بسم الله الرحمن الرحيم

١٠٢٥٤٥

دانشگاه شهید بهشتی تهران

موضوع:

پایان نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد رشته میکروبیولوژی

عنوان:

جداسازی و شناسایی ژن آنزیم ال-آسپاراژیناز از باکتری سالمونلا تایفی موریوم

اساتید راهنما:

دکتر حسین ریاحی

دکتر خسرو آقایی پور

۱۳۸۶/۸/۲۷

استاد مشاور:

دکتر مجید اسماعیل زاده

پژوهشگر:

روزبه ربانی

۱۰۲۵۴۵

تاریخ .....
شماره .....
پیوست.....

دانشگاه شهید بهشتی بسمه تعالی

«صورتجلسه دفاع پایان نامه دانشجویان دوره کارشناسی ارشد»

ن ۱۹۸۳۹۶۳۱۱۳ اوین
۲۹۹۰۱۰

بازگشت به مجوز دفاع مورخ جلسه هیأت داوران ارزیابی پایان نامه آقای روزبه ربانی به شماره شناسنامه ۳۶۸۷ صادره از تهران متولد ۱۳۶۰ دانشجوی دوره کارشناسی ارشد ناپیوسته رشته زیست شناسی- میکروبیولوژی

با عنوان :

جدا سازی و شناسائی ژن آنزیم ال- آسپاراژیناز از باکتری سالمونلاتایفی موریوم

به راهنمائی:

آقای دکتر حسین ریاحی
آقای دکتر خسرو آقائی پور

طبق دعوت قبلی در تاریخ ۱۳۸۶/۶/۱۹تشکیل گردید و براساس رأی هیأت داوری و با عنایت به ماده ۲۰ آئین نامه کارشناسی ارشد مورخ ۷۵/۱۰/۲۵ پایان نامه مزبور با نمره ۱۹٫۷۰ و درجه عالی مورد تصویب قرار گرفت.

۱- استاد راهنما: آقای دکتر حسین ریاحی

۲- استاد راهنما: آقای دکتر خسرو آقائی پور

۳- استاد مشاور: آقای مهندس مجید اسماعیل زاده

۴- استاد داور : آقای دکتر جلیل وند یوسفی

۵- استاد داورونماینده تحصیلات تکمیلی : آقای دکتر غلامحسین ابراهیمی پور

تقدیم به **مادرم**

آن سرو عطوفتی که تمام هستی ام فدای اوست.

تقدیم به **پدرم**

آن سنگ صبوری که جانم به پای اوست.

تقدیم به **برادرم رضا**

آن گل خوشبویی که تمام نفسهایم برای اوست.

و تقدیم به **خانواده عزیزم**

آن جمع صمیمی که زندگی ام به امید بودن و ماندن آنهاست.

تقدیم به دکتر **ریاحی** که به عنوان پدری دلسوز، مرا یاری نمود.

تقدیم به دکتر **آقایی پور** که به عنوان استاد و برادی بزرگتر، به من زندگی آموخت.

تقدیم به دکتر **اسماعیل پور** که با نگاهی پر از امید، به من دیدن و خوبتر دیدن آموخت.

تقدیم به خانم مهندس **صفویه** که با دلی نورانی، نور راهم را به من داد.

و تقدیم به تمام کسانی که مرا یاری نمودند.

کلونینگ ژن آسپاراژیناز

خلاصه:

آنزیم آسپاراژیناز (آمیدو هیدرولاز E.C.3.5.1.1)کاربرد موثری در درمان لوسمی لنفوبلاستیک(ALL) دارد. سلول های سرطانی بخصوص ALL، برای رشد سریع خود به ذخیره ال-آسپاراژین احتیاج فراوانی دارند. آنزیم ال آسپاراژیناز ، آسپاراژین را به ال- آسپارتات و آمونیوم تبدیل می کند. بر خلاف سلول های سرطانی، سلولهای نرمال احتیاج مبرمی به ال- آسپاراژین ندارند. بنابراین حذف چرخه تولید ال- آسپاراژین توسط ال آسپاراژیناز منجر به تخریب سلول های سرطانی شده و سلولهای نرمال صدمه ای نمی بینند.

