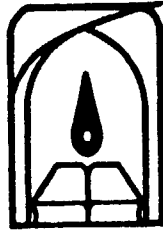


بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

۱۳۸۱ / ۱۱ / ۲۲

انستیتوت تحقیقات پزشکی
دانشگاه تربیت مدرس



دانشگاه تربیت مدرس
دانشکده علوم پزشکی

016652

پایان نامه

برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته باکتری شناسی

عنوان

اثر غلظت‌های پایین‌تر از MIC و نکومایسین در القاء اشکال L
استافیلوکوکوس اورئوس و بررسی پایداری آن‌ها در خون
(در شرایط آزمایشگاهی)

نگارش

فرشاد نجومی

۳۹۹۵۶

استاد راهنما

دکتر قربان بهزادبان‌نژاد

اساتید مشاور

دکتر مرضی ستاری

زمستان ۱۳۸۰

۳۹۹۵۶

«فرم تأییدیه اعضای هیأت داوران مندرج در پایان نامه کارشناسی ارشد»

بدینوسیله پایان نامه کارشناسی ارشد آقای فرشاد نجومی

رشته: باکتری شناسی گرایش:

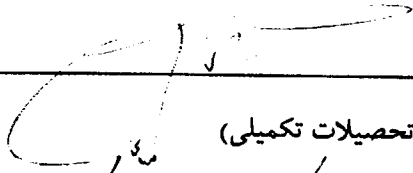
تقدیم می شود. اینجانبان نسخه نهائی این پایان نامه را از نظر فرم و محتوی بررسی و تأیید کرده و پذیرش آنرا برای تکمیل درجه کارشناسی ارشد پیشنهاد می کنیم.

نام و نام خانوادگی و امضاء اعضای هیأت داوران:

جناب آقای دکتر بهزادیان نژاد (استاد راهنما)

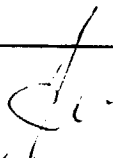


جناب آقای دکتر مرتضی ستاری (استاد مشاور)

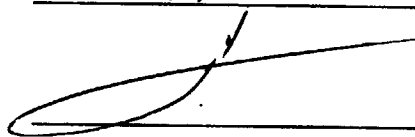


سرکار خانم دکتر شهین نجارپیرایه (نماینده شورای تحصیلات تکمیلی)

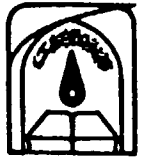
سرکار خانم دکتر سلمه درانی (استاد ناظر)



جناب آقای دکتر کیومرث قاضی سعیدی



کتابخانه تخصصی
انرژی و فناوریهای نوین



بسمه تعالی

آیین نامه چاپ پایان نامه (رساله) های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله) های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیت های علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین 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 پایان نامه (رساله) ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲ در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه)، عبارت ذیل را چاپ کند:
«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد / رساله دکتری نگارنده در رشته میکرو سنجی است که در سال ۱۳۸۰ در دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم / جناب آقای دکتر بهزادین تراد، مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر مرتضی ساری و مشاوره سرکار خانم / جناب آقای دکتر سهرین نجار برایم از آن دفاع شده است.»

ماده ۳ به منظور جبران بخشی از هزینه های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر بوبت چاپ) را به «دفتر نشر آثار علمی» دانشگاه اهدا 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 فرساردنجوی دانشجوی رشته میکرو سنجی مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: فرساردنجوی

تاریخ و امضا: ۸۰/۱۲/۱۸

تقدیم به راد مردان و زنان سالهای مماسه و ایثار
تقدیم به پرستوهای مهاجر که عاشقانه از این دیار کوچ کردند و به دیدار مضرت
دوست شتافتند.
تقدیم به آنانکه عهده دار دفاع از مرزهای ایران می‌باشند.

تقدیر و تشکر:

حمد و سپاس بی انتها خدای عزوجل را که هر چه دارم از اوست و چنانچه الطاف حضرتش شامل حال من نمی‌شد، هیچگاه نمی‌توانستم تا این مرحله در امر تحصیل علم پیشرفت نمایم. از کلیه اعضای خانواده‌ام نیز به خاطر فراهم نمودن محیطی آرام و بخاطر ایجاد دلگرمی و حمایت‌های فکری سپاسگزارم.

از مدیر گروه محترم میکروب شناسی، جناب آقای دکتر رضایی به دلیل همکاری صمیمانه ایشان با اینجانب و زحمات ایشان در تدریس دروس مختلف کمال تشکر را دارم.

