فصل البروتينات الكلية والأحماض الدهنية لجرثومة *Yersinia enteriocolitica* المعزولة من الزائدة الدودية للإنسان في محافظة نينوى

د. نوال عزيز خليل
فرع الأحياء المجهرية / كلية الطب البيطري
جامعة الموصل

د. أميرة محمود الراوي
كلية العلوم / قسم علوم الحياة
جامعة الموصل

الاستلام 2011 / 02 / 28

القبول 2011 / 07 / 10

ABSTRACT

The study was conducted to isolate *Yersinia enterocolitica* from human sources including 90 samples from appendixes of human. Extraction of crude proteins of the bacterium were done. The identification of protein were carried out by using Sodium Dodecyle Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis technique. (SDS-PAGE).

The study showed the bacteria isolated from appendixes samples contain (4) proteins bands with molecular weight 22, 24, 43, 66 KDa approximately.

Detection of free fatty acids of *Yersinia enteriocoltica* by thin layer chromatograph (TLC) was performed and the results showed the presence of two types of fatty acids, Oleic acid and Palmatic acid.

الملخص

تضمنت الدراسة عزل جرثومة *Yersinia enterocoltica* من مصادر بشرية تضمنت 90 عينة جمعت من عينات الزائدة الدودية للإنسان، وتم استخلاص البروتينات الكلية للجرثومة وفصلها بتقنية الهجرة الكهربائية PAGE-SDS لحساب الأوزان الجزيئية لها حيث أظهرت النتائج وجود (4) حزم بروتينية للعزلات المعزولة من عينات الزائدة الدودية وبأوزان جزيئية تقريبية 66 ,43 ,24 ,22 كيلو دالتون على التوالي.

التحري عن الأحماض الدهنية الحرة الموجودة في جرثومة*Yersinia enteriocolitica* تمت باستخدام تقنية التحليل الكروماتوكرافي للصفائح الرقيقة TLC وأوضحت النتائج وجود نوعين من الأحماض الدهنية تمثلت بالحامض الدهني Oleic acid والحامض الدهني Palmatic acid.

المقدمة

تتصف خلايا جرثومة *Yersinia enterocolitica* بأنها عصيات ثنائية القطب lerBipo سالبة لصبغة كرام وتظهر بأشكال مختلفة في المزارع القديمة، غير مكونة للسبورات، متحركة بأسواط محيطية Peritrichous flagella بدرجة (25-22°م) وغير متحركة بدرجة 37°م [ ] 12,، تظهر حركتها في الأوساط السائلة على شكل حركة سباحة Swimming Motility، أما في الأوساط الصلبة فتظهر على شكل حركة عجية Swarming Motility [3].

وصفت جرثومة *Yersinia enterocolitica* بأنها هوائية أو لا هوائية اختبارية Facutative anaerobic ولها القابلية على النمو بدرجات حرارية تتقارب ما بين (44-0°م) لكن الدرجة الحرارية المثلى للنمو تتقارب بين 22°م و 29°م، تتميز معظم عزلات جرثومة *Yersinia enterocolitica* بأنها لا تستهلك السترات، لا تنتج الاندول، سالبة لاختبار الفوكس بروسكاور فضلاً عن أن جميع عزلات هذه الجرثومة تكون موجبة لاختبار المثيل الاحمر. وقد أظهرت الدراسات أن جرثومة *Yersinia enterocolitica* تمتلك العديد من عوامل الضرارة التي تشفر أما كروموسوميا أو بواسطة البلازميدات وتمكن الجرثومة من العيش والتكاثر في الأنسجة اللمفاوية للمضيف وأحداث المرض ومن العوامل المشفرة كروموسومياً وبلازميديا هي جينات الالتصاق *Ail gene* وجينات الدخول *Inv gene*، وبر وتينات الغشاء الخارجي Yersinia Outer Proteins(Yops) والمشفرة بالبلازميد Plasmid Yersinia Virulence (Pyv والتي تؤدي دوراً رئيسياً ضد عملية البلعمة حيث تحقن هذه البروتينات الجرثومية في سايتوسول خلية المضيف وقد أشارت العديد من الدراسات إلى أن هذه البلازميدات تؤدي دوراً أساسياً في أمراضية الجرثومة وتشفر عن (6) بروتينات على الأقل وهي YopD , YopM, YopO, YopB, YopE, YopH [ ] 4,56,.

