



جمهورية العراق
وزارة التعليم والبحث العلمي
جامعة ديالى
كلية العلوم



عزل وتشخيص بكتريا السل الرئوي
Mycobacterium Tuberculosis ودراسة جينات المقاومة
المتعددة MDR

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

محمد مصطفى غضن

بكالوريوس علوم حياة - كلية العلوم

جامعة ديالى 2014

ياشرف

د. احمد اسمر منخي

أ. د. مثنى عد القادر صالح

٢٠١٧ م

١٤٣٨ هـ



بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

يَرْفَعِ اللَّهُ الَّذِينَ آمَنُوا مِنْكُمْ وَالَّذِينَ أُوتُوا
الْعِلْمَ دَرَجَاتٍ وَاللَّهُ بِمَا تَعْمَلُونَ خَبِيرٌ

صدق الله العظيم

سورة المجادلة الآية ١١



الإهداء

إلى رمز المحبة والعطاء والكلمة الطيبة

... أبي

إلى رمز الحنان والتضحية

... أمي

إلى الذين إستقيت منهم معاني العطاء والحب

... أخواني وأخواتي الاحبة

إلى كل من أحبني وتمنى لي الخير

... أساتذتي الكرماء

أهدي إليكم ثمرة جهدي بما وفقني به ربي

الشكر والتقدير

الحمد لله رب العالمين والصلاة والسلام على سيد المرسلين نبينا محمد صلى الله عليه وعلى آل بيته الطيبين وصحبه أجمعين، ومن اهتدى بهديه إلى يوم الدين وبعد.

بعد أن وفقني الله تعالى بإنجاز هذه الرسالة، أجد لزاماً ومن واجب الوفاء ان اتقدم بخالص الشكر والعرفان إلى عمادة كلية العلوم- ورئاسة قسم علوم الحياة على استقبالها لي طالبة في الدراسات العليا كي انهل من معين علمائها، فجزى الله الجميع خيراً ممن تتلمذت على ايديهم في هذا الصرح العلمي الموقر.

ولا يسعني إلا أن أتقدم بجزيل الشكر والامتنان إلى الاستاذي الفاضلين الأستاذ الدكتور مثنى عبد القادر والدكتور احمد اسمر منخي لإشرافهما على الرسالة ولرعايته العلمية القيمة وملاحظتهما السديدة التي أسهمت في أغناء الرسالة وإخراجها بهذه الصورة، ، فجزاهما الله تعالى خير الجزاء

كما أتوجه بالشكر والتقدير إلى منتسبي مركز الأمراض الصدرية والتنفسية التخصصي على ما قدموه لي من عون ودعم لتذليل صعوبات البحث كما اشكر اخواتي (نور وساره ودعاء) و زميلاتي (رغده وقطر الندى وميسون) لمساندتهن لي ولما قدموه من دعم معنوي طوال رحلة الدراسة كما اشكر زملاء الدراسات العليا واخص بالذكر احمد .

وأخيراً أقدم شكري العميق إلى عائلتي داعيةً من الباري (عزوجل) أن يمن عليهم بالصحة والعافية انه سميع مجيب ، واخيراً اتقدم بخالص شكري و امتناني إلى كل الذين وقفوا إلى جانبي يشدون من أزمي بحسن تشجيعهم وصائب آرائهم وصادق نصائحهم مما كان لهم اطيب الاثر لإتمام هذه الرسالة. فجزاهم الله خير الجزاء .

الخلاصة



الخلاصة



أجريت هذه الدراسة في معهد الأمراض الصدرية والتنفسية / بغداد لمدة من (1\9\2016) إلى (1\1\2017)، إذ جمعت 500 عينة سريرية مختلفة من كلا الجنسين وبأعمار مختلفة للتحري عن بكتريا *M. tuberculosis* باستخدام الطرق التقليدية والجزئية ودراسة التغيرات بين العزلات وكذلك دراسة الطفرات المسؤولة عن مقاومة البكتريا لمضاد المتعددة Multidrud-resistant.

حيث بينت نتائج الفحص المجهرى المباشر للمسحات المصبوغة بصبغة Ziehl-Neelsen ايجابية 63 نموذج لمرض التدرن وبنسبة 12.8% من أصل 500 عينة، زرعت النماذج على الوسط الصلب (L.J) Lowenstein Jensen media وقد بينت النتائج أن 90 عينة بنسبة 18% أظهرت نمو حقيقي، وكانت عينات القشع هي الأعلى ايجابية للفحص المجهرى والزرع على الوسط الصلب حيث شكلت نسبة 15.9% و 23.1% على التوالي وشخصت المستعمرات البكتيرية باستخدام الفحوصات الكيموحيوية والتفريقية لجميع العزلات وتبين أنها تعود لبكتريا *M.tuberculosis*.

أظهرت النتائج أن أعلى نسبة للإصابة لمرض التدرن كانت بين الذكور حيث شكلت نسبة 60% بينما كانت في الإناث 40% حيث أظهرت اختلافات معنوية عند مستوى ($p > 0.05$). وكذلك بينت نتائج التحليل الإحصائي أن هناك فروق معنوية عند مستوى ($P > 0.01$) في عدد الإصابة بالتدرن في الفئات العمرية إذ سجلت فئة (21-30) أعلى نسبة وبلغت 30%-23% يليها الفئتين (31-40) و (41-50) حيث شكلت 22.20%، ثم تم اختبار حساسية 90 عزلة من بكتريا التدرن لمضادات الخط الدوائي الأول (Isoniazid، Rifampicin، Streptomycin، Ethambutol) بالطرق التقليدية Proportion method وكانت 48 عزلة وبنسبة 53.3% من أصل 90 عزلة مقاومة لهذه المضادات وكانت أعلى نسبة مقاومة هي لمضاد Isoniazid حيث شكلت 38.9% من أصل 90 عزلة يليها المقاومة لمضاد Rifampicin حيث شكلت 25.6% من أصل 90 عينة، أما نسبة المقاومة لمضاد Streptomycin كانت 17.8% من أصل 90 عينة، أما اقل نسبة مقاومة فكانت لمضاد Ethambutol، حيث شكلت 11.1% من أصل 90 عينة وبفروق معنوية عالية عند مستوى $p > 0.01$.

من جانب آخر أظهرت 27 عزلة وبنسبة 30 % مقاومة مضاد مايكروبي واحد و 11 عزلة بنسبة 12 % مقاومة لأكثر من مضاد مايكروبي ، اما نسبة المقاومة المتعددة المايكروبية (MDR-TB) وكانت 10 عزلات وبنسبة 11.1% ، وبعد ذلك تم استخلاص الحامض النووي DNA لـ (10) عزلات من بكتريا التدرن التي اظهرت مقاومة متعددة دوائية بالطرق التقليدية وذلك لغرض التشخيص الجزيئي لهذه العزلات باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) polymerase chain reaction إذ تم استخدام جين 16SrRNA لهذا الغرض حيث أوضح الترحيل الكهربائي أن جميع العزلات أعطت نتائج موجبة لجين 16SrRNA ، ثم شخصت بعد ذلك باستهداف عنصر الغرس IS6110 حيث بينت النتائج ان جميع العزلات تحتوي على هذا العنصر الوراثي ولتأكيد عائدة هذه العزلات لبكتريا Mycobacterium tuberculosis تم استخدام تقنية تحليل تتابع سلسلة القواعد sequencing PCR لجين 16SrRNA وعنصر الغرس IS6110 من قبل شركة Macrogen Company ومطابقة مع تسلسل الجين نفسه على موقع NCBI ، فكانت النتائج مطابقة بنسبة 99% بالنسبة لجين 16SrRNA و 100% لعنصر الغرس

وفي هذه الدراسة تم الكشف عن التغيرات الوراثي بين عزلات بكتريا التدرن حيث وجد ان 80 % من العزلات تحتوي على نسخ متعددة من عنصر الغرس IS6110 (6-10) نسخ و 20% تحتوي على نسخ قليلة من هذا العنصر وهذا يبين أن هناك تباين بين العزلات من خلال الكشف عن إعداد هذا العنصر.