از جناب آقای دکتر بهزادیان که به عنوان پدری دلسوز، چه در سمت مدیرگروه میکروب‌شناسی، چه در سمت تدریس و راهنمایی پایان نامه برای اینجانب زحمات زیادی کشیدند، بسیار سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر ستاری، استاد مشاور اول یا به عبارتی استاد راهنمای دوم خود که دلسوزانه برای پیشبرد امور پایان نامه چه در زمینه علمی و چه در کارهای آماری به اینجانب کمک زیادی نمودند نیز کمال تشکر را دارم. از زحمات سرکار خانم دکتر پیرایه، استاد بزرگوارم و استاد مشاور دوم پایان نامه‌ام نیز بسیار متشکرم. از دیگر اساتید و مربیان گروه از جمله سرکار خانم دکتر درانی، سرکار خانم دکتر مبارز، سرکار خانم صمیمی و کارشناس محترم گروه سرکار خانم رازقی نیز بسیار ممنون و سپاسگزارم و آرزوی سلامت و توفیق روزافزون برای کلیه این عزیزان دارم.

از همیاری و مساعدتهای همکلاسی‌های خوبم یعنی خانم‌ها کاشف، زندی، فردوسیان و احمدنژاد و کلیه دانشجویان کارشناسی ارشد ورودی ۷۷ و ۷۹ و یا دانشجویان دکتری ورودیهای مختلف بسیار سپاسگزارم و توفیقات روزافزون ایشان را از خداوند متعال خواستارم.

در پایان بر خود لازم می‌دانم که از کلیه مسئولین و دست‌اندرکاران دانشکده پزشکی و نیز سرکار خانم ضیائی و دست‌اندرکاران دفتر فنی نصر بخاطر تایپ خوب و تکثیر پایان نامه تشکر نمایم.

چکیده:

اشکال L، باکتریهای گرم مثبت یا گرم منفی هستند که دارای نقص در دیواره سلولی خود بوده و فاقد پپتیدوگلیکان می باشند، ولی در محیطهای هیپرتونیک توانایی رشد و تکثیر دارند. ونکومایسین نیز یکی از آنتی بیوتیک هایی است که از سنتز پپتیدوگلیکان جلوگیری نموده و در القاء اشکال L باکتریهای گرم مثبت مؤثر می باشد. امروزه از این آنتی بیوتیک برای درمان عفونتهای استافیلوکوکی مختلف بویژه عفونتهای خونی استفاده می شود.

در این مطالعه، اثر غلظتهای ونکومایسین بر روی سویه استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) آزمایش گردید. سپس رشد باکتریها در محیطهای BHI Agar، BHI broth، LPM Agar و LPM broth مورد بررسی قرار گرفت.

در غلظتهای باکتریساید و MIC ونکومایسین، هیچ نوع رشدی از باکتریها دیده نشد، ولی رشد باکتریها در LPM broth پس از ۲ الی ۵ روز مشهود بود. در غلظتهای پایین تر از MIC ونکومایسین، باکتریها قادر به رشد در تمامی محیطها بودند. تلقیح اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس (که در محیط LPM broth و در غلظتهای باکتریساید ونکومایسین القاء شده بودند)، به خون انسان موجب تبدیل این اشکال به صورت باکتریهای معمولی و طبیعی شد.

نتایج تأیید می کنند که استفاده از یک آنتی بیوتیک مؤثر بر سنتز دیواره سلولی به تنهایی، برای درمان عفونتهای استافیلوکوکی ممکن است خطر القاء اشکال L و باکتریهای مقاوم را افزایش دهد.

کلمات کلیدی: اشکال L، استافیلوکوکوس اورئوس، ونکومایسین، خون، MIC.

فهرست مطالب

عنوان صفحه

فصل اول: مقدمه و کلیات

مقدمه	۱
۱-۱- استافیلوکوکوس اورئوس	۳
۱-۱-۱- تعریف	۳
۱-۱-۲- دیواره سلولی	۴
۲-۱- اشکال L	۷
۱-۲-۱- تعریف	۷
۲-۲-۲- تاریخچه و اهمیت اشکال L	۸
۳-۱- ونکومایسین	۱۰
۱-۳-۱- تاریخچه	۱۰
۲-۳-۱- مکانیسم عمل	۱۰
۳-۳-۱- موارد استفاده و عوارض جانبی	۱۱
۴-۳-۱- مقاومت در برابر ونکومایسین	۱۱