ما در این تحقیق در مرحله اول با استفاده از دو روش فنل -کلروفرم- ایزو آمیل الکل و روش کیت DNA باکتری سالمونلا تایفی موریوم استخراج شد. سپس با استفاده از ژل الکتروفورز شاهد باند مناسبی بودیم که موید استخراج مناسب DNA باکتری بود. در مرحله بعد و با استفاده از نرم افزار و با اطلاعاتی که از این ژن از پایگاه NCBI به دست آمد اقدام به طراحی پرایمر تخصصی این ژن نمودیم. پس از سفارش پرایمرها از دو پرایمر U-AnsB-Sal (به عنوان پرایمر Forward)و L-AnsB-Sal (به عنوان پرایمر Reverse)در واکنش PCR بصورت Basic انجام شد و سپس با بهینه نمودن شرایط PCR مانند Gradiant گذاشتن دمای Annealing، بهینه کردن غلظت پرایمرو... و با استفاده از ژل الکتروفورز، باند مناسبی از ژن مورد نظر بدست آمد. در مرحله بعد با استفاده از غلظتی که از محصول PCR بدست آمده بود، Ligation با روش T/A cloning انجام گردید. وکتور مورد استفاده در Ligation ، pTZ57R/T بود. ترانسفورمیشن با دو روش دستی و کیت شرکت Fermentas(با استفاده از سلول میزبان E.coli DH5α) انجام گردید و از هر دو روش کلنی های مناسبی بدست آمد. درمرحله بعد غربالسازی انجام شد و با استفاده از روش Large scale پلاسمید کلون شده استخراج گردید و پس از تعیین غلظت، تعیین توالی گردید. سپس با استفاده از اطلاعاتی که از این ژن ال - آسپاراژیناز بدست آمد و با استفاده از نرم افزار BLAST و DNA MAN در پایگاهNCBI با ژنوم باکتری سالمونلا تایفی موریوم های غیر بومی مقایسه گردید.

باکتری سالمونلا تایفی موریومی که در این پروژه استفاده گردید باکتری بومی ایران بود. بنابر این شناسایی ژن آنزیم ال-آسپاراژیناز این باکتری بومی می تواند زمینه ساز تحقیقات آتی جهت بیان مناسب، تولید نیمه صنعتی و صنعتی این آنزیم، تولید دارویی این آنزیم و خود کفایی در زمینه تولید این داروی مهم گردد.

عنوان	صفحه
مقدمه	۱
آسپاراژیناز	۲
تاریخچه	۲
مقدمه	۲
فعالیت آنتی نئوپلاستیک آنزیم ال- آسپاراژیناز	۳
خصوصیت شیمیائی دارو جهت درمان	٤
خاصیت سمی آنزیم	٥
شیگلا	٦
شیگلا فلکسنری	٦
شیگلوزیز	۷
تشخیص آزمایشگاهی شیگلا	۷
درمان	۸
سالمونلا	۸
اهمیت سروارو زیرسروارها در بیماریهای مربوط به انسان	۹
جداسازی سالمونلا	۹
شناسایی سالمونلا	۱۰
کلونینگ	۱۱
آنزیم های کاربردی در کلونینگ	۱۱
ساختمان عمومی آنزیم ها	۱۱
آنزیم های برش دهنده DNA	۱۱
مکانیسم فعالیت آنزیم های برش دهنده	۱۲
انواع مختلف آنزیم های برش دهنده	۱۲
تشخیص آنزیم های برش دهنده	۱٤
DNA لایگیز باکتریوفاژ T4	۱٥
لایسوزایم Lysosyme	۱٦
RNase H	۱٦
DNA Taq پلی مراز	۱٦
آنزیم آلکالین فسفات ایز روده گوساله	۱۷
PCR	۱۸

عنوان	صفحه
واسرشتگی DNA	۱۹
اتصال آغاز گرهای الیگونوکلئوتید	۲۰
سنتز DNA	۲۱
تکمیل سنتز DNA	۲۲
الکتروفورز	۲۲
آگارز	۲۳
پلی اکریل آمید	۲۳
اشکال مختلف ژل	۲٤
لایگیشن	۲۵
وکتورهای DNA برای کلونینگ	۲٦
مشخصات کلی وکتورهای کلونینگ DNA	۲۵
ترانسفورمیشن و غربالسازی	۲۹
مکانیسم انتقال DNA به E.coli توسط وکتور	۲۹
نقش آنتی بیوتیک ها در کشت و غربال نمودن سلول های انتقال یافته	۳۰
نقش IPTG در کشت و غربال نمودن سلول های انتقال یافته	۳۱
نقش X-Gal در کشت و غربال نمودن سلول های انتقال یافته	۳۱
روش کار کلونینگ و توالی یابی ژن ال- آسپاراژیناز	۳۳
کشت سالمونلا تایفی موریوم و شیگلا فلکسنری لیو فریزه شده	۳٤
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	۳٤
روش کار	۳٤
استخراج DNA باکتری	۳۵
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	۳۵
روش کار	۳۵
الکتروفورز	۳۷
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	۳۷
روش کار	۳۸
واکنش زنجیره ای پلیمراز (PCR)	۳۸
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	۳۸
روش کار	۳۹

