس الديلـــزة (M.W.Co:6000-8,000) لمدة يوم ضد دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 5، مع مراعاة تغيير الدارئ بين مدة و اخرى.

عوملت الطبقة المائية بانزيم الـــ RNase بمقدار (50 مايكروغرام/ مليلتر) و وضع على المازج لمدة ساعة بدرجة 4 م ثم اضيف انزيم الـــ DNase بمقدار (5 مايكروغرام/ مليلتر) لمدة ساعة ثم اعيدت عملية الاستخلاص بالفينول بتركيز 80% بدرجة حرارة الغرفة، وأعيدت عملية الديلزة ضد دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري ذو الرقم الهيدروجيني 4.7 جفد المستخلص الخام بجهاز التجفيد (Lyophilizer)، ثم قدرت كمية الـــ PO_4 بطريقة [14] و كمية البروتين بطريقة Lowry [15].

التنقية الجزئية للـــ LTA

أجريت التنقية الجزئية للمستخلص الخام بطريقة كروماتوغرافيا الترشيح الهلامي بأستخدام هلام Sepharose CL-4B ذو أبعاد (1.6×65) سنتيمتر.

أذيب 300 ملغرام من المستخلص المجفد في 3 مليلتر من دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 4.7. بعد انتهاء عملية الموازنة أنزلت العينة على العمود و تم أسترداد العينة باستخدام محلول الغسل دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 4.7. جمعت الاجزاء (Fractions) بمقدار 4 مليلتر/ جزء. قدرت كمية الـــ PO4 لجميع الاجزاء بطريقة [14] و تم قراءة الامتصاصية على طول موجي 260 نانوميتر للتحري عن وجود الاحماض النووية ، كما قدرت كمية البروتين في كل قمة فوسفاتية.

تحلل الـــ LTA بالامونيا

أتبعت طريقة [16] لغرض ازالة الشحوم المرتبطة باصرة استرية بسلسلة كليسيرول–الفوسفات للحصول على deacylated LTA (dLTA) و لمعرفة دور هذه الشحوم في الالتصاق على الخلايا الطلائية.

أذيب 10 ملغرام من مستخلص الـــ LTA في 1 مليلتر من الماء المقطر. عومل الـــ LTA بمحلول الكلوروفورم: ميثانول (1:2)، جمعت الطبقة المائية. كررت العملية لثلاث

مرات، ثم جفدت و أذيب المستخلص في 1 مليلتر ماء مقطر و أضيف حجم مساو من 30% من NH4OH، حضن لمدة يوم واحد بدرجة حرارة الغرفة.

جفد المستخلص، ثم أعيدت أذابته في 1 مليلترمن الماء المقطر. أستخلص 0.5 مليلتر من هذا المحلول بطريقة الكلوروفورم: ميثانول (1:2) ثلاث مرات. جمعت الطبقة المائية في كل مرة، ثم سحب المتبقي من الكلوروفورم: ميثانول بوساطة أكياس الديلزة باستخدام حبيبات PEG، جفد المستخلص ثم اعيد تعليقه بـــ 0.5 مليلتر ماء مقطر.

تحضير أضداد الـــ LTA

أتبعت طريقة [11]

1- تحضير راسب (TA-mBSA) (TA-methylated BSA)

حضر باضافة 3 مليلتر من الـــ (LTA 1.7 مايكرومول فوسفات / مليلتر)، الى 1 مليلتر من1% mBSA وجمع الراسب بعد اجراء عملية الطرد المركزي بسرعة 3000 دورة/ دقيقة لمدة 30 دقيقة.

2- حضر لقاح TA-mBSA للحقن بتعليق 2 ملغرام من الراسب TA-mBSA في 1 مليلتر ماء مقطر، مضاف له 1 مليلتر من مساعد فروند المنقوص و 2 مليلتر من Tween 80 2%.

3- حقنت الفئران بـــ 0.1 مليلتر من لقاح TA-mBSA في البريتون لمدة اربع اسابيع وحضر المصل و حفظ على درجة حرارة 0 ° م لحين الاستعمال.