فصل دوم - مروری بر مطالعات انجام شده

۱-۲- بررسی عوامل موثر در ایجاد اشکال L	۱۳
۱-۱-۲- اثر آنتی بیوتیک‌ها	۱۳
۲-۱-۲- اثر مواد و عوامل دیگر	۱۵
۲-۲- خصوصیات اشکال L باکتریها	۱۶
۱-۲-۲- نیازهای عمومی در محیط کشت	۱۶
۲-۲-۲- تکثیر اشکال L	۱۷
۳-۲-۲- ساختمان و بیوشیمی اشکال L	۱۸
۴-۲-۲- فیزیولوژی و متابولیسم اشکال L	۲۰

۲۳	۵-۲-۲- رشد و نمو اشکال L
۲۵	۶-۲-۲- حساسیت دارویی اشکال L
۲۶	۷-۲-۲- باکتری‌هایی که قادرند به اشکال L تبدیل شوند
۲۷	۳-۲- وجوه تشابه و تمایز اشکال L و مایکوپلاسماها
۲۹	۴-۲- نحوه‌ی القاء اشکال L باکتری‌ها در شرایط آزمایشگاهی
۲۹	۱-۴-۲- القاء با آنتی بیوتیک‌ها
۳۱	۲-۴-۲- القاء با آنزیم‌ها
۳۲	۳-۴-۲- القاء با آنتی بادیها و پروتئین‌های کمپلمان
۳۲	۴-۴-۲- القاء با گلايسين
۳۳	۵-۲- القاء اشکال L در بدن موجود زنده
۳۳	۱-۵-۲- القاء طبیعی در حیوان تجربی
۳۴	۲-۵-۲- القاء در بدن با استفاده از آنتی بیوتیک و آنزیم
۳۶	۶-۲- خصوصیات بیماری‌زائی اشکال L
۴۰	۷-۲- تشخیص اولیه‌ی رشد اشکال L
۴۱	۸-۲- بازگشت اشکال L به شکل دیواره دار
۴۴	۹-۲- روشهای جداسازی اشکال L از نمونه‌های بالینی
۴۴	۱-۹-۲- نمونه‌های بالینی مایع
۴۴	۲-۹-۲- نمونه‌های بالینی جامد
۴۶	۱۰-۲- ویژگیهای ظاهری اشکال L
۴۶	۱-۱۰-۲- ظاهر کلنی‌های اشکال L
۴۶	۲-۱۰-۲- ظاهر میکروسکوپی اشکال L
۴۷	۱۱-۲- روش‌های رنگ‌آمیزی
۴۷	۱-۱۱-۲- روش داینس
۴۸	۲-۱۱-۲- رنگ‌آمیزی آکریدین نارنجی

۴۹	۲-۱۱-۳- رنگ آمیزی گرم
۴۹	۲-۱۲- مطالعه کلنی ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی
۵۰	۲-۱۳- نگهداری طولانی مدت اشکال L

فصل سوم - مواد و روش ها

۵۲	۳-۱- مواد مورد نیاز
۵۲	۳-۱-۱- سویه استاندارد
۵۲	۳-۱-۲- ونکو مایسین
۵۲	۳-۱-۳- محیط های کشت
۵۴	۳-۱-۴- خون
۵۵	۳-۲- روش کار
۵۵	۳-۲-۱- تعیین MIC سویه استاندارد
۵۶	۳-۲-۲- نحوه القاء اشکال L
۵۷	۳-۲-۳- رنگ آمیزی اشکال L
۵۸	۳-۲-۴- بررسی پایداری اشکال L در خون

فصل چهارم - نتایج

۶۰	۴-۱- القاء اشکال L
۶۱	۴-۲- بررسی پایداری اشکال L القاء شده در خون
۶۴	۴-۳- نتایج حاصل از آزمایش های بیوشیمیائی
۷۰	۴-۴- نتایج حاصل از طیف سنجی نوری و شمارش کلنی

فصل پنجم - بحث و تفسیر نتایج

۷۷	۵-۱- مرحله القاء اشکال L
۷۹	۵-۲- مرحله تلقیح اشکال L به خون
۸۱	پیشنهادهات
۸۲	فهرست منابع

