دانشگاه علوم پزشکی تهران

دانشکده داروسازی

پایان نامه

جهت اخذ درجه دکترا

موضوع :

اثر استرپتوکیناز در تشخیص اندوکاردیت تحت حاد
حاصل از استرپتوکوکها

برا هنمائی:

استاد ارجمند جناب آقای دکتر هرمز دیارا عتمادی

نگارش :
بابک ایماق نائینی

سال تحصیلی ۷۰ - ۱۳۶۹ شماره پایان نامه : ۲۸۳۱

۱۴۷۱۷

تقدیم بـــه :

پدردلسوزم

،

مادرفداکارم

و

برادرمهربانم . .

۱۴۷/۱۷

تقدیم بـــــه :

نسرین عزیزترا زجا نـــــم .

با تشکر از کلیه دوستانم در ورودی ۶۴ نوبت دوم
دانشکده داروسازی بخصوص جناب آقای دکتر
سعید دهنمکی

با تشکر از ستاد گرامی جناب آقای دکتر هرمزدیا و اعتمادی و سایر
اعضای هیئت قضات رساله دکترا و کلیه کارکنان گروه میکروبشناسی
و ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران و نیز
کارکنان آزمایشگاههای میکروبشناسی مرکز طبی کودکان و بیمارستان
امیراعلم

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
بخش نظری	۱
قسمت اول: استرپتوکوکها	۱
تاریخچه کلی	۳
جایگاه زیست	۵
مقاومت	۵
مصونیت	۶
روشهایی برای استخراج آنتی ژنهای گروههای مختلف استرپتوکوکها درتقسیم بندی لانسفیلد	۷
استخراج با اسیدکلریدریک	۷
استخراج با فرمامید	۸
تست رسوب کردن برای طبقه‌بندی لانسفیلد	۸
قسمت دوم: مروری برگروههای مختلف استرپتوکوکها	۹
الف: استرپتوکوکوس پیوژن	۹
مشخصات میکروب	۹
اجزاء سلولی	۱۰
فرآورده‌های خارج سلولی	۱۵
محیط آگارخوندارحاوی کریستال ویوله	۱۷
محیط (پلی میکسین ب، نئومایسین سولفات، فوزیدیک اسید) PNF	۱۸
تیپ بندی استرپتوکوکهای گروه A	۱۹
تست آگلوتیناسیون روی صفحه	۱۹

فهرست مطالـــــب

عنـــــوان	صفحـــه
تست رسوب گذاری	۲۰
ب ـ استرپتوکوکوس پنومونیه	۲۰
میکروبشناسی	۲۱
طبقه‌بندی	۲۱
متابولیسم واحتیاجات تغذیه‌ای	۲۲
شناسائی آزمایشگاهی	۲۳
شکل ظاهری میکروب	۲۳
شکل ظاهری کولونی	۲۴
تست حساسیت به اوپتوکین	۲۵
تست حلالیت درصفرا	۲۵
روش اول	۲۶
روش دوم	۲۶
تست تورم کپسولی	۲۶
واکنش نوفلد ـ کولانگ	۲۸
تزریق به حیوان حساس	۲۹
آنتی ژنهای سطحی	۳۰
پلی ساکاریدهای کپسولی	۳۰
ماده C	۳۲
آنتی ژن پروتئین M	۳۳
آنتی ژن پروتئین R	۳۳
آزمایشهایی برای تشخیص آنتی ژنهای پنوموکوکی	۳۳
تست کوآگلوتیناسیون	۳۳

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
تیپ بندی با استفاده از COA	۳۴
تشخیص عفونت با استفاده از COA	۳۵
تست آگلوتیناسیون لاتکس	۳۶
ایمونوالکتروفورزیس با جریان مخالف	۳۷
سموم	۳۷
پنومولایزین	۳۷
ماده اصلی ایجادکننده پورپورا	۳۸
نورآمینیداز	۳۸
اتولایزین ها	۳۸
باکتریوفاژ پنوموکوکی	۳۹
انتقالات ژنتیکی	۴۰
تیپهای پنوموکوکی	۴۰
ج- گونه‌های انتروکوک واستریتوکوکهای گروه D	۴۳
میکروبشناسی واپیدمیولوژی	۴۳
تست تجزیه اسکولین	۴۵
تست رشد در آبگوشت حاوی ۶/۵% نمک طعام	۴۶
تست رشد در محیط لیتموس - شیر	۴۷
شیر بدون خامه	۴۷
محول لیتموس	۴۸
ساخت محیط کامل لیتموس - شیر	۴۸
تخمیر گلیسرول وسوربیتول	۴۹
د - استریتوکوکوس آگالاکتیه	۴۹

