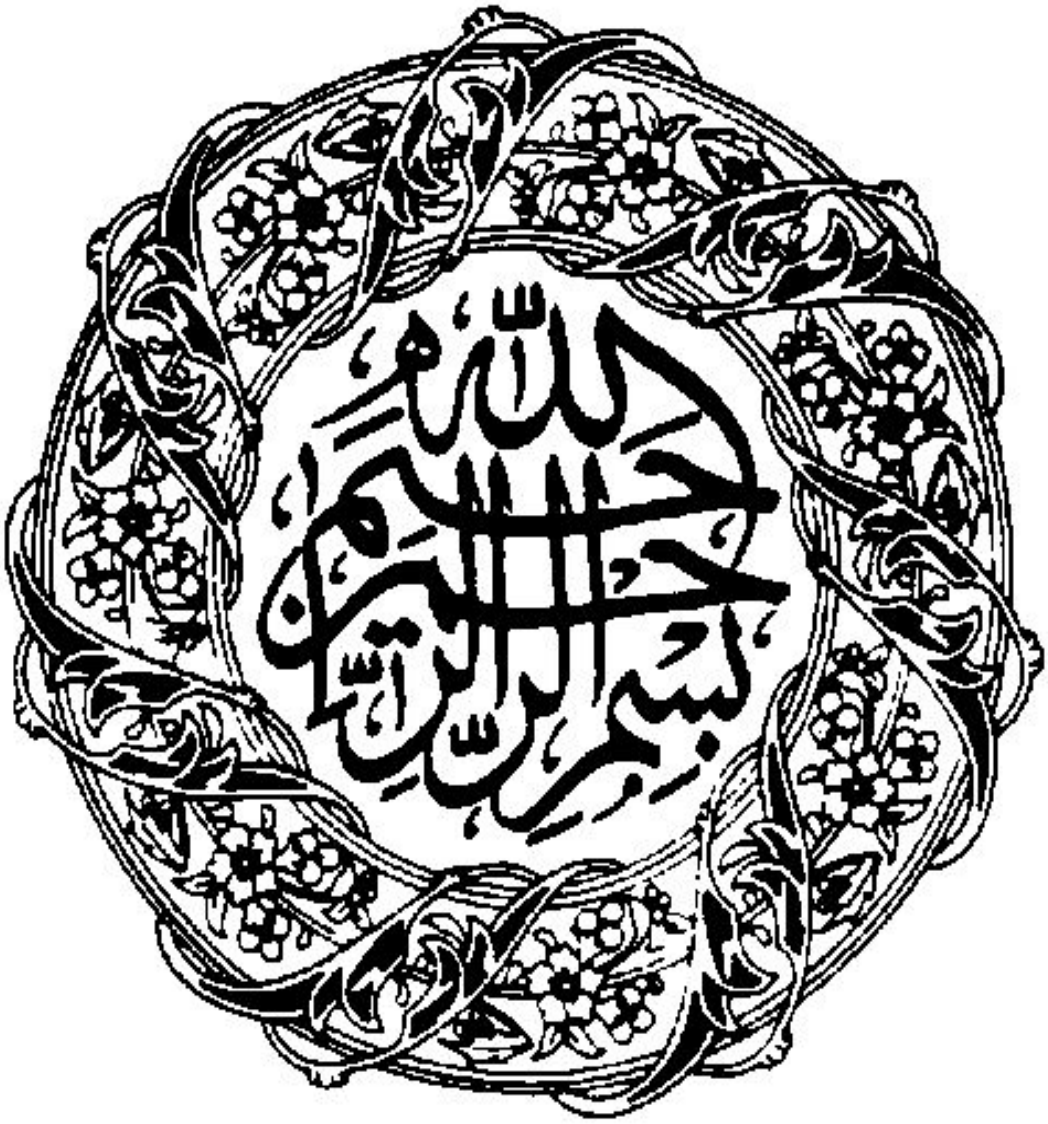

بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه الزهرا (س)

دانشکده علوم پایه

پایان نامه

جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد

رشته زیست شناسی

گرایش میکرو بیولوژی

عنوان

مطالعه بیوفیلم های مخمری در بیماران مبتلا به عفونت های ادراری

استاد راهنما

دکتر پریسا محمدی

استاد مشاور

دکتر شهلا رودبار محمدی

دانشجو

ناهید شعاعی شیره جینی

اسفند ماه ۱۳۹۰

کلیه دستاوردهای این تحقیق
متعلق به دانشگاه الزهرا
(س) است.

