بسم الله الرحمن الرحیم

دانشگاه الزهراء(س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد

رشته بیوشیمی

عنوان

بررسی مولکولی ژن پروتئین OapA در سویه های هموفیلوس آنفلوانزا جدا شده از ایران، در راستای طراحی واکسن بومی علیه آن

اساتید راهنما

دکتر پریچهر حناچی

دکتر سعید بوذری

استاد مشاور

دکتر سید داور سیادت

دانشجو

پریسا رحیمی (ش د:901361002)

تیر 1392

کلیه دستاوردهای این تحقیق متعلق

به دانشگاه الزهرا (س) است.

تشکر و قدردانی

سپاس خدای را که سخنوران ، در ستودن او بمانند و شمارندگان ، شمردن نعمت های او ندانند و کوشندگان ، حق او را گزاردن نتوانند. و سلام و درود بر محمّد(ص) و خاندان پاك او ، طاهران معصوم ، هم آنان که وجودمان وامدار وجودشان است ؛ و نفرین پیوسته بر دشمنان ایشان تا روز رستاخیز...

سپاسگذار کسانی هستم که سرآغاز تولد من هستند. از یکی زاده می شوم و از دیگری جاودانه.

استادی که سپیدی را بر تخته سیاه زندگیم نگاشت

و پدر و مادری که تار مویی از آنان به پای من سیاه نماند.

بر خود واجب می دانم به خاطر راهنمایی ها و الطاف بی شائبه ای که اساتید بزرگوارم سرکارخانم دکتر پریچهر حناچی ، جناب آقای دکتر سعید بوذری ، جناب آقای دکتر سید داور سیادت و سرکار خانم دکتر انیس جعفری ، به جهت پیشبرد هر چه بهتر این پژوهش داشتند ، سپاس گزاری نمایم. انجام این رساله فرصت مغتنمی بود تا نگارنده از خرمن دانش و فضل این سروان اندیشمند خوشه چینی کند. همچنین بسیار شایسته خواهد بود تا خاضعانه نسبت به الطاف بی دریغی که سرکار خانم دکتر پریناز قدم و نیز جناب آقای ابوالفضل دشتبانی بر من روا داشتند ، ابراز احترام کنم. همچنین از کلیه پرسنل و دوستان عزیزم در دانشگاه الزهرا و انسیتو پاستور ایران ، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در نهایت این پایان نامه را به محضر حضرت ولی عصر (عج) و چهارده معصوم ،

به خانواده ی عزیزم ، که تمام زندگی من هستند ،

به استادان فرزانه و فرهیخته ای که در راه کسب علم و معرفت مرا یاری نمودند ،

به آنان که در راه کسب دانش راهنمایم بودند

و به همه ی آنان که نفس خیرشان و دعای روح پرورشان بدرقه ی راهم بود ،

تقدیم می نمایم.

بر عهده ی من نیست که در مسابقه برنده شوم

اما بر من است که راست و درست باشم

بر عهده ی من نیست که حتما" در کار خود موفق شوم

اما بر عهده ی من است که به آنچه از نور الهی در دست دارم وفادار مانم.

بر من است که در کنار همه ی راستان و صدیقان باشم

و یار آن باشم که حق با اوست

و از او جدا شوم هنگامی که به خطا می رود.

