Archive of SID

مقایسه کارآیی روش گاز کروماتوگرافی مایع با روش مولکولی تخلیص پروتیئنهای ساختمانی در تشخیص و تایپینگ باکتریهای بی هوازی

دکتر رسول یوسفی مشعوف* ، دکتر براین دوردن**

چکیده:

برخی از باکتریها قادرند در شرایط بیهوازی در محیط کشت مایع مغذی FAB ، اسیدهای چرب تولید نمایند که با روش گاز کروماتوگرافی مایع (GLC) قابل اندازه گیری می باشند. نظر به اینکه هر یک از گونه های بیهوازی می توانند تنها یک یا چند نوع از اسیدهای چرب فرار یا غیر فرار تولید نمایند، بنابراین می تواند برای آنها ارزش تشخیصی داشته باشد. از طرفی روش تخلیص پروتئینهای ساختمانی این باکتریها بعنوان یک تکنیک مطمئن تر برای تشخیص و تایپینگ آنها معرفی شده است. هدف از این مطالعه، مقایسه کارایی روش گاز کروماتو گرافی مایع با روش مولکولی تخلیص پروتئینهای ساختمانی (SDS-PAGE) در تشخیص و تایپینگ سویه های رفرانس بیهوازی و سایر نمونه های جدا شده از بیماران می باشد.

در این مطالعه چهار سویه رفرانس باکتروئیدس فراژیلیس، موبیلونکوس کروتزی، پرووتلا بیویا و پورفیرومونا‌س ژینجیوالیس موجود در کلکسیون به همراه ۶۲ نمونه کلینیکی جدا شده از بیماران با دو روش GLC و SDS-PAGE مورد آزمایش قرار گرفتند.

بسیاری از سویه های رفرانس و نمونه های کلینیکی، اسیدهای چرب فرار و غیرفرار در محیط کشت مایع FAB تولید نمودند که موجب افتراق آنها در سطح جنس گردید، اما قادر به تقسیم بندی آنها در سطح گونه و زیر گونه نگردید. بیشترین اسیدهای تولید شده شامل پروپیونیک، استیک، بوتیریک، ایزووالریک، لاکتیک، سوکسینیک و فنیل استیک بود .در این مطالعه همچنین باندهای پروتئینی زیادی از مولکولهای سنگین بیش از ۱۹۲کیلو دالتون (KDa) تا مولکوهای کوچکتر از ۳۷ کیلو دالتون بدست آمد که به خوبی باعث تمایز جنس ها از یکدیگر گردید.

نتایج این مطالعه نشان داد که از روش گاز کروماتوگرافی مایع میتوان در تشخیص و تایپینگ ارگانیسمها در سطح جنس و از روش تخلیص پروتئینهای ساختمانی برای تایپینگ و طبقه بندی باکتریها در سطح گونه و زیر گونه جهت مطالعات مولکولی استفاده نمود.

کلید واژه ها : باکتریهای بی هوازی/ تایپینگ/ تخلیص پروتئینهای ساختمانی / گاز کروماتوگرافی مایع

مقدمه :

استخراج اسیدهای چرب با روش GLC یا گاز کروماتوگرافی مایع اخیرا" برای تشخیص و تایپینگ بسیاری از میکروارگانیسمها بویژه باکتریهای بیهوازی مانند کلستریدیوم ها، پپتوکوکوس ها ،باکتروئیدس ها، فوزوباکتریوم ها ، پرووتلاها و پورفیرومونا‌س ها بکار گرفته شده است (۳-۱).

