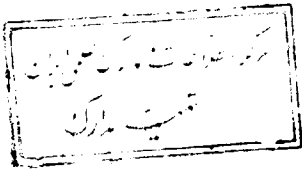


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۲۶۲/۴



۱۳۷۸ / ۱ / ۲۰

دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی

پایان نامه:
برای دریافت درجه دکترای داروسازی

موضوع:
شناسایی و تعیین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش
کروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC)

اساتید راهنما:
جناب آقای دکتر ناصر خدایی بوران - جناب آقای دکتر مجتبی طباطبائی یزدی

استاد مشاور:
جناب آقای دکتر رضا صغیری

نگارش:
الهام زرین پاشنه

شماره پایان نامه ۳۹۳۰

سال تحصیلی ۷۸-۱۳۷۷

1832/2

۲۴۳۱۴

تقدیم به پدر و مادر عزیزم:

که تمام موفقیت‌های زندگی‌م را مرهون محبت‌های بی‌شائبه ایشان می‌دانم.

باتشکر از اساتید و اعضای محترم هیئت قضات:

- جناب آقای دکتر ناصر خدائی بوران

- جناب آقای دکتر مجتبی طباطبایی یزدی

- جناب آقای دکتر رضا صغیری

- جناب آقای دکتر محمد مهدی فیض آبادی

و

- جناب آقای دکتر احمد رضا شاهوردی

باتشکر از جناب آقای دکتر مرتضی آذرنوش ریاست محترم انستیتو پاستور
ایران که امکان تحقیق در این مرکز تحقیقاتی را برای این جانب فراهم
آوردند.

همچنین با تشکر از همکاری صمیمانه:

- جناب آقای دکتر احمد رضا بهره مند
- سرکار خانم دکتر اعظم کلوبندی
- جناب آقای عباس صنمی
- جناب آقای محمود شفیع
- سرکار خانم مهران حیدری
- جناب آقای مجید رستم پور
- جناب آقای محمد رضا بابائی مقدم
- جناب آقای حمید رضا فریبرز
- جناب آقای خالد مهربانپور
- سرکار خانم مهناز وفادار
- سرکار خانم زهره ناجی

فهرست:

- ۱..... اختصارات
- ۲..... مقدمه
- ۴..... خلاصه تحقیق
- ۵..... فصل اول: کلیات
- ۶..... تاریخچه
- ۶..... معرفی مایکوبا کتریوم توبرکلوزیس
- ۷..... ساختمان سلولی
- ۸..... ساختمان دیواره سلولی
- ۹..... ساختمان آنتی ژنیک
- ۱۰..... -عصاره ناخالص باسیل کخ
- ۱۰..... -عصاره خالص شده باسیل کخ
- ۱۰..... -عصاره حرارت ندیده
- ۱۱..... -پلی ساکارید
- ۱۱..... -فسفاتیدیل انیتوزیتول مانوزیدز
- ۱۱..... -WAX - D
- ۱۲..... -فاکتور طناب

- ۱۲.....- سونفولپیداها
- ۱۲.....- مایکوزیدها
- ۱۳.....- آنتی ژنهای اختصاصی مایکوبا کتریوم تو برکلوزیس
- ۱۴.....- متابولیسم و کشت
- ۱۵.....- خواص بیوشیمیایی
- ۱۵.....- تشخیص آزمایشگاهی
- ۱۶.....- آزمایش مستقیم
- ۱۷.....- کشت
- ۱۷.....- تلقیح به حیوان
- ۱۸.....- آزمایشهای سرمی
- ۱۸.....- خواص فیزیکی شیمیایی مورد استفاده برای شناسایی مایکوبا کتریها
- ۲۱.....- آریل سولفاتاز
- ۲۱.....- کاتالاز (روش قطره)
- ۲۲.....- کاتالاز بعد از حرارت تا 68°C
- ۲۲.....- کاتالاز نیمه کمی
- ۲۳.....- آزمایشهای مهارتی برای تشخیص
- ۲۵.....- جذب آهن

- ۲۵.....رشد روی محیط کانکی - آگار
- ۲۶.....نیاسین
- ۲۸.....احیاء نیترات
- ۲۹.....پیرازین آمیداز
- ۲۹.....تحمل سدیم کلراید
- ۳۰.....احیاء تلوریت
- ۳۰.....حساسیت به TCH
- ۳۱.....هیدرولیز Tween 80
- ۳۲.....اوره آز
- ۳۲.....سیستم BACTEC
- ۳۴.....واکنش های زنجیره ای پلیمرز (PCR)
- ۳۸.....گاز کروماتوگرافی چربی های دیواره سلولی (GLC)
- ۳۹.....کروماتوگرافی
- ۳۹.....تاریخچه کروماتوگرافی
- ۴۰.....کروماتوگرافی بر روی غشاء نازک (TLC)
- ۴۰.....مقدمه کروماتوگرافی
- ۴۱.....اساس کار

