

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۲۴۵۴۴



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

پایان نامه

دوره دکتری تخصصی (Ph.D) میکروبیولوژی پزشکی

عنوان:

بررسی اثر هم افزایی لیزر کم قدرت (He/Ne) و جنتامیسین بر تولید آلزینات و رشد
پسودوموناس ائروژینوزا در شرایط آزمایشگاهی

نگارش:

پرویز اولیاء

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد

استاد مشاور:

سرکار خانم دکتر عفت سوری

۲۴۵۶۴

۱۵۸۱/۲

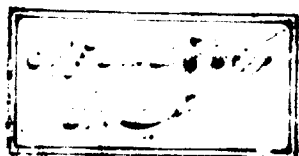
نمونه فرم ناییده اعضای هیأت داوران مندرج در رساله دکتری

بدینوسیله رساله دکتری خانم/آقای پرویز اولیاء..... تحت عنوان
• بررسی اثر هم افزایی لیزر (He/Ne) با جنتامایسین بر رشد و تولید آلزینات در
پسودوموناس اثر و زینوزا در شرایط آزمایشگاهی

تقدیم می شود. اینجانبان نسخه نهائی این رساله را از نظر فرم و محتوی بررسی و نائید کرده و پذیرش آنرا
برای تکمیل درجه دکتری پیشنهاد میکنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

۱۳۷۸ / ۲ / ۲۵



جناب آقای دکتر بهزادیان نژاد (استاد راهنما)

سرکار خانم دکتر سوری (استاد مشاور)

آقای دکتر قاضی سعیدی (استاد ناظر)

آقای دکتر فرسام (استاد ناظر)

آقای دکتر بادامی (استاد ناظر)

آقای دکتر ستاری (استاد ناظر)

آقای دکتر حیدرنیا (استاد ناظر)

این نامه چاپ رساله های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار رساله های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس مبین بخشی از فعالیتهای علمی- پژوهشی دانشگاه است بنابر این به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه ، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می شوند:

ماده ۱ در صورت اقدام به چاپ رساله ی خود ، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مرکز نشر دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب عبارت ذیل را چاپ کند:

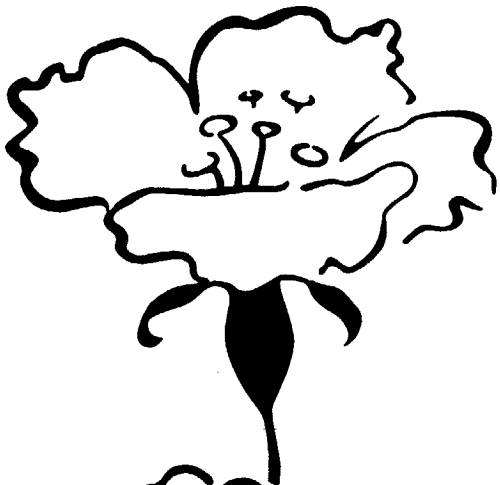
"کتاب حاضر، حاصل رساله دکتری نگارنده در رشته میکروبیشناسی است که در سال ۱۳۷۷ در دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی جناب آقای دکتر قربان بهزادیان نژاد و مشاوره سرکار خانم دکتر عفت سوری از آن دفاع شده است."

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های نشریات دانشگاه تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت چاپ) را به مرکز نشر دانشگاه اهداء کند دانشگاه می تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر در معرض فروش قرار دهد.

ماده ۴ در صورت عدم رعایت ماده ۳ ، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵ دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند. به علاوه به دانشگاه حق می دهد به منظور استیفای حقوق خود ، از طریق دادگاه ، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تأمین نماید.

ماده ۶ اینجانب پرویز لولیان دانشجوی رشته میکروبیشناسی مقطع دکتری تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده ، به آن ملتزم می شوم.