* دانشیار گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی همدان

** استاد گروه میکروبیولوژی دانشگاه ویلز انگلستان

www.SID.ir

Archive of SID

این باکتریها قادرند در شرایط بیهوازی در محیط کشت مایع بیهوازی FAB (Fastidous Anaerobes Broth) ، اسیدهای چرب فرار یا غیر فرار تولید نمایند. اسیدهای چرب فرار شامل اسیدهای استیک، پروپیونیک، ایزووالریک، والریک، ایزوبوتیریک، بوتیریک، هپتانوئیک و کاپروئیک می باشند. اسیدهای چرب غیرفرار نیز شامل اسیدهای پیرووویک، لاکتیک، اکزالیک استیک، اکزالیک، متیل مالونیک، مالونیک، فوماریک، سوکسینیک و فنیل استیک می باشند. هر یک از این اسیدها با روش GLC قابل اندازه گیری می باشند. هر یک از جنس های ذکر شده قادرند یک یا چند نوع از اسیدهای چرب فرار یا غیر فرار تولید نمایند که برای تشخیص آنها بکار رود(۳،۴). از آنجایی که مواد بینابینی حاصل از متابولیسم باکتری های بیهوازی پیچیده و افزونتر از باکتری های هوازی و بیهوازی اختیاری است، لذا تجزیه و شناسایی این مواد بوسیله GLC ، میتواند در گروه بندی آنها موثر واقع شود. از طرف دیگر چون واکنشهای متابولیسمی به آنزیمهای مختلف وابسته بوده و آنزیمها بطور ژنیتیکی در هر نوع سلول ثابت می باشد ، بنابراین فرآورده های حاصل از متابولیسم میتواند ارزش تشخیصی (Finger-print) برای سلول باکتری در بر داشته باشد. در این خصوص شناسایی و تجزیه اسیدهای چرب کوتاه زنجیر حاصل از فرمانتاسون باکتریهای بیهوازی گرم منفی مانند باکتروئیدس ها ، موبیلونکوس ، پرووتلا و پورفیرومونا‌س میتواند در تایپینگ آنها بکار گرفته شود (۶-۴). از طرفی روش تخلیص پروتئینهای ساختمانی این باکتریها بعنوان یک تکنیک مطمئن تر برای تشخیص و تایپینگ میکروارگانیسم ها معرفی شده است (۷،۸). در این روش پروتئین های محلول در آب سلول باکتری استخراج شده و پس از خالص سازی، توسط پلی آکریل آماید ژل الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی تولید شده مورد تجزیه و تحلیل قرار میگیرد.

هدف از این مطالعه، مقایسه کارآیی روش گاز کروماتوگرافی مایع با روش مولکولی تخلیص پروتئینهای ساختمانی در تشخیص و تایپینگ سویه های رفرانس و سایر نمونه های جدا شده از بیماران می باشد.

روش کار:

در این روش چهار سویه رفرانس باکتروئیدس فراژیلیس، موبیلونکوس کروتزی، پرووتلا بیویا و پورفیرومونا‌س ژینجیوالیس موجود در کلکسیون به همراه۶۲ نمونه کلینیکی جدا شده از بیماران با دو روش GLC و SDS-PAGE موردآزمایش قرار گرفتند. نمونه های کلینیکی جدا شده از بیماران شامل نمونه های بدست آمده از ترشحات واژینال و حفره دهان (لثه چرکی و پلاک دندانی) بود. اسیدهای چرب فرار و غیر فرار سویه ها با گاز کروماتوگرافی مایع به روش Holdman , et al تعیین شد(۹). در این روش نمونه ها پس از خالص سازی بمدت ۴ تا ۵ روز در محیط کشت مایع بیهوازی FAB در شرایط بیهوازی و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شد و اسید های چرب حاصل از فرمانتاسیون به روش زیر استخراج گردید :

الف- مراحل استخراج اسید های چرب فرار : ۰/۵میلی لیتر از کشت مایع چهار روزه باکتریها را در یک لوله آزمایش ریخته و با ۰/۱ میلی لیتر اسید سولفوریک ۵۰ درصد مخلوط می نمائیم . ۰/۵ میلی لیتر اتیل اتر کروماتوگرافی(BDH) به لوله آزمایش اضافه می کنیم و درب آنرا می بندیم و به خوبی مخلوط می نمائیم، سپس آنرا با دور rpm ۳۰۰۰ برای مدت سه دقیقه سانتریفوژ می نمائیم . دو فاز در لوله تشکیل می شود که محلول رویی اتر حاوی اسید های چرب فرار میباشد که آن را در یک میکرو لوله اپندورف ۱/۵ میلی لیتری جمع آوری می نمائیم. اکنون نمونه آماده تزریق می باشد. کلیه مراحل فوق را برای نمونه استاندارد (کنترل مثبت) تکرار می کنیم .