بعد ذلك استخدم تقنية تحليل تتابع القواعد لحظات *inhA*, *KatG*, *rpoB* لدراسة وتحديد الطفرات المسؤولة عن المقاومة لمضاد Rifampicin , Isoniazid وهي من أكثر مضادات الخط الأول فعالية ، وان نسبة الطفرات الحاصلة في جين *rpoB* والمسؤولة عن مقاومة لمضاد Rifampicin كانت 100% ، أما الطفرات المسؤولة عن المقاومة لمضاد isoniazid فقد كانت في جين *katG* نسبة 80% ، أما التغيرات الحاصلة في جين *InhA* والمسؤولة عن المقاومة لمضاد Isoniazid ظهرت في 3 عزلات أظهرت نتائج الدراسة أن جميع عزلات بكتريا *M. tuberculosis* تحتوي على عنصر الغرس IS6110 وان هناك تغيرات polymorphism بالاعتماد على عنصر الغرس هذا وان هناك علاقة بين الطفرات الحاصلة في جين *rpoB* والمقاومة لمضاد Rifamicin وكذلك بين الطفرات الحاصلة في جين *inhA*, *KatG* والمقاومة لمضاد Isoniazid .

قائمة المحتويات

رقم الصفحة	العناوين
I.....	الخلاصة
1.....	الفصل الأول : المقدمة Introduction
1.....	1.1 المقدمة
3.....	2.1 Aim of The Study الهدف من الدراسة
4.....	الفصل الثاني: استعراض المراجع Literatures Review
4.....	1.2 نبذة تاريخية
5.....	2.2 تصنيف بكتريا <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
6.....	3.2 الصفات العامة لبكتريا <i>M. tuberculosis</i>
7.....	4.2 جدار الخلية Cell wall
9.....	5.2 عوامل ضراوة بكتريا <i>M. tuberculosis</i>
10.....	6.2 إمرضية بكتريا <i>M. tuberculosis</i>
12.....	7.2 وبائية بكتريا <i>M. tuberculosis</i>
12.....	1.7.2 عالمياً
14.....	2.7.2 العراق
16.....	8.2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
16.....	9.2 المكون الوراثي لبكتريا <i>M. tuberculosis</i>
18.....	10.2 عنصر الغرس insertion sequence
20.....	11.2 علاج التدرن
22.....	12.2 برنامج العلاج قصير الأمد تحت الإشراف المباشر
22.....	13.2 مقاومة بكتريا <i>M. tuberculosis</i> المتعددة لمضادات التدرن
24.....	14.2 مقاومة العلاج على الصعيد العالمي والعراق
25.....	15.2 الآلية الجزيئية لمقاومة بكتريا <i>M. tuberculosis</i>
25.....	1.15.2 Isoniazid
26.....	2.15.2 Rifampicin

27.....	16.2 الاختبارات والفحوصات الطبية
29.....	الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and Methods
29.....	1.3 المواد
29.....	1.1.3 الأجهزة و المستلزمات المختبرية
30.....	2.1.3 المواد الكيميائية المستخدمة
31.....	3.1.3 الأوساط الزرعية المستخدمة
32.....	4.1.3. المضادات الحيوية (Antibiotics)
32.....	5.1.3. The diagnostic kits العدة التشخيصية
32.....	2.3 تحضير الصبغات والمحاليل والأوساط المستخدمة
32.....	1.2.3 تحضير صبغة زيل نلسون Ziehl – Neelson stain
34.....	3.2.3 تحضير 2 ملغرام/مليتر من TCH
35.....	4.2.3 تحضير 500 ملغرام/مليتر من مسحوق PNB :
35.....	5.2.3 تحضير الوسط الزرعي الصلب ستون برينك Stonebrink media :
35.....	6.2.3 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution
35.....	7.2.3 دارئ ترس-حامض الهيدروكلوريك Tris-HCl
36.....	8.2.3 محلول دارئ TE
36.....	9.2.3 تحضير محلول ماكفرلاند MCFrland solution
36.....	10.2.3 تحضير محلول التعادل في طريقة Petroff
36.....	11.2.3 المحاليل الخزينة للمضادات المايكروبية
38.....	3.3 النماذج Specimens
38.....	4.3 جمع العينات specimen collection
38.....	5.3 تحضير اللطخات Smearing
39.....	6.3 صبغ الشرائح Staining
39.....	7.3 زرع العينات Samples culture
40.....	8.3 الفحوصات الكيموحيوية

40.....	Niacin Test	فحص النياسين	1.8.3
41.....	Nitrate reduction	فحص اختزال النترات	2.8.3
Lowenstein Jensen media		فحص قابلية البكتريا على النمو في وسط لوفنشتاين جنس	3.8.3
41.....	(PNB) para nitro benzoic acid	المحتوي على مادة	
Lowenstein Jensen medio		فحص قابلية البكتريا على النمو في وسط لوفنشتاين جنس	4.3.8
42.....	Thiophen- 2-Carboxylic Acid Hydrazide(TCH)	المحتوي على مادة	
42.....	M.tuberculosis	اختبار حساسية عزلات بكتريا M.tuberculosis للمضادات المايكروبية	5.8.3
42.....	Porportion method	طريقة لفحص الحساسية	9.3
44.....	PCR	التشخيص الجزيئي بتقنية	10.3
44.....	Genomic DNA	عزل من البكتريا	1.10.3
44.....	Estimation DNA Concentration and Purity	تقدير تركيز الدنا ونقاوته	2.10.3
44.....	Primers Preparation	تحضير البادئات	3.10.3
45.....	PCR	تحضير وسط تفاعل البلمرة المتسلسل	4.10.3
47.....		الكشف عن نواتج تفاعل البلمرة بتقنية الترحيل الكهربائي	5.10.3
48.....	Result and discussion	الفصل الرابع : النتائج والمناقشة	
48.....	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	عزل وتشخيص بكتريا	1.4
50.....	Biochemical Tests	الفحوصات الكيموحيوية	2.4
52.....		علاقة العمر بمرض التدرن	3.4
53.....		علاقة الجنس بمرض السل	4.4
54.....	<i>M. tuberculosis</i>	حساسية بكتريا لمضادات الخط الأول	5.4
6.4	Molecular Diagnosis of	التشخيص الجزيئي لبكتريا التدرن المتعددة المقاومة الدوائية	
59.....	MDR-TB		
59.....	PCR	الكشف عن <i>M. tuberculosis</i> بواسطة	1.6.4
2.6.4		تشخيص بكتريا التدرن من خلال الكشف عن وجود عنصر الغرس IS6110 في بكتريا <i>M. tuberculosis</i>	
60.....	PCR Finger printing		3.4.6

62.....	IS6110 و عنصر الغرس 16SrRNA و تتابع سلسلة قواعد جين
64.....	5.6.4 دراسة التسلسل التتابعي لجينات <i>inhA</i> gen, <i>katG</i> gen, <i>rpoB</i> gen
69.....	Conclusions and Recommendation الاستنتاجات والتوصيات
69.....	Conclusions الاستنتاجات
69.....	Recommendation التوصيات
71.....	References المصادر : الفصل الخامس
71.....	1.5 المصادر العربية
72.....	2.5 المصادر الاجنبية
86.....	الملاحق
86.....	الملحق (1) : البيانات الأولية وفحص القشع والزرع على وسط LJ
89.....	الملحق (2): الاختبارات الكيموحيوية
91.....	الملحق (3) : فحص الحساسية
	الملحق (4) : تراكيز الحامض النووي DNA وقيم الامتصاصية في جهاز Nanodrop
93.....	spectrophotometer
94.....	SUMMARY

قائمة الجداول

الصفحة	الموضوع	التسلسل
6	يوضح تصنيف <i>M. tuberculosis</i>	1-1
21	يوضح مضادات التدرن وسنه الاكتشاف	1-2
29	الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة	1-3
30	المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة	2-3
31	الوسط الزرعي المستخدم في الدراسة	3-3
32	العدة الخاصة بمضادات التدرن للخط الدوائي الاول	4-3
32	العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة	3-5
45	تتابعات البودائ لجينات المستخدمة	6-3
46	مكونات وسط التفاعل المستخدمة لتضاعف الدنا DNA	7-3

