Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

مشتق سازی،استخراج و تخلیص اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا از M.Bovis در BCG به روش HPLC

دکتر تقی ناصرپور فریور * ، دکتر سید اصغر هوائی**، دکترغلامعلی نادری***، دکترحسن تمییزی فر**

* دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی زاهدان، دانشکده پزشکی ، گروه میکروب شناسی
** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، دانشکده پزشکی ، گروه میکروب شناسی
*** دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اصفهان، مرکز تحقیقات قلب و عروق

چکیده

از مشکلات موجود در شناسائی مایکوباکتریومها پس از کشت اولیه، وقت گیر بودن تست های بیوشیمیائی معمول است که فرآیند شناسائی مایکوباکتریومها را سخت می‌نماید. یکی از راههای برطرف کردن این مشکل استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) می‌باشد. از مهمترین مواد لازم برای انجام این روش، مشتق فناسیل اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا است که بعنوان استاندارد مورد استفاده قرار می گیرد. این استاندارد منحصراً توسط یک شرکت آمریکائی تولید می‌شود و همواره به سهولت در دسترس نمی باشد. لذا این بررسی جهت مشتق سازی، استخراج و تخلیص اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا از مایکوباکتریوم بویس‌موجود درBCG بعنوان استاندارد در شناسائی مایکوباکتریومها صورت گرفته است.

باکتری مورد استفاده M.bovis BCG بوده و اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالای آن توسط پارابرومونفاسیل بروماید و ترکیب 18-crow مشتق سازی شده و با ستون Lich.RP و با استفاده از یک گرادیان متانول – کلروفورم استخراج گردیده است .

کروماتوگرافهای استاندارد خارجی تهیه شده توسط شرکت سازنده و کروماتوگرام استاندارد تهیه شده در این بررسی مورد مقایسه قرار گرفته و زمان نگهداری پیک های مربوطه ثبت شد.تشابه کامل بین کروماتوگرام های استاندارد ساخت شرکت تجاری و استاندارد تهیه شده در این بررسی مؤید یکسان بودن‌آنها است. لذا از این استانداردتهیه شده می توان در شناسائی مایکوباکتریومها استفاده کرد. **(مجله طبیب شرق، سال پنجم، شماره ۱، بهار ۱۳۸۲، ص ۵۳ تا ۶۰)**

گل‌واژه ها: مایکوباکتریوم ، اسید چرب ، HPLC

مقدمه

تشخیص افتراقی گونه های مختلف مایکوباکتریومها بطور مرسوم براساس واکنش های بیوشیمیائی آنها صورت می گیرد.[۱] زمان لازم برای انجام این تستها طولانی بوده و شناسائی تاکسونومیک معمول را فرایندی وقت گیر می نماید و نیاز به روشهای سریعتری برای تشخیص افتراقی گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم ها کاملاً ملموس می باشد.[۲]

آنالیز شیمیائی اسیدهای چرب سلولی و بخصوص اسیدهای چرب با وزن مولکولی بالا،(اسیدهای مایکولیکی که دارای انشعاب α بوده و در موقعیت β هیدروکسیله می باشند) بعنوان روشی سریع در طبقه بندی مایکوباکتریومها بکار برده شده است.[۳] از طرفی این اسیدهای مایکولیک که توزیع ناهمگنی دارند، ارزش زیاد خود را هم در طبقه بندی و هم در شناسائی و تشخیص مایکوباکتریومها به اثبات رسانده‌اند.[۴] استفاده از اسیدهای مایکولیک در تفکیک جنس های باکتریائی دیگری نیز که واجد این نوع از اسیدهای چرب می‌باشند، قبلاً گزارش گردیده است.[۵]

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

اکنون روشهای یک مرحله ای آنالیز شیمیائی مشتق استری P- برموفناسیل اسیدهای مایکولیک استخراج شده از سلول صابونی شـده گونه هـای مختـلف مایکوباکتریومی ارائه گردیده‌اند و ثابت شده است که گونه های مختلف دارای الگوی انگشت نگاری (Fingerprint) متفاوتی هستند که قابل استفاده برای شناسائی آنها می باشد.[۶]