آبراهام لینکلن ، ترجمه ی حسین الهی قمشه ای

فهرست

عنوان **صفحه**

1- چکیده فارسی.....1

2- مقدمه.....3

2.1- توصیف کلی باکتری.....4

2.2- تاریخچه باکتری.....4

2.3- خصوصیات باکتری.....4

2.4- سروتایپ های هموفیلوس آنفلوانزا.....5

2.5- تشخیص *H. influenzae*.....5

2.6- بیوتایپ های هموفیلوس آنفلوانزا.....6

2.7-تست ایندول.....8

2.8- آزمایش اوره آز.....8

2.9- آزمایش دکربوکسیلاسیون اورنیتین.....9

2.10-کشت باکتری.....9

2.11.1- محیط های کشت قابل استفاده.....11

2.11.1- Chocolate agar حاوی Isovital X و یا بدون افزودنی.....11

2.11.2- استفاده از محیط BHI غنی شده با فاکتورهای V &X.....12

2.11.3- رشد در محیط Blood agar همراه با ایجاد پدیده ساتیلیتیسم استافیلوکوکی.12

2.12- بیماری های ایجاد شده توسط *H. influenzae*.....14

2.13- شیوع باکتری.....15

2.14- *H. influenzae* به عنوان بخشی از فلور نرمال ناحیه ی تنفسی.....16

2.15- پاتوژنز و فاکتورهای ویرولانس.....16

2.16- کلونیزه شدن.....17
2.17- فاکتور ویرولانس اصلی در *H. influenzae* 18
2.17.1- کپسول.....18
2.17.2- پیلی 19
2.17.3- آدهزین های فیمبریال (Fimbrial Adhesion).....20
2.17.4- آدهزین های $_{1,2}$ High Molecular weight 20
2.17.5- آدهزین Hap.....21
2.17.6- آدهزین های Hia وHsf 21
2.17.7- IgA Protease.....22
2.17.8- Autotransporters.....22
2.17.9- Haemocin (HMC).....22
2.17.10- Lipopolysaccharide (LPS).....23
2.17.11- Phosphorylcholine (ChoP).....24
2.17.12- Outer membrane vesicles (OMV).....24
2.17.13- Outer Membraine Proteins (OMP) 25
2.17.14- Protein D(PD).....25
2.17.15- Opacity-Associated Protein A (OapA).....26
2.18- درمان با آنتی بیوتیک ها.....28
2.19- واکسن های طراحی شده 29
2.19.1- واکسن های *H. influenzae type b* پلی ساکاریدی و نحوه ی عمل.....30
2.19.2- واکسن های کنژوگه *H. influenzae type b* و نحوه ی عمل.....30
2.19.3- خصوصیات واکسن های کنژوگه *H. influenzae type b*.....31

2.20- Opacity associated protein A.....32
2.21- مروری بر تعیین توالی DNA 37
2.22- هدف پژوهش.....40
3- مواد و روش ها.....31
3.1- انواع سویه های مورد بررسی.....48
3.2- محیط کشت و شرایط مورد استفاده.....49
3.3- تهیه و کنترل کیفیت محیط های کشت 49
3.4- نگهداری و استفاده از سویه‌های باکتریایی.....50
3.4.1- نگهداری طولانی مدت 51
3.4.1.1- نگهداری در دیپ فریز (50 °C- تا 70- یا پایین تر) و یا نیتروژن مایع.....51
3.4.1.2- استفاده از روغن معدنی در دمای اتاق.....52
3.4.2- نگهداری کوتاه مدت هموفیلوس.....52
3.5- رنگ آمیزی گرم 52
3.6- آزمایش سیتوکروم اکسیداز.....56
3.7- آزمایش کاتالاز 58
3.8- تست ایندول 60
3.9- آزمایش اوره آز 60
3.10- آزمایش دکربوکسیلاسیون اورنیتین 61
3.11- استخراج و تخلیص DNA.....63
3.11.1- بررسی کیفیت DNA استخراج شده.....63
3.12- واکنش PCR.....63
3.12.1- مواد و واکنشگر ها بر طبق پروتکل های اولیه ی موجود PCR.....64

3.12.2- مراحل واکنشPCR.....64
3.12.3- شرایط واکنش PCR.....67
3.12.3.1- مشخصات کیت شرکت سینا کلون.....68
3.12.3.2- مشخصات کیت شرکت فرمنتاز.....68
3.13- مشخصات پرایمرهای مورد استفاده.....69
3.13.1- جفت پرایمر اول 70
3.13.2- جفت پرایمر دوم.....70
3.14- PCR ناحیه N-ترمینال ژن *oapA* با استفاده از پرایمرهای F_1R_1.....71
3.15- PCR ناحیه C-ترمینال ژن *oapA* با استفاده از پرایمرهای F_2R_2.....72
3.16- شرایط ژل الکتروفورز.....73
4- نتایج.....75
4.1- نتایج تست های تشخیصی.....76
4.1.1-بررسی فنوتیپی ایزوله های بالینی.....76
4.1.2-نتایج آزمایشات بیوشیمیایی.....77
4.2-تعیین بیوتایپ *H. influenzae* توسط تستهای بیوشیمیایی مرجع.....78
4.2.1-تست اوره آز.....78
4.2.2-تست ایندول.....78
4.2.3- تست اورنیتین دکربوکسیلاز.....79
4.3- بررسی کیفیت DNA استخراج شده.....80
4.4- نتایج واکنش PCR 80
4.5- نتایج تعیین توالی.....82

4.5.1- نتیجه ی تعیین توالی برای 3 نمونه ای که از بقیه متفاوت ظاهر شدند و در ناحیه N-ترمینال از ژن دارای باند در محدوده ی حدود 700 بودند.....82

4.5.1.1- توالی بدست آمده برای این سویه ها.....82

4.5.1.2- نتیجه BLAST X این توالی با داده های NCBI.....84

4.5.2- نتیجه ی تعیین توالی برای 11 نمونه ای که در ناحیه N-ترمینال از ژن دارای باند در محدوده ی حدود 800 جفت باز بودند.....85