تقدیم به :

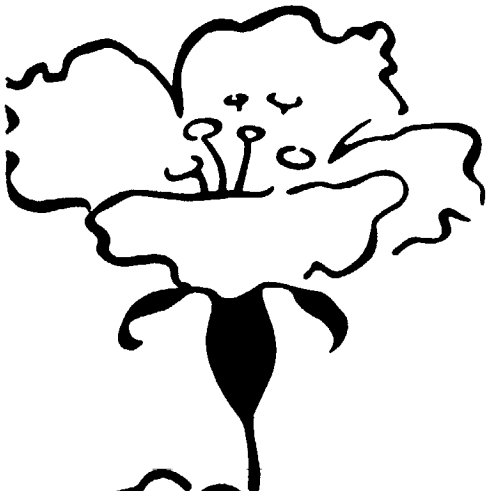
« شهدای راه حق، عدالت و علم »

« شهید حسن اولیاء »

« مادر مهربان و مرحوم پدر عزیزم »

و

« همسر گرامیم »



تقدیم به :

« جناب آقای دکتر بهزادیان نژاد »

« سرکار خانم دکتر سوری »

« جناب آقای دکتر فرسام »

« سرکار خانم دکتر معظمی »

با تشکر از:

- جناب آقای دکتر قاضی سعیدی
- جناب آقای دکتر بادامی
- جناب آقای دکتر ستاری
- جناب آقای دکتر بابایی
- جناب آقای دکتر حیدرنیا
- جناب آقای دکتر امانلو
- جناب آقای آبرون
- جناب آقای شهبازی
- سرکار خانم صمیمی
- سرکار خانم رازقی
- مسئولین محترم مؤسسه توسعه دانش و پژوهش ایران
- مسئولین محترم سازمان انرژی اتمی ایران

خلاصه

پسودوموناس اثرورزینوزا یک بیماریزای فرصت طلب است که طیف وسیعی از انواع عفونت‌ها را ایجاد می‌کند. سویه‌های موکوئیدی پسودوموناس اثرورزینوزا تولید کپسولی از جنس آلژینات می‌کنند که نقش مهمی در بیماریزایی دارد. در مطالعاتی که برخی از محققان انجام داده‌اند، نشان داده شده که برخی از آنتی‌بیوتیک‌ها در غلظت‌های SMIC می‌توانند تولید برخی از عوامل بیماریزایی از قبیل پروتئازها و آگزوتوکسین A را کاهش دهد.

در این مطالعه، اثر هم افزایی لیزر کم قدرت هلیوم - نئون و غلظت‌های SMIC جنتامیسین بر رشد و تولید آلژینات در پسودوموناس اثرورزینوزا، بررسی شده است. نتایج حاصل، نشان می‌دهد که لیزر به تنهایی قادر به کاهش رشد باکتری نیست، اما هم افزایی لیزر و جنتامیسین می‌تواند سبب کاهش رشد باکتری شود. در صورتیکه این هم افزایی بر تولید آلژینات اثری ندارد. همچنین نشان داده شد که در غلظت‌های $\frac{1}{4}$ MIC و $\frac{1}{2}$ MIC جنتامیسین مقدار تولید آلژینات در مقایسه با نمونه شاهد کاهش بارزی دارد. این اثر توسط میکروسکوپ نوری و الکترونی نیز بررسی شد و مشخص گردید که در این غلظت‌ها قطر کپسول این باکتری کاهش می‌یابد.

کلیه مراحل آزمایشگاهی توسط آزمون Paired - t - test از نظر آماری ارزیابی گردید تا مشخص گردد که آیا تفاوت‌ها با $\alpha = 0/05$ معنادار است یا خیر.