شناسائی پیک های موجود در کروماتوگرام و بخصوص پیکهای موجود در فینگرپرینت در مقایسه با استاندارد خارجی صورت می گیرد و از مقایسه زمان بازداری یا ارتفاع پیکهای موجود در این فینگرپرینت ها با پیک استاندارد ، شناسائی باکتری صورت می گیرد. از مایکوباکتریوم های گوناگونی جهت تهیه این استانداردداستفاده شده است که از آن جمله می‌توان به M.tuberculosis و M.Smegmatis[۶] و M.avium[۷و۸] اشاره کرد.

از آنجائیکه امکان دسترسی مستقیم و آسان به این استاندارد همواره میسر نمی باشدو تاکنون اقدامی در جهت تهیه آن در داخل کشور نشده است، لذا در این تحقیق اقدام به مشتق سازی ، استخراج و خالص سازی مشتق استریP-برومو فناسیل اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا از مایکوباکتریوم بویسBCG نموده ایم.

روش کار

سویه M.Bovis در BCG، سویه تولید شده توسط انستیتو پاستور بوده که بر روی محیط Sawton کشت داده شده و سپس در ۱۰۰۰۰ گرم به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردیده و آنگاه ۳ بار شسته و سپس باکتریها در محلول هیدروکسید پتاسیم اتانلی به مدت ۲ ساعت در ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد و اسید مایکولیک آنها با۲ میلی لیتر محلول اسیدکلرئیدریک غلیظ (۳۷٪) و آب به نسبت ۵۰ :۵۰ و ۱ میلی لیتر کلروفورم استخراج گردید. پس از استخراج،این اسیدهای مایکولیک با استفاده از۱۰۰µLمشتق ساز پارا بروموفناسیل بروماید به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۵درجه سانتی گراد مشتق سازی و تا درجه حرارت اتاق خنک گردید.سپس نمونه مورد بررسی با افزودن ۲ میلی لیترمحلول اسیدکلریدریک غلیظ و آب اسیدی شده و۲ میلی لیتر متانول به آن اضافه گردید. لایه کلروفورمی جدا شده و خشک گردید. نمونه در ۱۰۰µLکلروفورم حل گردیده و به HPLC تزریق گردید.[۶-۸] پس از آنکه محل اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا بر روی محور زمانی کروماتوگرام مشخص گردید،(در مقایسه با کروماتوگرام استاندارد و مقالات ارائه شده قبلی) در فاصله زمانی خروج این ماده، نمونه های خروجی از HPLC جمع آوری گردید و فاز متحرک همراه این نمونه باحرارت دادن در ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه از محیط خارج گردید. از آنجائیکه از ستون آنالیتیک در این تحقیق استفاده گردیده است، عمل تزریق به میزان ۱۰۰µLدر هر بار تزریق و به تعدادچندین بار صورت گرفت تا اسید مایکولیک با وزن مولکولی بالای مشتق سازی شده به میزان کافی دردسترس قرار گیرد در حالیکه برای نمونه های تشخیصی تنها ۵ µL تزریق می گردد. بدیهی است در صورت استفاده از ستونهای Preparative column که قطر به مراتب زیادتری دارند، نیازی به تکرار چندین باره عمل آنالیز نخواهد بود.پس از جمع آوری اسیدهای مایکولیک به روش مذکور برای اطمینان از خلوص آنها اقدام به تزریق اسیدهای مایکولیک جدا شده (با همان شرایط قبلی انجام کروماتوگرافی) گردید و کروماتوگرام حاصله با کروماتوگرام استاندارد خارجی مورد مقایسه قرار گرفت.[۷]

شرایطHPLC: از یک ستون LiRP۱۸(reverse phase) شرکت Hichrom به ابعاد۴/۶×۲۵ و گرادیان متانول ـ کلروفورم با سرعت جریان ۲/۵ml/min و دتکتور UVدر جذبnm ۲۵۴ استفاده گردید. مشخصات دستگاه مورد استفاده عبارت است از HPLC مدل ۱۲۰۰ از شرکت Cecil با دو پمپ CE1100/Liquid chromatography pump و دتکتـــور

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

CE۱۲۰۰ با طول موج متغیر.

