



جمهورية العراق
وزارة التعليم والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم



عزل وتشخيص بكتريا السل الرئوي *Mycobacterium tuberculosis* والتحري عن التغيرات الوراثية في جينات المقاومة المتعددة

رسالة مقدمة إلى مجلس كلية العلوم - جامعة ديالى
وهي جزء من متطلبات نيل شهادة الماجستير في علوم الحياة
من قبل الطالب

محمد مصطفى غضبان

بكالوريوس علوم حياة - كلية العلوم
جامعة ديالى 2012

ياشرف

م. د. احمد اسمر منخي

م. د. مثنى عبد القادر صالح

م 2018

هـ 1439

الفصل الأول : المقدمة Introduction

1 المقدمة

يعد التدرن Tuberculosis من الأمراض المدمرة للبشرية وكان موجوداً بالفعل منذ عصور ما قبل التاريخ. المسبب الرئيسي لإصابة الإنسان بالتدرن هي بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* (MTB)، وهي بكتريا عصوية الشكل هوائية Aerobic bacilli، غير متحركة Non motile، مقاومة للحموضة Acid-fast، وذات نمو بطيء Slow-growing (moreira et al., 2013). كما تستطيع أنواع بكتيرية أخرى شديدة القرابة لبكتريا *M. tuberculosis* ان تسبب مرض السل ويطلق على هذه الأنواع مجتمعة تسمية (MTBC) *M. tuberculosis complex* وتضم *M. microti* و *M. africanum*, *M. bovis* وبالطبع *M. tuberculosis* (Alexander et al., 2010).

الشكل الشائع للإصابة بالمرض هو التدرن الرئوي Pulmonary TB، يمكن أن يصيب المرض أماكن أخرى خارج الجهاز التنفسي في الجسم Extra pulmonary TB، ولكون انتشار المرض عن طريق الهواء يحدث فقط من خلال المرضى المصابين بالسل الرئوي لذلك يعد تشخيص البكتريا من العينات الرئوية مهم جداً في السيطرة على انتشار المرض (Reddington et al., 2012). لا يزال التدرن واحداً من الأمراض المعدية الأكثر تدميراً على الصعيد العالمي ويعتقد ان حوالي ثلث سكان العالم مصاباً بعصيات التدرن وتقدر سرعة انتقال المرض وحدوث حالات اصابة جديدة بمعدل شخص واحد لكل ثانية (WHO, 2007). ووفقاً لمنظمة الصحة العالمية فأن مرض التدرن يسجل ثاني أعلى معدل وفيات من بين الأمراض المعدية ولا يزال يشكل عبئاً صحي في جميع انحاء العالم على الرغم من التقدم والتطور في تشخيص وعلاج هذا المرض، إذ سجل ما يقدر 10.4 مليون شخص مصاب بالسل وتوفي حوالي 1.8 مليون شخص منهم جراء هذا المرض في عام 2015 (WHO, 2015). يعد العراق من بين ثمانية بلدان في اقليم الشرق الاوسط تسجل أعلى نسبة اصابة بمرض التدرن. وفقاً لتقديرات صدرت مؤخراً عن وزارة الصحة قدر معدل الإصابة بالتدرن بحدود (100,000/45)، على الرغم من امتلاك العراق مختبر مرجعي في مركز الامراض الصدرية والتنفسية المتخصص في بغداد بالإضافة الى 124 مختبر فرعي للسل، فضلاً عن برنامج متابعة مرضى السل تحت العلاج (MOH.NTP, 2013).

أعطى استعمال الأدوية الفعالة لمكافحة مرض التدرن مثل streptomycin عام 1941 و Isoniazid عام 1952 و Rifampicin عام 1970 الأمل في علاج المرض إذ انخفضت معدلات الإصابة بنسبة 75% إلا أن سير الأحداث تغير بشكل غير متوقع ففي عام 1993 و بسبب وباء مرض نقص المناعة البشري أعلنت منظمة الصحة العالمية حالة طوارئ صحية عالمية انخفض على اثرها التركيز على برامج مقاومة مرض التدرن وبدأ ظهور بكتريا التدرن المقاومة للعلاج التي تشكل تهديداً كبيراً في السيطرة على المرض. ذكرت منظمة الصحة العالمية في تقريرها عام 2009 تسجيل أكثر من نصف مليون حالة جديدة من التدرن المقاوم للأدوية المتعددة حدثت خلال عام 2009 (Margaret, 2009; Dennis, 2009). ينجم مرض التدرن المقاوم للمضادات عن سلالات البكتريا *M.tuberculosis* التي تقاوم على الأقل اثنين من المضادات الحياتية التي تعد الأدوية الأكثر فعالية في علاج مرض التدرن وهما Isoniazid و Rifampicin (Kolyva and karakousis, 2012). حسب تقديرات منظمة الصحة العالمية لعام 2014 ان هناك نسب مقاومة عالية للريفامبسين تصل 7.6% وللايزونيازيد يتجاوز 5.9% ولذلك فهي تحتاج إلى رصد ومتابعة مستمرة. بينت الدراسات الجزيئية ان تطور مقاومة بكتريا التدرن لهذه المضادات ناتجة بشكل رئيسي عن الطفرات الحاصلة في جينات *inhA*, *katG*, *rpoB* (Aragón et al., 2006) ازداد مؤخراً استعمال الطرق الجزيئية في تشخيص بكتريا التدرن على مستوى الجنس والنوع (Nakajima et al., 2010) ، وتعد التقنيات المعتمدة على تضخيم الحامض النووي باستعمال تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction سريعة جداً وحساسة في تشخيص بكتريا التدرن ويمكن لهذه الطرق ان تقلل الوقت التشخيصي للمرض من عدة أسابيع إلى ساعات واثبتت جدارتها ايضاً في اختبارات فحص الحساسية للمضادات الحياتية وفي دراسة الوبائية والتغاير الوراثي polymorphism لبكتريا التدرن (Ruiz et al., 2004). يمكن أن تستخدمها في تصنيف العزلات البكتيرية بواسطة توليد بصمة وراثية مميزة للحامض النووي DNA مباشرة من البكتريا المزروعة على الأوساط الصلبة والتفريق بينهما من خلال المقارنة البصرية ضمن وقت قصير (Brooks et al., 2016).