عنوان	صفحه
تخلیص نمونه محصول PCR از ژل آگارز	٤١
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٤١
روش کار	٤٢
لایگیشن	٤٥
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٤٥
روش کار	٤٥
ترانسفورماسیون	٤٦
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٤٦
روش کار	٤٧
استخراج پلاسمیدبه روشLarge scale	٤٩
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٤٩
روش کار	٤٩
تائید کلونینگ و تعیین غلظت پلاسمید استخراجی	٥٠
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٥٠
روش کار	٥١
بررسی امکان بیان ژن ال-آسپاراژیناز باکتری شیگلا فلکسنری(RTCC:2264)	٥٣
PCR و تخلیص محصول PCR از ژل آگارز جهت بیان	٥٤
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٥٤
روش کار	٥٤
برش آنزیمی ژن آسپاراژیناز محصول PCR و وکتورهای pAED4 و pET22b(+)	٥٥
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٥٥
روش کار	٥٦
لایگیشن	٥٧
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٥٧
روش کار	٥٧
ترانسفورمیشن	٥٨
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٥٩
روش کار	٦٠
بیان ژن آسپاراژیناز در سیستم پروکاریوتیک	٦١

عنوان	صفحه
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٦١
روش کار	٦١
الکتروفورز پروتئین بیان شده در ژل پلی اکریل آمید(SDS-PAGE)	٦٢
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٦٢
روش کار	٦٢
رنگ آمیزی ژل با استفاده از کوماسی بلو	٦٢
مواد، نمونه ها و وسائل مورد نیاز	٦٢
روش کار	٦٣
نتایج کلونینگ ژن آسپاراژیناز	٦٤
رشدباکتریها واستخراج ژنوم باکتری سالمونلا و شیگلا	٦٥
PCR	٦٦
استخراج محصول PCR از ژل الکتروفورز	٧٣
لایگیشن	٧٤
ترانسفورمیشن	٧٦
تخلیص پلاسمید به روش Large scale	٧٦
سکانس ORF ژن آسپاراژیناز سالمونلا تایفی موریوم	24
سکانس ORF ژن آسپاراژیناز شیگلا فلکسنری /1 -$مرحله اول#	3/
سکانس ORF ژن آسپاراژیناز شیگلا فلکسنری /1 -$ مرحله دوم#	34
نتایج امکان بررسی بیان ژن	4/
PCR وتخلیص ژن از روی ژل آگارز	40
Double-digest محصول PCR و وکتورهای pAED4 و (+)pET22b	40
تخلیص نمونه های هضم آنزیمی شده از روی ژل آگارز	43
لایگیشن	44
ترانسفورمیشن	44
بحث و نتیجه گیری	,+
پیشنهادات	,,,
پیوست ,	,,٠
پیوست -	,,3
منابع	,--

فصل اول

مقدمه

کلونینگ ژن آسپاراژیناز

۱-۱)آسپاراژیناز:

۱-۱-۱)تاریخچه

پیشگام مشاهده اینکه آنزیم ال- آسپاراژیناز به عنوان یک عامل بالقوهٔ ضد سرطان خون می باشد دانشمندی به نام Clementi بود. او با مشاهده فعالیت بالای آنزیم ال- آسپاراژیناز را در سرم خوکچه هندی توانست این فعالیت شدید را مشاهده کند. دانشمندی به نام MCcoy در سال ۱۹۵۶ این مشاهدات را گسترش داد که رشد ردهٔ سلولی مشتق شده از کارسینوسارکومای Walker احتیاج به ال- آسپاراژین دارند. در سال ۱۹۶۱ دانشمندی بنام Broome با تحقیقات خود مشاهدات Clementi را تأیید کرد و موفق شد نشان دهد که فعالیت ضد سرطان خون در سرم خوکچه هندی از ال- آسپاراژیناز موجود در سرم آن است. دو دانشمند بنام های Wriston و Yellin در سال ۱۹۶۶ پس از خالص سازی دو ایزوفرم آسپاراژیناز از سرم خوکچه به این نکته رسیدند که فقط یک ایزوفرم این آنزیم فعالیت ضد سرطانی در شرایط invivo دارد.[1]