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	فصل اول - کلیات
۲	۱-۱-۱- پseudomonas aeruginosa
۲	۱-۱-۱- خصوصیات pseudomonas aeruginosa
۳	۱-۱-۲- همه گیر شناسی
۵	۱-۱-۳- بیماریزایی
۸	۱-۱-۴- عوامل بیماریزایی pseudomonas aeruginosa
۱۹	۱-۱-۵- حساسیت و مقاومت pseudomonas aeruginosa به مواد ضد میکروبی
۲۳	۱-۲-۱- جنتامیسین
۲۸	۱-۲-۱- مکانیسم عمل جنتامیسین
۳۳	۱-۲-۲- مقاومت در برابر جنتامیسین
۳۴	۱-۳-۱- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
۳۵	۱-۳-۱- کروماتوگرافی مایع
۳۸	۱-۳-۲- کروماتوگرافی مایع - جامد
۴۰	۱-۳-۳- تجهیزات کروماتوگرافی مایع
۴۵	۱-۴-۱- لیزر
۵۰	۱-۴-۱- اثرات زیست شناختی لیزر
۵۵	فصل دوم - مواد و روش ها
۵۶	۱-۲- باکتریهای مورد نیاز
۵۶	۱-۱-۲- تأیید سویه های تهیه شده
۵۷	۱-۲- نگهداری و استفاده روزانه از سویه های فرانس
۵۹	۱-۲-۳- بررسی اولیه تولید آلژینات در سویه pseudomonas aeruginosa M۸۸۲۱

- ۶۰ ۲-۲- تعیین MIC و حساسیت پسودوموناس ائروژینوزا M۸۸۲۱
- ۶۰ ۲-۲-۱- منابع تهیه آنتی بیوتیک
- ۶۰ ۲-۲-۲- توزین پودر آنتی بیوتیک
- ۶۲ ۲-۲-۳- تهیه محلول های ذخیره
- ۶۳ ۲-۲-۴- تعیین MIC به روش رقت در آگار
- ۶۳ ۲-۲-۱- محیط کشت
- ۶۴ ۲-۲-۴- آماده سازی پلیت های حاوی محیط
- ۶۵ ۲-۲-۳- آماده سازی تلقیح
- ۶۶ ۲-۲-۴- گرمخانه گذاری پلیت ها
- ۶۶ ۲-۲-۵- تعیین نقطه پایان
- ۶۸ ۲-۳- تعیین حساسیت
- ۷۱ ۲-۴- راه اندازی سنجش آلزینات
- ۷۴ ۲-۵- سنجش آلزینات پسودوموناس ائروژینوزا
- ۷۶ ۲-۶- بررسی اثر غلظت های SMIC بر تولید آلزینات
- ۷۷ ۲-۷- راه اندازی سیستم لیزر
- ۸۰ ۲-۸- بررسی اثر لیزر بر رشد پسودوموناس ائروژینوزا M۸۸۲۱
- ۲-۹- بررسی اثر هم افزایی لیزر و جنتامیسین با غلظت های SMIC بر رشد پسودوموناس
- ۸۲ ائروژینوزا M۸۸۲۱
- ۸۳ ۲-۱۰- بررسی اثر هم افزایی لیزر و غلظت های SMIC و جنتامیسین بر تولید آلزینات
- ۸۴ ۲-۱۱- مطالعه میکروسکوپی اثر غلظت های SMIC بر تولید آلزینات
- ۸۴ ۲-۱۱-۱- بررسی با میکروسکوپ نوری
- ۸۶ ۲-۱۱-۲- بررسی با میکروسکوپ الکترونی
- ۸۸ ۲-۱۲- محاسبات آماری