4.5.2.1- توالی بدست آمده برای این سویه ها.....85

4.5.2.2- نتیجه BLAST X این توالی با داده های NCBI.....86

4.5.3- نتایج بلاست برای ناحیه ی C-ترمینال این ژن 87

4.4.4- جمع بندی نتایج.....88

5- بحث 89

6- پیشنهادات.....97

7- منابع.....99

8- ضمائم.....ز-ن

چکیده انگلیسی.....و

1- چکیده:

Haemophilus influenzae، یک باکتری گرم منفی و پاتوژن اختصاصی انسانی است که از نظر بیماری زایی می تواند ایجاد مننژیت حاد باکتریایی، سپتی سمی، اپی گلوتیت، باکتریمی، عفونت گوش میانی و غیره کند. در درمان آن، ابتدا آنتی بیوتیک ها و سپس واکسن های کنژوگه مورد استفاده قرار گرفت. در طراحی این واکسن ها از پروتئین های حفاظت شده باکتری، به همراه کپسول پلی ساکاریدی استفاده می شود. هدف این مطالعه بررسی یکی از این پروتئین های حفاظت شده در باکتری هموفیلوس آنفلوانزای ایرانی با هدف طراحی واکسن بومی علیه آن می باشد.

OapA یک پروتیین آدهزینی است که عامل ایجاد مورفولوژی کلنی شفاف در *H. influenzae* می باشد. وزن مولکولی آن 47kDa بوده و در میان تمامی گونه های *H. influenzae* حفظ شده است. OapA اتصال میکروارگانیسم به سلول های اپی تلیال در کشت سلولی را تسهیل کرده و یکی از عوامل مهم در کلنی شدن میکروارگانیسم در ناحیه حلقی گلوگاه می باشد و می تواند بعنوان یک کاندیدای مهم در طراحی واکسن علیه عفونتهای *H. influenzae* مطرح شود.

تعداد 14 سویه ی بالینی *H. influenzae* ها (4 سویه که مربوط به *Type b H. influenzae* و 10 سویه مربوط به *Nontypeable H. influenzae*)، مربوط به بخش های مختلف بدن شامل چشم، نازوفارنکس، خون، CSF و BAL از بیمارستان میلاد تهیه شد. پس از کشت باکتری ها بر روی شکلات آگار، به منظور تشخیص صحیح *H. influenzae*، تست های اکسیداز، کاتالاز و نیازمندی به فاکتورهای X و V، انجام شد. سپس جهت تعیین بیوتایپ این سویه ها، تست های ایندول، اوره آز و دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه ی اورنیتین صورت گرفت. همچنین به منظور آنالیز مولکولی این ژن، استخراج و تخلیص DNA با روش جوشاندن صورت گرفته و سوپرناتانت حاوی DNA، جهت واکنش PCR مورد استفاده قرار گرفت. برای این ژن، دو جفت پرایمر اختصاصی طراحی گردید، یکی برای قسمت N-ترمینال ژن و دیگری برای قسمت C-ترمینال. و در نهایت محصولات PCR تعدادی از سویه ها که بطور تصادفی انتخاب شده بودند، جهت تعیین توالی به شرکت های مربوطه ارسال گردید.

نتیجه تعیین بیوتایپ سویه ها نشان داد، 29٪ از سویه ها مربوط به بیوتایپ I، 29٪ مربوط به بیوتایپ II، 21.4٪ مربوط به بیوتایپ III، 7.14٪ مربوط به بیوتایپ IV، 7.14٪ مربوط به بیوتایپ V و 7.14٪ مربوط به بیوتایپ VII می باشند. نتایج واکنش PCR نیز نشان داد از