ب- مراحل استخراج اسید های چرب نافرار : ۰/۵میلی لیتر از کشت مایع چهار روزه مانند روش قبلی اسیدیفیه می نمائیم ، سپس ۰/۵ میلی لیتر متانول کروماتوگرافی به لوله آزمایش اضافه می کنیم و پس از مخلوط نمودن به مدت ۳۰ دقیقه در حرارت ۵۶ درجه سانتیگراد قرار می دهیم . ۰/۵میلی لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلروفرم به لوله اضافه نموده و مانند روش قبلی بخوبی مخلوط و سانتریفوژ می نمائیم . دو فاز در لوله تشکیل شده که این بار فاز پائینی کلروفرم حاوی اسید های چرب نافرار بوده که با دقت وارد لوله میکرواپندورف می نمائیم. مراحل فوق را برای نمونه استاندارد نیز تکرار می نمائیم. با استفاده از سرنگ SGE، یک میکرولیتر از هر کدام از نمونه های استاندارد، کنترل منفی و نمونه

www.SID.ir

Archive of SID

آزمایش به دستگاه تزریق نموده و کروماتوگرام هر یک از نمونه ها را جدا گانه بدست آورده و پیکهای (peaks) حاصله را با توجه به زمان باز داری برای هرگونه اسید یادداشت می نمائیم. میزان اسید های تولید شده توسط نمونه های آزمایش را با استفاده از ارتفاع پیکها (peak heights) مقایسه و با کروماتوگرام نمونه استاندارد محاسبه کرده و در این مطالعه بصورت – تا + + نشان میدهیم.

الکتروفورز پروتئینهای ساختمانی سویه ها به روش Taylor , et al (۷) با اندکی اصلاح صورت گرفت۴ تا ۵ کلنی برداشت شده و پس از سه بار سانتریفوژ با سالین، رسوب را در ۱۰۰ میکرولیتر لایزیس بافر حل نموده، سپس سوسپانسیون را به آرامی مخلوط نموده و مدت ۵ دقیقه در حرارت ۱۰۰درجه سانتیگراد بن ماری قرار داده و پس از سانتریفوژ مجدداً مقدار ۱۵۰ میکرولیتر لایزیس بافر حاوی SDS 3% به محلول اضافه نموده و پس از ده بار مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سوسپانسیون برای مدت ۳۰ دقیقه در ظرف حاوی یخ سرد شده و سپس با ورتکس بخوبی مخلوط نموده و سوسپانسیون به مدت ده دقیقه با دور rpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شده و مایع رویی که حاوی پروتئین های ساختمانی میباشد، جدا نموده و قبل از مصرف در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شده و در هنگام استفاده نیز در حرارت ۳۷ درجه سانتیگراد گرم میشود. مقدار ۱۰ میکرولیتر از محلول حاوی پروتئین به هر چاه ژل تزریق نموده و پس از رنگ آمیزی ژل ها با آبی کوماسی ، اوزان مولکولی باندهای حاصل از الکتروفورز سویه های مورد مطالعه با استفاده از منحنی مربوط به باندهای حاصل از پروتئینهای استاندارد مشخص گردید و میزان RF هر یک از باندهانیزمحاسبه گردید. چگالی باندهای پروتئینی هر یک از سویه ها با دستگاه دنسیتومتری مشخص گردید. برای تخمین اوزان مولکولی باندهای پروتئینی، با هر ژل یک مارکر استاندارد(Mol.Wt.St) ساخت شرکت سیگما (40-112 Kda) نیز استفاده گردید.