الصفحة	الموضوع	التسلسل
46	برمجة جهاز PCR	8-3
48	نتائج الفحص المجهرى لبكتريا التدرن	1-4
50	يوضح نتائج الزرع على وسط (L.J)	2-4
67	نتائج التحليل الوراثي للتسلسل التتابعي	3-4
86	البيانات الأولية وفحص القشع والزرع على وسط L.J	1م
89	الاختبارات الكيموحيوية	2م
91	فحص الحساسية	3م
93	تراكيز الحامض النووي DNA وقيم الامتصاصية في جهاز Nanodrop spectrophotometer	4م

قائمة الاشكال

الصفحة	الموضوع	التسلسل
8	يوضح الجدار الخلوي لبكتريا التدرن	1-1
13	يوضح معدل حالات الإصابة بالتدرن لعام 2015	2-1
15	يوضح وبائية السل في العراق	3-1
16	M. tuberculosis يوضح الخريطة الكرموسومية لبكتريا	4-1
19	يوضح دور تتابعات الغرس في تكوين العناصر الانتقالية	5-1
49	(Z.N) يُبين بكتريا التدرن تحت المجهر الضوئي عند استخدام صبغة	5.4
50	L.J شكل مستعمرات بكتريا التدرن على وسط	1-4
51	اختبار النياسين	2-4
51	اختبار اختزال النترات	3a-4
52	الايوساط الزرعية التفريقية لبكتريا التدرن	3b-4

الصفحة	الموضوع	التسلسل
53	يمثل النسب المئوية لحالات التدرن حسب الفئات العمرية	3c-4
54	النسب المئوية لحالات التدرن حسب الجنس	4-4
55	اختبار حساسية بكتريا التدرن لمضادات الخط الاول	5-4
56	النسب المئوية لأعداد المقاومة الدوائية لبكتريا التدرن	6-4
57	يبين النسب المئوية لمقاومة بكتريا التدرن للمضادات المتعددة	7-4
58	شكل المقاومة الأحادية لبكتريا التدرن لمضادات الخط الاول	8-4
60	بحجم S rRNA لبكتريا التدرن لجين 16 PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل الدليل 549,M زوج قاعدي.تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدته 45 دقيقة السيطرة C ، PCR الحجمي(100) زوج قاعدي،(1-10) النتائج الموجبة لتفاعل السيطرة الموجبة P السالبة،	9-4
61	IS6110 لبكتريا التدرن لعنصر الغرس PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل M،بحجم 245 زوج قاعدي.تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدته 45 دقيقة C ، PCR الدليل الحجمي(100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل السيطرة الموجبة P السيطرة السالبة ،	10-4
62	لبكتريا التدرن لإعداد عنصر الغرس PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل الدليل M، تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدته 45 دقيقة. IS6110 السيطرة C ، PCR الحجمي(100) زوج قاعدي،(1-10) النتائج الموجبة لتفاعل السيطرة الموجبة P السالبة ،	11-4
63	للعينة رقم(1) NCBI على موقع SfrRNA نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين 16	12-4
64	للعينة رقم(1) NCBI نتائج تحليل التسلسل التتابعي على موقع	13-4
65	تركيز الهلام rpoB لبكتريا التدرن لجين PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل الدليل الحجمي(100) زوج M ، 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة السيطرة P السيطرة السالبة ، C ، PCR قاعدي،(1-10) النتائج الموجبة لتفاعل الموجبة	14-4
65	تركيز الهلام katG لبكتريا التدرن لجين PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل الدليل الحجمي(100) زوج قاعدي، M، 1.5، الفولتية 75 فولت لمدته 45 دقيقة السيطرة الموجبة P السيطرة السالبة ، C ، PCR (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل	15-4

الصفحة	الموضوع	التسلسل
66	تركيز الهلام inhA لبكتريا التدرن لجين PCR شكل الترحيل الكهربائي لنتاج تفاعل الدليل الحجمي (100) زوج M, 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة السيطرة P السيطرة السالبة ، C ، PCR قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل الموجبة	16-4

قائمة المختصرات

Abbreviation	Key
API	Analytical Profile Index
DNA	DeoxyRibo Nucleic acid
EDTA	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
EPS	Exopolymeric substances
MIC	Minimal Inhibitory Concentraion
PBPs	Penicillin – Binding Protiens
PCR	Polymerase Chain Reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulphate
UTI	Urinary Tract Infection
WHO	World Health Organization

الفصل الأول : المقدمة

Introduction



الفصل الأول : المقدمة Introduction



1.1 المقدمة

التدرن (Tuberculosis) هو مرض مدمر للبشرية كان موجود بالفعل منذ عصور ما قبل التاريخ ، وان السبب الرئيسي لإصابة الإنسان بالتدرن هي بكتريا *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) وهي بكتريا مقاومة للحموضة Acid -fast ، غير متحركة Non motile ، وذات نمو بطيئ Slow-growing ، عسوية الشكل هوائية Aerobic bacilli (moreira et al.,2013) ويمكن أن يتسبب مرض التدرن بواسطة العديد من أنواع البكتريا التي تكون Closely related لبكتريا *M. tuberculosis* هذه الأنواع جميعا يطلق عليها *M. tuberculosis* complex (MTBC) مثل *M. bovis* , *M. africanum* , *M. microti* ، وبالطبع *M. tuberculosis* (Aleyader et al .,2010) .

ويعد التدرن الرئوي Pulmonary TB هو الشكل الشائع من الإصابة بالمرض لكن يمكن أن يصيب المرض أماكن أخرى من الجسم Extra pulmonary TB ، أن انتشار المرض في الهواء يحدث فقط من خلال المرضى المصابين بالسل الرئوي لذلك فان تشخيص البكتريا من العينات الرئوية مهم جدا في السيطرة على انتشار المرض (Reddigton et al.,2012).

لايزال التدرن واحد من الامراض المعدية الاكثر تدميراً على الصعيد العالمي ويعتقد ان حوالي ثلث سكان العالم يكون مصاب بعصيات التدرن وان نسبة انتقال المرض وحدوث حالات اصابة جديدة يقدر بمعدل شخص واحد لكل ثانية (WHO,2007) ووفقا لمنظمة الصحة العالمية فان مرض التدرن يسجل ثاني اعلى معدل وفيات من بين الامراض المعدية في جميع انحاء العالم وعلى الرغم من التقدم والتطور في تشخيص وعلاج هذا المرض لايزال يشكل عبئاً صحي في جميع انحاء العالم ، حيث سجل مايقدر 10.4 مليون شخص مصاب بالسل وتوفي حوالي 1.8 مليون شخص اخر من جراء هذا المرض في عام 2015 (WHO, 2015).

ويعد العراق من بين ثمانية بلدان في اقليم الشرق الاوسط تشكل اعلى نسبة للإصابة بمرض التدرن. ووفقا لتقديرات صدرت مؤخرا عن وزارة الصحة فقد قدر معدل الاصابة بالتدرن (100,000/45) نسمة ،ومع هذا فان العراق لديه 124مختبر للسل ، وبرنامج متابعة مرضى السل تحت

العلاج ، ومختبر مرجعي يقع في بغداد في مركز الامراض الصدرية والتنفسية المتخصص (MOH.NTP,2013).

دخلت الأدوية الفعالة لمكافحة مرض التدرن مثل streptomycin عام 1941 و Isoniazid عام 1952 Rifampicin عام 1970 وأعطت الأمل في علاج مرض التدرن حيث انخفضت معدلات الإصابة بنسبة 75% إلا أن سير الأحداث تغير بشكل غير متوقع ففي عام 1993 أعلنت منظمة الصحة العالمية عن حالة طوارئ صحية عالمية بسبب وباء مرض نقص المناعة البشري وارتفاع معدل الإصابة بهذا المرض وعندها فقد ظهرت بكتريا التدرن المقاومة للعلاج .وفي تقرير لمنظمة الصحة العالمية 2009 سجلت بان هناك أكثر من نصف مليون حالة جديدة من التدرن المقاوم للأدوية المتعددة حدثت خلال عام 2009 (Margad2009.Deunis,2009)

يشكل مرض التدرن المقاوم للأدوية تهديداً كبيراً في السيطرة على المرض وينجم عن سلالات البكتريا *M. tuberculosis* التي تقاوم على الأقل لمضاد Isoniazid, Rifampicin وهي الأدوية الأكثر فعالية في علاج مرض التدرن (Loddeukempal et al .,2002) ان تطور بكتريا التدرن لهذه المضادات ناتجة عن الطفرة الحاصلة في جين *inhA, katG, rpoB* (Aragon.,2006) .