الجين امشفرلبروتين الالتصاق Yad A والمحمول على بلازمد الضراوة PYV 7[8 ,] وهو عبارة عن لبيفات تغطي سطح الجرثومة و تعد واسطة للارتباط بخلايا HEP_2 خاصة في منطقة اللفائفي حيث يعزز من التصاق الجرثومة بالطبقة المخاطية ويغير خاصية الجرثومة لرهب الماء من خاصية الكارة للماء Hydrophobic إلى خاصية المحبة للماء

Hydorphilic الذي يزيد من Mucin فضلا عن يساعد على ارتباط الجرثومة بالخلايا الطلائية والكولاجين والفايبرونكتين [910,]. إن YadA له دور فعال في ضراوة الجرثومةحيث أشار باحثون عديدون إلى أن من بين وظائف البروتين YadA مقاوم للمصل وخاصية رهاب الماء لسطح الخلية والتلازن الذاتي والتلازن الدموي]1112,[.

أما بالنسبة للحوامض الدهنية الموجودة في جرثومة *Yersinia enterocolitica* فتتمثل بحامض)016C: (Palamatic acid وحامض)118C: (Oleic acid وحامض)161C (Palmitoleic acid، إضافة إلى وجود كميات كبيرة من الأحماض الدهنية المشبعة وغير المشبعة والحاملة لحلقة Cyclopropane، فضلاً عن احتوائها على الدهون المفسفره مثلcardiolipin, lysophosphatidylglycerol, phatitdylethanolaminepho , phosphatidylglycerol, lysophosphatidylethanol amines [ ]13.

إن نمو هذه الجرثومة في مديات واسعة من درجات الحرارة له تأثير في تركيب الأحماض الدهنية حيث تزداد الأحماض الدهنية المشبعة وأحماض ropaneCyclop وتقل الأحماض الدهنية غير المشبعة عندما ترتفع درجة حرارة الوسط [1415,].

المواد وطرائق العمل:

العينات:

جمعت 90 عينة من عينات الزائدة الدودية للفترة من كانون الثاني ()2003 ولغاية اذار(2005), من مرضى بأعمار مختلفة تراوحت بين (45-12) سنة راقدين في مستشفى السلام وابن سينا في مدينة الموصل، خضعوا لعملية استئصال الزائدة الدودية، حيث وضعت العينات في الوسط الناقل Peptone Physiological Saline بحجم (15) سم لكل عينة. بعد جلب عينات الزائدة الدودية تم تقطيعها وسحقها ثم لقح (5) سم^3 منها في (45) سم^3 من وسط مرق تربتون الصويا TSB. حضت الأنابيب في (25°م) لمدة (24) ساعة، بعد انتهاء مدة التحضين أخذت حملة لوب من الانابيب الموجبة ولقحت على الوسط الانتخابي Cefsulodin Irgasan CIN(Novobicin((16) حضنت الأطباق بدرجة (25°م) لمدة (24) ساعة، بعد التحضين ولغرض تشخيص جرثومة *rsinia enterocoliticaYe* حضرت مسحات من المستعمرات النموذجية لهذه الجرثومة التي تبدو بشكل عين الثور)Bull eye(على الوسط الانتخابي CIN ولوحظ شكل ولون المستعمرات ومواصفاتها. صبغت الأغشية بصبغة كرام وفحصت مجهرياً لملاحظة شكل الخلايا الجرثومية وطبيعة اصطباغها, كما أجريت الفحوصات البايوكيمياوية التي تضمنت اختبار الاوكسديز، الكتاليز، الاندول، اختبار المثيل الاحمر والفوكس بروسكاور، استهلاك السترات، اختبار اختزال النترات، اختبار تخمر السكريات[4].