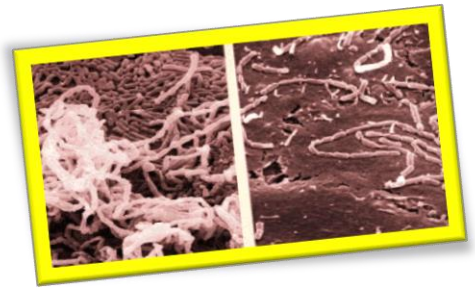
بین 14 سویه بالینی مورد مطالعه، 11 نمونه دارای باند حدود 800 جفت بازی در ناحیه ی N-ترمینال (نوکلئوتیدهای شماره ی 792-1)، و 3 نمونه ی باقیمانده ها (که همگی مربوط به *Non typeable H. influenzae*)، دارای باند حدود 700 جفت بازی در این ناحیه هستند. و هر 14 سویه در ناحیه ی C-ترمینالشان (نوکلئوتیدهای شماره ی 1295-792) دارای باند حدود 600 جفت باز بودند. یازده سویه ای که در ناحیه ی N-ترمینال خود دارای باند در محدوده ی حدود 800 جفت باز بودند، بسیار شبیه به توالی های نوکلئوتیدی موجود در NCBI بودند، بطوریکه بین 99-95٪ شباهت مشاهده گردید. برای 3 نمونه ای که از بقیه متفاوت ظاهر شدند و در ناحیه N-ترمینال از ژن دارای باند در محدوده ی حدود 700 بودند، بررسی این توالی در NCBI نشان داد که در هر سه نمونه، یک ناحیه ی حدود 125 نوکلئوتیدی که مابین نوکلئوتیدهای شماره 605 و شماره 731 بوده اند، دچار حذف شده است و لذا وجود باندی با حدود 100 جفت باز کوتاهتر از حد مورد نظر در بررسی PCR ناحیه N-ترمینال، می تواند علت آن باشد. و در کل این ژن در این سویه ها دارای 96-94٪ تشابه با توالی های NCBI بود. همچنین نتیجه بلاست نواحی C- ترمینال سویه های هموفیلوس آنفلوانزای مورد استفاده در این مطالعه، شباهت 99-95 ٪ را با داده های NCBI نشان داد. لذا پیشنهاد می شود که در تحقیقات آینده، که به منظور طراحی واکسن صورت می گیرد، به دلیل حفاظت شده بودن این ژن در میان تمامی سویه های هموفیلوس آنفلوانزای تیپ b، استفاده از آن مورد توجه قرار گیرد.

کلمات کلیدی: *Haemophilus influenzae*، *oapA* ، PCR

2. مقدمه

2.1- توصیف کلی باکتری:

Haemophilus ها، عضوی از خانواده بزرگ *Pasteurellaceae* هستند. این خانواده، تنوعی از باکتری های گرم منفی، اعم از پاتوژن های مهم مانند *H. influenzae* (شکل 1-2) تا باکتری هایی که به عنوان هم سفره ی مخاطی انسان و حیوان تعریف می شوند را شامل می شود [1].



شکل 1-2: نمایش *H. influenzae* [2]

2.2- تاریخچه باکتری:

H. influenzae، توسط Robert Pfeiffer در سال 1892 کشف شد. تا قبل از سال 1933یعنی قبل از کشف *influenza virus*، این باکتری به اشتباه به عنوان عامل سرماخوردگی محسوب می شد [3]. و چون تصور می شد که این باکتری عامل *influenza* می باشد، به همین دلیل این نام را گرفت. اما بعدها در سال 1933، Smith نشان داد که *influenzae*، توسط یک عامل ویروسی ایجاد می شود [4].

2.3- خصوصیات باکتری:

H.influenzae، کوکوباسیلوس گرم منفی غیرمتحرک [3]، میله ای شکل، بی هوازی اختیاری، و پاتوژن اختصاصی انسانی است [4]. گرچه عموما" یک باکتری هوازی است، اما می تواند به صورت بی هوازی اختیاری نیز رشد کند. گونه های کپسول دار *H.influenzae* جداشده از مایع مغزی-

نخاعی، کوکوباسیل هایی با اندازه های 0.2 تا 0.8 میکرومتر و گونه های بی کپسول خلط، چند شکلی[1] بوده و اغلب رشته ها و فیلامنت های طولانی دارند [3]. از طرفی *H. influenzae*، اولین ارگانیسمی بود که توسط دانشمندان، ژنوم آن بطور کامل تعیین توالی شد، و شامل 1830137 جفت باز DNA در یک کروموزوم حلقوی است که 1740 ژن کدکننده پروتئین و 58 ژن tRNA و 18 ژن RNA دیگر را دارا می باشد [3].

2.4- سروتایپ های هموفیلوس آنفلوانزا:

H. influenzae، شامل سویه های کپسول دار (typeable) و سویه های بدون کپسول (non typeable) می باشد. سویه های کپسول دار بر مبنای تمایز آنتی ژن کپسولی به سروتایپ های (a, b, c, d, e, f) طبقه بندی می شوند [3,4,5].