هر پاسخی که زندگی به تلاشهایمان بدهد، یا ندهد، هنگامی که به پایان تلاشهایمان نزدیک می شویم هر کدامان باید حق آن را داشته باشیم که با صدای بلند بگوئیم:

من آنچه در توان داشته ام انجام داده ام

لوئی پاستور

تقدیم به:

گلهای یاس بهشت آرزوهایم، پدر و مادر عزیزم که عطرشان پایدار و مهرشان ستودنی است.

و

یگانه برادرم که وجودش آرام بخش لحظات زندگی ام است.

و

آنان که عاشقانه سوختند تا روشنگر راهمان باشند.

سپاس نامه

با سپاس فراوان از استاد بزرگوارم سرکار خانم دکتر پریسا محمدی که با راهنمایی خردمندانه خود من را در به پایان رساندن این پایان نامه یاری فرمودند.

و با قدردانی فراوان از استاد ارجمندم سرکار خانم دکتر شهلا رودبار محمدی که با کمک های بیدریغشان مرا در انجام این پایان نامه یاری نمودند.

و با تشکر از تمامی دوستان و عزیزانی که در سپری کردن این مسیر با من همراه بودند.

چکیده

مطالعات در سال های اخیر نشان داده است که بروز عفونت با گونه های کاندیدیایی ارتباط شدیدی با توانایی تشکیل بیوفیلم توسط این گونه ها دارد. این ساختارها ذاتا به عوامل ضد قارچی مقاوم اند و همین امر سبب بروز مشکلات بسیار زیادی در درمان عفونت های قارچی شده است. هدف از این مطالعه جداسازی و شناسایی گونه های کاندیدیایی آلوده کننده سوند های ادراری بیماران بستری در بخش ICU و مطالعه بیوفیلم این جدایه ها بود و در نهایت اثر مهاری عصاره های گیاهی بر روی بیوفیلم های تشکیل شده توسط جدایه های بالینی مطالعه گردید. در این تحقیق ۵۵ نمونه سوند ادراری از بیماران بستری شده در بخش ICU از بیمارستان ۵۰۱ ارتش استان تهران جمع آوری شد و با استفاده از روش های کلاسیک و ملکولی شناسایی شدند. میزان بیوفیلم با استفاده از روش های کریستال ویلوله و MTT سنجیده شد. سپس حداقل غلظت مهار کنندگی (MICs)[۱] این عصاره های گیاهی با استفاده از پروتکل CLSI و از طریق روش میکرودایلوشن به دست آمد پس از آن حداقل

۱) Minimum Inhibitory Concentration
۲) Minimum Fungicidal Concentration

غلظت کشندگی (MFC) [۲] عصاره ها نیز تعیین شد. در نهایت فعالیت ضد بیوفیلمی تعدادی از عصاره های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت.

۱۶ مخمر از سطح این سوند ها جدا و شناسایی شد که شامل ٤ گونه *Candida tropicalis*، *C.glabrata*، *C. albicans* و *C.krusei* با میزان شیوع ٤۳/۷۵%، ٦/۲۵%، ۲۵% و ۲۵% بود. هر ٤ سویه توانایی بالایی در تشکیل بیوفیلم داشتند. اسانس های آویشن، مورت و عصاره آبی سیر بیشترین اثر مهاری را بر روی سلول های پلانکتونیک از خود نشان دادند.

سیر توانایی بالایی در حذف بیوفیلم گونه های کاندیدیایی در مقایسه با آنتی بیوتیک کتوکونازول از خود نشان داد و می توان از آن به عنوان جایگزینی مناسب برای مقابله با عفونت های مرتبط با ساختارهای بیوفیلمی استفاده کرد.

