بسم الله الرحمن الرحيم

اطلبوا العلم من المهد الى اللحد

"رسول الرحيم ص"

١٠٠٤١

دانشگـــــاه تهـــــــران

دانشکده بهداشـــت

پایان نامـه

بـــرای دریافت درجه فوق لیسانس (کارشناسی ارشـــــــــــــــــــد)

عـلـــوم بهداشتـی

(M . S. P. H .)

در رشتـه میکـــــروب شناسـی

مـوضـــوع :

تشخیص حصبـــــــه

با روش کانتر ایمونو الکتروفـــورز

به راهنمـــائـــی

دکتـر محمـد باقـــر اسلامـی

نگـارش :

محمد رضا طاهـری

سـال تحصیلی ۶۶ ـ ۱۳۶۵

۱۰۰۵۱

هـــر کـــس به من کلامی آمـــوخت

مـــرا بنده خـــویـــش ســـاخـــت.

مولای متقیان حضرت علی (ع)

تـــعلیم و تـــعلم عـــبادت است .

امـــام خـــمیـــنی

تـــقدیم :

به پیشگاه ولی عصر (عج) و نایب بر حقش امـــام خمـــینی .

به پیشـــگاه شـــهدای مـــظلوم اســـلام .

به پیشـــگاه رزمندگان گمـــنام و پیـــروز اســـلام .

رحمت خدا بروان پاك پدر زحمتكشم
كه رسم كار و تلاش‌را به من آموخت .

تقديم :
به مادر فداكارم .
به برادر بزرگم كه در حقم پدری نمود .
به ديگر برادران و خواهران عزيزم .

تقديم :
به همسر و فرزندان عزيزم كه در طی تحصيلات طولانيم
باصبر و شكيبائی ، سختيها و دشواريهای زيادی راتحمل
نموده‌اند .

تشکر و تقدیر :

ضمن عرض سلام به پیشگاه خانواده معظم شهدا و جانبازان انقلاب اسلامی ، از استاد محترم آقای دکتر محمد باقر اسلامی که با پیشنهاد موضوع پایان نامه و قبول راهنمائی ، زحمات زیادی را متحمل شدند تشکر و تقدیر مینمایم .

از آقای دکتر کیومرث قاضی سعید و خانم پریوش قوامیان که علاوه بر شرکت در کمیته پایان نامه ، در طول این دوره تحصیلی در امر آموزش زحمت بسیار کشیدند ، سپاسگزارم .

از آقای محمد پزشکی و خانم ستاره طبیبی که در انجام امور عملی این تحقیق از هیچگونه کمکی دریغ نفرمودند ، تشکر مینمایم .

از کلیه اعضاء محترم جهاد دانشگاهی و برادران عزیز انجمن اسلامی بویژه برادر صالح محقق حضرتی و برادر حسین کاکوئی که نهایت برادری و بزرگواری را داشته‌اند تشکر مینمایم .

از کلیه مسئولین و کارکنان دانشکده بهداشت دانشگاه تهران بویژه از برادران مسئول کتابخانه سپاسگزارم .

از مسئولین محترم بیمارستان شفا یحیائیان و همکاران آزمایشگاه تشکر مینمایم .

بسمه تعالی

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فصل اول :	
تب حصبه	۱
تاریخچه	۱
عامل بیماری	۲
تقسیم بندی	٤
ساختمان آنتی ژنیك	٦
اندوتوکسین یا LPS	۱۰
فعالیت بیولوژیك LPS	۱۳
پاسخ عادی به LPS	۱۳
تب	۱٤
کاهش فشار خون	۱٥
انعقاد داخل عروقی	۱٥
انعقاد داخل لوله‌ای	۱۸
تغییرات سلولهای گردش خون	۱۸
واکنشهای ایمنی در مقابل LPS	۲۰
واکنشهای ایمنی سلولی	۲۰
واکنشهای ایمنی هومورال	۲۲
اثر ادجوانتی LPS	۲٤
تحریك فعالیت انترفرون	۲٤
سقط	۲٤
نکروز توموری	۲٥
مکانیسم بیماریزائی	۲٦
تظاهرات بالینی	۲۸
عوارض	۲۹
خونریزی روده	۲۹
سوراخ شدن روده	۳۰
عود بیماری	۳۰
ناقلین مزمن	۳۱
تشخیص آزمایشگاهی	۳۳
تشخیص باکتریولوژیك	۳٤
تشخیص سرولوژیك	۳٦
اپید میولوژیك	۳٦
درمان	۳۷
واکسیناسیون	۳۸
هدف	٤۰
معرفی روش CIE یا کانترایمونوالکتروفورز	٤۱
ژل	٤۱
عواملی که به ملکولهای مورد آزمایش بستگی دارد	٤٤
شکل ملکولها	٤٤
ماهیت شیمیائی	٤٤
بار الکتریکی	٤٤