گرادیان : متانول با ۹۰درصد شروع شده در مدت ۱ دقیقه به ۸۰ درصد رسیده سپس به مدت ۲۰ دقیقه به میزان ۳۵ درصد رسیده و مجدداً در مدت ۱ دقیقه به میزان اولیه خود بر می گردد و سپس ۱۲ دقیقه کالیبره کردن ستون برای تزریق بعدی انجام می گیرد.[۷]

یافته ها

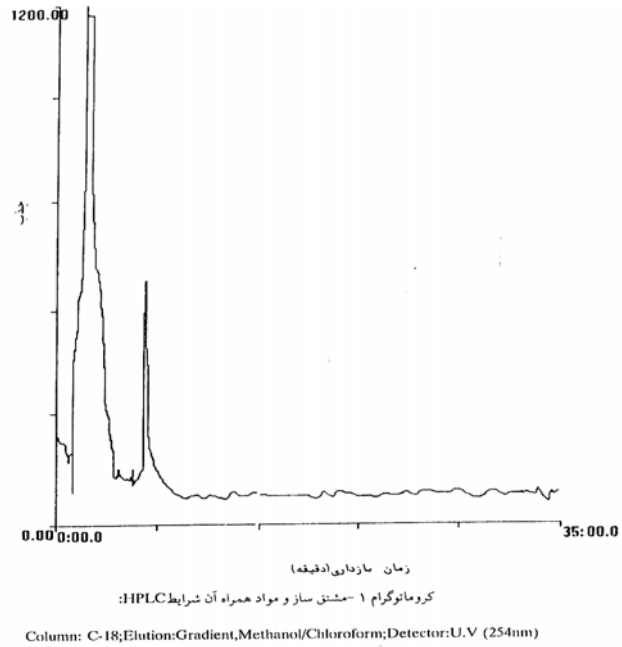
نتایج این بررسی نشان می دهد که مشتق ساز و مواد همراه آن در این شرایط کروماتوگرافی قبل از ۷دقیقه از ستون خارج می شوند و بعد از این زمان پیکی که در ارتباط با مشتق ساز باشد ، در کروماتوگرام مشاهده نمی گردد.(کروماتوگرام۱)

از بررسی محور زمان کروماتوگرام مربوط به استاندارد اسیدهای چرب با وزن مولکولی بالا متعلق به شرکت Ribi محل خروج پیک مشتق مورد نظر مشخص می شود.این تعیین مکان از روی مقالات قبلی نیز قابل استخراج است.چرا که یک فاصله زمانی ۳-۲ دقیقه ای بین زمان خروج آخرین پیک موجود در فینگرپرینت نمونه های مایکوباکتریومی و زمان خروج مشتق استری پارابروموفناسیل اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالاوجود دارد.(کروماتوگرام۲)

محل خروج مشتق استری پارابروموفناسیل بروماید اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا در کروماتوگرام مربوط به آنالیز اسیدهای مایکولیک M.bovis BCGکه ارتفاع نسبتاً کمی نسبت به سایرپیکهای موجوددر فینگر پرینت دارد(ومعرف میزان کم آن در کروماتوگرام می باشد)مشخص شده است. با مشخص شدن زمان خروج این پیک، فاز متحرک حاوی این اسیدهای چرب جمع آوری گردیده و با قرار دادن در 85°C متانول و کلروفورم همراه آن تبخیر گردیده و به این ترتیب تغلیظ شده است.(کروماتوگرام۴)