واژگان کلیدی: بیوفیلم، گونه های کاندیدیایی، عفونت های کاندیدیایی

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه و مروری بر مطالعات گذشته

۱-۱. بیوفیلم چیست ؟ ۲

۱-۲. ماتریکس پلیمری خارج سلولیِ EPS ۳

۱-۳. ساختار و مراحل تشکیل بیوفیلم ٤

۱-٤. سطوحی که بیوفیلم بر روی آنها تشکیل می شود ۸

۱-٥. مخمرها ۹

۱-٦.نحوه تعامل باکتری ها و مخمرها در ساختار های بیوفیلمی ۱۲

۱-۷. فاکتورهای موثر در بیماری زایی گونه های کاندیدیایی ۱۳

۱-۸. مراحل تشکیل بیوفیلم توسط *C.albicans* ۱٦

۱-۹.مزایای بیوفیلم ۱۷

۱-۱۰. مشکلات ناشی از بیوفیلم ها ۱۷

۱-۱۰-۱. مشکلات ناشی از بیوفیلم ها در صنعت ۱۸

۱-۱۰-۲. مشکلات ناشی از بیوفیلم ها در پزشکی ۱۹

۱-۱۱. راهکارهای حذف بیوفیلم از تجهیزات پزشکی ۲۱

۱-۱۲.علل مقاوت بیوفیلم ها به داروهای ضد قارچی ۲۲

۱-۱۲-۱.سلول هاي persister ۲٤

۱-۱۲-۲. کاهش میزان ارگوسترول ۲٤

۱-۱۳. روش های مختلف حذف بیوفیلم ۲٥

۱-۱۳-۱. نانو ذرات ۲٥

۱-۱۳-۲. بیوسایدها ۲۶
۱-۱۳-۲-۱. Sodium Dodecyl Sulphate (SDS) ۲۷
۱-۱۳-۲-۲. Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid (EDTA) ۲۷
۱-۱۳-۳. آنتی بیوتیک ها ۲۸
۱-۱۳-٤. عصاره های گیاهی ۳۰
۱-۱۳-٥. آنزیم ها ۳۲
۱-۱۳-٦. اسیدهای چرب ۳٤
۱-۱٤. روش های جدید مقابله با بیوفیلم ۳٥
مروری بر مطالعات گذشته ۳۷
فصل دوم: مواد و روش ها
۲-۱. نمونه گیری ۳۹
۲-۲. شناسایی گونه های قارچی ۳۹
۲-۲-۱. روش های شناسایی کلاسیک ۳۹
۲-۲-۱-۲. کشت در محیط کروم آگار ۳۹
۲-۲-۱-۳. تولید لوله زایا ٤۰
۲-۲-۱-٤. ایجاد کلامیدوسپور ٤۰
۲-۲-۱-٥. تست جذب قندها ٤۱
۲-۲-۱-٥-۱. تهیه دیسک های قندی ٤۱
۲-۲-۱-٥-۲. روش کار تست جذب قندها ٤۱
۲-۲-۲. روش شناسایی ملکولی سویه های کاندیدایی از طریق PCR ٤۲
۲-۲-۲-۱. استخراج DNA سویه های کاندیدا ٤۲

۲-۲-۲-۲. تهیه بافر TBE٥X ٤٥
۲-۲-۲-۳. واکنش هضم آنزیم ٤٦
۲-۲-۲-٤. الکتروفورز محصول هضم آنزیم MSP۱ ٤٧
۲-۳. روش تشکیل بیوفیلم کاندیدایی به روش میکروتیتر ٤٧
۲-۳-۱. روش های سنجش میزان بیوفیلم سویه های کاندیدیایی ٤٧
۲-۳-۱-۱. روش کریستال ویوله ٤٧
۲-۳-۱-۲. روش MTT ٤٨
۲-٤.روش تشکیل بیوفیلم های چند گانه در پلیت میکروتیتر ٤٨
۲-٥. تهیه اسانس و عصاره های گیاهی ٤٩
۲-٦. روش تعیین حداقل غلظت مهارکنندگی رشد ٥٠
۲-۷. روش مهار بیوفیلم های کاندیدیایی ٥١
۲-۷-۱. مهار بیوفیلم های کاندیدیایی با اسانس ها و عصاره های گیاهی و آنتی بیوتیک کتوکونازول ٥١
۲-۸. مهار بیوفیلم های چند گانه سویه های کاندیدیایی ٥۲
۲-۸-۱. روش مهار بیوفیلم های چند گانه با استفاده از عصاره از عصاره سیر و آنتی بیوتیک کتوکونازول ٥۲