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
تقسیم بندی وخصوصیات ظاهری	۴۹
تعیین هویت	۵۰
محیط اختصاصی برای استرپتوکوکهای گروه B	۵۲
تست CAMP	۵۳
تست سدیم هیپورات	۵۴
تست پیگمان	۵۵
تقسیم بندی سرولوژیکی	۵۵
هـ ـ استرپتوکوکوس ویریدنس	۵۶
میکروبیولوژی بالینی	۶۰
تشخیص افتراقی گونه‌ها	۶۱
استرپتوکوکهای میتیس ، سانگیوس I ، II	
سالیواریوس ، موتانز ، موبیلوروم ،	۶۲
استرپتوکوکهای متنوع ازنظرتغذیه‌ای	۶۳
چندتست تشخیصی ونتایج آنها برای تعیین هویت	
استرپتوکوکهای ویریدنس	۶۴
و ـ استرپتوکوکهای گروه اینترمدیوس	۶۵
میکروبیولوژی بالینی	۶۵

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
بخش عملی	۶۷
مقدمه	۶۷
a ـ استرپتوکیناز	۶۸
b ـ توروکولات	۷۰
c ـ محیط کشت آماده	۷۱
d ـ محیط کشت دست ساز	۷۱
- روش عمل	۷۱
تست همولیز	۷۶
تست کاتالاز	۷۶
تست اکسیداز	۷۷
خلاصه ونتیجه	۷۹
منابع	۸۲

بخش نظـــــری :

قسمت اول : استرپتوکوکها : (Streptococci):

استرپتوکوکها باکتریهایی هستندبه شکل کروی یا بیضی که بصـــــورت دوتایی ویا زنجیره‌های بسیار بلندرشدمیکنند .بیشترآنها بیهوازی - اختیاری‌بوده ولی با این وجودبعضی ازآنها بیهوازی اجباری هستند . استرپتوکوکها گرم مثبت ، بدون اسپور ، کاتالازواکسیدازمنفی و- بی حرکت هستندواحتیاجات غذایی پیچیده ومتغیری دارند .ازنظـــــر طبقه‌بندی این ارگانیسم ها متعلق به‌جنس Streptococcus بوده که شامل بیشتراز ۲۰ گونه‌میباشد .برخی ازآنها برای انســان بیماریزا بوده که قابل توجه‌ترازهمه Streptococcus pyogenes Steptococcus pneumoniae هستند .تنها یک سیستم تقسیم - بندی قادربه‌تمیزدادن این ارگانیسمها نیست وتقسیم بندی آنها بستگی به‌همولیزروی آگارخوندار دربلیت ، ترکیبات آنتی ژنیک ، مشخصـــات مربوط به‌رشد ، واکنشهای بیوشیمیایی وبیشترازهمه‌تجزیه ژنتیکـــی دارند. وقتی استرپتوکوک روی آگارخوندار رشدمیکند ، هیچ وجه‌مشخصه‌ای ازنظرسطح وظاهراین کلنی ها مثل شکل پرگنه‌ها ویارنگ وشفافیـــــت بین گونه‌ها وجودندارد . دربیشترمواردکولونی گونه‌های اصلی با یـــک منطقه بی رنگ وشفاف که‌حاکی ازلیزشدن کامل سلولهای قرمزخـــــون میباشد ، احاطه شده است واین حالت نشان دهنده‌همولیزنوع بتا(β)که یک خصوصیت مهم درموردا استرپتوکوکس‌پیوژن وتعدادی دیگرازاسترپتو- کوکهای بیماریزای انسان است ، میباشد .گروه‌دوم ازاین ارگانیسمها همولیزآلفا (α) نشان میدهند . درزیر میکروسکوپ همولیزنـــــوع آلفا ، شامل یک منطقه داخلی عدم‌همولیز ویک منطقه‌خارجی واجـــــد