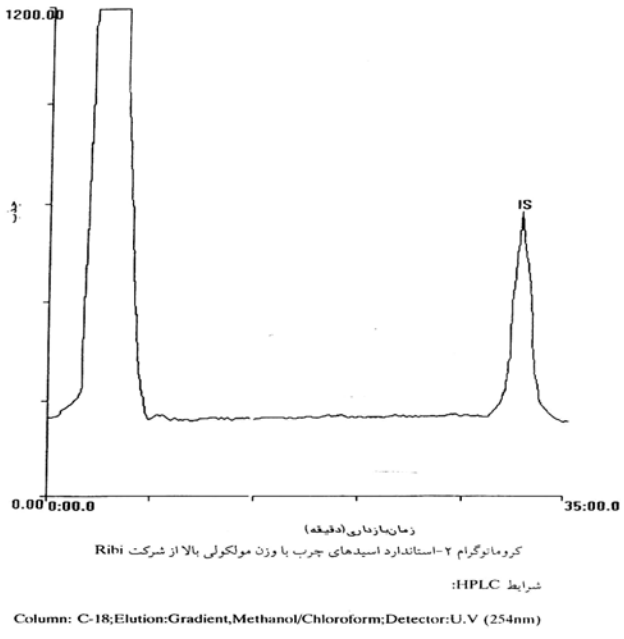
بررسی کروماتوگرام همان باکتری مورد آزمایش در کروماتوگرام ۳ و پس از افزودن استاندارد تهیه شده نشان دهنده آن است که این استاندارد در محل مورد انتظار در کروماتوگرام اسیدهای مایکولیک باکتری مورد بررسی ظاهر گردیده و سبب افزایش ارتفاع پیک مربوطه گردیده است.(کروماتوگرام۵)

باتوجه به پیک مربوط به این استاندارد و با مقایسه کروماتوگرامهای ۵ و ۳ مشخص می شود که پیک خروجی از زمان ۳۲ تا ۳۵ دقیقه افزایش ارتفاع یافته و این دو پیک با هم همپوشانی نموده اند.



کروماتوگرام ۱ -مشتق ساز و مواد همراه آن شرایطHPLC:

Column: C-18;Elution:Gradient,Methanol/Chloroform;Detector:U.V (254nm)

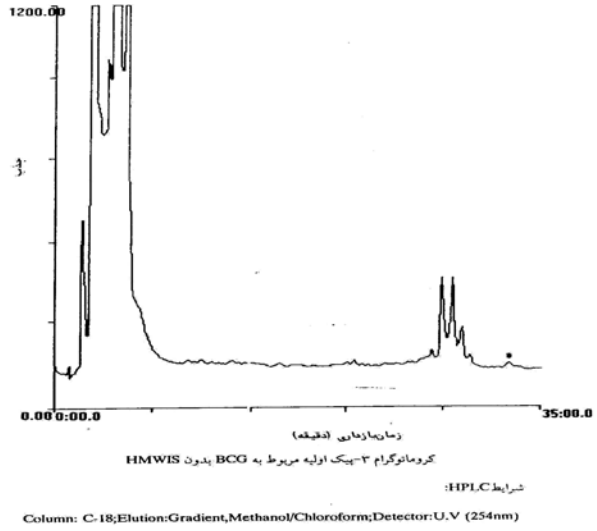


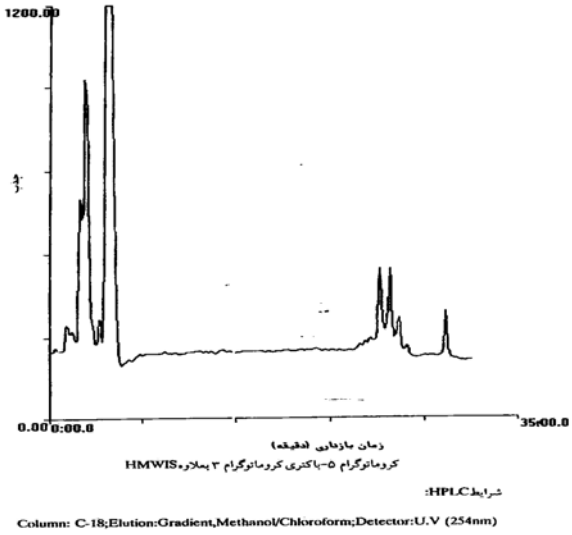
کروماتوگرام ۲-استاندارد اسیدهای چرب با وزن مولکولی بالا از شرکت Ribi