عنوان	صفحه
فصل دوم :	
روش کار، مواد و لوازم مورد نیاز	٤٦
روش تکثیر باکتری	٤٦
جدا سازی آنتی ژنهای باکتری	٤٨
ایمن‌سازی خرگوش، تهیه آنتی سرم	٤٩
طرز تهیه مخلوط آنتی ژن ـ اد جوانت	٥١
طرز تهیه استاندارد	٥٣
کدورت سنج مك فارلند	
تهیه بافر ورونال	٥٤
تهیه ژل آگاروز	٥٤
تعیین تیتر آنتی ژن و آنتی سرم	٥٦
تهیه رقت سریال آنتی ژن وآنتی سرم	٥٨
روش رنگ‌آمیزی	٥٩
جمع آوری نمونه	٦٠
اساس عمل در آزمایش نمونه ها	٦١
دستگاه L.K.B	٦٤
دستگاه میلی پور MILLIPORE	٦٥
فصل سوم : نتایج	٦٧
فصل چهارم : بحث	٦٩
فصل پنجم : خلاصه‌بزبان فارسی	٧٣
خلاصه به زبان انگلیسی	٧٥
منابع و مأخذ	٧٧

بسمه تعالی

فصل اول

تب حصبه

بیماری حصبه در نتیجه یک عفونت عمومی بدن بوسیله سالمونلا تیفی بوجود می‌آید . معمولا" با تب ، سردرد ، ضعف ، ناراحتی شکم ، بیقراری ، بثورات جلدی موقتی ، بزرگی طحال و لکوپنی همراه بوده ، و مهمترین عوارض آن خون‌ریزی و سوراخ شدن روده میباشد .این بیماری که تنها بانسان اختصاص دارد ، نمونه کلاسیک تبهای روده ای با عامل سالمونلا هاست . تبهای روده ای‌مشابه که بوسیله سروتیپهای دیگر سالمونلا ایجاد میشوند ، پاراتیفوئید یا شبه حصبه نامیده میشوند .

تاریخچه : ابرت Eberth در سال ۱۸۸۰ باسیل مولد بیماری از غدد لنفاوی مزانتر و طحال افراد فوت شده از حصبه جدا نمود . و از این جهت باسیل ابرت نامیده شد . چهار سال بعد گافکی Gaffky توانست آنرا کشت دهد . در سال ۱۸۸۵ باکتریولوژیست معروف سالمون Salmon باکتری سالمونلاکلراسویس را کشف ، و از آن پس همراه با باکتریهای مشابه Salmonella نامیده شدند .

در سال ۱۸۹۶ جورج ویدال و آرتورسیکارد* آزمایش ویدال را پیشنهاد کردند که در حال حاضر رایجترین آزمایش سرولوژیکی موجود جهت تشخیص حصبه میباشد .

---

* Georges F.I. Widal and Arthur Sicard

عـامـل بیمـاری :

سالمونلا تیفی باسیلی است ، با اندازه تقریبی ۳ـ۱ میکرون ، گرم منفی هوازی و بیهوازی اختیاری ، متحرک که دارای فلاژلهای متعدد جانبی است (سوش 901-0 فاقد فلاژل وبیحرکت است) . گلوکز را تخمیر ولی لاکتوز منفی است .بنابراین کشت آن بر روی محیط TSI پس از ۲۴ـ۱۸ ساعت انکوباسیون ، عمق محیط را زرد و سطح آنرا قرمز مینماید . مقدار بسیار جزئی هیدروژن سولفوره تولید میکند که برای تشخیص اولیه شاخص خوبی می‌باشد . سیترات منفی و گاز تولید نمیکند . بر روی محیطهای معمولی و مغذی خوب رشد کرده و کلنی‌های بیرنگ ، براق بقطر ۳ـ۲ میلی‌متر تولید میکند .

جدول یک ، خواص بیوشیمیائی و متابولیسمی سالمونلا ها را نشان میدهد .