أختبار التلازن الدموي المنفعل

أتبعت طريقة Ofek و جماعته [16] :

حضر عالق كريات الدم الحمر للانسان بتركيز 2% باستخدام PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 و حضرت تراكيز مضاعفة لمستخلص LTA، (500،250،125،62.5،31.25،15.65) مايكروغرام / مليلتر و بحجم نهائي 1 مليلتر. حضرت تراكيز مضاعفة للـــ LTA المنقى جزئياً الاتية (500،250،125،62.5،31.25،15.65) مايكروغرام / مليلتر و بحجم نهائي 1 مليلتر.

حضرت تراكيز مضاعفة للـــ LTA المعامل بالامونيا الاتية (500،250،125،62.5،31.25،15.65) مايكروغرام/ مليلتر و بحجم نهائي 1 مليلتر.

حضر مصل الـــ LTA أجري تخفيف مضاعف للمصل 1:100 و للتحري عن الفعالية التحسسية للـــ LTA أتبعت طريقة [17]:

أضيف 0.05 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر 2% الى 0.1 مليلتر من تراكيز مستخلص الـــ LTA و تراكيز الـــ LTA المنقى جزئياً و تراكيز الـــ LTA المعامل بالامونيا في أنابيب صغيرة (أنابيب درهم).

- حضنت الانابيب على درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة.
- غسلت مرتين بـ PBS ذي الرقم الهيدروجيني 7.2 ثم أهمل الراشح.
- أضيف 0.2 مليلتر من تخفيف المصل المضاعف للأنابيب و أعيد تعليق راسب الكريات بالرج.
- حضنت الانابيب على درجة حرارة 37°م لمدة 30 دقيقة.
- نبذت الانابيب بسرعة 1.000 g لمدة 5 دقيقه بالمنبذة الدقيقة (Microfuge).
- دونت النتائج بعد رج الانابيب برقة، حيث تعد النتيجة الموجبة عند وجود تلازن مرئي بالعين المجردة. عين التركيز الامثل لـــ LTA كاقل كمية من الـــ LTA (مايكروغرام/مليلتر) التي تعطي تلازناً مرئياً.

عرفت الفعالية التحسسية كالاتي:

الفعالية التحسسية = أقل كمية من الـــ LTA (مايكروغرام/ مليلتر) التي تعطي تلازن مرئي.

- حضرت السيطرة كالاتي :

اضيف 0.15 مليلتر من PBS الى 0.05 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر غير المحسسة (2%)

اضيف 0.15 مليلتر من المصل الى 0.05 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر غير المحسسة (2%)

اضيف 0.15 مليلتر من PBS الى 0.05 مليلتر من عالق كريات الدم الحمر المحسسة (2%).

النتائج و المناقشة

تشخيص العينات

الصفات المظهرية لبكتيريا *E. faecalis*

شخصت المستعمرات النامية مبدئياً على وسط KAA كمكورات معوية بظهور مستعمرات ذات لون أسود، و مرتفعة، و دائرية [18،19]. اجري الفحص المجهري للمستعمرات النامية لغرض التأكد. كما شخصت باجراء الفحوصات الكيموح يوية المتعددة من قبل [21،20] واستخدام نظام API 20 Strep و التشخيص المصلي بطريقة مجاميع لانسفيلد (Lancfield groups).

أستخلاص الـــLTA

أستخلص الـــ LTA من عزلة الأدرار U12 *E.faecalis*، التي أختيرت لضراوتها العالية و مقاومتها للعديد من المضادات الحيوية. نميت العزلة في وسط التنمية الخاص بالاستخلاص لكونه وسطاً أغنائياً يحوي على مادة K2HPO4.