تحضير المستخلص البروتيني:

حضر معلق من الجرثومة بتلقيح وسط نقيع القلب والمخ مع التحضين بدرجة حرارة 37م لمدة 24 ساعة، جمعت الخلايا وغسلت بمحلول الملح الفسيولوجي، علقت بالمحلول نفسه ورسبت الخلايا بواسطة جهاز الطرد المركزي المبرد(xg10000) لمدة 5دقائق، علق الراسب بدارئ ترس حامض الهيدروكلوريك (HCl Buffer-Tris) 0650. مولار،2% ٍ ٍ SSD، 5% mercaptoethanol -B،10% glycerol وصبغة 0010.% bromophenol blue ولمدة 5 دقائق واصبحت العينة جاهزة 19.

فصل البروتينات بتقنية الهجرة الكهربائية وباستخدام: PAGE-SDS

Protein separating by using Sodium Dodecyle Sulphate Poly Acrylamide Gel Electrophoresis
(SDS-PAGE):

تعتمد هذه التقنية على فصل البروتينات حيث أن سطح البروتين يحوي شحنات موجبة وسالبة فعند وضعها في المجال الكهربائي سوف تتجه إلى القطب المعاكس لها بالشحنة وتعمل مادة SDS على إحاطة الشحنات في المجاميع المختلفة للمركبات المراد فصلها وتعتمد عملية الفصل على الوزن الجزيئي للمركبات ودرجة الحرارة وتركيز الهلام وشدة المجال الكهربائي المستخدم] 18] 17[. وتتكون المحاليل مما يلي:

أولاً: المحاليل الأساسية (Stock Solution)

ثانياً: محاليل العمل Working Solution

تتكون من هلام الفصل gelSeparating Polyacrylamide وبتركيز 57.% اضافة الى الهلام الأولى Stacking Polyacrylamide Gel وبتركيز 753.%.

تحضير وحقن العينة:

تم تحضير العينة بمزج (50) مايكروليتر من البروتين الكلي المذاب في المحلول المحضر من إذابة 6 غم من Tris مع 48 سم من 1مولاري حامض HCl في 100سم3 بتركيز 2 ملغم/سم^3 مع (10) مايكروليتر من SDS مع (3) مايكروليتر من 2-mercaptoethenol ثم سخن المزيج في حمام مائي مغلي لمدة (3) دقائق بعدها أضيف سكروز و 10 مايكروليتر من صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol blue بتركيز .%.0050

ثم أخذ 25 مايكروليتر من المحلول المحضر ووضع على سطح الهلام وبعد ملء خزانات جهاز الفصل بالمحلول المحضر باذابة 336.غم من Tris مع 48سم من 1مولاري حامض HCl المخفف بنسبة 110: بالماء المقطر أضيف العينات والبروتينات القياسية إلى الهلام وتم ربط القطب الأعلى الموجب Anode إلى الخزان الأسفل والقطب السالب thodeCa

إلى الخزان الأعلى ووصل التيار الكهربائي وتم تشغيل الجهاز وكان التيار 6 ملي أمبير لكل أسطوانة هلام و (25) ملي أمبير لكل الهلام وتم استمرار العمل إلى أن وصلت الصبغة إلى أسفل الأنبوب بعدها تم إيقاف التيار الكهربائي وإخراج أسطوانات الهلام بدفعها بواسطة الماء المقطر واستخدم في هذه التقنية جهاز الهجرة الكهربائيةVertical Diselctrophoresis من نوع Quick Fit England Instrumentation.