فصل سوم - نتایج.....	۹۰
۱-۳- نتایج حاصل از تأیید سویه‌های رفرانس.....	۹۱
۲-۳- نتایج حاصل از تعیین MIC و حساسیت.....	۹۳
۳-۳- نتایج حاصل از سنجش آلزینات استاندارد.....	۹۵
۴-۳- نتایج حاصل از سنجش آلزینات در پسودوموناس ائروژینوزا.....	۱۰۷
۵-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر غلظت‌های sMIC جنتامیسین بر تولید آلزینات.....	۱۰۹
۶-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر لیزر بر رشد پسودوموناس ائروژینوزا.....	۱۱۲
۷-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر هم‌افزایی لیزر و جنتامیسین با غلظت‌های sMIC بر رشد پسودوموناس ائروژینوزا ۸۸۲۱M.....	۱۱۶
۸-۳- نتایج حاصل از بررسی اثر هم‌افزایی لیزر و غلظت sMIC در تولید آلزینات.....	۱۲۱
۹-۳- نتایج حاصل از مطالعه میکروسکوپی اثر غلظت‌های sMIC بر تولید آلزینات.....	۱۲۳
۱-۹-۳- نتایج حاصل از بررسی با میکروسکوپ نوری.....	۱۲۳
۲-۹-۳- نتایج حاصل از بررسی با میکروسکوپ الکترونی.....	۱۲۵
فصل چهارم - بحث و پیشنهادات.....	۱۲۸
۱-۴- بحث.....	۱۲۹
۲-۴- پیشنهادات.....	۱۳۳
منابع.....	۱۳۴

فصل اول

کلیات

۱-۱- پ سودوموناس ائروژینوزا

۱-۱-۱- خصوصیات پ سودوموناس ائروژینوزا

مهمترین گونه جنس پ سودوموناس از نظر پزشکی ائروژینوزا است. این جنس در خانواده پ سودوموناداسیه قرار دارد. پ سودوموناس ائروژینوزا در سال ۱۸۸۲ توسط ژسارد^۱ کشف گردید، اما ۲۰ سال قبل از آن، رنگدانه آن از چرک زخمها جدا گردید و به علت رنگ آبی آن، پیوسیانین نامیده شد (۱۶).

باکتری میله‌ای مستقیم به طول $3-4 \times 0.5-1$ میکرومتر است با دو طرف موازی و دو انتهای گرد. دارای یک تا سه تاژک در یک انتهای خود بوده و کاملاً متحرک است. هوازی مطلق بوده و به آسانی روی محیطهای معمولی و ساده رشد می‌کند. بهترین درجه حرارت برای رشد ۳۰ تا ۳۷ درجه سانتیگراد در $pH = 7/2$ است اما دامنه درجه حرارت رشد آن ۵ تا ۴۲ درجه سانتیگراد است. دارای متابولیسم تنفسی بوده و از طریق متابولیسم اکسیداتیو کربوهیدراتها انرژی حاصل می‌کند. چون اسید حاصل از راه اکسیداتیو بسیار کمتر از راه تخمیر است، برای پی بردن به آن از محیط ^{2}OF استفاده می‌شود. هر چند این باکتری هوازی است اما قادر است از نیترات و آرژنین به عنوان گیرنده الکترون استفاده کند و به صورت بی‌هوازی رشد نماید. در محیط کشت مایع علاوه بر کدورت یکنواخت، پرده‌ای در سطح محیط ایجاد می‌نماید که به اطراف لوله می‌چسبد و افزون بر این، رنگ آبی مایل به سبز نیز تولید می‌نماید. کشت این باکتری به علت تولیدتری متیل آمین^۳ دارای بوی مخصوص و مطبوع است (۵۴).

پ سودوموناس ائروژینوزا دو نوع رنگدانه اصلی ترشح می‌کند که عبارتند از رنگدانه آبی یا

1. Gessard

2. Oxidative - Fermentative media

3. Trimethylamine

پیوسیانین^۱ و رنگدانه سبز یا پیووردین^۲ یا فلواورسین^۳. رنگدانه آبی در آب و کلروفورم محلول است و برای ایجاد آن باید هوا به مقدار کافی در محیط کشت وجود داشته باشد. این رنگدانه مشتق فنالین است. تمام سویه‌ها این رنگدانه را ترشح نمی‌کنند. رنگدانه سبز در آب و اسید استیک محلول است اما در کلروفورم حل نمی‌شود. این دو رنگدانه در عمق ژلز غذایی هم نفوذ می‌کنند و آن را به رنگ آبی مایل به سبز که فلورسانس دارد در می‌آورد. پس از چند روز رنگدانه‌های نامبرده در مجاورت هوا با اکسیژن ترکیب می‌شوند و قهوه‌ای تیره یا سیاه‌رنگ می‌گردند. افزون بر رنگدانه‌های فوق بعضی از نمونه‌ها قادرند رنگدانه‌های دیگری مانند قرمز تیره و غیره تولید کنند (۶۳ و ۵۴).