۴۲ عملیات لازم برای انجام TLC
۴۵ انتخاب سیستم‌های کروماتوگرافی بر روی غشاء نازک
۴۶ فصل دوم: مواد و روشها
۴۷ مواد و وسایل به کار رفته جهت انجام عمل کشت
۴۷ مواد و وسایل به کار رفته جهت انجام عمل استخراج
۴۸ مواد و وسایل به کار رفته جهت انجام عمل کروماتوگرافی
۴۸ باکتریهای به کار رفته در این تحقیق
۴۹ تهیه محیط کشت مایع 7H9
۵۰ کشت
۵۳ استخراج سولفولپید -۱
۵۶ کروماتوگرافی
۵۹ فصل سوم: ارائه نتایج
۶۴ فصل چهارم: بحث و نتیجه گیری
۷۰ فهرست منابع

اختصارات

- ATCC: American type culture collection
- GC: Gas chromatography
- GLC: Gas liquid chromatography
- HPLC: High - Performance Liquid chromatography
- NAP: p - Nitro - α - acetylamino - β - hydroxypropiophenone.
- OT: Old Tuberculin
- PCR: Polymerase Chain Reaction
- PGL: Phenolic glycolipid
- PLC: Preparative layer Chromatography
- PLE: Preparative layer Electrophoretic
- PPD: Purified Protein Derivative
- PPTR: Polyphthienoyl Trehalose
- R_f: Resolution factor
- SL - I: Sulpholipid I
- SQ: Semiquantitative
- TCH: Thiophene - 2 - Carboxylic acid hydrazide
- TLC: Thin - layer Chromatography

مقدمه:

در بین بیماریهای عفونی شایع در جهان، بیماری سل یا توبرکلوزیس از جایگاه مهم و ویژه‌ای برخوردار است. این بیماری یکی از عوامل شایع مرگ و میر در جهان می‌باشد طوری که هر ساله نزدیک به دو میلیارد نفر در دنیا به این باکتری آلوده می‌شوند، از این بین هشت میلیون نفر علائم بیماری شدید را از خود نشان می‌دهند و سه میلیون نفر از آنها جان خود را در اثر این بیماری از دست می‌دهند (۱۲۳).

عفونتهای مایکوباکتریایی به عنوان یکی از مسائل بزرگ سازمان بهداشت جهانی (WHO) مجدداً مطرح شده‌اند و این بازگشت دوباره بیماری همراه با افزایش مقاومت باسیل سل به داروهای ضد توبرکلوز است.

بعلاوه به موازات گسترش بیماری ایدز در جهان این بیماری نیز توسعه یافته. چراکه افراد مبتلا به سندرم نقص سیستم ایمنی نسبت به ورود باکتری به بدن بسیار حساس‌تر از افراد سالم هستند و حتی باسیل‌های توبرکلزی که قبلاً در بدنشان به صورت غیر فعال وجود داشته در آنها ایجاد بیماری شدید می‌کند (۵۴).

تشخیص سریع بیماری سل بسیار مهم است چراکه با تشخیص به موقع آن می‌توان هر چه سریعتر به مبارزه با بیماری پرداخت و از درمانهای اشتباه پرهیز کرد. لیکن هنوز تشخیص این بیماری احتیاج به وقت و هزینه زیادی دارد. جداسازی و کشت نمونه‌های کلینیکی حداقل ۴ تا ۶ هفته طول می‌کشد و پس از آنهم بایستی روی کلنی‌ها آزمایشات متداول شیمیایی را انجام داد تا باکتری را به دقت تعیین هویت کرد و حساسیت آن به آنتی‌بیوتیک‌های متداول را تعیین کرد. بنابراین یافتن روشی که بتواند به عنوان یک جایگزین مناسب برای روشهای سنتی باشد بسیار مهم خواهد بود.

روشهای کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی روی لایه نازک چندی است که توجه محققان در این امر را به خود جلب کرده است. این روشها تاکنون در کشور ایران انجام نشده لیکن در سایر کشورها تحقیقات زیادی روی آن صورت گرفته است.

در سالهای ۱۹۶۶ و ۱۹۶۷ کروماتوگرافی از لیپیدهای مایکوباکتریایی به عنوان روشی برای طبقه‌بندی آنها معرفی شد. این تحقیقات در دهه هشتاد شکل گسترده‌تری به خود گرفت به طوری که در سال ۱۹۸۲ روش کروماتوگرافی از لیپیدهای دیواره مایکوباکتریا به عنوان روشی کم هزینه و مفید برای شناسایی و طبقه‌بندی آنها ارائه شد.