به این علت که استخراج این آنزیم از سرم خوکچه کار بسیار سختی است در حال حاضر این آنزیم را از میکروارگانیسم ها استخراج می کنند. دو دانشمند به نام های Mashburn و Campbell در سال ۱۹۶۹ گزارش دادند که تخلیص ال- آسپاراژیناز از E.coli خاصیت ضد سرطان خونی شبیه ال- آسپاراژیناز سرم خون خوکچه دارد. این تحقیق شرایط را برای تولید مقدار زیاد این آنزیم توسط باکتری جهت مطالعات کلینیکی فراهم نمود. در سال ۱۹۶۷ دانشمندی بنام Dettgen برای اولین بار تأثیر ال- آسپاراژیناز بر سرطان خون انسان را نشان داد. Old و همکارانش در invivo فعالیت آنتی تومورال ال- آسپاراژیناز را در مدل سگی که لنفوسارکوما داشت اثبات کردند. [2،3]

۱-۱-۲) مقدمه

اولین مطالعات بر ال- آسپاراژینازخوکچه هندی بود ولی بدست آوردن آن کار بسیار سختی است. دربعضی از گیاهان و گونه های حیوانی آنزیم ال- آسپاراژیناز یافت شده ولی پروسه استخراج آنزیم از آنها بسیار دشوار می باشد. منبع بسیار مناسب این آنزیم

میکروارگانیسم ها هستند که منبع بسیار مؤثر و غیر هزینه بر این آنزیم می باشند. طیف وسیعی از میکروب ها مانند قارچ ها، باکتری ها، مخمرها، اکتینو مایست ها و جلبک ها می توانند این آنزیم را تولید نمایند. ولی خصوصیات آنزیم از میکروارگانیسم به میکروارگانیسم دیگر متغیر می باشد. در حال حاضر تولید در مقیاس بسیار بالای این آنزیم از دوگونه باکتری بنام های E.coli و اروینیا کروتووورا بدست می آید. آنزیم بدست آمده از این دو باکتری خاصیت سمی (Toxicity) کمتری نسبت به آنزیم های متفاوت بسیاری که فعالیت آنتی تومورال مشابه ای دارند نشان می دهد.

- امروزه ال- آسپاراژیناز که در کلینیک کاربرد دارد به ۳ صورت تهیه می شود:

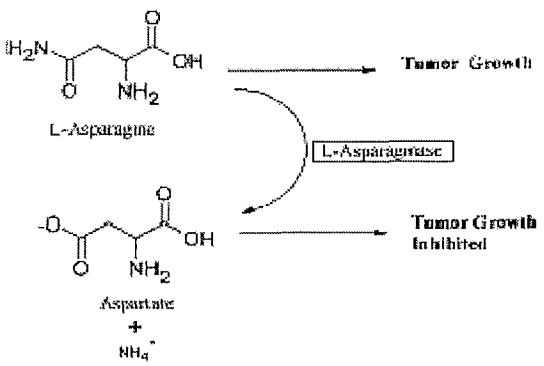
۱) فرم native (غیر تغییر یافته) آنزیم ال- آسپاراژیناز از باکتری E.coli

۲) فرم native (غیر تغییر یافته) آنزیم ال آسپاراژیناز از باکتری Erwinina crotowora

۳) PEG-L-asparaginanse که اتصال کووالانسی بین پلی اتیلین گلیکول و ال- آسپاراژیناز E-coli می باشد.[4, 5]

۳-۱-۱) فعالیت آنتی نئوپلاستیک آنزیم ال- آسپاراژیناز :

سلولهای سرطانی، بخصوص سلولهای لنفاوی، نیاز به مقدار زیادی از آسپاراژین جهت رشد سریع خود دارد. این سلولها ال- آسپاراژین سنتتاز ندارند یا به مقدار بسیار کم دارند به همین دلیل نمی توانند ال- آسپاراژین را تولید نمایند و تکیه بر ال- آسپاراژین موجود در سرم دارند. ال- آسپاراژیناز با حذف سرم این فاکتور الزامی برای پروتئین سازی سلولهای سرطانی، سلولهای سرطانی را از بین می برد.[7 ,6]