تم الحصول على 20 غرام وزن رطب من البكتيريا علق بـــ 50 مليلتر من دارئ سترات الصوديوم (0.1) مولاري ذي الرقم الهيدروجيني 3 و المبرد للحفاظ قدر المستطاع على Alanine ester substituents. كسرت الخلايا بأستخدام الكرات الزجاجية والمازج على درجة حرارة 4°م و عند رقم هيدروجيني منخفض (3) لغرض تثبيط تحلل الخلية الذاتي و التميؤ المائي (Hydrolysis) للشحوم المرتبطة بالاستر بوساطة أنزيمات محلله للشحوم الداخلية و الحفاظ على الـــ LTA بشكله الطبيعي و عدم فقدان مجموعة الاسل، أذ تعمل الظروف المتعادلة و قليلة القاعدية ذات الرقم الهيدروجيني (7-8) على فقدان الالنين المرتبـــط بالاستـــر (alanine–bind Ester)[12،13] أستخدمت طريقة الفينول الساخن بدرجة حرارة 65 م لكونها تستخلص الـــ LTA بكميات كبيرة مع كمية قليلة من البروتين و النيوكليوتيدات [24،23] و هذه الطريقة تحافظ على الـــ LTA بشكله الطبيعي بنسبة [13%(90-80)].

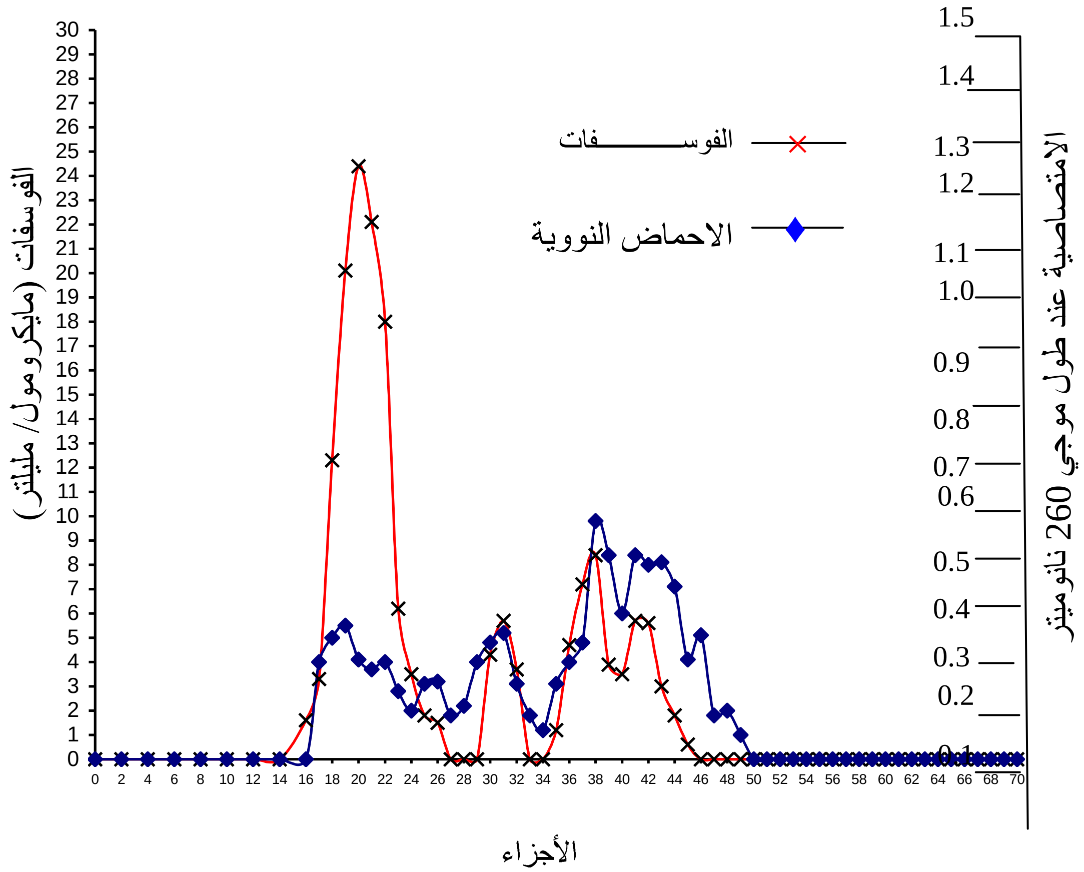
أوضح Wicken و جماعته [24] ان طريقة الفينول الساخن تعطي أعلى كمية من الـــ LTA مع نسبة قليلة من البروتين و قليل من النيوكليوتيدات عند مقارنتها مع الطرائق الاخرى للاستخلاص. بعد أجراء عملية النبذ لوحظ تكون 3 طبقات هي : طبقة مائية، و طبقة بينية، و طبقة الفينول، سحب الطور المائي الذي يحتوي على طبقة الـــ LTA الخام للحصول على أكبر كمية ممكنة من الـــ LTA، تمت ديلزة الطبقة المائية ضد دارئ خلات الصوديوم (0.1) مولاري برقم هيدروجيني 5 لازالة الفينول المتبقي و الاملاح و تعديل الرقم هيدروجيني الى 5 لغرض تهيئة المستخلص لمعاملته بانزيمي RNase و DNase التي تعمل على أزالة جزء كبير من النيوكليوتيدات. تم الحصول على 1740 مايكرومول/ غرام PO4 للمستخلص الخام المجفد بطريقة [14].