نتایج :

بسیاری از سویه های رفرانس و نمونه های کلینیکی، اسیدهای چرب فرار و غیر فرار در محیط کشت مایع FAB تولید نمودند که موجب افتراق آنها در سطح جنس (Genus) گردید، اما قادر به تقسیم بندی آنها در سطح گونه (Species) یا زیر گونه نگردید. از ۶۲ نمونه کلینیکی ۲۳ سویه (۳۷/۱٪) پرووتلا، ۲۱ سویه (۳۳/۸٪) پورفیرومونـاس، ۱۳ سویه (۲۰/۹٪) باکتروئیدس و ۶ سویه (۹/۷٪) موبیلونکوس، بدست آمد. توزیع فراوانی سویه های هر یک از جنس های جدا شده از نمونه های کلینیکی در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱: توزیع فراوانی سویه های هر یک از جنس های جدا شده از نمونه های کلینیکی

ارگانیسم	تعداد	درصد
پرووتلا سپوا	۱۲	۱۹/۳
پرووتلا اینترمدیا	۷	۱۱/۳
پرووتلا دیزینس	۴	۶/۴
پورفیرومونـاس ژینجیوالیس	۱۶	۲۵/۸
پورفیرومونـاس اندودونتالیس	۳	۴/۸
باکتروئیدس فراژیلیس	۸	۱۲/۹
باکتروئیدس ولگاتوس	۵	۸/۱
باکتروئیدس یونیفرمیس	۲	۳/۲
موبیلونکوس کروتری	۵	۸/۱
جمع	۶۲	۱۰۰

سویه های پرووتلا توانستند اسیدهای چرب استیک و سوکسینیک به مقدار زیاد (++) و اسیدهای ایزووالریک و لاکتیک به مقدار کم (+) تولید نمایند. سویه های پورفیرومونـاس نیز توانستند اسیدهای چرب بوتیریک، استیک، سوکسینیک و فنیل استیک به مقدار زیاد (++) و اسید ایزوبوتیریک به مقدار کم (+) تولید نمودند. سویه های باکتروئیدس اسیدهای پروپیونیک، استیک و سوکسینیک به مقدار زیاد (++) و اسید لاکتیک به مقدار کم (+) تولید نمودند. سویه های موبیلونکوس توانستند تنها اسید استیک به مقدار زیاد (++) و اسید لاکتیک و سوکسینیک به مقدار کم (+) تولید نمایند و قادر به تولید اسید سوکسینیک نبودند (جدول ۲).

جدول ۲: میزان تولید اسید های چرب فرار و غیر فرار توسط جنسهای بیهوازی مورد آزمایش

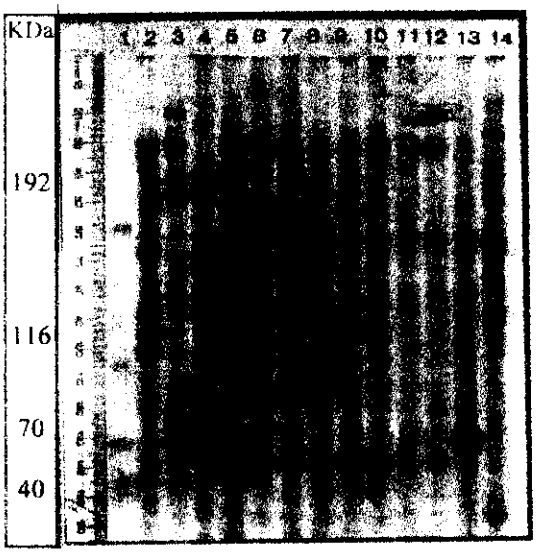
اسید چرب / ارگانیسم	A	P	IV	B	IB	L	S	PA
پرووتلا	++	–	+	–	–	+	++	–
پورفیرومونـاس	++	–	–	++	+	–	++	++
باکتروئیدس	++	++	–	–	–	+	++	–
موبیلونکوس	++	–	–	–	–	+	+	–