وحسب تقديرات منظمة الصحة العالمية لعام 2014 أن نسبة المقاومة Rifampicin كانت عالية تصل 7.6% Isoniazid يتجاوز 5.9% ولذلك فهي تحتاج إلى رصد مستمر .

تستخدم التقنيات التقليدية في تشخيص مرض التدرن مثل الفحص المجهرى المباشر بواسطة استخدام صبغة Ziehl-Neelsen والفحص تحت المجهر الضوئي وهي من الطرق السهلة والسريعة والرخيصة في حين تعتبر طريقة الزرع على الأوساط الصلبة Lowenstein- jesusien agar المقياس الذهبي للتشخيص gold .staudar وهي أكثر حساسية من الفحص المجهرى (Hung et al.,2007).

ومؤخراً ازداد استخدام الطرق الجزيئية في تشخيص بكتريا التدرن وقد اثبت هذه الطريقة جدارتها في تميز بكتريا التدرن على مستوى الجنس والنوع (Nakajlma et al.,2010) ، وان التقنيات المعتمدة على تضخيم الحمض النووي باستخدام تفاعل البلمرة المتسلسل (PCR) Polymerase Chain Reaction هي طرق سريعة جداً وحساسة في تشخيص بكتريا التدرن و كذلك في اختبارات فحص الحساسية للمضادات الميكروبية وفي دراسة الوبائية والتغاير polymorphism

لبكتريا التدرن ويمكن لهذه الطرق ان تقلل الوقت التشخيصي للمرض من عدة أسابيع إلى أيام (Ruiz *et al.*, 2004).

ويمكن أن تستخدم تقنية PCR في تصنيف العزلات البكتيرية بواسطة توليد بصمة وراثية مميزة للحامض النووي DNA مباشرةً من البكتريا المزروعة على الأوساط الصلبة والتفريق بينهما من خلال المقارنة البصرية ضمن وقت قصير (Nieimark *et al.*, 1996)

2.1 الهدف من الدراسة Aim of The Study

- 1- عزل وتشخيص *M. tuberculosis* من عينات القشع والعينات الأخرى بواسطة الطرق التقليدية والجزيئية باستخدام (PCR) .
- 2- الكشف عن بكتريا التدرن لمضادات الخط الأول بواسطة الطرق التقليدية ودراسة الطفرات المسؤولة عن المقاومة لمضاد Rifampicin ,Isoniazid بواسطة استخدام تقنية تحليل تتابع سلسلة القواعد Sequencing PCR
- 3- دراسة التغيرات polymorphism باستخدام PCR Finger printing.

الفصل الثاني : استعراض المراجع

Literatures Review



الفصل الثاني: استعراض المراجع Literatures Review



1.2 نبذة تاريخية

تُعد بكتريا العصية الفطرية الدرنية *Mycobacterium tuberculosis* المسبب الرئيسي لمرض التدرن tuberculosis وهو من أكثر الأمراض المعدية والتي سببت عدد كبير من الوفيات في المجتمعات ولازمته المختلفة. وقد افترضت الدراسات السابقة إلى إن أول انتقال لمرض السل للإنسان عن طريق العجول (Bos et al.,2013). وتشير الاكتشافات المبكرة لبكتريا السل *M. tuberculosis* على وجود أدلة للمرض في بقايا الثيران الميتة التي تعود إلى حوالي 17,000 سنة مضت (Rothschihd et al.,2001).

بغض النظر عن أصل ظهور مسبب مرض التدرن في الحيوان ثم انتقل إلى الإنسان، أو إنه اشتق من أسلاف مشتركة لازال غير واضحة لحد الآن (Deace-Duret,2006)، كانت نتيجة المقارنة بين جين (MTBC) *Mycobacterium tuberculosis complex* في الإنسان و (MTBC) في الحيوان تبين أن الإنسان لم يكتسب (MTBC) من الحيوانات خلال تدجين الحيوان كما كان الاعتقاد سائد، إذ أن كل من السلالتين قد انحدرت من أسلاف مشتركة قد تكون عائدة إلى الإنسان في العصور الحجرية (Comas and Gagneux,2009). هناك أدلة على وجود المرض في قارة آسيا وإفريقيا في فترة ما قبل التاريخ، حيث لوحظت آثار الإصابة ببكتريا *M. tuberculosis* في مصر والهند والصين قبل 5000 سنة مضت (Danid,2006). فقد وجدت عظام عليها آثار الإصابة بمرض التدرن لأشخاص ماتوا قبل 4000 سنة كما في مومياء قدماء المصريين وقد ذكر المرض أيضا في الألواح الطينية الآشورية (Zink et al., 2003).

عرف أطباء العرب والمسلمون مرض التدرن tuberculosis وساهموا في الكشف عن هذا المرض منذ عدة قرون، إذ يصف ابن سينا علامات المرض فيقول "حمى رقيقة لازمه تشدد عند الليل، والسعال الذي كثيرا ما يستبد بهم فيؤدي إلى نفث الدم، ويأخذ البدن بالذبول، كما وصف مرضى السل بقوله "أنهم طويلوا الأعناق، ضيقوا الصدر، وأكتافهم خالية من اللحم " اما الرازي فقد قال "ان القرحة الحادثة من التدرن لا تبرئ لان مثل هذه القرحة تحتاج إلى مدة طويلة جدا في برئها وفي هذه المدة إما

يتكون تعفن فتتاكل الرئة كلها وأما تتصلب وتصبح في حد ما لا يمكن أن تلتئم " (ابن سينا، سنة الطبع (2004); الرازي، سنة الطبع(2000)).

ويعد يوم 24 آذار عام 1882 ميلادي مهما في تاريخ المرض إذ قدم العالم الألماني روبرت كوخ Robork Koch محاضراته الشهيرة التي ألقاها في جمعية الفسيولوجين في برلين .حيث استخدم التقنيات المجهرية، وحدد العامل المسبب لمرض التدرن في الأنسجة، ووصفه ببكتريا عصويه الشكل لذلك أصبح هذا اليوم هو اليوم العالمي للتدرن الذي تتضافر فيه الجهود للتصدي لمرض السل (Combau and Draucout,2014). استحدثت تسمية *Mycobacterium* من قبل العالمان ليومان ونيومان (Lenman and newman) عام 1896 حيث تعني العصية الفطرية الدرنية، لأنها تكون نمو حلقي في الوسط السائل يشبه النمو الفطري (Denkantor et al.,1898; منخي،2009). أما بالنسبة لتسمية التدرن الرئوي Tubercuiosis فقد اشتق من الكلمة اللاتينية Tuberculum التي تعني وجود عقيدات في النسيج الرئوي (Bhamdi,2009).

قبل اكتشاف المرض من قبل العالم روبرت كوخ عام 1882 عُرف بالعديد من الأسماء. حيث وضعوه الإغريق تحت تسمية Phthisis وهي تعني الاستهلاك في اليونانية، لأنه يستهلك جسم المريض ويجعله ناحلا (CDC,2009) وقد أطلق على مرض التدرن بالطاعون الأبيض لأنه يظهر على المصاب بمرض التدرن الشحوب وبشدة. ولا يزال هذا المرض من كوارث المجتمعات المدنية (Bhamidi,2004).

2.2 تصنيف بكتريا *Mycobacterium tuberculosis*

يبدأ تصنيف أي كائن حي منذ وقت اكتشافه، وهذا يمكن اي شخص من تحديد نفس الكائن الحي في مختلف المواقع الجغرافية، وكما في باقي أنواع البكتريا فان تشخيص وتصنيف بكتريا *M. tuberculosis* تم في البداية اعتمادا على الصفات المظهرية التي تتضمن الخواص المورفولوجية والكيميائية بالإضافة إلى الشكل المستضدي Antigenic make up وان التطور الحديث واستخدام التقنيات الجزيئية سمح بتصنيف البكتريا اعتمادا على القرابة الوراثية. (Hanukah et al .,2007).

تعتبر بكتريا *M. tuberculosis* احد أنواع عوائل Mycobacteriaceae التي تعيش بصورة حرة في المياه والتربة والتي تعد بيئتها الطبيعية، إما المكان الملائم لها هو أنسجة الإنسان والحيوانات ذوات الدم الدافئ (Ray et al.,2004). يوجد هناك اكثر من 200 نوع من mycobacterium ويلاحظ في

الجدول (2- 1) تصنيف هذه البكتريا متضمناً بعض الانواع ذات الاهمية المرضية للانسان (palomino,2007).