(مکانیسم عمل آنزیم ال-آسپاراژیناز)

٤-١-١) خصوصیت شیمیائی دارو جهت درمان

١-فرم native آنزیم: ال- آسپاراژیناز خالص شده E.coli وزنی در حدود 133-141 KDa دارد. تمامی آسپاراژینازها از ۴ زیر واحد تشکیل شده اند که هر زیر واحد یک جایگاه فعال دارد و وزن هر زیر واحد تقریبا 22-40 KDa می باشد.فعالیت اختصاصی آنزیم تخلیص شده بین 300-400 umol از سوبسترا در دقیقه در میلی گرم از پروتئین می باشد.نقطه ایزوالکتریک ال- آسپاراژیناز E.coli در حدود ph=4.6-5.5 و در اروینیا در حدود 8.7 می باشد.

این آسپاراژینازها معمولا تا ١٠٪ دارای فعالیت ال- گلوتا مینازی هستند. ولی تحقیقات برای اینکه این فعالیت را از بین ببرند تا کنون نتیجهٔ خاصی نداده. ال آسپاراژیناز خوکچه هندی فعالیت ال- گلوتامینازی ندارد ولی نمی توان مقدار مناسبی از این آنزیم را جهت کارهای کلینیکی خالص سازی کرد .[7, 8]

Different L-asparaginase preparations showing glutaminase activity (%)

Source	Specific activity (U/g)	Glutaminase activity (%)
Guinea pig serum	50	0
E. coli	270	2
Erwinia	700	10
Serratia	60	5

٢- آنزیم تغییر یافته: ٢٥٪ از بیمارانی که آنزیم native را دریافت می کنند به علت نیمه عمر کوتاه آنزیم درمان خوبی ندارند یا دچار شوک های خفیف آنافیلاکسی می شوند. تلاش های زیادی جهت پائین آوردن ایمونوژ نیسیته جهت حفظ عمل آنزیم و در طرف دیگر بالا بردن نیمه عمر آنزیم انجام شده. این تلاش ها از میانه دهه شروع شد. مهمترین تغییری که توانستند در این آنزیم ایجاد کنند الحاق PEG به این آنزیم بود. این کار را برای اولین بار Abu chowski و همکارانش با موفقیت انجام دادند. PEG توانست اپی توپ های آنزیم را تا حدی پوشش دهد و از دسترسی دستگاه ایمنی محافظت کند.

این آنزیم تغییر یافته وزن ملکولی بالا تری از فرم native دارد. سپس برای این آنزیم تغییر یافته نام های جدید تجاری بنام های ONCASPAR و ENZON برگزیدند.در تحقیقات دیگر نیز ال- آسپاراژیناز را با دکستران الحاق کردند که کار دستگاه ایمنی را

پائین آورده و پایداری آنزیم را بالا برد ولی نسبت به PEG بسیار کمتر مؤثر بود. در تحقیقات دیگر نیز این آنزیم آسیله شد ولی محدودیت این تغییر یافته به این دلیل بود که آنزیم را هیدروفوبیک می نمود.[9]

Comparison of native and modified L-asparaginases

	E. coli		*Erwinia* (Native)
	Native	PEGylated	
Activity (IU/mg protein)	280–400	280–400	650–700
K_m (μM)-L-asparaginase	12	12	12
K_m (μM)-L-glutaminase	3000	3000	1400
L-Glu/L-Asp (maximal activity)	0.03	0.03	0.10
Molecular weight	141000	–	138000
PI	5.0	5.0	8.7

۵-۱-۱) خاصیت سمی آنزیم

Toxicity profile of L-asparaginase therapy

System	Complications
Immune	Hypersensitivity
	Reactions — Grading (CTC)
	No reactions — 0
	Mild local (<10 cm, <24h) — 1
	Urticaria — 2
	Bronchospasm, serum sickness, severe local reactions (>10 cm>24h) — 3
	Hypotension, anaphylaxis — 4
	Immunosuppression
Liver	Hypoalbumenia; elevations in transaminase, biliruhin and alkaline phosphatase; lipoprotein abnormalities, decrease in serum cholesterol.
Pancreas	Acute hemorrhagic pancreatitis; pancreatitis; decreased serum insulin; diabetic ketosis.
Coagulation	Increase in prothrombin time; hypofibrinogenemia; decrease in plasminogen, factor V, VII, VIII, IX and others, thromboembolism; hemorrhagic events.
CNS	Mild depression and personality changes; confusion and hallucinations.
Others	Parotitis; lethargy; comma; seizure.