Characteristics	*Salmonella* I	*Salmonella* II	*Salmonella* III = Arizona	*Salmonella* IV	*Salmonella choleraesuis*	*Salmonella gallinarum*	*Salmonella paratyphi* A	*Salmonella pullorum*	*Salmonella typhi*
Indole production	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Methyl red	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Voges-Proskauer	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Citrate, Simmons'	+	+	+	+	[−]	−	−	−	−
Hydrogen sulfide on TSI	+	+	+	+	d	+	−	+	+
Urease, Christensen's	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Phenylalanine deaminase	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Lysine decarboxylase	+	+	+	+	+	+	−	+	+
Arginine dihydrolase	d	+	[+]	d	d	−	[−]	d	−
Ornithine decarboxylase	+	+	+	+	+	−	+	+	−
Motility	+	+	+	+	+	−	+	−	+
Gelatin liquefaction at 22°C	−	−	−	−	−	−	−	−	−
KCN, growth in	−	−	−	+	−	−	−	−	−
Malonate utilization	−	+	+	−	−	−	−	−	−
D-Glucose, acid production	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Glucose, gas production	+	+	+	+	+	−	+	[+]	−
Lactose	−	−	d	−	−	−	−	−	−
Sucrose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	+	+	−	−	−	+	+	−	−
Salicin	−	−	−	d	−	−	−	−	−
D-Adonitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
myo-Inositol	d	[−]	−	d	−	−	−	−	−
D-Sorbitol	+	+	+	+	[+]	−	+	[−]	+
L-Arabinose	+	+	+	+	−	[+]	+	+	−
Raffinose	−	−	−	−	−	−	−	−	−
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	−	+	+	−
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	−	+
D-Xylose	+	+	+	+	+	d	−	[+]	[+]
Trehalose	+	+	+	+	−	d	+	[+]	+
Cellobiose	−	−	−	[−]	−	−	[−]	−	−
α-Methyl-D-glucoside	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Esculin hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Melibiose	+	+	+	+	d	−	+	−	+
D-Arabitol	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Mucate	+	+	d	−	−	d	−	−	−
Lipase, corn oil	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Deoxyribonuclease at 25°C	−	−	−	−	−	−	−	−	−
$NO_3^- \rightarrow NO_2^-$	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidase, Kovacs'	−	−	−	−	−	−	−	−	−
ONPG (β-galactosidase)	−	d	+	−	−	−	−	−	−
Yellow pigment	−	−	−	−	−	−	−	−	−
D-Mannose	+	+	+	+	[+]	+	+	+	+

*Symbols: +, 90–100% of strains are positive; [+], 76–89% positive; d, 26–75% positive; [−], 11–25% positive; −, 0–10% positive. Data are calculated for a 48-h incubation period unless otherwise indicated (gelatin liquefaction and deoxyribonuclease). The incubation temperature was 36 ± 1°C for all species except *Yersinia ruckeri* and *Xenorhabdus* species, which were incubated at 25 ± 1°C.

جدول ۱ ــ خواص بیوشیمیائی و متابولیسمی سالمونلا (۱)

تقسیـــم بنـــدی :

سالمونلا یکی از جنس های خانواده انتروباکتریا است . مهمترین تقسیم ــ بندی رایج ، بوسیله کافمن و وایت صورت گرفته که در کتاب Bergy,s, Manual چاپ نهم (۱۹۸۴) بطور کامل منعکس ، و بیش از ۱۷۰۰ گونه مختلـــــــف سالمونلا را در بر میگیرد (۱) . این تقسیم بندی ، بر اساس انواع آنتی‌ژنهای پیکری (O) و فلاژلار (H) استوار بوده و شاخصهای آنتی‌ژنیکی ، تعییـــن کننده نوع آنتی‌ژن میباشند . و هر شاخص آنتی‌ژنیک دارای قند بخصوصـــــی است . جـــدول شمـــاره ۲ .

Species	Group	O antigen*	H antigens		O-specific sugars in determinants
			Phase 1	Phase 2	
S. paratyphi-A	A	(1), 2, 12	a	—	Mannose, rhamnose, paratose
S. schottmülleri	B	(1), 4, (5), 12	b	1, 2	Mannose, rhamnose, abequose
S. typhimurium	B	(1), 4, (5), 12	i	1, 2	Mannose, rhamnose, abequose
S. paratyphi-C	C_1	6, 7, Vi	c	1, 5	Mannose
S. cholerae-suis	C_1	6, 7	c	1, 5	Mannose
S. montevideo	C_1	6, 7	g,m,s	—	Mannose
S. newport	C_2	6, 8	e,h	1, 2	Mannose, rhamnose, abequose
S. typhi	D	9, 12, Vi	d	—	Mannose, rhamnose, tyvelose
S. enteritidis	D	(1), 9, 12	g,m	—	Mannose, rhamnose, tyvelose
S. gallinarum	D	1, 9, 12	—	—	Mannose, rhamnose, tyvelose
S. aratum	E	3, 10	e,h	1, 6	Mannose, rhamnose