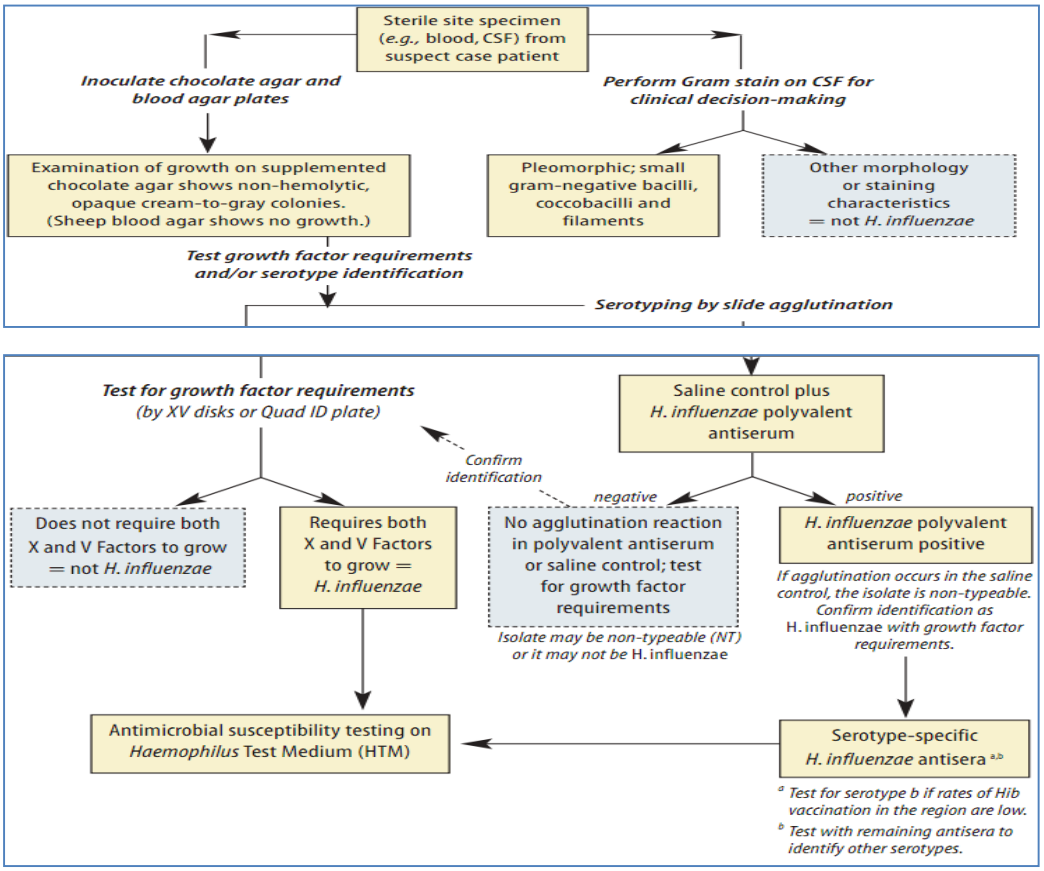
سویه های کپسول دار تیپ b اغلب کودکان را درگیر می کنند. تیپ b، مهاجم ترین سویه های کپسول دار را دارا می باشد، سایر سویه های کپسول دار اغلب بعنوان پاتوژن شناخته نمی شوند، اما همه 5 گونه بعضی بیماری های مشابه تیپ b را ایجاد می کنند [5].

2.5- تشخیص *H. influenzae*:

متدهای رایج برای شناسایی *H.influenzae*، بر متدهای فیزیولوژیکی سنتی و روشهای بیوشیمیایی تکیه دارند. اینها شامل: بررسی مورفولوژی پس ازرنگ آمیزی گرم، واکنش اکسیداز و کاتالاز، فعالیت همولایتیک روی پلیت های حاوی خون اسب، تست پورفیرین، نیازمندی به فاکتورهای رشد (hemin) و V (NAD) و یک سری دیگر از تست های بیوشیمیایی. متدهای

[1] Poleomorphic

سرولوژیکی مانند latex agglutination، برای تعیین سویه های *H. influenzae*، به کار می روند (نمودار 1-2).



نمودار 1-2: فلوچارت تشخیص آزمایشگاهی *H. influenzae* [6].

2.6- بیوتایپ های هموفیلوس آنفلوانزا:

H.influenzae، بر اساس سه تست ایندول، اوره آز و دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین، به 8 بیوتایپ تقسیم می شود (جدول1) [7,8,9,11]. بیوتایپ III هموفیلوس آنفلوانزا و هموفیلوس اجیپتوس، از لحاظ مورفولوژیکی و بیوشیمیایی مشابه می باشند، اما پروفایل پروتئین غشای خارجی شان مجزا می باشد [10].