تثبت أسطوانات الهلام بغمرها في محلول 20% من Trichloroacetic Acid)TCA(لمدة 30 دقيقة، غسلت بعدها بالماء المقطر وغمرت في محلول الصبغ. حيث تم استخدام صبغة Coomassie Brilliant Blue لإظهار البروتينات التي فصلت بالهجرة الكهربائية حيث حضرت الصبغة بإذابة 251. غم من الصبغة في 227 سم^3 من الميثانول و 46 سم^3 من حامض الخليك الثلجي وأكمل الحجم إلى 500 سم^3 بالماء المقطر، وغمرت أسطوانات في محلول الصبغة لمدة 30 دقيقة وبدرجة حرارة المختبر حيث تعد هذه المدة كافية لإظهار البروتينات المفصولة على الهلام، غمرت أسطوانات الهلام لمدة 45 ساعة في محلول إزالة الصبغة المحضر من مزج 7 سم^3 من الميثانول مع 7 سم^3 من حامض الخليك الثلجي، أكمل الحجم إلى 100 سم^3 من الماء المقطر إزالة الصبغة الفائضة وغسلت بعدها بالماء المقطر لعدة مرات.

فصل الأحماض الدهنية باستخدام طريقة التحليل الكروماتوكرافي للصفائح الرقيقة:

Separation of Fatty Acids by Thin Layer Chromatography (TLC)

لغرض معرفة وتحديد الأحماض الدهنية في الجرثومة المعزولة للدراسة الحالية استخدمت طريقة TLC وبالاعتماد على طريقة [20] حيث نميت الخلايا الجرثومية في أطباق حاوية على الوسط الانتخابي CIN(Cefsulodin Irgasan Novoboiocin(وحضنت بدرجة (25°م) لمدة (24) ساعة، رسبت الخلايا الجرثومية وغسلت ثلاث مرات بدارئ الفوسفيت المنظم)PBS(ذو الدالة الحامضية (37.) باستخدام جهاز الطرد المركزي بسرعة (3000) دورة بالدقيقة لمدة (15) دقيقة، أخذ الراسب وجفد باستخدام جهاز النجفيد Lyophilizer، أذيب 200 ملغم من الخلايا الجافة في 10 سم^3 من هيدروكسيد الصوديوم NAOH (57.) عياري في الميثانول المخفف بالماء المقطر بنسبة (64:)، سخن المزيج في درجة حرارة (105°م) لمدة (90) دقيقة، برد المحلول ثم أضيف اليه 12 سم3 من الماء المقطر وضبطت الدالة الحامضية عند 02. باستعمال حامض الكبريتيك بتركيز (20%). أضيف (50-30سم^3) من ثنائي الإيثر thyl etherDie وتم فصل طبقة الإيثر الحاوية على الأحماض الدهنية باستخدام قمع فصل لضمان سحب كل الدهون في المذيب وفصلها عن الحامض والماء. أخذت طبقة الإيثر الحاوية على الأحماض الدهنية وضبطت الدالة الحامضية عند (07.) وجفدت باستخدام جهاز التجفيد تحت ضغط مخلخل وبدرجة حرارة (50°م) للحصول على الأحماض الدهنية.

استعملت الصفائح الزجاجية (20×20) سم^3 من نوع Fertig platen kieselgel-DC المطلية بطبقة من السليكا بسمك 250 مايكروليتر المغمورة بالبارافين السائل المذاب في ثنائي إثيل الأيثر بنسبة (5%)، جففت بالهواء لمدة (48-24) ساعة للتخلص من الرطوبة. وضعت الأحماض الدهنية القياسية والعينة على الصفائح بمقدار (5) مايكروليتر لكل بقعة وعلى بعد (2) سم من أسفل الصفيحة، تركت البقع لتجف باستخدام مجفف الشعر أو تترك في درجة الغرفة، غمرت الصفائح المحملة بالأحماض الدهنية في خزان الفصل chamberSeparation الحاوي على محلول الفصل 100 سم3 من (بنزين – داي أثيل إثير) بنسبة (7525:) حجم/حجم، ترك محلول الفصل للصعود إلى أعلى الصفيحة قبل النهاية بمقدار 3 سم، رفعت الصفائح من إناء الفصل وعوملت بحامض الكبريتيك بتركيز (50%) وجففت بوضعها في الفرن بدرجة (120-110) لمدة (10) دقائق ثم فحصت تحت الأشعة فوق البنفسجية)UV(ذات طول موجي 365 نانوميتر لملاحظة ظهور الحامض الدهني بشكل بقع قهوائية فاتحة وتم قياس معدل الجريان للبقعة التي تم الحصول عليها من خلال المعادلة التالية:

خطأ!] 2122,[

النتائج والمناقشة

أظهرت نتائج الدراسة الحصول على عزلات لجرثومة *Yersinia enterocolitica*

من عينات الزائدة الدودية بشكل عصيات قصيرة سالبة لصبغة كرام ثنائية القطب، كما اظهر الوسط الانتخابي CIN كفاءة عالية ونمو متميز للجرثومة بظهور مستعمرات شبيهة بعين الثور ذات مركز احمر غامق محاط بهالة شفافه فضلا عن ان الوسط غني بالجلاتين و الكازائين اللذان يزودان الوسط بالنتروجين و الاحماض الامينية, مع وجود مستخلص الخميرة الذي يعد مصدر للفيتامينات الضرورية لنمو الجرثومة اضافة لاحتواء الوسط على املاح كلوريد الصوديوم المثبط لنمو الجراثيم الموجبة لصبغة كرام وبعض الجراثيم السالبة لصبغة كرام وهذه النتائج جاءت مطابقة لنتائج (16) حيث عزل الجرثومة بنسبة 99.9% عند تنميتها على وسط CIN, في حين ابدت عزلات هذه الجرثومة تباينا في تفاعلاتها الكيموحيوية [4] .

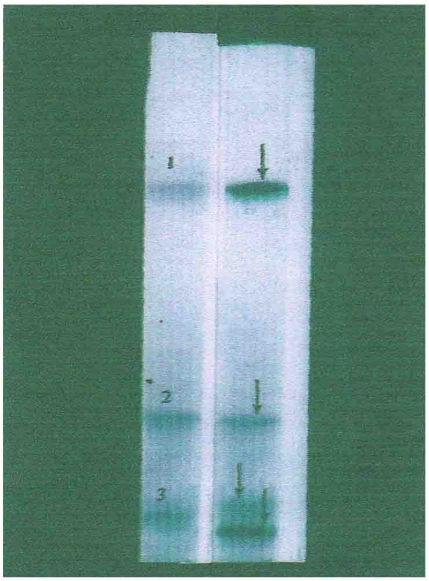
حيث ان جميع العزلات كانت ايجابية لاختبار الكتاليز وسالبة لاختبار الاوكسديز اللذان يعدان من افضل الاختبارات واسرعها لدور هذه الانزيمات في ضراوة الجرثومة حيث يعملان على تخلصها من البلاعم الكبيرة، في حين أظهرت نتائج دراسة فصل للبروتينات الكلية لجرثومة*Yersinia enterocolitica* المعزولة من عينات الزائدة الدودية وحسب طريقة Lowry ان تركيزالبروتين الكلي بلغ (74) مايكروغرام/سم فضلا عن عدم وجود تباين في عدد الحزم البروتينية للبروتين الكلي لعزلات الجرثومة مع تباين في أوزانها الجزيئية، وبالاعتماد على البروتينات المعلومة الوزن الجزيئي، وكما هو مبين في الجدول (1) والموضح في الشكل (1) تم استخدام الأوزان الجزيئية التقريبية للعزلات المدروسة.

توضح الصورة (1) الحزم البروتينية للبروتينات القياسية والحزم البروتينية الكلية للجرثومة إذ يشير الرقم (1) إلى وجود (4) حزم بروتينية للعزلة المعزولة من عينات الزائدة الدودية وبأوزان جزيئية تقريبية 22، 24، 43، 66 كيلو دالتون على التوالي.

كانت دراستنا مقاربة لنتائج دراسات أخرى التي قدرت الوزن الجزيئي للبروتين الكلي في جرثومة بين (17–92) كيلو دالتون [23].

الجدول (1): العلاقة بين الوزن الجزيئي والمسافة المقطوعة للمواد المستخدمة في تقدير الوزن الجزيئي التقريبي بتقنية PAGE-SDS.