فصل سوم: نتایج

۳-۱. نتایج نمونه گیری ٥٤
۳-۲. نتایج شناسایی گونه های کاندیدیایی با استفاده از روش های کلاسیک ٥٨
۳-۲-۱. نتایج کشت بر محیط کروم آگار ٥٨

۳-۲-۲. نتایج حاصل از بررسی لوله زایا ۵۹
۳-۲-۳. نتایج حاصل از بررسی ایجاد کلامیدوسپور ۶۱
۳-۲-٤. نتایج حاصل از بررسی تست جذب قندها ۶۲
۳-۳. نتایج حاصل از روش ملکولی PCR و هضم آنزیمی با آنزیم MSP۱ ۶۳
۳-٤. نتایج سنجش بیوفیلم به روش کریستال ویوله ۶٤
۳-٤-۱. نتایج سنجش بیوفیلم جدایه های بالینی به روش کریستال ویوله ۶٤
۳-٤-۲. نتایج سنجش بیوفیلم سویه های استاندارد به روش کریستال ویوله ۶۵
۳-۵. نتایج سنجش بیوفیلم به روش MTT ۶۶
۳-۵-۱. نتایج سنجش بیوفیلم جدایه های بالینی به روش MTT ۶۶
۳-۵-۲. نتایج سنجش بیوفیلم سویه های استاندارد به روش MTT ۶۷
۳-۶. نتایج سنجش بیوفیلم های چند گانه جدایه های بالینی و سویه های استاندارد به روش MTT ۶۹
۳-۷. نتایج تعیین غلظت مهار کنندگی عصاره ها و آنتی بیوتیک بر جدایه های بالینی و سویه های استاندارد ۷۱
۳-۷-۱. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی اسانس آویشن بر سلول های پلانکتونیک ۷۱
۳-۷-۲. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی اسانس مورت بر سلول های پلانکتونیک ۷۳

۳-۷-۳. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی اسانس کاکوتی بر سلول های پلانکتونیک ۷۵
۳-۷-٤. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره آبی سیر بر سلول های پلانکتونیک ۷۷
۳-۷-٥. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره آبی مریم نخودی بر سلول های پلانکتونیک ۷۹
۳-۷-٦. نتایج بررسی خاصیت ضد قارچی عصاره آبی زنجبیل بر سلول های پلانکتونیک ۸۱
۳-۸. نتایج مهار بیوفیلم سویه های کاندیدیایی ۸۳
۳-۸-۱. نتایج بررسی اثر ضد بیوفیلمی عصاره آبی سیر بر جدایه های بالینی و سویه های استاندارد ۸۳
۳-۸-۲. نتایج بررسی اثر ضد بیوفیلمی اسانس آویشن بر جدایه های بالینی و سویه های استاندارد ۸۵
۳-۸-۳. نتایج بررسی اثر ضد بیوفیلمی اسانس مورت بر جدایه های بالینی و سویه های استاندارد ۸۷
۳-۸-٤. نتایج بررسی اثر ضد بیوفیلمی آنتی بیوتیک کتوکونازول بر جدایه های بالینی و سویه های استاندارد ۸۹
۳-۹. نتایج مقایسه ای بررسی اثر ضد بیوفیلمی عصاره آبی سیر و آنتی بیوتیک کتوکونازول بر روی بیوفیلم های چند گانه ۹۲
فصل چهارم: بحث و پیشنهادها
بحث ۹٦
پیشنهادها ۱۱٥