التنقية الجزئية للـــ LTA

نقي الـــ LTA جزئيا بطريقة كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي باستخدام هلام Sepharose CL-4B. قدرت كمية الفوسفات للـــ 70 جزءاً التي أستردت من العمود بطريقة [14]، كما قدرت كمية الاحماض النووية بقياس الامتصاصية عند طول موجي 260 نانوميتر الشكل (3-2). لوحظ انفصال ثلاث قمم من الفوسفات الشكل (3-3). القمة الاولى أمتدت من الجزء (16–27)، و القمة الثانية أمتدت من الجزء (29-33)، و القمة الثالثة أمتدت من الجزء (34-46).

أختيرت القمة على أساس تركيز الفوسفات الى الاحماض النووية، باعلى نسبة فوسفات/ الاحماض النووية. لذا فان القمة الاولى تمثل الـــ LTA الشكل (1) لكونها تمتلك نسبة عالية من الفوسفات/ الاحماض النوويه، مقارنة بالقمتين اللتين تحويان على نسبه أقل من الفوسفات/ الاحماض النووية، أذ تحوي القمة الثانية على نسبة من الاحماض النووية مقاربة لنسبة الفوسفات أما القمة الثالثة فتحوي على نسبة أعلى من الاحماض النووية مقارنة بالفوسفات. هذا يتفق مع نتائج العديد من الدراسات، أذ حصل Teti و جماعته [25] على حامض اللايبوتكويك كقمة أولى باستخدام هلام Sepharose CL-6B و حصل Cleveland و جماعته [26] على الـــ LTA كقمة أولى باستخدام هلام SepharoseCL-6B.

أوضحت العديد من الدراسات ان الاحماض النوويه لا يمكن أزالتها بشكل تام حتى عند أستخدام أنزيمي DNase و RNase أذ تبقى نسبة قليلة و المتمثلة بالاحماض النووية المرتبطة بالــ LTA و التي أزيل أغلبها خلال عملية التنقية بكروماتوكرافيا الترشيح الهلامي [24]. جمعت الاجزاء للقمة الاولى ثم جفدت. بلغ تركيز الفوسفات 45.4 مايكرومول/ غرام، و تركيز البروتين 1.2% من الــ LTA.



شكل (1) كروماتوكرافيا الترشيح الهلامي للــ LTA المستخلص من العزلة U12 *E.faecalis*.باستعمال عمود Sepharose Cl. 4B (1.6 X 65) سنتمتر و بواقع 4 مل للجزء باستعمال دارئ خلات الصوديوم (0.1 مولاري و برقم هدروجيني 4.7).