المادة	المسافة النسبية	الوزن الجزيئي للبروتينات
البومين مصل الأبقار)Bovine Serum Albumin(	0.55	67.000
البومين البيض (AlbuminEgg)	0.32	45.000
تربسين)Trypsin(	0.8	23.000

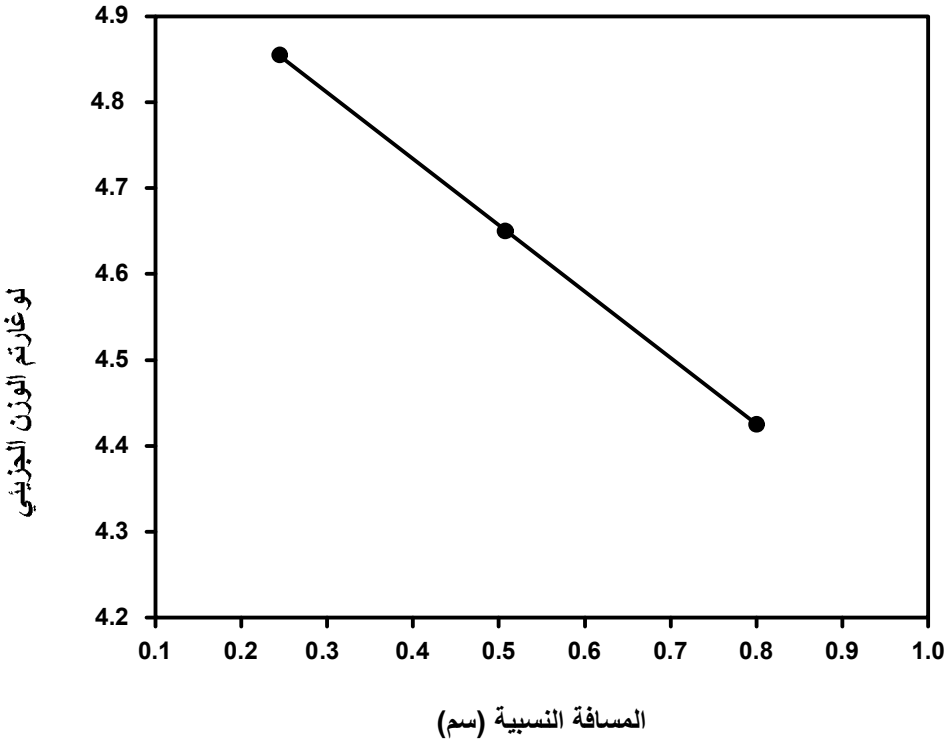


1 2

الصورة (1): الحزم البروتينية للبروتينات الكلية للعزلات المعزولة من عينات الزائدة الدودية مع الحزم البروتينية للبروتينات القياسية.

1. **العزلة رقم (1).**
2. **الحزم البروتينية للبروتينات القياسية:**

(1– البومين مصل الأبقار، 2– البومين البيض، 3– التربسين)