جدول 1-2: خصوصیات بیوتایپ های *H.influenzae*

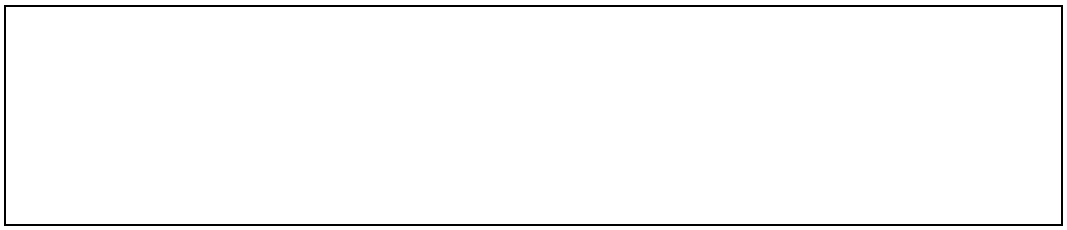
Biotype	Ornithine decarboxylase"	Urease"	Indole"
I	+	+	+
II	−	+	+
III	−	+	−
IV	+	+	−
V	+	−	+
VI	+	−	−
VII	−	−	+
VIII	-	-	-

در مطالعه ای که توسط Albritton و همکارانشان در 1978 انجام شد، برای *H. influenzae* تیپ b، ایزوله های مهاجم، تقریبا" همیشه متعلق به بیوتایپ I و II می باشند. و از ایزوله های مهاجم *Non typeable H.influenzae* مورد مطالعه، تنها یک سوم متعلق به بیوتایپ I و حدود یک چهارم متعلق به بیوتایپ V می باشند [12].

بیوتایپ *H.influenzae* را با بررسی نتایج سه تست ایندول، آنزیم اوره آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین و با استفاده از جداول مراجع می توان مشخص کرد [7].

برای تعیین بیوتایپ، می توان سوسپانسیونی غلیظ از باکتری را در محیط تریپتوفان براث کشت داد. که بعد از 24 ساعت گرمخانه گذاری با افزودن چند قطره معرف کواکس، تولید ایندول با مشاهده رنگ قرمز مشخص خواهد شد. همچنین می توان در سطح محیط کریستنسنس اوره آگار، سوسپانسیون غلیظی از باکتری را کشت داد و بعد از انکوباسیون 24 ساعته، تولید آنزیم اوره آز را با ایجاد رنگ ارغوانی، بررسی کرد. برای بررسی دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین، محیط مایع مولردکربوکسیلاز حاوی 1% اورنیتین را با سوسپانسیون غلیظ باکتری تلقیح کرده و سپس سطح آن با روغن معدنی استریل پوشانده و هم زمان نیز از یک محیط کشت داده نشده به عنوان کنترل استفاده می شود. دکربوکسیلاسیون اسیدآمینه اورنیتین، با ایجاد رنگ ارغوانی پررنگ مشخص می شود. بنابراین بیوتایپ *H.influenzae*، با بررسی نتایج سه تست ایندول، آنزیم اوره آز و دکربوکسیلاسیون اورنیتین و با استفاده از جداول مرجع مشخص می شود [7].

2.7- تست ایندول:

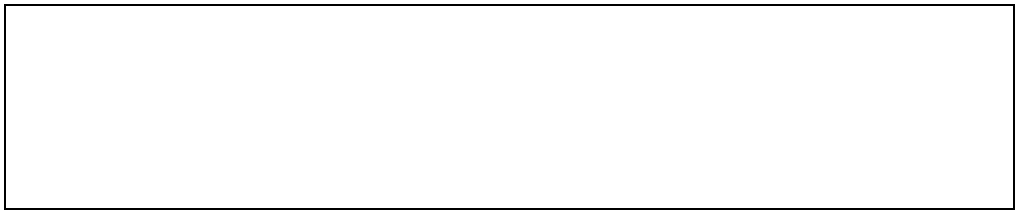


تست بیوشیمیایی می باشد که بر روی گونه های باکتری ها به منظور تعیین توانایی آنها در جداکردن ایندول از آمینواسید تریپتوفان، به کار می رود. این تجزیه با زنجیره ای از آنزیم های درون سلولی مختلف، انجام می شود. سیستمی که بطور کلی به تریپتوفاناز اشاره می کند [13].

ایندول با دآمیناسیون احیایی از تریپتوفان با یک مولکول حدواسط به نام ایندول پیرویک اسید، ایجاد می شود. تریپتوفاناز، واکنش دآمیناسیون را کاتالیز می کند که طی آن، گروه NH_2 آمینی مولکول تریپتوفان، حذف می شود. محصول نهایی واکنش ایندول، پیرویک اسید، آمونیاک و انرژی می باشد. پیرودوکسال فسفات نیز به عنوان یک کوآنزیم مورد نیاز است [13].

برای انجام تست ایندول، کشت خالص 48-24 ساعته از باکتری بر روی تریپتوفان استریل یا براث پپتون، تهیه کرده و سپس 5 قطره از معرف کواکس (ایزوآمیل الکل پارا دی متیل آمینوبنزآلدهید هیدروکلریداسید غلیظ شده) به کشت براث افزوده می شود [13].