جدول (1-1) يوضح تصنيف *M. tuberculosis*

Taxonomic level	Name
Kingdom	Bacteria
Phylum	Actinobacteria
Class	Actinobacteria
Subclass	Actinobacteridae
Order	Actinomycetales
Suborder	Corynebacterineae
Family	Mycobacteriaceae
Genus	<i>Mycobacterium</i>
	Unique genus
Species	<i>M. tuberculosis</i>
	<i>M. bovis</i>
	<i>M. africanum</i>
	<i>M. microti</i>
	<i>M. canetti</i>
	<i>M. caprae</i>
	<i>M. pinnipedii</i>

3.2 الصفات العامة لبكتريا *M. tuberculosis*

تكون بكتريا *M. tuberculosis* عصوية الشكل Rod shaped طولها من (2-4) مايكروليتر وعرضها (0.2-0.5) مايكروليتر، غير متحركة Non-motile، هوائية مجبرة Obligat anaerobic، محبة لدرجات الحرارة المعتدلة Mesophilic، حيث تنمو في 37 م (Murray et al., 2005; Todra, 2009). لا تحتوي على محفظة Non-capsulated، غيرمكونة للسبورات Non-sporeforming، ولكن هناك بحوث حديثة تشير إلى احتمال قدرة *M. marinum* وربما *M. bovis* على تكوين سبورات (Ghosh et al., 2009)، على كل حال هناك جدل بين العلماء في هذا الموضوع (Traag et al., 2010).

تعد هذه البكتريا طفيلية إجبارية داخل خلوية Obligat intracellular parasite. وعادة ما تصيب الخلايا أحادية النواة Mononuclear مثل الخلايا البلعمية Phagocytes. زمن انقسام *M.*

tuberculosis بطيء جدا مقارنة مع البكتريا الأخرى (التي تحتاج دقائق لانقسامها) اذ تنقسم هذه البكتريا كل 15-20 ساعة. تستطيع هذه العصيات الصغيرة تحمل المطهرات بتراكيز مخففة، وكذلك تحمل الجفاف لمدة أسابيع. و السبب الأساسي وراء قدره المقاومة لهذه البكتريا مكونات جدارها غير الاعتيادية الغنية بالدهون وتعد من عوامل الظراوه المهمه لهذه البكتريا (Murray et al.,2005;Todra,2009).

لا يمكن تصنيف بكتريا السل على أنها سالبة أو موجبة لصبغة كرام، وذلك عند تصبغها بالصبغة القاعدية لا يمكن إزالة الصبغة بواسطة القصر بالكحول. و تعتبر عصيات السل مقاومة للحوامض Acid fastness. فعند القصر 95% كحول اثلي يحتوي 3% الهيدوكلوريك سوف يقصر بسرعة جميع البكتريا عدا *M. tuberculosis*. وترجع صفة المقاومة للحموضة إلى ارتفاع نسبة المواد الشمعية وحامض المايكولك mycolic acid في جدارها الخارجي (Jawtz,2015).

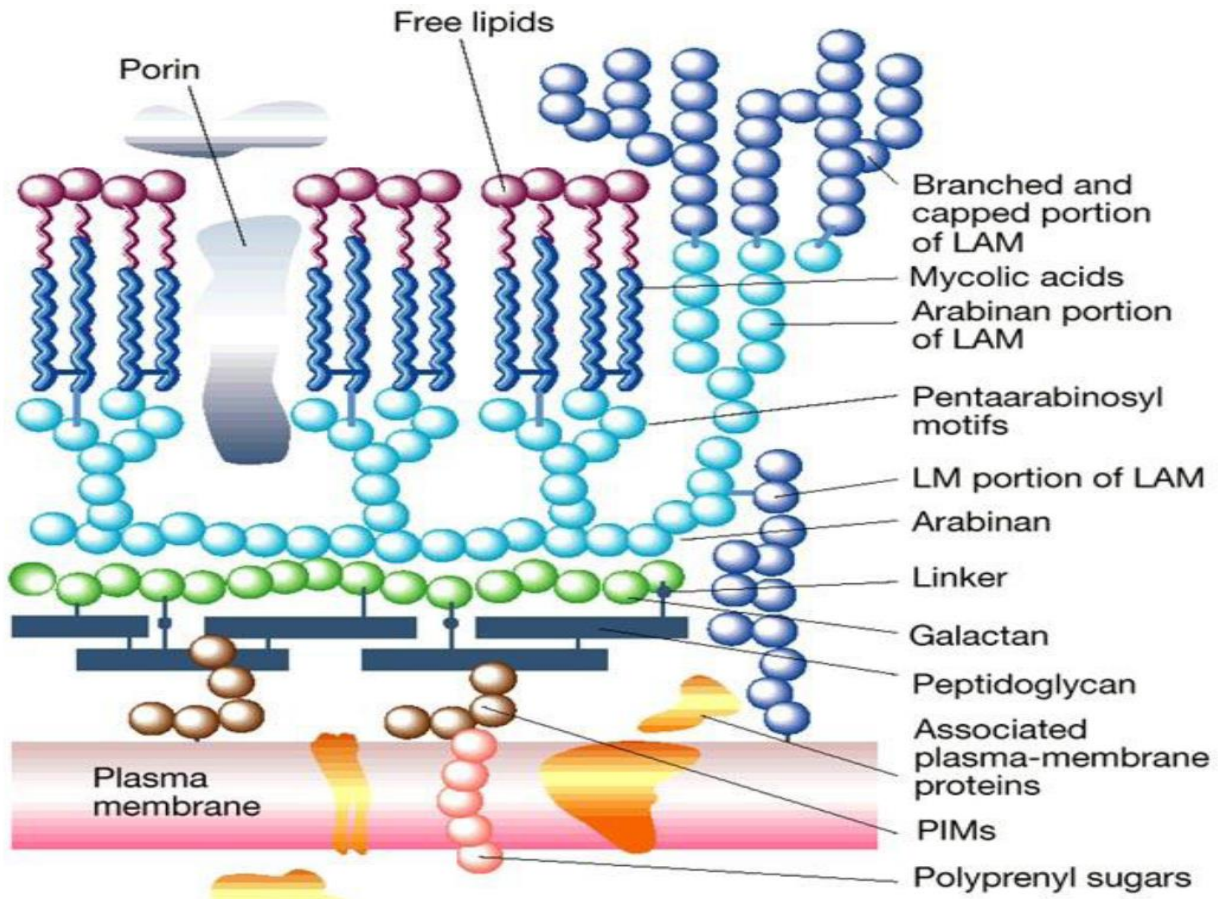
4.2 جدار الخلية Cell wall

يعد الجدار الخلوي من أهم الصفات المميزة لبكتريا *M. tuberculosis* الذي يعد ذو تركيب مميز من بين بدائيه النواة. يتكون من طبقات داخلية وخارجيه تتألف الطبقات الداخليه من الببتيدوكلايكان peptidoglycan وهذه الطبقات هي المسؤولة عن إعطاء الشكل الخاص للبكتريا ويمنع التحلل الازموزي للخلية. كما يختلف تركيب طبقات جدار هذه البكتريا عن التراكيب الشائعة في البكتريا الأخرى إذ يحتوي على مواد كيميائية خاصه بالإضافة إلى العدد الكبير من الأواصر الرابطه (Kim et al.,2014).

وهناك ثلاث عناصر مهمة تدخل في تركيب جدار بكتريا *M. tuberculosis* هي حامض المايكولك Mycolic acid والشمع-D Wax-D و عامل التجميع Corfactor. يشكل حامض المايكولك 50% من الوزن الجاف للخلية ويترسب بشكل قشرة دهنية حول البكتريا *M. tuberculosis* التي تزيد من حالة عدم النفاذية كما يجعلها تقاوم الشوارد الاوكسجينية الحره والإنزيمات الحالة داخل الخلايا البلعمية Macrophage. ان التركيب المميز لحامض Mycolic acid يعطي صفة مهمة للبكتريا تسمح في تميز العديد من أجناسها بواسطة تقنيات مختلفه مثل Gas liquid و High performance liquid و Thin-layer chromatography. هناك ثلاث أنواع من حامض المايكولك تختلف في محتواها من ذرات الكربون هي alpha و keto و methoxymycolotes (يحتوي على 76-82 و 84-89 و 83-96 ذرة كربون على التوالي).