A = استیک , P = پروپیونیک , IV = ایزووالریک , B = بوتیریک
PA = فنیل استیک , S = سوکسینیک , L = لاکتیک , IB = ایزوبوتیریک

www.SID.ir

Archive of SID

چنانچه ملاحظه میگردد تمامی سویه های آزمایش شده در تولید اسیدهای چرب استیک و سوکسینیک مشترک بودند، اما در تولید اسیدهای چرب ایزووالریک، بوتیریک، فنیل استیک، ایزوبوتیریک و پروپیونیک با یکدیگر اختلاف داشتند که موجب افتراق آنها در سطح جنس گردید. سویه های هر یک از جنسها ی آزمایش شده، اسیدهای چرب مشابه تولید نمودند، بنابراین موجب افتراق آنها از یکدیگر در سطح گونه نگردید. اما الکتروفورز پروتئینهای ساختمانی سویه ها به روش SDS-PAGE تفاوتهای قابل ملاحظه ای در جنسها و سویه های آزمایش شده در سطح جنس و گونه نشان داد. در این مطالعه باندهای پروتئینی زیادی از مولکولهای سنگین بیش از ۱۹۲کیلو دالتون تا مولکولهای کوچکتر از ۳۷ کیلو دالتون بدست آمد که به خوبی باعث تمایز جنسها از یکدیگر گردید و بیشترین اختلاف در نواحی بین ۴۰ ، ۷۰ ، ۱۱۶ و ۱۹۲کیلو دالتون بود. الگوی پروتئینی بین سویه های رفرانس (کلکسیون) و نمونه های جدا شده از بیماران موجب افتراق آنها در سطح گو نه و زیر گونه گردید. گونه های باکتروئیدس به ۵ الگوی پروتئینی، موبیلونکوس به ۲ الگوی پروتئینی، پرووتلا و پورفیرومونا‌س هر کدام به ۳ الگوی پروتئینی و زیر گونه تقسیم شدند(تصویر ۱).



تصویر ۱ : الگوی پروتئینی سویه های بیهوازی مورد آزمایش - تراک ۱: استاندار مارکر وزن مولکولی، تراکهای ۲ تا ۴: سویه های پرووتلا، تراکهای ۵ تا ۱۰: سویه های باکتروئیدس، تراکهای ۱۱ تا ۱۲: سویه های پورفیرومونا‌س و تراکهای ۱۳ تا ۱۴: سویه های موبیلونکوس

بحث:

نتایج بدست آمده در این پژوهش نشان دادکه آنالیز فرآورده های نهایی ناشی از متابولیسم (اسیدهای چرب با زنجیره کوتاه) باکتریهای بیهوازی از جمله سویه های باکتروئیدس، پرووتلا، موبیلونکوس، میتواند به گروه بندی و شناسایی آنها تنها در سطوح جنس کمک نماید. البته این روش هنگامی کارآیی مفیدتری در بر دارد که میکروارگانیسم ها ، قبلاً توسط سایر روشهای تشخیصی مرسوم مانند رنگ آمیزی، کشت و تستهای بیوشیمی مورد شناسایی اولیه قرار گرفته باشند (۴،۶). تولید اسیدهای چرب فرار و غیر فرار ناشی از متابولیسم جنس های باکتروئیدس، پرووتلا، موبیلونکوس و پورفیرومونا‌س بطور نسبی موجب افتراق آنها از یکدیگر گردید، با اینحال سویه های موبیلونکوس الگوی نسبتاً مشابه ای با الگوی سویه های باکتروئیدس از خود نشان دادند. اختلاف این دو جنس تنها در تولید اسید پروپیونیک توسط سویه های باکتروئیدس می باشد. سویه های پورفیرومونا‌س نیز با تولید مقدار قابل توجهی اسید های چرب بوتیریک و فنیل استیک، براحتی قابل تشخیص و افتراق از سایر جنس ها می باشند، در این تحقیق سویه های هیچیک از جنس های مورد آزمایش، قادر به تولید اسید های ذکر شده نبودند. همچنین سویه های پرووتلا با تولید اسید ایزووالریک، توانستند از سویه های سایر جنسها متمایز شوند. در مطالعات مشابه‌ای که بر روی آنالیز اسیدهای چرب ناشی از فرمانتاسیون سویه های باکتروئیدس فراژیلیس، پرووتلا بیویا و پورفیرومونا‌س ژینجیوالیس صورت گرفته است نتایج بدست آمده در این مطالعه همخوانی دارد(۱۲-۱۰، ۱). نکته قابل ذکر دیگر اینکه تقریباً تمامی جنس های تست شده توانستند مقدار زیادی اسیدهای استیک و سوکسینیک تولید نمایند که این الگوی تولید میتواند آنها را از سویه های باکتریهای بیهوازی گرم مثبت نظیر کلستریدیوم ها ، ائوباکتریوم ها، پروپیونوباکتریوم ها و بیفیدوباکتریوم ها متمایز گرداند (۴،۱۳،۱۴) ، مثلاً اکثر جنس های کلستریدیوم قادرند مقادیر قابل توجهی اسیدهای بوتیریک ، لاکتیک و ایزوکاپروئیک تولید نمایند، درحالیکه هیچیک از سویه های باکتروئیدس، پرووتلا، موبیلونکوس و پورفیرومونا‌س قادر به تولید اسید ایزوکاپروئیک نمی باشند (۱،۴). اکثر سویه های