منبع[10]

در این تحقیق مطالعه بر روی یکی دیگر از جنس های خانوادهٔ انتروباکتریاسه انجام گرفت. خانوادهٔ انتروباکتریاسه یک خانواده بزرگ باکتریائی هستند. جنس ها و گونه های این خانواده بهترین گزینه ها برای شناسائی و جداسازی ژن این آنزیم می باشند، زیرا اکثر گونه های این خانواده، در صورت تولید آنزیم ال- آسپاراژیناز آنرا بصورت پری پلاسمیک تولید می نمایند که جهت استخراج مقرون به صرفه می باشد. مطالعه ما برروی جنس سالمونلا و جنس شیگلا می باشد.

۲-۱) شیگلا

شیگلا یک جنس از خانواده بزرگ باکتریایی به نام انترو باکتریاسه می باشد. شیگلا در حدود ۱۰۰ سال پیش توسط یک میکروبیولوژیست ژاپنی به نام شیگا کشف شد. شیگلا یک باکتری گرم منفی بدون حرکت ،بدون اسپور، باسیل شکل و بسیار شبیه اشرشیا کلای می باشد. شیگلا دارای گونه های متعددی می باشد، ولی مهمترین گونه های آن شامل:

۱)شیگلا بوئیدی(Sh.boiidi)

۲)شیگلا دیسانتریه(Sh.dysantrie)

۳)شیگلا فلکسنری (Sh. Felexneri)

۴) شیگلا سونه ی (Sh.soncii).[11]

۱-۲-۱) شیگلا فلکسنری:

این باکتری عامل پاتوژن روده ای در انسان می باشد، که ایجاد دیسانتری یا اسهال خونی در انسان می کند. این عمل خود را با حمله به اپیتلیوم روده بزرگ انجام می دهد. این باکتری معمولا در آبهای آلوده به فضولات انسان یافت می شود. این باکتری توسط آب و مواد غذایی آلوده و تماس بین انسان ها منتقل می گردد. ژنوم این باکتری اولین بار از باکتری ایزوله شده از شهر پکن چین در سال ۱۹۸۴بدست آمد. این باکتری در حدود ۴۷۰۰ ژن دارد. ژنوم باکتری شیگلا فلکسنری شامل کروموزوم و ساختار های کوچک DNA به نام پلاسمیدهای ویرولانس می باشد. این پلاسمیدها شامل ژنهای مهم در بیماریزایی می باشند.[11]

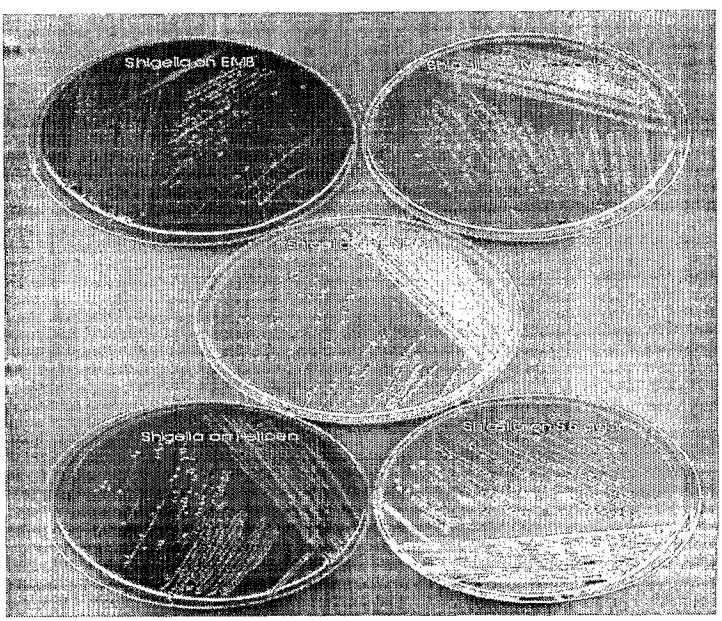
۲-۲-۱) شیگلوزیز:

باکتری شیگلا فلکسنری یکی از مهمترین عوامل شیگلوزیز میباشد. از علائم مشخص شیگلوزیز این باکتری تب ،لرز و در بعضی اوقات مدفوع خونی می باشد. این باکتری می تواند عامل سندرم رایتر نیز باشد. در سال در حدود ۱۶۵ میلیون نفر به انواع مختلف شیگلوزیز مبتلا می شوند و در حدود ۱/۵ میلیون نفر بر اثر این بیماری از بین می روند. شیگلوزیز نه تنها باعث مرگ و میر کودکان می گردد بلکه در جوامع پیشرفته باعث عفونت پایدار می گردد. این باکتری بسیار به آنتی بیوتیک مقاوم بوده و هیچ واکسنی تا بحال بر علیه این باکتری ساخته نشده است.