يعد wax-D من المكونات الأساسية لجدار بكتريا السل (Bhamidi,2009)، حيث يعطي العديد من المميزات لهذه البكتريا مثل مقاومة المضادات الحيوية و عدم نفاذية غشاء الخلية للصبغات و مقاومة عوامل الاكسدة القاتلة و البقاء حية داخل الخلايا البلعمية macrophage و مقاومة العوامل الكيميائية مثل الأحماض بتراكيز معينة (Tadar, 2009) .

أما بالنسبة Corfacto يكون مرتبط بصوره اساسيه بعوامل ضراوه هذه البكتريا هو عامل سمي لخلايا الثدييات و يعد مثبط لكريات الدم الحبيبية (PMNS) (Ameeru addin, 2014). ويرجع العدد الكبير من الاواصر الرابطة في جدار البكتريا إلى بعض الدهون السكرية Glycolipid مثل Lipomannan(Lm) و Lipoarabin mannan(LAm) التي تثبت نفسها في الغشاء البلازمي من جهة وتمتد إلى داخل الجدار الخلوي من جهة أخرى. اما الطبقات الخارجية من الجدار الخلوي فإنها ترتبط مع الدهون الحرة كما مبين في الشكل (1-1) (Takayama et al.,2005).



شكل (1-1) يوضح الجدار الخلوي لبكتريا التدرن (Park and Bendelac,2000)

5.2 عوامل ضراوة بكتريا *M. tuberculosis*

تعد ضراوة بكتريا *M. tuberculosis* متنوعة ومعقدة جدا، وعلى الرغم من كون هذه البكتريا لا تنتج إي نوع من السموم، لكن يعود سبب الضراوة إلى خواص فيسيولوجية و تركيبية تمتلكها هذه البكتريا، التي هي معروفة في مساهمتها في ضراوتها وإمراضيتها (Jo,2008 ; Uematsu,2006). ومن هذه الخواص المهمة ما يلي :

1. الآليات الخاصة لدخول الخلية: Special mechanisms for cell entry: ترتبط

M. tuberculosis بصورة مباشرة مع مستقبلات المانوز Mannose receptor الموجودة على الخلايا البلعمية Macrophage بواسطة الشحوم السكرية glycolipid من نوع Lipoarabinomaunau ، وكذلك ترتبط بصورة غير مباشرة عن طريق مستقبلات الجزء المتبلور FC في جزيئه الأضداد و مستقبلات المتمم على سطح الخلايا البلعمية (Nigou et al.,2001;Kang et al.,2005).

2. النمو داخل الخلايا Intracellular growth: تنمو بكتريا *M. tuberculosis* داخل الخلايا،

وتعد هذه الخاصية من الطرق الفعالة لتجنب دفاعات الجهاز المناعي وخاصة الأجسام المضادة بالإضافة إلى بروتينات المتمم التي تكون غير فعالة في هذه الحالة، وعندما يتم بلعمة *M. tuberculosis* تتمكن من تثبيط اندماج الفجوة phagosome بالجسيم الحال lysosome، عندها إما أن تبقى داخل الفجوة أو خارجها، وفي كلتا الحالتين سوف تجد البكتريا البيئة الملائمة للنمو داخل الخلايا البلعمية (Haarding and Boom,2010).

3. معقد المستضد 85 Anrtigen 85 complex : هو معقد مكون من مجموعة من البروتينات،

التي تساعد في تكوين جدار يحمي بكتريا *M. tuberculosis* من الجهاز المناعي ويسهل تكوين درنات البكتريا (Bbennan,2003;Guinn et al .,2004).

4. بطئ زمن الجيل Slow generation time ونتيجة لبطئ زمن جيل بكتريا

M. tuberculosis، فلا يتم التعرف عليها بسرعة من قبل الجهاز المناعي، أو قد لا يتم تحفيز الجهاز المناعي بشكل كافي لأزالتها (Murray et al .,2005;Todar,2009).

6.2 إِمراضية بكتريا *M. tuberculosis*

يعد مرض السل من الأمراض المعدية، حيث ينتقل عن طريق استنشاق من (1-3) من القطيرات النووية droplet nuclei الحاوية على بكتريا *M. tuberculosis* والتي تطلق من شخص مصاب عند العطاس أو السعال، وتتحول إلى نوية القطيرة بعد جفافها. ويصل قطر القطيرة الواحدة إلى 5 مايكروميتر لذا يمكن أن تبقى في الهواء لمدة طويلة من الزمن، وإن كل قطيرة تحتوي ثلاث عصيات. فيمكن أن يتولد ما لا يقل عن 300 قطيرة عن طريق السعال، بينما يتولد نفس العدد من القطيرات عند الكلام لمدة 5 دقائق، أما عند العطاس فيتولد عدد هائل منها، وتستطيع أن تنتشر القطيرات على بعد 10 أقدام (Cambier et al., 2014 ; WHO, 2014).

ومن الضروري التمييز بين العدوى بمرض السل TB infection ومرض السل TB disease أمر ضروري، حيث أن الإصابة بمرض السل TB infection تعني وجود بكتريا *M. tuberculosis* داخل المضيف بغض النظر عن حدوث المرض من عدمه، بالحقيقة فإن 90-95% من الأشخاص المصابين لا تظهر عليهم أعراض وهذا ما يسمى بالتدرن الكامن Latent TB infection، وإن 5% فقط يتطور لديهم التدرن الفعال مباشرة بعد التعرض الأولي إلى بكتريا *M. tuberculosis* حيث تظهر عليهم أعراض مثل السعال والحمى وفقدان الوزن والتعرق ليلاً (Kumar et al., 2010). أن من العوامل التي تساعد على تنشيط الإصابة الكامنة هي نقص المناعة الناتجة عن التقدم بالعمر، وسوء التغذية بالإضافة إلى الإصابة بفيروس العوز البشري (Kumar et al., 2010).

وحال دخول القطيرات النووية الحاوية على بكتريا *M. tuberculosis* إلى رئتي الشخص المصاب، سوف تتحرك إلى داخل الخلايا البلعمية الموجودة في الحويصلات الرئوية وتتم داخل الخلايا البلعمية في فجوات محاطة بغشاء وهذا يمكن بكتريا *M. tuberculosis* تجنب التحلل بواسطة الجهاز المناعي لأن هذه الفجوات تمنع الارتباط مع الجسيمات الحالة Lysosomes، ولكونها داخل خلوية فأنها لا تتعرض إلى تأثير البروتيازات في الساييتوسول cytosolic proteasomes وتكون معرضة فقط إلى تأثير البروتينات الأقل فعالية الموجودة داخل هذه الحويصلات. وبعد هذه المرحلة تبدأ البكتريا بالتضاعف داخل الخلايا البلعمية macrophage بشكل متواصل وإن الموقع الأولي للإصابة في الرئة يسمى معقد Ghon focuse وهو يقع في الجهة السفلى من الفص العلوي للرئة (Kumar et al., 2007). يستمر تضاعف البكتريا داخل الخلايا البلعمية macrophage حتى تنفجر، وإن عدد من الخلايا الدم

وحيدة النوى البيضاء blood monocyte تترشح من الأوعية الدموية وتتمايز إلى خلايا بلعمية macrophage وتستمر عملية البلعمة ولكن من غير جدوى حيث تكون غير فعالة ولا يتم القضاء على البكتريا (Herrmann and Lagrange, 2005; mccann, 2009).

وبعد مرور ثلاث أسابيع من الإصابة تبدأ الخلايا للمفاوية التائية T cell التسلل إلى مواقع الإصابة ويبدأ تنشيطها بالتعرف على مستضدات بكتريا *M. tuberculosis* المعروضة عن طريق معقد التوافق النسيجي الثاني على سطح الخلايا البلعمية ونتيجة لهذا التنشيط سوف تقوم بإفراز العديد من الوسائط الالتهابية مثل gamma interferon (IFN) الذي يؤدي إلى تنشيط الخلايا البلعمية macrophage وعند تنشيطها يستطيع بالإمكان تحطيم البكتريا والقضاء عليها (Macmicking et al., 2003).