الشكل (1): المنحنى القياسي لتقدير الوزن الجزيئي بتقنية OAGE-SDS

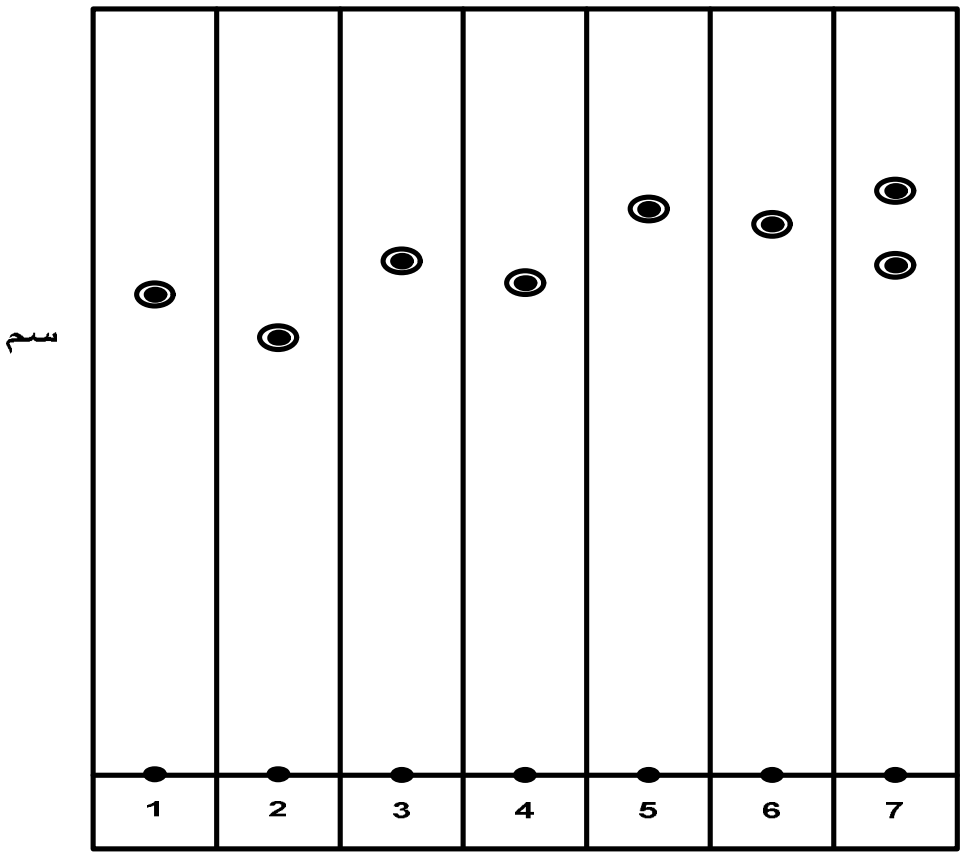
فصل الأحماض الدهنية في جرثومة *Yersinia enterocolitica*:

أظهرت نتائج الدراسة الحالية وبالاعتماد على قيم معدل الجريان للأحماض الدهنية المستخدمة في الاختبار وكما هو موضح في الجدول (2) والشكل (4) حدد نوعان من الأحماض الدهنية هما الحامض الدهني أوليك Oleic acid والحامض الدهني بالمتك Palmatic acid حيث ظهر الحامض الدهني بشكل بقع قهوائية فاتحة وشخصت البقعة بأنها تعود لهذا الحامض من خلال الجريان RF.

الجدول (2): الأحماض الدهنية القياسية والأحماض الدهنية المفصولة من جرثومة *Yersinia enterocolitica* باستخدام تقنية TLC.

الحامض الدهني	RF للأحماض القياسية	RF للأحماض الدهنية في جرثومة *Yersinia enterocolitica*
Caproic acid (C6:0)	0.54	-
Myretic acid (C14:0)	0.64	-
Palmatic acid (C16:0)	0.71	0.70
Stearic acid (C18:0)	0.62	-
Oleic acid (C18:1)	0.58	0.56
Linoleic acd (C18:2)	0.52	-

الشكل (2): الأحماض الدهنية القياسية والمفصولة من جرثومة *Yersinia enterocolitica* باستخدام تقنية(TLC)



نوع الحامض الدهني المفصول

1. Caproic acid.
2. Linolenic acid.
3. Myretic acid.
4. Oleic acid.
5. Palmatic acid.
6. Steric acid.
7. Oleic acid, Palmatic acid

هذه النتائج مقارنة لدراسة الباحث [13] الذي بين أن جرثومة *Yersinia enterocolitica* تحتوي على الحامض الدهني (016C:) المتمثل بالحامض الدهني Palmitoleic acid والحامض الدهني (118C:) المتمثل بالحامض الدهني Oleic acid.