جدول ۲ : تقسیم بندی سرولوژیکی و شیمیائی گونه های معمولی سالمونلا اعدادی که در پرانتز نوشته شده اند ، دلالت بر این دارند که شاخـــــص آنتی‌ژنیکی مربوطه ممکن است بسختی قابل یافتن باشد . در ضمن فرمـــــول آنتی‌ژنهـــای پیکری (O) ، کپسولی (Vi) و تاژکی (H) گروههای مختلف نشان داده شده است (۳) .

اخیرا" جنس سالمونلا از نظر خواص بیوشیمیائی و متابولیسمی به پنج زیر جنس تقسیم که هر زیر جنس خود دارای گونه هائی میباشد(۱) .

جدول ۳ .

	"Subgenus"				
	I	II	III	IV	V[b]
β-galactosidase (ONPG test)	−	− or x	+	−	+
Acid production from:					
Lactose	−	−	+ or x	−	−
Dulcitol	+	+	−	−	+
Mucate	+	+	d	−	+
Galacturonate[c]	−	+	d	+	+
Utilization of:					
Malonate	−	+	+	−	−
d-Tartrate	+	− or x	− or x	− or x	−
Gelatin hydrolysis (film method)	−	+	+	+	−
Growth in presence of KCN	−	−	−	+	+
Habitat of the majority of strains:					
Warm-blooded animals	+	−	−	−	−
Cold-blooded animals and environment	−	+	+	+	+

[a] Symbols: +, positive for 90% or more of strains in 1–2 days; d, positive for 11–89% of strains in 1–2 days; −, positive for 0–10% of strains in 1–2 days; x, late and irregularly positive (3–7 days). The temperature for all reactions is 37°C.

[b] L. Le Minor. M. Véron and M. Popoff, 1982, Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur): *133B*: 223-243.

[c] From Le Minor et al. (1979). Monophasic serovars of "Subgenus" III are galacturonate-negative; diphasic serovars are positive.

جدول ۳ : ویژگیهای افتراقی زیرجنسهای سالمونلا

مهمترین زیر جنس I عبارتند از ، سالمونلاکلراسویس، سالمونلاتیفی ، پاراتیفی A ، پاراتیفی B ، پاراتیفی C ، تیفی‌موریم ، انترتیید یس ، گالیناروم . کلیه سالمونلا های بیماریزا برای انسان جزو زیر جنس I میباشند .

از مهمترین زیر جنس II ، سالمونلا سالاما S.Salama را میتوان نام برد .

زیر جنس III شامل سالمونلا آریزونا و از زیر جنس IV سالمونلا هوتنا S.Houtenae را میتوان نام برد . زیرجنس V شامل سالمونلا بونگور S.Bongor میباشد . بسیاری از گونه های زیرجنسهای II ، IV و V تنها در حیوانات خون سرد یافت شده اند .

ساختمان آنتی‌ژنیک سالمونلاها :

با سیلهای مختلف خانواده آنتروباکتریاسه را بر اساس قدرت تخمیری و دیگر واکنشهای متابولیکی برروی محیطهای قندی و غذائی مختلف میتوان تشخیص داد . ولی تشخیص نهائی بسیاری از گونه ها بر اساس ساختمان آنتی‌ژنیک آنهاست . سوشهای دارای ساختمان آنتی‌ژنیکی کاملا" مشابه ، هرگزواکنشهای متابولیکی مختلفی را نشان نمیدهند .