وفي هذه المرحلة يصبح الشخص موجب لاختبار الجلد skin testing نتيجة لدور الاستجابة المناعية الخلوية cell mediate immune (CMI). أن تنشيط الخلايا البلعمية وخلايا T-cell يؤدي أيضاً إلى إفراز العديد من الوسائط الالتهابية الأخرى مثل IL12, IL6, TNF وكمية من الحركيات الخلوية cytokines مثل IL-4, IL-10 أن عدم السيطرة على إنتاج الحركيات الخلوية يؤدي إلى ظهور الكثير من أعراض مرض السل مثل ارتفاع درجات الحرارة والهلاك (Van crevel et al., 2002). أما بالنسبة للاستجابة المناعية الخلوية Antibody mediate immune فهي غير فعالة ضد *M. tuberculosis* وذلك لأنها تنمو داخل الخلايا البلعمية، وكذلك لاحتوائها على كمية كبيرة من الدهون التي تقاوم المتمم (Ferguson et al., 2004; Dheda et al., 2005).

وفي هذه المرحلة تبدأ الدرنه بالظهور Tubercle formation يطلق على مركز الدرنه Necross caseation الذي يكون شبيه بالجبن الابيض الطري (Li et al., 2002)؛ (Rosenkandt et al., 2002). ولا تتمكن البكتريا من التضاعف بعد تكوين الدرنه وذلك لنقص الأوكسجين وانخفاض الرقم الهيدروجيني فتبقى البكتريا خاملة وهذا يؤدي إلى حدوث الإصابة الخاملة. نادراً ما يستطيع الجهاز المناعي إزالة البكتريا بشكل كامل حيث ممكن أن تبقى بكتريا التدرن لعدة سنوات إلى أن يتم تنشيطها. إن نسبة 5-10% من المرضى الذين تطور المرض لديهم إلى الشكل النشط لا يستطيع الجهاز المناعي إيقاف الالتهاب من خلال تكوين التكتلات الحبيبية Granuloma وتبدأ البكتريا بالتضاعف مع تكوين المزيد من التخر الكازيني وتكوين التجاويف وتدمير الأنسجة. وإن 80% من هذه الحالات تبقى محصورة داخل الرئة مع ظهور أعراض المرض وفي حالات نادرة غالباً ما

يكون في لأطفال والمرضى ذوي المناعة الضعيفة تتمكن البكتريا من الانتقال عن طريق الجهاز اللمفاوي إلى مجرى الدم الذي ينقلها إلى أجزاء أخرى من الجسم مسبب حدوث التدرن خارج الرئة extra pulmanary tuberculosis مما يؤدي إلى تكوين العديد من الدرنات في أنحاء مختلفة من أنسجة الجسم وإقامة بؤر عديدة فيها ونتيجة لهذا سوف يؤدي إلى تكوين نوع جديد من مرض السل يدعى بالسل الدخني Miliary tuberculosis وجاءت هذه التسمية بسبب كون انتشار بشكل يشبه حبة الدخن (CDC,2005). وحسب ما ذكرت منظمة الصحة العالمية 2005 فإن نسبة الوفيات تصل إلى 100% إذا لم يعالج في المرحلة الأولى، حيث يساعد العلاج المبكر على خفض نسبة الوفيات إلى 10%، يكون الإصابة بهذا النوع من السل أكثر شيوعا عند الرضع والمسنين (Golden and Vikram, 2005).

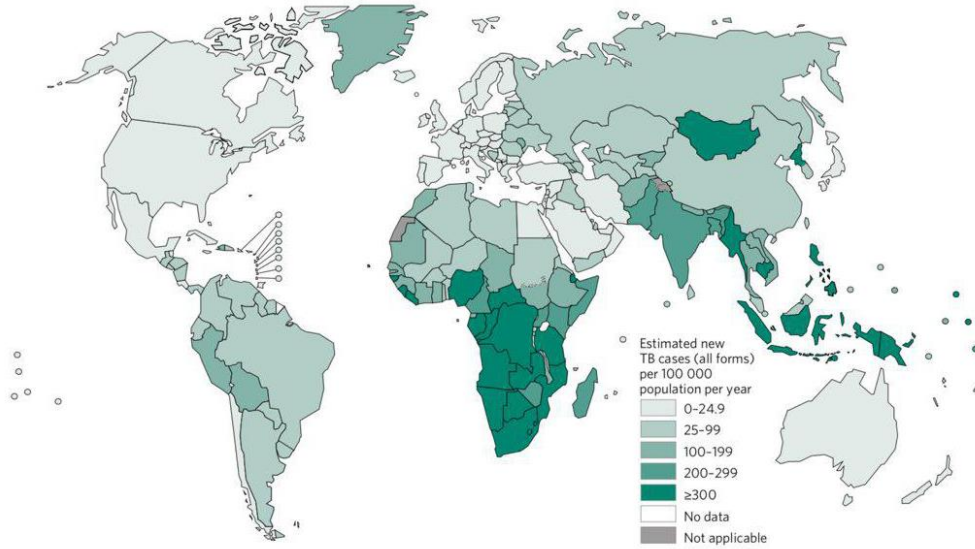
7.2 وبائية بكتريا *M. tuberculosis*

1.7.2 عالمياً

يعد السل من الأمراض شديدة العدوى المدمرة التي تصيب الرئة في المقام الأول. إذ يصنف السل على انه ثاني مرض يؤدي إلى حدوث وفيات بعد مرض الإصابة بفيروس العوز البشري وقد أعلنت منظمة الصحة العالمية في عام 1993 عن وجود حالة طوارئ عندما قدر حوالي 8 مليون حالة إصابة بالسل. ويقدر أن ثلث سكان العالم تقريباً مصاب بالسل وحوالي من 1.3-6 مليون حالة وفاة سنوياً (CDC, 2004). وقد سجل حوالي 8.7 مليون حالة إصابة بالسل وهي مقارنة إلى 125 حالة لكل 100,000 شخص عام 2011 (WHO,2012; CDC,2013; Bozzano et al.,2014).

أما في عام 2015، فقد أصيب 10.4 مليون شخص بالسل وتوفي 1.8 مليون شخص آخر من جراء هذا المرض (من بينهم 0.4 مليون شخص مصاب بفيروس العوز البشري) وان نسبة 95% من الوفيات تحدث في البلدان المتوسطة والمنخفضة الدخل. وكذلك قدر إصابة مليون طفل في السل وتوفي 170,000 طفل جراء هذا في عام 2015. وتتصدر الهند وإندونيسيا والصين ونيجيريا وباكستان وجنوب إفريقيا 60% من حالات الإصابة (WHO,2016).

معظم الأعداد المقدرة في حالة الإصابة بالسل لسنة 2015 تقع في آسيا بنسبة 61% و إفريقيا 26% وبنسبة قليلة في مناطق الشرق الأوسط حوالي 7%، أما في أوروبا وأمريكا تحدث بنسبة 3% كما في الشكل (2-1) (WHO,2015).



الشكل (2-1) يوضح معدل حالات الإصابة بالعدوى لعام 2015 (WHO,2016)

يقدر معدل انخفاض الإصابة بالسل بنسبة 1.5% سنويا منذ عام 2000. وينبغي تسريع هذه النسبة لتبلغ من 5-9% سنويا. من اجل تحقيق المهمة المستهدفة بلوغها لعام 2020 بموجب إستراتيجية دحر العدوى. تم إنقاذ ما يقدر بحوالي 49 مليون من الأرواح عن طريق تشخيص السل وعلاجه للفترة من عام 2000 إلى 2015 ويعد القضاء على وباء العدوى بحلول 2030 من بين الغايات التي تنص عليها أهداف التنمية المستدامة التي اعتمدها منظمه الصحة العالمية مؤخرا (WHO,2016).

تعد الإصابة بفيروس العوز البشري من أكثر عوامل الخطورة للإصابة بمرض العدوى، نتيجة لتدهور مناعة الأشخاص المصابين بهذا الفيروس وتكون احتمال الإصابة بمرض السل كبير جدا عند التعرض للبكتيريا او تنشيط المرض لدى الأشخاص ذوي الإصابة الكامنة (American Lung Assbciation,2013). حيث سجلت حوالي 360,000 من 1.5مليون حالة وفاة لدى أشخاص مصابين بفيروس العوز البشري في عام 2013 (Programme, 2014).