www.SID.ir

Archive of SID

پروپیونوباکتریوم ها می توانند مقدار زیادی اسید پروپیونیک و مقادیر کمی اسیدهای استیک و لاکتیک تولید نمایند. سویه های بیفیدوباکتریوم و اوباکتریوم نیز فقط توانایی تولید اسیدهای لاکتیک و استیک به مقدار زیاد را داشته و در تولید سایر اسیدها حتی بمقدار جزئی ناتوان هستند (۴،۱۵) که با این وصف قابل شناسایی از سایر جنس ها می باشند. از آنجایی که سویه های هر گونه، اسیدهای چرب مشابه تولید نمودند و تقریباً الگوی یکسانی از خود نشان دادند، بنابراین این روش قادر به تفکیک و یا متمایز نمودن سویه ها از یکدیگر در حد زیرجنس یا در سطح گونه نگردید. از سوی دیگر روش SDS-PAG با الکتروفورز نمودن پروتئینهای تخلیص شده باکتریها در ژل پلی آکریل آماید توانست ارگانیسمهای تست شده را بخوبی هم در سطح جنس و هم در سطح گونه و زیر گونه متمایز نماید. هر یک از سویه ها میتوانند یک الگوی پروتئینی (Protein profile) منحصر بفرد تولید نمایند که موجب تایپینگ آنها گردد. در این روش الگوی پروتئینی سویه ها و نمونه های کلینیکی با الگوی پروتئینی سویه های استاندارد مقایسه شدند و وزن مولکولی آنها پس از مقایسه با مارکر استاندارد محاسبه و تخمین زده شدند. هر الگوی پروتئینی میتواند تعدادی باندهای درشت یا ماژور (Major bands) و تعدادی باندهای کوچک یا مینور (Minor bands) تولید نماید. باندهای ماژور در طبقه بندی و متمایز نمودن سویه ها نقش بیشتری دارد. در این مطالعه سویه های باکتروئیدس علیرغم اینکه تعداد آنها کمتر از سویه های پرووتلا و پورفیرومونا بود، اما دارای بیشترین الگوی پروتئینی بودند و به ۵ زیر گونه تقسیم شدند. کمترین الگوی پروتئینی مربوط به سویه های موبیلونکوس بود.