فهرست عکسها، نمودارها و جدولها

- عکس ۱-۴ نمایش رشد یا عدم رشد استافیلوکوکوس اورئوس در محیط BHI broth ۶۵
- عکس ۲-۴ نمایش رشد استافیلوکوکوس اورئوس در محیط LPM broth ۶۵
- عکس ۳-۴ رنگ آمیزی گرم اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس ۶۶
- عکس ۴-۴ رنگ آمیزی گرم استافیلوکوکوس اورئوس پس از ۲۴ ساعت از کدر شدن کامل لوله ها ۶۶
- عکس ۵-۴ تبدیل اشکال L به استافیلوکوکهای طبیعی و دیواره دار ۶۷
- عکس ۶-۴ تست کواگولاز استافیلوکوکوس اورئوس پس از جداسازی از خون ۶۷
- عکس ۷-۴ نمایش رشد استافیلوکوکوس اورئوس بر روی محیط مانیتول سالت آگار پس از جداسازی از خون ۶۸
- عکس ۸-۴ تست DNase استافیلوکوکوس اورئوس پس از جداسازی از خون ۶۸
- عکس ۹-۴ رنگ آمیزی گرم از کلنی های طبیعی استافیلوکوکوس اورئوس پس از جداسازی از خون ۶۹
- نمودار ۱-۴ نتایج حاصل از طیف سنجی نوری محیط های BHI broth و LPM broth (قبل و پس از تلقیح به خون) ۷۱
- نمودار ۲-۴ نتایج حاصل از شمارش کلنی های طبیعی استافیلوکوکوس اورئوس (قبل و پس از تلقیح به خون) ۷۳
- ضمائم ۹۴-۱۰۲

فصل اول - مقدمه و کلیات

مقدمه:

اشکال L، واریانتهایی از باکتریهای معمولی اند که دارای نقص در دیواره سلولی خود بوده ولی در محیطهای هیپرتونیک^(۱) قادر به رشد و تکثیر هستند. این باکتریها در صورت ایجاد شرایط محیطی و اسمزی مناسب قادر به بازگشت به شکل دیواره دار می‌باشند. در این اشکال، لایه پپتیدوگلیکان از بین رفته و میکروارگانیزم توسط غشاء سیتوپلاسمی احاطه شده است. در برخی از این باکتریها بویژه در باکتریهای گرم منفی هنوز بخش‌هایی از دیواره سلولی وجود دارد.

عوامل گوناگونی از قبیل آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، آنتی بادیها، امواج فراصوت و برخی از ضد عفونی کننده‌ها در القاء اشکال L باکتریها دخیل هستند.

استافیلوکوکوس اورئوس^(۲)، نوعی کوکسی گرم مثبت، بیهوازی اختیاری و کاتالاز مثبت است که فاقد تاژک و اسپور بوده و در ایجاد بیماریها و عوارض مختلف، بویژه آبسه‌های احشایی و عفونت‌های جلدی دخالت دارد. ورود تعداد زیادی از این باکتری به خون می‌تواند موجب ایجاد چرک، التهاب و آبسه در استخوانها مفاصل، مغز و نخاع، ریه‌ها، قلب و دستگاه ادراری و بافت‌های زیر جلدی شود.

این میکروارگانیزم در مقابل اکثر آنتی بیوتیک‌های موجود مقاوم می‌باشد.

1- Hypertonic

2- Staphylococcus aureus

ونکومایسین، تنها داروی انتخابی است که هنوز برای درمان عفونت‌های ناشی از استافیلوکوکوس اورئوس بکار می‌رود و درصد بسیار کمی از سویه‌های این باکتری در مقابل این آنتی بیوتیک مقاوم می‌باشند.

ونکومایسین، سنتز پپتیدوگلیکان را در مرحله دوم، یعنی هنگامی که واسطه‌های لیپیدی به غشاء سیتوپلاسمی متصل می‌شوند، تحت تاثیر قرار داده و در ایجاد اشکال L در برخی از باکتریهای گرم مثبت نقش دارد.

هدف از این تحقیق، یافتن پاسخ‌های مناسبی برای این دو پرسش است که با توجه به ارزش زیاد این آنتی بیوتیک برای درمان عفونت‌های استافیلوکوکی بویژه در مواردی از قبیل سپتی سمی و اندوکاردیت حاد از یک سو و تجویز بی رویه و مصرف نادرست آن از سوی دیگر،

(۱) آیا خطر ایجاد اشکال L استافیلوکوکوس اورئوس در غلظتهای پایین‌تر از MIC

ونکومایسین وجود دارد؟ و (۲) آیا چنین اشکالی در شرایط آزمایشگاهی در خون پایدار باقی می‌مانند، به شکل دیواره دار برمی‌گردند و یا از بین می‌روند؟

۱-۱- استافیلوکوکوس اورئوس^(۱):

۱-۱-۱- تعریف:

استافیلوکوکوس اورئوس یا استافیلوکوک طلائی، کوکسی گرم مثبت، فاقد تاژک، فاقد اسپور و فاقد حرکتی است که در محیط جامد معمولاً به صورت خوشه‌های نسبتاً بزرگ و نامنظم دیده می‌شود ولی در محیط مایع، خوشه‌ها کمی کوچکترند و اشکال تک، دوتایی، چهارتایی و یا زنجیره کوتاه نیز قابل مشاهده می‌باشند. قطر این باکتریها در حالت تکی، حدود ۰/۸ الی ۱ میکرون است.