شرایط HPLC:

Column: C-18;Elution:Gradient,Methanol/Chloroform;Detector:U.V (254nm)

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

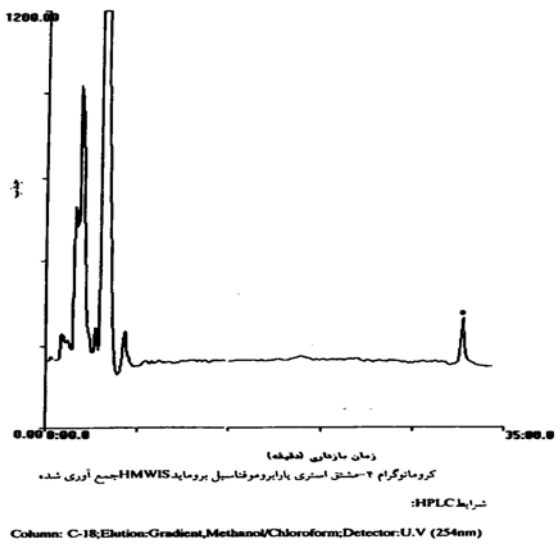




بحث

در حال حاضر تقریباً یک سوم جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آلوده هستند و سالیانه حدود ۸ میلیون مورد جدید ابتلا به سل در جهان بروز می کند و حدود ۳ میلیون نفر از این بیماری در هر سال می میرند.[۸] با گسترش و پخش سویه های مقاوم به داروی مایکوباکتریوم توبرکولوزیس ، HIV وAIDS، سل مجدداً به عنوان یکی از معضلات جامعه انسانی در دنیا مطرح گشته است.[۹] از طرفی کنترل مؤثر انتقال و درمان سل بستگی به شناسائی سریع آن دارد.[۱۰]

تلاشهای انجام شده در جهت کنترل سل به شدت تحت تاثیر زمان لازم برای رشد، شناسائی و تستهای تعیین حساسیت داروئی



روشهای جاری مختل می شود.[۱۱و۱۲] لذا نیاز به تکنیکهائی سریعتر و دقیق تر در شناسائی و تعیین هویت باکتری ایزوله شده لازم و ضروری به نظر می‌رسد. پس از کشت مایکوباکتریوم ها ، قدم بعدی تعیین هویت میکروبی است که از محیط کشت جدا شده است. یکی از سریعترین روشهای تعیین هویت، روش استفاده از آنالیز شیمیائی اسیدهای مایکولیک دیواره سلولی به طرق‌مختلف‌وازجمله Gas Liquid Chromatography (GLC) و High Performance Liquid Chromatography (HPLC) است.[۱۳و۱۴]

کاربرد روشهائی که بر مبنای تکثیر اسیدهای نوکلئیک قرار دارند با مشکلات خاصی روبرو هستند که از جمله این اشکالات می توان به عدم اختصاصی بودن هدف تکثیر مایکوباکتریومی، نبودن هدف تکثیر در بعضی از نمونه ها ،آلودگی های جانبی و موارد مثبت و منفی کاذب، لزوم کارآئی اوپراتور و تاثیر آن در نتایج حاصله از این روشها، مشکلات تهیه امکانات مربوطه، گرانی قیمت (بخصوص در مقایسه با HPLC و GLC) و... اشاره کرد.[۱۵-۲۰] اکنون تلاشهای برای شناسائی مایکوباکتریومها توسط HPLC بعد از کشت اولیه [۲۱- ۲۳] و بطور مستقیم[۲] صورت گرفته که به سرعت و با دقتی بیش از ۹۹/۹ درصد [۲۵] قادر به شناسائی مایکوباکتریومها می باشند. در انتخاب بین

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

HPLC وGLC نیز، در نمونه های بیولوژیک حتی الامکان HPLC به GLC ترجیح داده می شود.[۲۴] برای استفاده از HPLC نیز نیاز به استفاده از استاندارد داخلی اسیدهای مولکولی با وزن بالا می باشد.