2.8- آزمایش اوره آز:



اوره آز آنزیمی است که بعضی از ارگانیسم ها آن را تولید کرده و اوره را به دی اکسید کربن، آب و آمونیاک هیدرولیز می کنند. آمونیاک در محلول به کربنات آمونیوم تبدیل شده و باعث قلیایی شدن محیط و بالا رفتن pH می شود. عملکردهای اوره آز برای بالابودن pH محیط، اجازه ی بقا

در محیط اسیدی را می دهد؛ همچنین اوره آز ، باکتری را قادر می کند که از اوره به عنوان منبع نیتروژن، استفاده کند [14].

این پروتئین همچنین با میزبان انسانی برهم کنش می دهد و به عنوان یک فاکتور ویرولانس با چندین مکانیسم دیگر، شامل فعال سازی ماکروفاژها، القای میانجی گرهای التهابی، تنظیم بد اتصالات محکم اپی تلیال معده ای، آپوپتوزیس، فعال سازی پلاکت ها، افزایش بقا در ماکروفاژها و موارد دیگر عمل می کند [14].

ایزوله های *H. influenzae* ای که اپران ure را از دست داده اند، با احتمال 8 بار بیشتر نسبت به ایزوله های ایجاد کننده ی Otitis media و COPD[2] ، مربوط به ایزوله های *H. influenzae*ی جدا شده از ناحیه ی گلو می باشند [15].

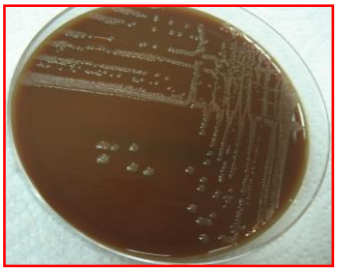
2.9- آزمایش دکربوکسیلاسیون اورنیتین

آنزیم های دکربوکسیلاز، اسیدهای آمینه را در محیط کشت دکربوکسیله نموده و آمین تولید می کنند. آمین های تولید شده باعث واکنش قلیایی می شوند [51,52].

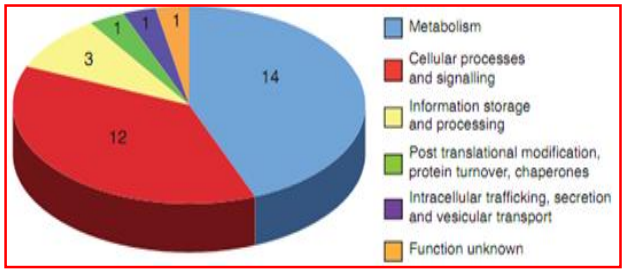
2.10- کشت باکتری:

H.influenzae، در اتمسفر مرطوب با CO_2 5-10%، و 35-37°C، رشد می کند (شکل 2-2). توزیع 31 پروتئین فراوان در طی رشد باکتری در خلط، در شکل 2-2 نشان داده شده است. این باکتری، اکسیدازمثبت و کاتالازمثبت بوده و قادر به تخمیر گلوکز و احیای نیترات است [4].

[2] Chronic obstructive pulmonary disease



الف



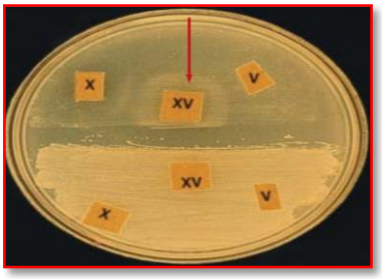
ب

شکل 2-2 الف) کلونی های *H. influenzae* در پلیت شکلات آگار

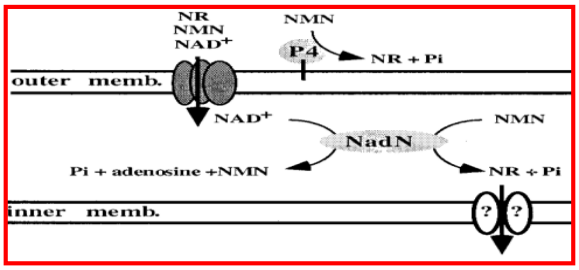
و ب) توزیع 31 پروتئین فراوان در طی رشد هموفیلوس آنفلوانزا در خلط [16].

H.influenzae، به محیط کشتی نیاز دارد که با دو فاکتور محرک رشد موجود در خون شامل hemin (X factor) و NAD (V factor)، تکمیل شده باشد (شکل 2-3 و جدول 2-2) [4]. Hemin به دما پایدار بوده و برای سنتز آنزیم های تنفسی مانند سیتوکروم اکسیداز، کاتالاز و پراکسیداز مورد نیاز است. اما NAD، حساس به دما بوده و برای سیستم اکسیداسیون–احیا، مورد نیاز می باشد [17].