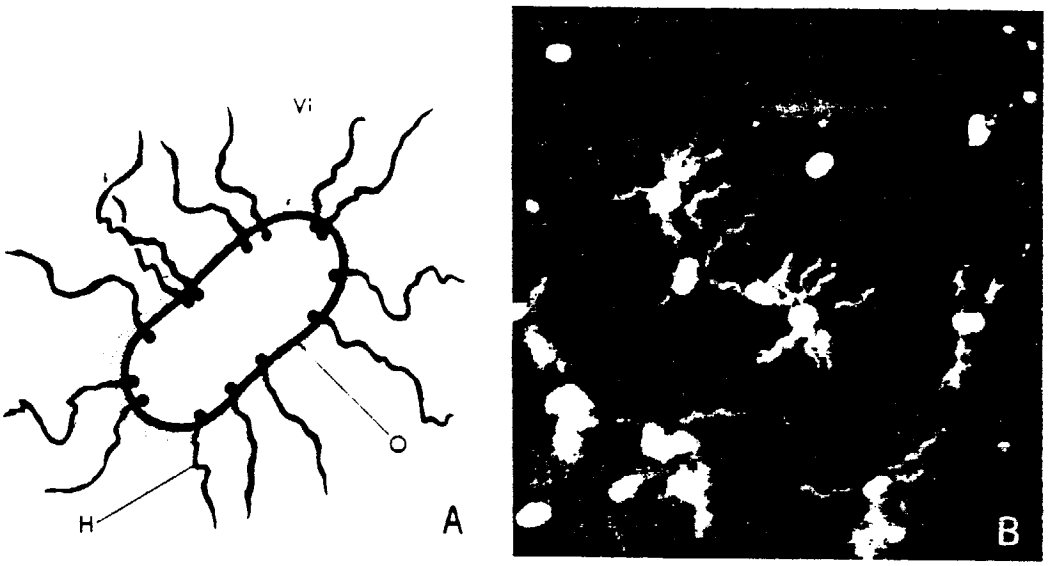
بطوریکه در شکل یک مشاهده میشود ، سه نوع آنتی‌ژن H ، Vi و O واکنشهای ارگانیسم را با آنتی سرمهای اختصاصی تعیین میکنند .

آنتی‌ژن Vi ــ خارجی‌ترین لایه پلی‌ساکاریدی سالمونلا تیفی است . بسیار ظریف بوده و بعنوان کپسول تلقی میشود . باکتریهای دارای کپسول تنها قادرند بوسیله آنتی سرمهای حاوی آنتی H یا آنتی Vi آگلوتینه شوند . و زمانی با آنتی سرم حاوی ضد O آگلوتینه میشوند که فاقد آنتی‌ژنهای H و Vi باشند .

آنتی‌ژن Viپلی‌مر یکنواختی‌از ان استیل گالاکتوزامینورونیک اسید میباشد . که بعلت گروههای کربوکسیل آزاد آن ، سطح سلول بشدت اسیدیست . (مرجع ۳ صفحه ۶۵۱) فرمول آنتی‌ژنیکی سالمونلا تیفی 9 , 12 , Vi - d میباشد .

علاوه بر سالمونلا تیفی ، سالمونلاپاراتیفی C بافرمول آنتی‌ژنیکی 6 , 7 , Vi - C - 1,5 و سالمونلا دوبلین با فرمول آنتی‌ژنیکی 1 , 9, 12 , Vi - g , P- ، دارای کپسول هستند . کپسول باکتری

سیتروباکتر فروندی از نظر شیمیائی مشابه کپسول سالمونلا تیفی بوده یعنی با یکدیگر قرابت آنتی‌ژنیک دارند و از این جهت برای یافتن آنتی‌بادی ضد ـ کپسولی در ناقلین سالمونلا تیفی مورد استفاده تشخیصی دارد . آنتی ژن Vi ضمن کشت براحتی از بین میرود . کلنیهای دارای آنتی‌ژن Vi کمی‌مات هستند .



شکل ۱ : A-دیاگرام یکما سیل رودهای و محل قرار گرفتن آنتی‌ژنهای O, Vi, H

B ـ سالمونلا تیفی رنگ شده بوسیله آنتی سرم حاوی آنتی‌بادیهای H و Vi و O نشاندار. (بافلئورسین) . نکته قابل توجه اینکه ، تعدادی از باسیلها بوسیله فلاژل بهم چسبیده اند . یعنی برخلاف وجود آنتی‌بادیهای ضد O و Vi فلاژلها مانع شده اند تا پیکره باکتریها بحد کافی بهم بچسبند .بنابراین در آگلوتیناسیون ایجاد شده بوسیله فلاژل ، سلولها کاملا" بهم فشرده نمیشوند در صورتیکه اگر فلاژل نباشد ، پیکره باکتریها بطور فشرده بهم چسبیده و آگلوـ تیناسیون متراکمی بوجود میآورند .

از دست دادن آنتی‌ژن Vi را تغییر V-W گویند . کلنی‌های V (دارای