از نظر خواص بیوشیمیایی قدرت پروتئولیتیکی شدیدی دارد. ژلاتین را به سرعت ذوب کرده و آمونیاک ایجاد می‌کند. قدرت تخمیری ندارد و گلوکز را بدون ایجاد گاز مورد استفاده فرار می‌دهد و اسید گلوکونیک به وجود می‌آورد. آرژینین دهیدرولاز و سیترات مثبت است اما متیل رد، وژسپرسکوئر، لاکتوز، اندول، تربیتوفان دامیناز، لیزین دکربوکسیلاز و سولفیدهیدروژن آن منفی است. اکسیداز و کاتالاز آن نیز مثبت است. (۶۵، ۵۶ و ۱۳).

۱-۱-۲ - همه گیر شناسی

از نظر اپیدمیولوژی پ سودوموناس اثرورینوزا یک باکتری استثنایی است. این باکتری در آب، خاک و سبزیجات یافت می‌شود. در سطح پوست و دستگاه گوارشی حدود ۳ درصد از افراد جامعه وجود دارد، اما ناقلان این باکتری در پرسنل بیمارستان تا ۲۰ درصد نیز افزایش می‌یابد، زیرا این باکتری در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها نسبتاً مقاوم است (۸۴).

1. Pyocyanine
3. Fluorescein

2. Pyoverdin

پسودوموناس ائروژینوزا بیماریزای فرصت طلبی است که می تواند سبب عفونت های بیمارستانی در بیماران بستری شده گردد. در بیشتر موارد، باکتریهای پسودوموناس به عنوان آلوده کننده ثانویه و غیر بیماریزا از زخم ها یا از خلط بیماران تحت درمان با آنتی بیوتیک ها، جدا می شود.

گاهی اوقات عفونت های ناشی از پسودوموناس ها در گوش، ریه، پوست یا مجرای ادراری بیماران، اغلب به هنگامی که بیماریزای اصلی به وسیله آنتی بیوتیک ها حذف شده باشد، ایجاد می شود. عفونت های شدید غالباً با آسیب دیدن موضعی بافت ها یا کم شدن مقاومت میزبانی ارتباط دارد. برخلاف فاکتورهای متعدد ویروانس در سوبه های پسودوموناس ائروژینوزا، این باکتری ندرتاً در افراد سالم بیماری ایجاد می کند (۵۴).

بیماران سیستمیک فیبروزیس یا مبتلایان به نوتروپنی در معرض خطر ابتلاء به عفونت شدید پسودوموناس ائروژینوزا قرار دارند. نوزادان نارس و مبتلا به ناهنجاریهای مادرزادی و بیماران مبتلا به لوسمی که معمولاً آنتی بیوتیک، گلوکوکورتیکوئیدهای^۱ غدد فوق کلیوی یا داروهای آنتی نئوپلاستیک دریافت می دارند نیز در معرضند. همچنین بیماران مبتلا به سوختگی و بیماران سالخورده مبتلا به بیماریهای تضعیف کننده احتمال دارد به عفونت های پسودوموناسی گرفتار شوند. اغلب این نوع عفونت ها در محیط بیمارستان رخ داده و عموماً عفونت خارجی است و به وسیله باکتری از منابعی غیر از میکروفلور طبیعی بیماریزایجاد می گردد. این باکتریها را از انواع محیط ها در بیمارستان، منابع آبی مشترک نظیر دستشویی، محلول های آنتی سبتیک و داروهای مایع جدا کرده اند. این باکتری در مخازن جمع آوری ادرار، سوندها و دست های پرستاران و پزشکان فراوان است و در چند مورد همه گیری عفونت های پسودوموناسی مجرای ادراری معلوم گردیده که بوسیله

1. Glucocorticoid