سویه‌های متعلق به کلنی‌های بلغمی یا موکوئیدی غالباً واجد کپسول یا میکروکپسول پلی ساکاریدی هستند [۱].

این میکروارگانیزم‌ها، هوازی، بیهوازی اختیاری بوده ولی در شرایط هوازی رشد بهتری دارند و رنگ‌دانه‌های زرد کاروتنوئیدی نیز در شرایط هوازی و در محیط کشت جامد تولید می‌شوند [۲].

استافیلوکوکوس اورئوس بر روی اکثر محیط‌های کشت از قبیل آگار غذایی^(۲)، آبگوشت غذایی^(۳)، آگارخوندار، برین هارت اینفیوژن آگار^(۴) و غیره به خوبی رشد می‌نماید. کلنی‌های این باکتری غالباً به صورت صاف، مات، گرد، اندکی محدب و به رنگ زرد بوده، قطر آنها بین ۱ الی ۴ میلی متر است.

استافیلوکوکوس اورئوس، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، احیاءنیترات مثبت و DNase مثبت است. گلوکز و مانیتول را در شرایط هوازی و بیهوازی مورد استفاده قرار می‌دهد و در کلرید سدیم ۱۰ درصد نیز قادر به رشد می‌باشد.

این باکتری با داشتن عوامل بیماریزائی و آنتی ژن‌های متعددی از قبیل همولیزین‌های

آلفا، گاما و دلتا، لوکوسیدین، اکس‌فولیاتین‌های A و B، انتروتوکسین‌های

1- Staphylococcus aureus
3- Nutrient broth

2- Nutrient Agar
4- Brain - Heart Infusion Agar(BHI Agar)

M, L, K, I, H, G, E, D, C, B, A، توکسین (۱) نشانگان شوک سمی، کپسول، پروتئین A، اسید لیپوتایکوئیک و پروتئین‌های متصل شونده به فیبرونکتین، الاستین، کلاژن و فیبرینوژن و آنزیم‌های کوآگولاز، DNase، استافیلوکیناز، لیپاز، هیالورونیداز، اوره‌آز و سرین پروتئیناز قادر به ایجاد بیماریها و عوارض مختلفی نظیر کورک^(۱)، فولیکولیت، کفگیرک^(۲)، زردزخم^(۳)، نشانگان فلسی شدن پوست^(۴)، گل مژه، التهاب ملتحمه چشم، آکنه^(۵)، آبسه‌های مغزی-نخاعی، باکتری می، سپتی سمی، ذات الریه، نشانگان شوک سمی، سینوزیت، مسمومیت غذایی، عفونت مجاری اداری، التهاب چرکی مفاصل، اندوکاریت و غیره می‌باشد.

ژنهایی که بر روی پلاسمیدها، ترانسسپوزون‌ها و یا کروموزوم استافیلوکوکوس اورئوس قرار دارند، با کد نمودن پروتئین‌ها و آنزیم‌های مختلفی نظیر بتالاکتاماز، کلرآمفنیکل استیل ترانسفراز، دی هیدروفولات ردوکتاز، فسفو ترانسفراز، آدنیل ترانسفراز و غیره باعث بروز مقاومت‌های آنتی بیوتیکی این باکتری در مقابل آنتی بیوتیک‌های مختلفی از قبیل پنی سیلین‌ها، اریترومایسین، تتراسایکلین، کینولون‌ها، کلرآمفنیکل، ریفامپین، تری متوپریم و بسیاری از آمینوگلیکوزیدها شده‌اند [۲].

در حال حاضر، اغلب سویه‌های استافیلوکوک طلایی نسبت به ونکومایسین حساس می‌باشند ولی در صورت مصرف بی رویه، این آنتی بیوتیک نیز کارآئی لازم را از دست می‌دهد.

۱-۱-۲- دیواره سلولی:

عمده‌ترین ترکیبات تشکیل دهنده دیواره سلولی استافیلوکوکوس اورئوس عبارتند از:

پپتیدوگلیکان، پروتئین A و پلی ساکارید A

1- Boil or Furuncle

3- Impetigo

5-Acne

2-Carbuncle

4-Scalded Skin Syndrome