لذا در طی این تحقیق مشتق فناسیل اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا از M.bovis BCG با استفاده از دستگاه HPLCجدا سازی، استخراج و تخلیص گردید.نتایج حاصله از مقایسه کروماتوگرامهای حاصله از آنالیز مواد استخراج شده با مقالات ارائه شده در خصوص زمان بازداری و روش انجام کار و همچنین مقایسه این کروماتوگرام ها با کروماتوگرام استاندارد خارجی ، همگی مؤید تشابه این مشتق با ماده مشابه خارجی می باشند. این نتایج با تحقیقات قبلی Butler و Jost که به ترتیب بر روی جداسازی استاندارد اسیدهای مایکولیک با وزن مولکولی بالا از M.Smegmatis-M.tuberculosis و M.avium انجام شده نیز همخوانی دارد.[۲۵و۶،۷] با توجه به موارد فوق الذکر مشخص می شود که می توان از استاندارد تهیه شده در این تحقیق که مشابه استاندارد خارجی می باشد در شناسائی مایکوباکتریوم ها استفاده کرد.

سپاسگزاری

از راهنمائیهای سرکار خانم دکتر عسگری و آقای دکتر کیومرث قاضی سعیدی، از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی برای در اختیار قرار دادن نمونه ها و از آقای دکتر پرودینگر از دانشگاه اینسبورگ برای اهدای استاندارد اسیدهای مایکولیک کمال تشکر و امتنان را دارد.

منابع — *References*

1. Kubica GP. Differential Identification of Mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1973; 107:9-21.

۲. شفقی ب ، محمدی ف.تکنولوژی نوین در تشخیص سل.مجله بیماریهای عفونی و گرمسیری، سال اول ، شماره ۱ ، ۱۳۷۵ ، ص ۶۱-۵۷.

2. Minnikin DE, Good fellow M. Lipid composition in the classification of acid-fast bacteria. Good fellow M, Board RG. In: Microbiological classification and identification. London: Academic Press; 1980.189-256.
3. Minnikin DE, Minnikin SM, Dobson G, et al. Mycolic acid patterns of four vaccine strains of Mycobacterium bovic BCG. J Gen Microbiology1983; 129:889-91.
4. Butler WR, Kilburn JO. High performance Liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of Corynbacterium, Nocardia, Rhodococcus and Mycobacterium species. J Clin Microbiol 1986; 23:182-5.
5. Butler WR, Kilburn JO. Identification of major slow growing pathogenic mycobacterium gordonae by High performance Liquid chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiology 1987; 26:50-3.
6. Butler WR, Kiburn JO. Identification of Mycobacteria by High Performance Liquid chromatography. J Clin Microbiology 1991; 29:2468-72.
7. World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO Report 2001, WHO/CDC/TB7 2001.287.