در نهایت با توجه به یافته های این پژوهش میتوان چنین استنتاج نمود که: ۱- بکارگیری روش GLC در شناسایی میکروارگانیسم ها در آزمایشگاههای روتین تشخیص طبی نمیتواند کاربرد وسیعی داشته باشد، چون این روش به تنهایی نمیتواند گونه میکروارگانیسم را دقیقاً مشخص نماید، و برای اینکار به آزمایشات تکمیلی و تأیید کننده نیاز میباشد. ۲- نظر به اینکه اسید های چرب ذکر شده بیشتر توسط باکتریهای بیهوازی تولید می شود و از طرفی کشت های بیهوازی مشکل و زمان بر میباشد، لذا با اثبات وجود چنین اسیدهایی در ترشحات و نمونه های کلینیکی بدست آمده از بیمار در عرض کمتر از دو ساعت می توان به وجود باکتریهای بیهوازی در نمونه پی برد، البته باتعیین مقادیر اسیدهای تولید شده می توان جنس باکتری را نیز حدس و تخمین زد. ۳- در تحقیقات بنیادی میکروبیولوژی جهت تعیین طبقه و گونه میکروارگانیسمهای جدید و ناشناخته که قدرت تولید اسید های چرب را به میزان قابل توجهی دارا می باشند، میتوان از این روش استفاده نمود و به تعیین جایگاه آنها در طبقه (Taxon) کمک نمود. ۴- نتایج این مطالعه نشان داد که از روش GLC میتوان در تشخیص و تایپینگ ارگانیسم ها تنها در سطح جنس و از روشSDS-PAGE برای تایپینگ و طبقه بندی باکتریها در سطح گونه و زیر گونه جهت مطالعات مولکولی استفاده نمود.

منابع :

1. Baron EJ , Peterson LR, Finegold SM. Diagnostic microbiology. 9th ed. Baltimore: Mosby 1994: 504-519.
2. Carlsson J. Simplified gas chromatographic procedure for identifiction bacterial metabolic products. Appl Microbiol. 1973; 25: 287-290.
3. Deacon AG, Duerden BI, Holbrook WP. Gas chromatographic analysis of metabolic products in identification of Bacteroidaceae of clinical interest . J Med Microbiol. 1978; 11: 81-85.
4. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Scchreckenberger PC, Winn-Jr WC. Color atlas and text book of diagnostic microbiology, 5th ed. Philadelphia: Lippincott , 1997.
5. Zaleznik DF, Kasper DL. Intraabdominal infectious and abscesses, In : Fauci F, Braunwald E, Isselbacher KJ (eds). Harrisons principles of internal medicine.17th ed. Vol 2. New York: McGraw-Hill, 2001; 829-34.
6. Bennett L. Bacteroides, Prevotella, Porphyromonas and Fusobacterium species, In: Mandell GL, Bennet JE, Mandell RD (eds). Text book of principles and practice of infectious

www.SID.ir

Archive of SID

disease. 4th ed. New York: Churchill Livinstone, 2000; 2561-70.
7. Taylor AJ, Costas M, Owen, RJ. Numerical analysis of electrophoretic protein patterns of Bacteroides ureolyticus clinical isolates. J Clin Microbiol, 1987; 25: 660-666.
8. Holt JG , Krieg NR, Sneath PA , Staley JT , Williams ST. Bergey's manual of systemic bacteriology. 4th ed. New York: Williams & Wilkins, 1994; 294-299.
9. Holdeman LV , Cato EP , Moore WEC. Anaerobic laboratory manual. 4th ed. Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Va. 1997
10. Shah NH, Collins. MD. Proposal for reclassification of bacteroides asaccharolyticus, bacteroides gingivalis, and bacteroides endodontalis in a new genus, porphyronomas. Int J Syst Bacteriol 1988; 38: 128-132.
11. Shah NH, Collins. MD. Proposal to restrict the genus Bacteroldes (Castellani and Chalmers) to Bacteroides fragilis and closely related species . Int Syst Bacteriol 1989; 39:85-89.
12. Shah NH, Collins. MD. Prevotella, a new genus to include Bacteroides melaninogenicus and related species formerly classified in the genus Bacteroides . Int Svst Bacteriol 1990; 40: 205-208 .
13. Shah NH, Gharbia SE. Bacteroides and Fusobacterium: Classification and relationship to other bacteria . In: Duerden BI, Drasar BS (eds). Anaerobes in human disease. London: Edward Arnold, 1991.
14. Van Den Bgaard AE, Hazen MJ , Van Boven CP . Quantive gas chromatographic analysis of volatile fatty acids in spent culture media body fluids. J Clin Microbiol. 1986; 23:523-527.
15. Dongowski G, Lorenz A, Anger H. Degradation of pectins with different degrees of esterification by Bacteroides thetaiotaomicron isolated from human gut flora. Appl Environ Microbiol 2000; 66 (4): 1321-7.

www.SID.ir