أختبار تلازن الدم المنفعل

أظهرت نتائج أختبار PHA ان الــ LTA المستخلص يمتلك فعالية تحسسيه قدرها 62.5 مايكروغرام/ مليلتر، أما الــ LTA المنقى جزئياً يمتلك فعاليه تحسسيه قدرها 15.6 مايكروغرام/ مليلتر، في حين يلاحظ أن الــ dLTA لا يمتلك فعالية تحسسية. أوضح كل من Ofek و جماعته[16] و Courtney و جماعته[27] بان dLTA يفقد فعاليته التحسسية للكريات لكونها معتمده على مجموعة الاسل و التي تزال بوساطة الامونيا. كما حصل Teti وجماعته[25] على فعاليه تحسسيه قدرها 31.2 مايكروغرام/مليلتر في القمه الاولى و بعد التنقيه أكثر حصل على 15.6 مايكروغرام/مليلتر، في حين حصل Chugh و جماعته [28] على فعالية تحسسية قدرها 7.8 مايكروغرام/مليلتر. يلاحظ ان الفعالية التحسسية تقل مما يدل على وجود شوائب و مواد كانت تمنع ارتباط الــ LTA بالكريات الحمر او ارتباط الــ LTA بالاضداد.

References

[1] Low D.E.; Willey B.M.; Betschel, S. and Kreiswirth B.,. "*Enterococcus*: Pathogens of the 90s". Eur.J.Surg.Suppl. 573:19-24. (1994).

[12] Fischer W.; Koch H.U. and Haas K.. Improved Preparation of Lipoteichoic Acid. Eur.J.Biochem. 17 :523-530. (1983).

[13] Fischer W.; Koch H.U. and Rosel P. Alanin Ester-Containing Native Lipoteichoic Acids Do Not Act as Lipoteichoic Acid Carrier. J.Biochem. 255 (10) : 4557-4562.. (1980).

[14] WHO. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater.20th ed. (1999).

[15] Lowry O.H.; Rosebrough N.J.; Farr A.L. and Randall R.J.. Protein Mesurment Folin -Phenol Reagents. J.Biol.Chem.*193*:265-275. (1951).

[16] Ofek I.; Beachey E.H.; Jefferson W. and Campbell G.L.. Cell Membrane –Binding Properties of Group A Streptococcal Lipoteichoic Acid. J.Exp.Med.141:990-1002. (1975).

[17] Teti G.; Tomasello F.; Chiofalo M.S.; Orefici G..and Mastroeni P..Adherance of Group B Streptococci to Adult and Neonatal Epithelial Cells Mediated by Lipoteichoic Acid. Infect. Immun. 55(12):3057-3064. (1987).

[18] Facklam R.R..Recognition of Group D Streptococcal Species of Human Origin by Biochemical and Physiological Tests. Appl. Microbiol. 23(6):1131-1139. (1972).

[19] Domig K.; Mayer H.K. and Kneifel W.. Methods Used for the Isolation, Enumeration, Characterization and Identification of *Enterococcus* spp. 1.Media for Isolation and Enumeration. Int.J. Food. Micro. 88:147-164. (2003).

[20] Holt J.G..; krieg N.R.; Sneath P.H.A.; Staley J.T. and Williiams S.T.. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.9th ed.Williams and Wilkins. Maryland, USA. (1994).

[21] MacFaddin J.F. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. 3rd ed. Lippincott, Williams and Wilkins. Philadelphia. London.

[22] Joseph R. and Shockman G.D..Cellular Localization of Lipoteichoic Acid *Streptococcus faecalis*. J.Bacteriol. 122(3): 1375-1386. (1975).

[23] Knox K.W. and Wicken A.J.. Immunological Properties of Teichoic Acids.Bacteriol.Rev. 37(2):215-257. (1973).

[2] Desai P.T.; Pandit D.,; Mathur M., and Gogate A. " Prevalence, Identification and Distribution of Various Species of Enterococci Isolated from Clinical Specimens with Special Reference to Urinary Tract Infection in Catheterized Patients". (Internet). (2001).

[3] Hancock L.E. and Gilmore M.S. "Pathogenicity of Enterococci. The *Enterococcus*" Research Site. (2000).

[4] Creti R.; Imperi M. ; Bertccini L.; Fabretti F.; Orefici G.; Di Rosa R. and Baldassarri L. "Survey for Virulence Determinants Among *Enterococcus faecalis* Isolated from Different Sources " J.Med.Microbiol. 53:13-20. (2004).