منابع ۱۱۶

چکیده انگلیسی ۱۲۶

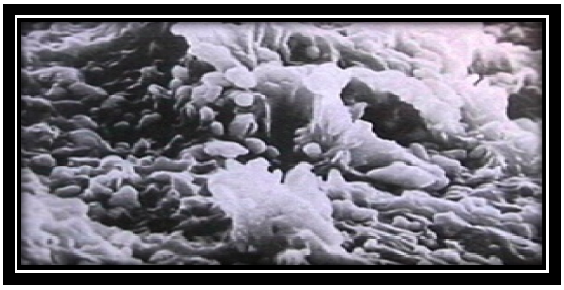
فصل اول

مقدمه

۱-۱. بیوفیلم چیست ؟

بیوفیلم، تجمعی از سلول های میکروبی است که به طور محکم به سطوح متصل شده و توسط ماتریکس خارج سلولی Extracellular polymeric substances (EPS) که میکروارگانیسم ها تولید می کنند، احاطه می گردند. نام بیوفیلم برای اولین بار در سال ۱۹۷۸ توسط Costerton به اجتماعات میکروبی نسبت داده شد (Kokare and etal.۲۰۰۹. Ferreira and etal .۲۰۰۹) . مطالعات نشان داده است که بیوفیلم محیطی بسیار پیچیده و فعال و با ساختار اسفنجی دارای کانال های آبی مویینه می باشد که از طریق این کانال ها آب و مواد غذایی به سلول ها انتقال می یابند. انتقال مواد غذایی به قسمت های زیرین بیوفیلم از طریق لوله های مویینه خاصی انجام می گردد (Kokare and etal.۲۰۰۹). انتقال مواد به داخل یا خارج بیوفیلم ها با انتشار غیر فعال و یا به کمک آب صورت می گیرد. البته مشخص شده که انتشار تسهیل شده نیز، برای انتقال ملکول ها به داخل بیوفیلم مورد استفاده قرار می گیرد. کانال های آبی در انتقال اکسیژن به فضاهای داخل بیوفیلم نقش دارند. ولی متاسفانه محدودیت های انتشار و مصرف اکسیژن منجر به ظرفیت پایین اکسیژن در درون بیوفیلم می گردد و این امر خود دلالت بر این دارد که چرا در یک بیوفیلم

میکروارگانیسم های هوازی و بی هوازی می توانند در کنار هم زندگی کنند (Kermanshahi.۱۳۸۵).



شکل ۱-۱. بیوفیلم متشکل از سلول های میکروبی و ماتریکس خارج سلولی

۱-۲. ماتریکس پلیمری خارج سلولی EPS

اسکلت EPS از واحدهای ۱،۳ یا ۱,٤ β هگزوزی تشکیل شده است. EPSها ممکن است در ویژگی های فیزیکی و شیمیایی تفاوت هایی با هم داشته باشند اما اساسا از پلی ساکاریدها تشکیل شده اند. بعضی از پلی ساکارید ها خنثی و برخی پلی آنیونیک هستند که این ویژگی ها به اتصال کاتیون های دی والانت مانند کلسیم و منیزیم کمک می کنند و اتصالات متقاطعی را با رشته های پلی مری برقرار می سازند و به این ترتیب نیروی اتصالی قوی را در بیوفیلم ایجاد می کنند. میزان EPS تولید شده توسط ارگانیسم های مختلف ممکن است به لحاظ ساختار متفاوت باشد. بنابراین EPS ها می توانند به آنیون های فلزی، کاتیون های دی والانت و ماکرو ملکولهایی مثل پروتئین ها، DNA و لیپیدها متصل شوند. بررسی ها

نشان داده است که تولید EPS تحت تاثیر میزان نیترات و کربن موجود در محیط قرار دارد. کمبود و محدودیت نیتروژن، پتاسیم و فسفات سنتز EPS را افزایش می دهد. میزان EPS تولید شده همچنین وابسته به سن سلول هاست و با افزایش سن بیوفیلم، میزان تولید آن افزایش می یابد (Kokare and etal.۲۰۰۹).