همولیزمیباشد. درهمولیزآلفا درواقع یک منطقه سبزرنگ درا طـــراف کلنی بوجودمیآید. این نوع همولیزسبزرنگ با تغییرنوع خون بکـــار رفته ونیزشرایط انکوباسیون ، تغییرخواهدکردویک نشانه‌ای بـــرای تشخیص استرپتوکوکوس‌های ویریدنس میباشد. استرپتوکوکوس پنومونیه مانندبسیاری ازاسترپتوکوکهائی که بطورطبیعی درمجاری فوقانـــی تنفسی ولوله‌های گوارشی انسان وجوددارند، آلفا همولیتیک میباشد. همولیزنوع گاما (۸) برای گونه‌هایی درنظرگرفته میشودکه‌درواقـــع هیچگونه‌همولیزی را بوجودنمی آورند (non - hemolytic)

بسیاری ازوجه‌مشخصه‌های استرپتوکوکوس‌های بتا همولیتیک بوسیلـــه لانسفیلد (Lancefield) که‌روی اختلافات این ارگانیسمها درسرو - گروپ های مختلف با توجه‌به‌تفاوتهای کربوهیدراتهای موجوددردیواره سلولی آنها کارمیکرد، پیدا شده‌اند. آنتی ژنهای مخصوص‌گروههـــا ازدیواره سلولی با استفاده‌ازآنتی سرمهای مخصوص وایجادواکنـــش پرسیپیتاسیون یارسوب‌گذاری ، استخراج وشناسایی میشوند. تا ایـــن زمان سروگروپهای A تا H و K تا V شناسایی‌شده‌اند. گروههـــای A و B و C و D و G بیشترین‌ارگانیسمهای پیداشده‌ازاین جنس‌در انسان میباشند (جدول شماره ۱).

با وجوداینکه سیستم خانم لانسفیددرابتدابرای شناسایی استرپتوکوکهای بتا همولیتیک موردتوجه‌قرارگرفت ، ولی گروههای اصلی گاما و آلفا همولیتیک نیزحاوی آنتی ژنهای مخصوص‌گروه هستندمثل استرپتوکوکوس‌گروه D که‌اغلب‌آنتروکوک خوانده‌میشوندوبیشترگونه‌های آن همولیزبتا نشان نمیدهندواخیرا " بصورت یک جنس مجزا موردبررسی قرار میگیرندوبیماریهایی را هم درانسان بوجودمیآورند. استرپتوکوکهایی

TABLE 1. Streptococcal Serogroups Most Frequently Involved in Human Disease

Serogroup	Group Specific Cell Wall Antigen	Usual Clinical Features
A	Rhamnose-N-acetylglucosamine polysaccharide	Pharyngitis, tonsillitis, otitis media, sinusitis, scarlet fever, erysipelas, cellulitis, impetigo, pneumonia, endometritis, septicemia Delayed nonsuppurative sequelae: acute rheumatic fever, acute glomerulonephritis
B	Rhamnose-glucosamine polysaccharide	Chorioamnionitis, puerperal sepsis, neonatal sepsis and meningitis
C	Rhamnose-N-acetylgalactosamine polysaccharide	Upper respiratory infections
D	Glycerol teichoic acid	Genitourinary tract infections, wound infections, endocarditis
G	Rhamnose-galactosamine polysaccharide	Upper respiratory infections, cellulitis, septicemia, deep-tissue infections

جدول شماره ۱

که از طریق آنتی ژن گروه تشخیص داده نمیشوند ، توسط تستهای فیزیولوژیکی مثل واکنشهای تخمیری ورشددرحرارتهای $10^{o}C$ و $45^{o}C$ ورشد درآبگوشت حاوی غلظتهای زیادی ازنمک ، موردشنا سایی قرار میگیرند . سه‌گونه از استرپتوکوکهای بیهوازی وسه‌گونه از استرپتوکوکهای میکروآئروفیلیک شناخته‌شده اخیرا " درکتاب *Bergey's manual* موردتجدیدنظرقرارگرفته‌اند . واکنش همولیتیک این ارگانیسمها متغیر است وروش موفقیت آمیزی برای دسته‌بندی آنها وجودنداردودرحال حاضر درعفونتهای انسانی واغلب درعفونتهای بافتهای نکروزه دیده‌میشوند .

تاریخچه‌کلی : *(General History)* :

استرپتوکوکها ابتدا اززخمهای عفونی ونیزضایعات بادسرخ بوسیله بیلروت *(Billroth)* درسال ۱۸۷۴ وازخون بیماران مبتلا به‌سپتی سمی پورپورال توسط پاستور *(Pasteur)* درسال ۱۸۷۹ جداگردیدند .