في دراستنا الحالية لم تظهر الأنواع الأخرى للأحماض الدهنية فقد يعزى ذلك إلى افتقار بعض الأنماط لها ووجودها في الأنماط المصلية الأخرى فضلاً عن وجود عدة عوامل تؤثر في الأحماض الدهنية مثل الأس الهيدروجيني ودرجة الحرارة التي تؤدي الى اختزال بعض الأحماض الدهنية إضافة إلى التباين في معدل الجريان الذي يعود إلى الاختلاف في عدد ذرات الكاربون المكونة للحامض وعدد الأواصر المزدوجة وهذا ما أكده الباحث [20].

المصادر

1) Yvonne, S., Guntram, A., Oliver, T., Mikael, S., Ingo, B. and Erwin, B. (2004). 72(12): 6780-6789.
2) Collyn, F., Lety, M., Nair, S., Escuyer, V., Ben, A. and Simonet, M. (2000). 70(11): 6196-6205.
3) Vinayak, K., John, W., Scott, A., Nicholas, R. and Birgit, M. (2004). 150: 2289-2300.
4) Florence, T., Fabric, H., Ruddy, W. and Veronique, C. (1999).. EMBOJ. 18(23): 6793-6799.
5) Sing, A., Dagmar, R., Trardovskaia, D., Rogger, A., Wiedemann, A. and Carsten, J. (2002). J. Exp. Med. Online/Jem. 200-209.
6) Fengshao, P. and Jack, E. D. (2003). Infect. Immun. 100(3): 404-409.
7) Portnoy, D. A. and Falkow, S. (1981). J. Bacterio. 148: 877-883.
8) Cornelis, G. R., Boand, A., Aoife, P., Geuijen, C., Iriarte, M. and Stainier, I. (1998). Microbiol. and Mol. Biolog. Rev. 62(7): 1315-1352.
9) Tertti, R., Shurnik, M., Vertio, T. and Kuusela, P. (1992). Infec. Immun. 60: 3020-3024.
10) Kot, B. and Wolska, K. (2003). J. Pol. Agricult. Bio. 6:1-7.
11) Maria, F. A. and Hannu, K. (2003). Clin. Microbiol. 16(2): 220-229.
12) Heise, T., Dersch, P. (2006). 103(91): 3375-3380.
13) Kanemasa, Y., Nagamachi, E. and Shibuya, S. (1991). Microbiol. Immunol. 35(1): 77-81.
14) Abbas, C. A. and Card, G. L., (1980). Biochim. Biophys. 602:469-476.
15) Bodnaruk, P. W.and Golden, D.(1996). Food Microbiology. 13(1): 17-22.
16) Devenish,J. A. and Schiemann, D, A.(1981).Can. J. Microbiol. 27:937-941.
17) Laemmli, U. K. (1970). T. Nature. 277: 680-685.
18) Voet, D. and Voet, J. (1990). "Biochemistry". John wiely and Sons. Inc., New York, USA. Pp: 75-106.
19) Lowry, O. H., Roserongh, N. J., Farr, A. L., and Rendall, R. J. (1951). J. Biol. Chem. 193: 265-275.
20) Kirchner, J. G. (1978). "Thin layer Chromatography, in Techniques chemistry", X | V., 2nd ed., Edmand perry-Awiley Interscience publica, John Wiley and Sons. New York.
21) النعمان، أذيبة يونس شريف. (1998). التأثير الجزيئي لبعض المستخلصات النباتية على نمو وأيض عدد من الجراثيم والسالبة لصبغة كرام. أطروحة دكتوراه، كلية العلوم/جامعة الموصل.
22) الخان، حسين إسماعيل، (2001)، تأثير المستخلصات المائية لنباتي الشفلح Capparis spinosa والحنظل Citrullus colocynthis على نمو وأيض أمامية السوط لطفيليات اللشمانيا الجلدية، أطروحة دكتوراه، كلية العلوم/جامعة الموصل.
23) Michiels, T., Wattiau, P., Brasseur, R. J. M. and Cornelis, G. (1990). Infect. Immun. 58(9):2840-2849.
24) Goverd, R. L., Kusters, J. G. and Huis, J. H. (19994). J. Appl. Bacteriol. 77(1):96-104.