نقش EPS در ساختار بیوفیلم ها

۱) ماتریکس EPS پتانسیل حفاظت از بیوفیلم را در برابر عوامل ضد میکروبی دارد.

۲) انتشار ترکیبات از محیط اطراف به داخل بیوفیلم را محدود می کند.

۳) سبب حذف آنیون های فلزی، کاتیون ها و توکسین ها از محیط میکروبی می گردد.

٤) امکان حفاظت از بیوفیلم در برابر استرس های محیطی مانند تغییرات pH، پرتو UV، شوک اسمزی و کمبود آب را فراهم می سازد.

٥) نقش بسیار مهمی را در کنار هم قرار دادن میکروارگانیسم ها در ساختار بیوفیلم به عهده دارد (Kokare and etal.۲۰۰۹. Baillie and Douglas.۲۰۰۰).

۱-۳. ساختار و مراحل تشکیل بیوفیلم

تشکیل بیوفیلم یک فرآیند تکاملی بسیار تنظیم شده، پیچیده و متنوع می باشد. اگر چه نحوه تشکیل بیوفیلم

هر گونه، خاص همان گونه می باشد اما مراحل عمومی تشکیل بیوفیلم در تمام میکروارگانیسم ها مشترک بوده و طی ۵ مرحله انجام می گیرد:

اتصال اولیه

اتصال به سطح در طی دو مرحله صورت می گیرد، اتصال برگشت پذیر و اتصال برگشت ناپذیر. در مرحله اتصال برگشت پذیر میکروارگانسیم به سطح بسیار نزدیک شده، تحرک سلولی آن کم می شود سپس به طور موقتی به سطح یا دیگر میکروارگانیسم هایی که پیشتر به سطح متصل شده اند، می چسبد این مرحله در بر گیرنده واکنش ضعیف میکروارگانیسم با سطح پایه است که در نتیجه نیروهای واندروالس، الکترواستاتیک و واکنش های هیدروفوبیک بوده و معمولا ۵ تا ۳۰ ثانیه طول می کشد. در مرحله اتصال برگشت پذیر میکروارگانیسم ها قادر به تحرک و جابه جایی می باشند و ممکن است بسیاری از سطح جدا شده وبه شکل پلانکتونیک درآیند
(Chmielewski and Frank .۲۰۰۳).

تبدیل اتصال برگشت پذیر به حالت برگشت ناپذیر در سال ۱۹۴۳ توسط Zobell به عنوان انتقال از حالت واکنش ضعیف سلول با ماده به یک اتصال دائم به واسطه تولید پلی مرهای خارج سلولی مورد توجه قرار گرفت. البته تحقیقات اخیر، تغییرات فیزیولوژیکی را مسبب این نوع

از اتصال می دانند به عنوان مثال اتصال برگشت ناپذیر سطح سلول های *C. albicans* به سطح پایه با تولید پروتئین های خارج سلولی از قبیل پروتئین های خانواده Secreted Aspartic Protease (SAP) صورت می گیرد (Wu,T.۲۰۰۰).

تشکیل میکروکلنی

پس از اتصال و برگشت پذیر نا پذیر شدن آن مرحله تشکیل میکروکلنی آغاز می شود. بخش اصلی بیوفیلم رشد یافته را میکروکلنی تشکیل می دهد. نتایج به دست آمده از تحقیقات Otoole و Kolter بر روی سویه های جهش یافته *Pseudomonas aeruginosa* مطرح می کند که حرکت غلطیدن وابسته به پیلی نوع ٤ نقش مهمی را در تجمع و تشکیل میکروکلنی توسط این میکروارگانیسم بر روی سطوح ایفا می کند. مکانیسم دوم، تقسیم دو تایی سلول های متصل به سطح می باشد در هنگام تقسیم، سلول های دختری به سمت بیرون و بالای سطح مورد نظر قرار می گیرند.

تولید ماده پلیمریک خارج سلولی (EPS)

بعد از تشکیل میکروکلنی، سلول ها در داخل ماتریکس پلی مری خارج سلولی که خودشان ترشح می‌کنند قرار می گیرند (Dominic and etal.۲۰۰۷. Kokare and etal.۲۰۰۹).