فلیسن (Fehleisen) درسال ۱۸۸۳ ارگانیسمهای زنجیره‌ای جدا شده از بثورات با دسرخ را در محیط کشت بصورت خالص بدست آورد ونشان داده شدکه این ارگانیسمها قادر به ایجاد با دسرخ تیپیک در انسانها هستند و روزنباخ (Rosenbach) درسال ۱۸۸۴ نام استرپتوکوکوس پیوژن را به این ارگانیسمها دادوازآنزمان نامهای مختلفی را برای این باکتریها وضع کردندکه حالا منسوخ شده‌اندمانند: S. Scarlatinae

S. Hemolyticus , Streptococcus erysipelatos

کلمه استرپتوکوک از لغت یونانی Streptocos به معنی زنجیره‌ای از دانه‌های شبیه تسبیح و Coccus بمعنی توت گردگرفته شده است. اززمانی که مطالعات شوتمولر (Schotmuller) درسال ۱۹۰۳ درموردتکنیک استفاده ازآگارخون دار به منظورجداکردن استرپتوکوکهای همولیتیک وغیرهمولیتیک آغازگردید، پیشرفتهای ابتدایی درزمینه طبقه‌بندی استرپتوکوکها هم شیوع‌شد. درسال ۱۹۱۹ براون(J. H. Brown) مطالعات دقیقی را روی همولیزانجام دادواصطلاحات آلفا وبتا وگاما را وضع کرد. طبقه بندی استرپتوکوکهای بتا همولیتیک به سروگروپهای مجزا توسط لانسفیلد (Lancefield) درسال ۱۹۳۳ نقطه عطفی دردانستنیهای ما راجع به اپیدمیولوژی عفونتهای استرپتوکوکی بشمار میرود.

بیشترین سوشهای بیماریزای انسان به سروگروپ A با استرپتوکوکوس پیوژن تعلق دارند. سیستم تقسیم بندی استرپتوکوکهای گروه A به سروتیپهای مختلف یا براساس واکنشهای رسوبی پروتئین M (لانسفیلد) ویا برمبنای واکنشهای آگلوتیناسیون پروتئین T (Griffith) استواراست. بعلاوه لانسفیلدنقش حساس پروتئین M در ویرولانس استرپتوکوکهای موردنظرونیزطبیعت اختصاصی هرتیپ دربوجود آوردن ایمنی نسبت به عفونتهای استرپتوکوکی گروه A را ثابت کرد.

مطالعات دوشز (Dochez) ودیک (Dicks) دردهه ۱۹۲۰ ارتباط بین مخملک وعفونت استرپتوکوکی همولیتیک رابه اثبات رساند.چندسال بعد تود (Todd) روش تیتراسیون باآنتی استرپتولایزین O (ASO) رادر سرم ونیزاستفاده ازسایروسایل مهم ودردسترس درمطالعات ایمونولوژیکی واپیدمیولوژیکی بیماریهای استرپتوکوکی راتوضیح داد.راههای زیادی توسط محققین متعدداز جمله Rammelkamp , Collis , Cbburn Stollerman و Wannamaker برای ثابت کردن وابستگی عفونت استرپتوکوکی گروه A با بیماریهای تب روماتیسمی حاد (ARF) وگلومرولونفریت حاد (AGN) پیموده شده است. بسیاری ازدانستنیهای مدرن ما درموردجزئیات اپیدمیولوژی عفونتهای استرپتوکوکی و ARF ، نتیجه تحقیقات انجام شده درپایگاه نیروی هوایی آمریکا درایالت وایومینگ درطول سالهای ۱۹۴۹ تا ۱۹۵۱ بوسیله راملکمپ ، وانا میکرودنی (Denny) میباشند.

جایگاه زیست استرپتوکوکها : (Habitation) :

این باکتریها علاوه براینکه درعفونتهای گوناگون انسان وحیوان وناقلین وجوددارند ، دردهان ، حلق ، بینی ، گلوبن ، رکتوم ، واژن ، ملتحمه وپوست برخی افرادبصورت کمانسال دیده میشوند.هم‌چنین درطبیعت بصورت وسیع پراکنده اندودرخاک وآب وهوا وشیرهم دیده شده اند.

مقاومت : (Resistance) :

استرپتوکوکهای همولیتیک درحرارت $55^{o}C$ درعرض ۳۰ دقیقه ازبین