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

8. Nunn P. The effect of human immunodeficiency virus type- 1 on infectiousness of tuberculosis. Tubercle and Lung disease 1994; 75:420-4.
9. Ryan C, Nguyen BT, Sullivan SL. Rapid assay for mycobacterial growth and antibiotic susceptibility using gel mico drop encapsulation. J Clin Microbiol 1997; 35:1783-6.
10. Bloom BR, Murray CJL. Tuberculosis: Commentary on a re emergent killer. Science 1992; 257:1055-64.
11. Edlin BR, Tokars JI, Grieco MH, et al. An outbreak of multi drug resistant tuberculosis among hospital patients with the acquired immunodeficiency syndrome. New Engl J Med 1992; 326:1514-21.
12. Mc Clathey KD. Mycobacterium tuberculosis. Clinical Laboratory medicine.8th ed. Maryland: Williams & Wilkins; 1994.1291-307.
13. Tisdall PA, Roberts GD, Anhalt JP. Identification of mycobacteria with Gas Liquid chromatography alone. J Clin Microbiol 1979; 10:506-14.
14. Kent TD, Belington O, Dale JW, Gillespie SH. Demonstration of homology between IS6110 of Mycobacterium tuberculosis and DNAs of other mycobacterium spp. J Clin Microbiol 1995; 33:2290-3.
15. MC Hugh TD, Newport LE, Gillspie SH. IS6110 homologs are presents in multiple copies in mycobactria other than tuberculosis – causing mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35:1769-71.
16. Yuen LK, Ross BC, Jackson KM, Dwyer B. Characterization of mycobacterium tuberculosis strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31:1615-8.
17. Zwody K. Rendering of mycobacteria safe for molecular diagnostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. J Clin Microbiol 1994; 32:2140-6.
18. Noordhook GT, van embden JDA, Kolk AHJ. Reliability of nucleic acid amplification for detection of mycobacterium tuberculosis: on international collaborative quality control study among 30 laboratories. J Clin Microbiol 1996; 34:2522- 5.
19. Thibert L, Lapierre S. Routine application of high performance liquid chromatography for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 1993; 31:1759-63.
20. Tortall E, Kirschner P, Bartoloni A, et al. Isolation of an unusual mycobacterium from an ALDS Patient. J Clin Microbiol 1996; 34:2316-9.
21. Ritter D, Carlson LD, Logan BK, et al. Differentiation of mycobacterium genavense and mycobacterium simiae by automated mycolic acid analysis with high performance liquid chromatography. J Clin Microbiol 1996; 34:2004-6.
22. Duffey PS, Guthertz LS, Evans GC. Improved rapid identification of mycobacteria by combining solid – phase extraction with high performance liquid chromatography analysis of BACTEC cultures. J Clin Microbiol 1996; 34:1939-43.

23. Lindsay S. High performance Liquid chromatography. Second ed. Baltimore: John Wiley & sons; 1997. 1-16.
24. Jost KC, Dunbar DF, Barth SS, et al. Identification of mycobacterium tuberculosis and mycobacterium avium complex directly from smear-positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and computer driven pattern recognition models. J Clin Microbiol 1995:33:1270-7.

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

Derivatization, Extraction and Purification of High Molecular Weight Mycolic Acid of Mycobacterium bovis BCG by HPLC

Downloaded from zjrms.ir at 9:47 +0430 on Monday June 10th 2019

Naserpour Farivar T. PhD[*] , Hawaii A. PhD[**], Naderi GH.PhD[***], Tamizifar H.PhD[**]

Biochemical identification of Mycobacteria after primary culture is a laborious and time-consuming procedure. One of the suitable ways for overwhelming meaning this problems is using high performance liquid chromatography (HPLC) of their Mycolic acids and one of the most important materials for this process is phenacyl derivatives of high molecular weight Mycolic acids which is used as standard in this method. This standard is synthesized by an American company and is not available every time. So, this study is done for extraction, derivatization and purification of high molecular weight Mycolic acids from Mycobacterium bovis BCG as standard in the identification of Mycobacteria by means of HPLC.

Used bacterium in this study was M.bovis BCG and its high molecular weight Mycolic acids were derivatized by para bromophenacyl bromide and 18- Crown 6 and extracted by Lich. RP 18 column and methanol/chloroform gradient.

Chromatographs of company synthesized standard and prepared one's were compared and retention time of related peaks were recorded.

Complete similarities between chromatographs of commercially produced standard and provided standard suggest their uniqueness. So, this prepared standard can be used in identification of Mycobacteria.

***KEY WORDS**: HPLC, Mycobacterium, Mycolic acids*

*** Microbiology dept, faculty of medicine, Zahedan University of Medical Sciences and health services, Zahedan, Iran.**

**** Microbiology dept, faculty of medicine, Isfahan University of Medical Sciences and health services, Isfahan, Iran.**

*****Cardiac research center. Isfahan University of Medical Sciences and health Services, Isfahan, Iran.**