۳-۲-۱) تشخیص آزمایشگاهی شیگلا:

در شکل ۴ محیط مهم جهت شخیص این باکتری مشاهده می شود که شامل:

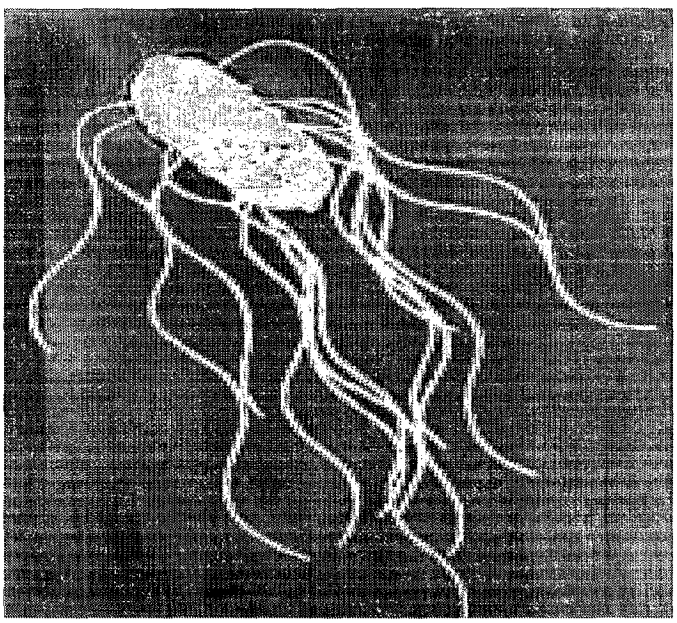
۱) EMB
۲) Mac Conkey
۳) ENDO
۴) Hekton
۵) SS agar



٤-٢-١) درمان:

درمان آنتی بیوتیکی در مورد شیگلوزیز وجود ندارد و تجویز آنتی بیوتیک منجر به مقاومت های آنتی بیوتیکی جدید در این باکتری می گردد. در افرادی که شیگلوزیز خفیف دارند معمولا بعد از مدتی بدون استفاده ا ز آنتی بیوتیک خود بخود بهبود می یابند. معمولا جهت درمان دارو های ضد اسهال مانند لوپرامید یا دیفن اکسیلات با اتروپن تجویز می شود.[11]

٣-١) سالمونلا



سالمونلا انتریکا(عکس از CDC)

سروارهای مختلف سالمونلا در خانواده انتروباکتریاسه قراردارند. این عوامل ، باکتریهای گرم منفی و میله ای شکل هستند که فاقد هاگ و فاقد کپسول می باشند . دارای تاژکهای بلند هستند و متحرکند. در محدوده دمایی ۵ تا ۴۵ درجه سانتیگراد ودرمحدوده pH، ۴ تا ۹ می توانند رشدکنند و نیترات را به نیتریت احیا می کنند. سالمونلاتیفی موریوم تخمیر گلوکز (اسید و گاز تولید می کند)، دولسیتول ، مانیتول ، مالتوز را انجام می دهد ولی قادر به تخمیر لاکتوز ، ساکاروز ، مالونات یا سالین نیست. درتمامی محیطها تولید سولفید هیدروژن

می کند و دکربوکسیلاسیون اورنی تین ولیزین را انجام می دهد و از سیترات بعنوان منبع مهم کربن بهره می گیـرد. سـالمونلاتیفی موریـوم اوره و ژلاتین را هیدرولیز نمی کند پس اندول تولید نمی کند.