[5] Wicken A.J., and Knox K.W.. Lipoteichoic Acid: A New Class of Bacterial Antigen. Science. *187*:1161-1167(1975).

[6] Simpson W.A.; Ofec I. and Beachey E.H.. Binding of Streptococcal Lipoteichoic Acid to the Fatty Acid Binding Sites on Serum Albumin. J.Bio.Chem 225(13):6092-6097. (*5*):950-953. (1980).

[7] Morath S.; Geyer A.; Spreitzer I.; Hermann C. and Hartung T.. Structural Decomposition and Heterogenecity of Commerical Lipoteichoic Acid Preparations. Infect.Immun *70*(*2*):938-944. (2002).

[8] Amersfoort.E.S.V. ; Van Berkel, T.J.C. and Kuiper J.. Receptors, Mediators and Mechanisims Involved in Bacterial Sepsis and Septic Shock. Clin.Microbiol.Rev. 16(3):379-414. (2003).

[9] Heumann D. Barras; C.; Severin A.; Glauser M.P. and Tomasz A..Gram-Positive Cell Wall Stimulate Synthesis of Tumer Necrosis Factor Alpha and Interleukin-6 by Human Monocytes. Infect. Immun. *62*(*7*):2715-2721. (1994).

[10] Leemans J.C.; Heikens M.; Kessel K.P.M.; Florquin S. and Poll T.V.D.. Lipoteichoic Acids and Peptidoglycan from *Staphylococcus aureus* Synerginistically Induce Neutrophil Influx in to the Lung of Mice. Clin.Diag.Lab.Immun. 10 (5):950-953. (2003).

[11] Fiedel B.A. and Jackson R.W.. Immunogenicity of a Purified and Carrier-Complex Streptococcal Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. *13* (*6*): 1585-1590. (1976).

[24] Wicken A.J.; Gibbens J.W. and Knox K.W. Comparative Studies on the Isolation of Membrane Lipoteichoic Acid from *Lactobacillus fermenti*. J.Bacteriol113(1):365-372..(1973).

[25] Teti G.; Chiofalo M.S.; Tomasello F.; Fava C. and Mastroeni P.. Mediation of *Staphylococcus saprophyticus* Adherence to Uroepithelial Cells by Lipoteichoic Acid. Infect.Immun. 55(3):839-842. (1987a).

[26] Cleveland R.F.; Wicken A.J.; Daneo-Moore L. and Shockman G.D..Inhibition of Wall Autolysis in *Streptococcus faecalis* by Lipoteichoic Acid and Lipid.J.Bacteriol. *126*(*1*) :192-197. (1976).

[27] Courtney H.S.; Simpson W.A. and Beachey E.H.. Relationship of Critical Micelle Concentrations of Bacterial Lipoteichoic Acids to Biological Activities. Infect.Immun. *51* (*2*): 414-418. (1986).

[28] Chugh T.D.; Burns G.J.; Shuhaiber H.J. and Bahr G.M. Adherance of Staohylococcus epidermidis to Fibrin-Platelet Clots In Vitro Mediated by Lipoteichoic Acid**.**Infect.Immun. *58*(*2*):315-319. (1990).

Abstract

Fourty seven *Enterococcus faecalis* isolates were obtained from 300 samples (100 Stool sample, 100 Urine sample, 100 Skin infection sample) at percentages of 28, 15 and 4% respectively. Lipotechoic acid (LTA) was extracted from the isolate *Enterococcus faecalis* U12.. Extraction was carried out using hot phenol and LTA was partially purified by gel filtration chromatography using Sepharose CL- 4B (1.4×65 cm). The peak of LTA was occupied the fractions from 16-27, the concentration of phosphate was 45.4 µmol ⁄g and the protein percentage was 1.2% of the lyophilized LTA. The sensitizing activity of extracted LTA was 62.5 µg⁄ml and 15.6 µg⁄ml for partially purified LTA, with no sensitizing activity for dLTA.