در سال ۱۹۹۲ در انستیتو پاستور فرانسه، کروماتوگرافی از سولفولیبید استخراج شده از مایکوباکتریها به عنوان روشی سریع در تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از سایر مایکوباکتریها معرفی شد که می‌توانست در آزمایشگاههای تشخیص طبی سل به کار گرفته شود.

در سالهای ۱۹۹۷ و ۱۹۹۴ برای کروماتوگرافی از مایکولیک اسید دیواره مایکوباکتری استفاده شد. امروزه با پیشرفت تکنیک‌هایی مانند GC و HPLC که بسیار دقیق هستند توجه بیشتری روی آنها می‌شود. لیکن هنوز TLC به عنوان روشی کم هزینه و دقیق مطرح است. در این تحقیق نیز سعی ما بر این بود که روشی دقیق، سریع و کم هزینه را تجربه کرده و استاندارد سازیم تا بتواند به عنوان مکملی در کنار تست‌های بیوشیمیایی متداول قرار گیرد.

«خلاصه تحقیق»

کروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC) مدتهای مدیدی است که بعنوان ابزاری مناسب برای شناسایی و خالص سازی مواد مختلف شیمیایی، آکالوئیدهای گیاهی، و چربی ها استفاده می شود. یکی دیگر از موارد استفاده از TLC در زمینه شناسایی میکروبیهای مختلف از یکدیگر است.

دیواره سلولی باکتریهای مختلف از نظر ساختمان شیمیایی یکدیگر متفاوت است و در برخی موارد آنتی ژنهایی کاملاً اختصاصی در دیواره سلولی هر باکتری وجود دارد که می توان با روشهای مختلف استخراجی و بکار گرفتن حلالهایی مناسب، در عمل استخراج، ماده شیمیایی مورد نظر (آنتی ژن اختصاصی گونه) را جداسازی کرده و با استفاده از عمل کروماتوگرافی به شناسایی باکتری مورد نظر اقدام نمود.

در تحقیق حاضر، سعی در شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کمک عمل کروماتوگرافی روی لایه نازک (TLC) بود. بدین صورت که ماده سولفونامید (I - Si) به عنوان آنتی ژن اختصاصی گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انتخاب شد و به کمک حلالهای مناسب اقدام به استخراج و تا حد امکان خالص سازی آن شد. سپس با راندن ماده استخراج شده روی صفحات TLC به کمک حلال مناسب کروماتوگرافی و ظاهر کردن لکه های ایجاد شده با معرف کرزین ویوله و مشاهده R_f و رنگ لکه های ایجاد شده سعی در شناسایی و خالص سازی ماده مورد نظر شد.

هم زمان با استخراج این ماده از دیواره مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عصاره دیواره سه گونه مایکوباکتری دیگر نیز با همین روش و تحت شرایط یکسان استخراج شد و روی صفحات پلیت رانده و رنگ آمیزی شد.

تحت شرایط موجود و به دلیل برخی محدودیتها در مورد و نبود تجربه کافی در این زمینه، تفاوت قابل ملاحظه ای بین عصاره های بدست آمده از سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریهای آتیبیک مشاهده نشد، که این امر احتیاج به بحث و تحقیقات بیشتری دارد.

فصل اول:

کلیات

تاریخچه بیماری سل:

بیماری سل یک بیماری قدیمی بشر است که در اسکلت انسانهای مربوط به عصر حجر و نیز در استخوانهای مومیایی شده در مصر قابل تشخیص است. برای نخستین بار ماهیت این بیماری در سال ۱۸۶۵ توسط Villemin شناخته شد. وی نشان داد که این بیماری مسری بوده و اگر از ضایعات سلی انسان به خرگوش تزریق شود در حیوان ایجاد بیماری می‌کند. در سال ۱۸۸۲ کخ توانست باسیل این بیماری را کشف کند و به همین خاطر باسیل سل به نام باسیل کخ نیز مشهور می‌باشد. کخ توانست باکتری را از خلط و سایر ضایعات سلی بیمار بدست آورد و برای نخستین بار این باکتری را روی محیط سرم منعقد شده گاو و گوسفند کشت دهد، علاوه بر این با تلقیح این باکتری به حیوان حساس، در حیوان ایجاد بیماری نمود و باکتری اولیه را از حیوان بدست آورد و بدین طریق اصول کخ را ثابت نمود (۱).

معرفی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس:

این باکتری مولد بیماری سل در انسان می‌باشد این باکتری در بدن انسان و حیوان مسلول زندگی می‌کند. انسان میزبان اصلی باسیل سل انسانی است این باسیل به طور گسترده در خلط و سرفه مبتلایان به سل ریوی وجود دارد.

این باکتری در زیر میکروسکوپ نوری به شکل استوانه‌ای به طول ۱ تا ۴ میکرون و عرض ۰/۲ تا ۰/۶ میکرون است دو انتهای آن مدور است و به صورت تک تک و یا توده‌ای دیده می‌شود که بدون حرکت، بدون