فلاژله باکتری سالمونلا (عکس از CDC)

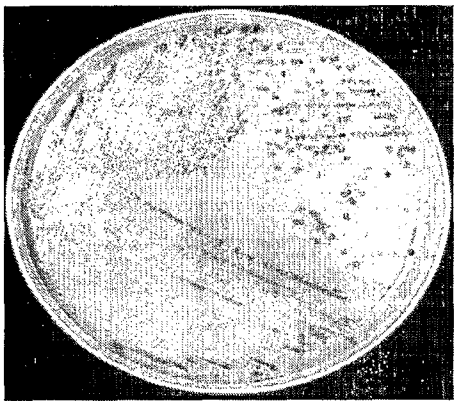
۱-۳-۱) اهمیت سروار و زیرسروارها در بیماریهای مربوط به انسان:

بیشتر عواملی که در انسان و پستانداران ایجاد بیماری می کند به خانواده S انتریکا و زیرسروارهایش تعلق دارد که عامل بیماری در انسان می باشند. انتقال بیماری عمدتاً از فرد به فرد دیگر است و مورد حیوان به انسان گزارش نشده است. سروارهای دیگر سـالمونلا کـه تحـت عنوان غیرتیفوئیدی خوانده می شود ز ئنوتیک یا بالقوه زئنوتیک اند.

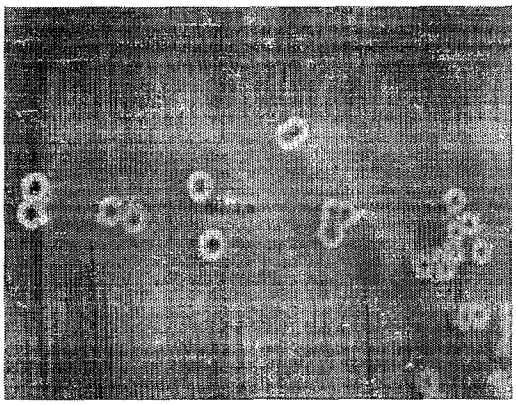
۲-۳-۱) جداسازی سالمونلا :

برای کشت نمونه ها جهت غنی سازی باکتری از محیطهای غنی کننده همچون بافر آب پپتونه استفاده می شود. سه محـیط مغـزی انتخـابی که معمولاً مورد استفاده قرار می گیرند، شامل آبگوشهای سلنیت ـ سیترات ، تترا تیونات و راپاپورت ـ واسـیلیادیس (RV) مـی باشـند. بـا

افزون آنتی بیوتیکهایی مانند نوبیوسین یا رنگهایی مانند بریلیانت گرین می توان محیط ها را انتخابی ترکرد. برای کشت از نمونه های آلوده مانند مدفوع ، سواب کلواک ، نمونه های محیطی یا کشت مجدد از محیط پیش مغذی ، از محیطهای مایع مغذی مثل RV استفاده می شود . در این حالت، نمونه به نسبت به محیط RV منتقل می شود. برای جدا سازی سالمونلا ، استفاده از حداقل دو محیط جامد توصیه می شود. محیط های جامد رایج عبارتند از : آگار مک کانکی ،دئوکسی کلات سیترات آگار (DCA) که پرگنه های سالمونلا بر روی آن بی رنگ به نظر می رسند و در آگار بریلیانت گرین پرگنه ها قرمز رنگ می شوند. سایر محیطها عبارتند از : گزیلوز لیزین دئودکسی کلات آگار (XLD) و محیطهای تغییر یافته آن .



کلنی سالمونلا تایفی موریوم بر روی XLD (عکس از CDC)



کلنی سالمونلا تایفی موریوم بر روی هکتون انتریت آگار(عکس از CDC)

۳-۳-۱) شناسایی سالمونلا:

تظاهرات بالینی و کالبد گشایی بیماری پاراتیفوئید مشابه سایر بیماریهای حاصله از سایرسالمونلا ها وحتی عوامل باکتریایی دیگر است. ابتدا می توان پرگنه های مشکوک را با آزمایش آگلوتیناسیون برروی لام با استفاده از سرم پلی والان O و سرم فیزیولوژی، آزمایش کرد . آزمایشهای بیوشیمیایی اصلی برای سالمونلا، تولید H_2S عدم تولید اندول درآب پپتونه، به همراه واکنشهای قندی خاص می باشد. واکنشهای قندی سالمونلا شامل تخمیر گلوکز، مانیتول، مالتوز و دولسیتول و عدم تخمیر لاکتوز، سوکروز و سالیسین می باشد. این واکنشهای بیوشیمیایی به طور مطلوبی در محیطهای ترکیبی که در حال حاضر برای شناسایی باکتریها دردسترس می باشند مثل محیط کوهنز Kohns یا TSI صورت می گیرد. [۱۱]