هدفت هذه الدراسة للتحري عن مدى أنتشار المقاومة المتعددة للمضادات الحياتية في عزلات بكتريا التدرن (MDR-TB) ودراسة التنوع الشكلي Polymorphism لهذه العزلات بأستعمال التقنيات الجزيئية وذلك عن طريق:

- 1- عزل وتشخيص بكتريا *M. tuberculosis* من عينات القشع والعينات الأخرى بواسطة الطرق التقليدية والجزيئية بأستعمال (PCR).
- 2- الكشف عن حساسية بكتريا التدرن لمضادات الخط الأول بواسطة الطرق التقليدية ودراسة الطفرات المسؤولة عن المقاومة لمضاد Rifampicin , Isoniazid بواسطة أستعمال تقنية تحليل تتابع سلسلة القواعد Sequencing PCR وتحليل تأثير الطفرات على انطواء البروتين.
- 3- دراسة التغيرات الوراثي polymorphism بين عزلات بكتريا *M. tuberculosis* بأستعمال .PCR Finger printing

الخلاصة

أجريت هذه الدراسة في معهد الأمراض الصدرية والتنفسية / بغداد للفترة من (1\9\2016) إلى (1\1\2017)، جمعت 500 عينة سريرية مختلفة (عينات القشع، غسيل القصبات، سائل الجنب، سائل الاستسقاء، سائل النخاع) من المرضى من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة للتحري عن بكتريا *Mycobacteriu tuberculosis* بأستعمال الطرق التقليدية والجزئية و دراسة التغيرات الوراثي بين العزلات و التحري عن الطفرات المسؤولة عن مقاومة البكتريا المتعددة للمضادات الحياتية Multidrug resistant.

بين الفحص المجهرى المباشر للمسحات بصبغة Ziehl-Neelsen ايجابية 12.8% من العينات (64 من أصل 500 عينة)، زرعت جميع العينات على وسط لوفنشتاين جنسن Lownstein Jensen media (L.J) وقد أظهرت أن 18% من العينات (90 عينة) نمو حقيقي لبكتريا التدرن، وكانت عينات القشع هي الأعلى إيجابية للفحص المجهرى والزرع على وسط لوفنشتاين جنسن إذ كانت نسبة الإيجابية للإختبار 15.9% و 23.1% على التوالي وبينت نتائج الفحوصات الكيموحيوية والتفريقية ان جميع العزلات تعود لبكتريا *M. tuberculosis*. وبينت النتائج عدم وجود فروقاً معنوية في نسب الإصابة بمرض التدرن بين الذكور والإناث إذ شكلت 51% و 49% على التوالي في حين كان هناك فروقاً معنوية عالية ($P < 0.01$) في نسب الإصابة بهذا المرض بين الفئات العمرية المختلفة إذ سجلت فئة (21-30) 23% تليها فئة (31-40) و (41-50) 22% .

استعملت الطرق الجزئية (تفاعل البلمرة المتسلسل polymerase chain reaction) لتأكيد التشخيص التقليدي لـ 10 عزلات من *M. tuberculosis* تم اختيارها بناء على إمتلاكها صفة المقاومة المتعددة. أوضحت نتائج الكشف عن جين *16S rRNA* بأن جميع العزلات تعود الى *M. tuberculosis*. بين تحليل تتابع القواعد للقطعة المضخمة من جين *16S rRNA* في عزلات بكتريا *M. tuberculosis* مع تتابع العزلة القياسية المسجلة في المركز الدولي لتقانة المعلوماتية الحياتية NCBI مطابقة بنسبة 99% إذ كان هناك اختلاف في قاعدة واحدة وسجلت هذه الطفرة في قاعدة البيانات NCBI تحت الرقم التسلسلي MG030630. وبين الكشف عن عنصر الغرس *IS6110* ان جميع العزلات تحتوي هذا العنصر و بين تحليل تتابع القواعد تطابق بنسبة 100% مع تسلسل عنصر