این باکتری، نیاز مطلق به NAD (factor V) دارد چون تقریبا" فاقد تمام آنزیم های بیوسنتزی ضروری برای سنتز دنووو این کوفاکتور می باشد. این فاکتور می تواند بصورت Nicotinamide adenosine dinucleotide (NAD), Nicotinamide mononucleotide (NMN), or Nicotinamide riboside (NR) در لوله آزمایش فراهم شود. اما درمورد منبع یا مکانیسم ورود این سوبستراها در درون بدن، اطلاعات کمی وجود دارد. حداقل، محصولات دو ژن در ورود NAD درگیرند؛ لیپوپروتئین e غشای خارجی (p4)، که فعالیت فسفاتازی دارد و توسط hel کد می شود. و یک نوکلئوتیداز NAD پری پلاسمی، که توسط nadN کد می شود. همچنین مشاهده شده است که محصول ژن دوم برای رشد *H. influenzae* روی محیطی که با NAD غنی شده است، ضروری می باشد [18].



الف



ب

شکل 2-3: الف) بررسی رشد هموفیلوس آنفلوانزا در حضور و غیاب فاکتورهای X و V؛ در قسمت بالای پلیت، رشد هموفیلوس آنفلوانزا فقط در حضور فاکتورهای XV صورت گرفته و در سمت پایین پلیت رشد باکتری دیگری نشان داده شده که به هیچ یک از این فاکتورها وابستگی ندارد. ب) مدلی برای استفاده *H. influenzae* از NAD؛ غشای خارجی شامل e(P4) و یک پورین انتشاری، بخش پری پلاسمی حاوی NadN، و غشای داخلی شامل یک کمپلکس انتقالی می باشد. فعالیت های آنزیمی پروتئین e (P4) و NadN منجر به ورود NR می شوند (توضیحات کامل در متن آمده است) [18].

جدول 2-2: فاکتور های مورد نیاز برای کشت *H. influenzae*

TABLE 1: Identification of *Haemophilus* species by their growth requirements

Species	X- and V-Factor Requirements X	V	ß-hemolysis on rabbit blood agar
H. influenzae	+	+	–
H. parainfluenzae *	–	+	–
H. haemolyticus	+	+	+
H. parahaemolyticus	–	+	+
H. aphrophilus	+	–	–
H. paraphrophilus *	–	+	–

* *H. paraphrophilus* is ornithine negative, whereas *H. parainfluenzae* is ornithine positive.

2.11- محیط های کشت قابل استفاده:

2.11.1- Chocolate agar حاوی Isovital X و یا بدون افزودنی:

از آنجا که شکلات آگار، حاوی فاکتورهای X و V می باشد، لذا نیازی به افزودن مجدد این فاکتورها به این محیط کشت وجود ندارد. کشت ها ابتدا بر روی شکلات آگار تهیه شده و پس 18-24 ساعت انکوباسیون در انکوباتور CO_2 دار، از کلونی های خالص رشد یافته، با لوپ برداشته و رنگ آمیزی گرم بر روی آنها انجام می شود.

2.11.2- استفاده از محیط BHI غنی شده با فاکتورهای V &X:

H.influenzae را در محیط شفاف شامل آبگوشت تزریقی قلب و مغز (BHI= Brain heart infusion) تکمیل شده با 1.5% fildes enrichment می توان کشت داد. پلیت های BHI را می توان با آگار 1% جامد کرد. و پس از انکوباسیون پلیت های آگار به مدت 14-16 h در 37°C، مورفولوژی کلونی ها با استفاده از یک میکروسکوپ مورد بررسی قرار می گیرد [19]. در محیط BHI کلونی ها، کوچک، گرد، با ظاهری شبنم مانند و رنگین کمانی هستند [17].

2.11.3- رشد در محیط Blood agar همراه با ایجاد پدیده ساتیلیتیسم[3] استافیلوکوکی:

محیط بلاد آگار، حاوی فاکتور X می باشد، اما به دلیل آنکه بلاد آگار خون گوسفند، حاوی آنزیم های غیرفعال کننده ی فاکتور V است، *هموفیلوس آنفلوانزا* بر روی محیط بلاد آگار به همراه کشت خطی *استافیلوکوکوس اورئوس* کشت می گردد تا با ایجاد پدیده ی ساتیلیتیسم (شکل 2-4)، *هموفیلوس آنفلوانزای* نیازمند به فاکتور V و فاکتور X، به دلیل آزاد شدن Hemin و هماتین از گلبول های قرمز، ناشی از عملکرد همولیزین استافیلوکوکی به صورت اقماری در اطراف کشت *استافیلوکوکوس اروئوس* رشد می کنند. و سپس در دمای 35°C و به مدت 24-28 ساعت، پلیت ها انکوبه می شوند [7].

[3] Satellitism