2.7.2 العراق

تعد وبائية الإصابة بمرض السل في العراق عالية، حيث صنف ضمن أعلى 44 دولة التي سجلت الإصابة فيها بالسل (WHO,2002) وسابع دولة من بين مناطق الشرق الأوسط حيث يشكل 3% من مجموع عدد الحالات المسجلة، ويقدر عدد المرضى المصابين بالعراق بنحو 20 ألف مريض. وتقدر الوفيات الناجمة عن السل بحوالي 9000 شخص سنويا (WHO,2004). ويلاحظ في الشكل (2-3) وبائية مرض التدرن في العراق ولغاية عام 2014 وحسب آخر تقدير لمنظمة الصحة العالمية المنشورة عام 2016 (WHO,2016) .

Population 2015 36 million

Estimates of TB burden*, 2015	Number (thousands)	Rate (per 100 000 population)
Mortality (excludes HIV+TB)	0.86 (0.018 3.3)	2.4 (0.05 8.9)
Mortality (HIV+TB only)	<0.01 (<0.01 <0.01)	0.02 (0.01 0.02)
Incidence (includes HIV+TB)	16 (14 18)	43 (38 49)
Incidence (HIV+TB only)	0.016 (0.012 0.02)	0.04 (0.03 0.05)
Incidence (MDR/RR-TB)**	1.2 (0.88 1.5)	3.3 (2.4 4.1)

Estimated TB incidence by age and sex (thousands)*, 2015			
	0-14 years	> 14 years	Total
Females	1 (0.7 1.3)	7.1 (5.8 8.4)	8.1 (6.5 9.8)
Males	0.81 (0.57 1)	6.8 (5.3 8.2)	7.6 (5.9 9.3)
Total	1.8 (1.4 2.2)	14 (13 15)	16 (14 18)

TB case notifications, 2015	
Total cases notified	8 255
Total new and relapse	8 183
- % tested with rapid diagnostics at time of diagnosis	
- % with known HIV status	51%
- % pulmonary	61%
- % bacteriologically confirmed among pulmonary	59%

Universal health coverage and social protection	
TB treatment coverage (notified/estimated incidence), 2015	52% (46 59)
TB patients facing catastrophic total costs	
TB case fatality ratio (estimated mortality/estimated incidence), 2015	0.06 (0 0.21)

TB/HIV care in new and relapse TB patients, 2015	
Patients with known HIV-status who are HIV-positive	0 0%
- on antiretroviral therapy	0

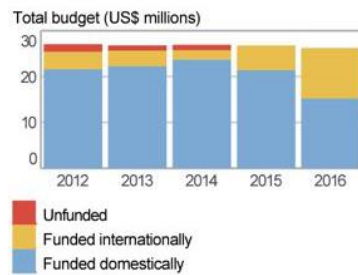
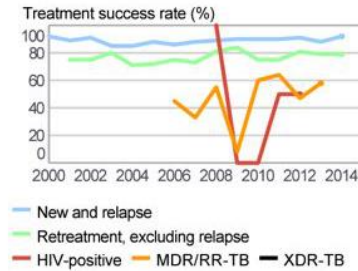
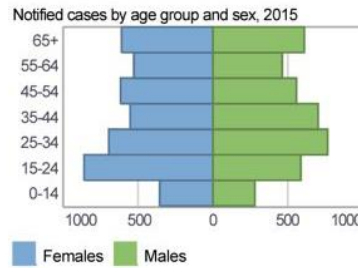
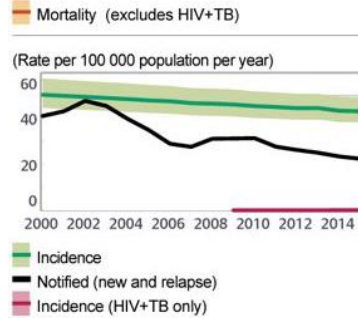
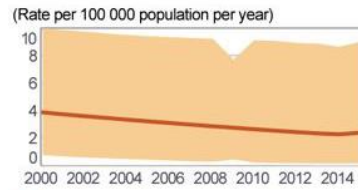
Drug-resistant TB care, 2015			
	New cases	Previously treated cases	Total number***
Estimated MDR/RR-TB cases among notified pulmonary TB cases			400 (310 490)
Estimated % of TB cases with MDR/RR-TB	6.1% (4.4 7.8)	24% (16 32)	
% notified tested for rifampicin resistance	1%	25%	279
MDR/RR-TB cases tested for resistance to second-line drugs			
Laboratory-confirmed cases		MDR/RR-TB: 93, XDR-TB:	
Patients started on treatment ****		MDR/RR-TB: 73, XDR-TB:	

Treatment success rate and cohort size		
New and relapse cases registered in 2014	92%	8 268
Previously treated cases, excluding relapse, registered in 2014	79%	73
HIV-positive TB cases, all types, registered in 2014		0
MDR/RR-TB cases started on second-line treatment in 2013	58%	84
XDR-TB cases started on second-line treatment in 2013		

TB preventive treatment, 2015	
% of HIV-positive people (newly enrolled in care) on preventive treatment	
% of children (aged < 5) household contacts of bacteriologically-confirmed TB cases on preventive treatment	100% (100 100)

TB financing, 2016	
National TB budget (US\$ millions)	26
Funding source: 58% domestic, 42% international, 0% unfunded	

* Ranges represent uncertainty intervals
 ** MDR is TB resistant to rifampicin and isoniazid; RR is TB resistant to rifampicin
 *** Includes cases with unknown previous TB treatment history
 **** Includes patients diagnosed before 2015 and patients who were not laboratory-confirmed



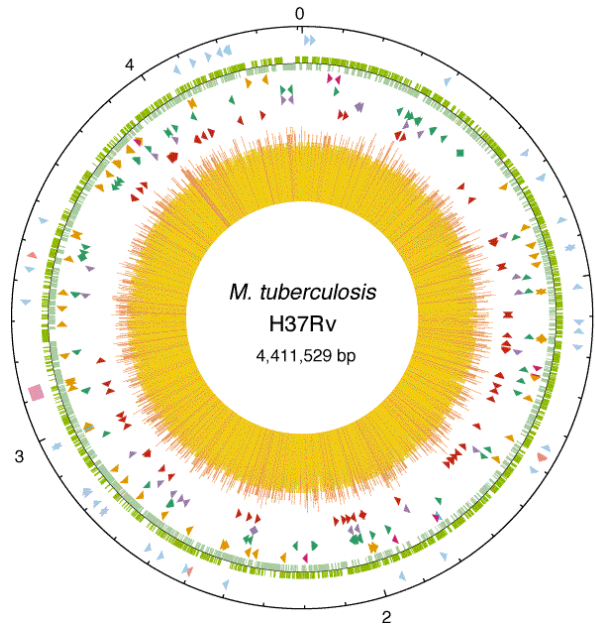
الشكل (3-1) يوضح وبائية السل في العراق

***Mycobacterium tuberculosis* complex 8.2**

معظم أنواع *Mycobacterium* تحلل المواد العضوية، وتكون بيئتها الطبيعية والأساسية التربة والمياه. وفي مسار التطور تحولت بعض أنواع *Mycobacterium* إلى بكتريا مرضية. وتعد *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) هي من بين أنواع البكتريا المرضية المهمة وخاصة *M. tuberculosis* و *M. bovis* وتختلف أنواع (MTBC) في أمراضها ومضائفها وخصوصاً بين *M. tuberculosis* و *M. bovis* و *M. microit* و *M. african* (Somokovi,2000).
تعد *M. tuberculosis* و *M. african* و *M. canettii* ممرضة للإنسان أما *M. microti* فأنها تصيب القوارض بصورة رئيسية، بالإضافة إلى *M. bovis* فأنها تصيب الإنسان والحيوان (ماشية، ماعز، فيلة، غزلان، القطط) على الرغم من أن إصابتها للحيوان تكون أكثر (Schluger,2001).
وان للطرق الجزيئية الحديثة دور في توضيح الاختلاف بين أنواع *Mycobacterium tuberculosis* complex (Danid,2004;Tanja et al., 2006).

9.2 المكون الوراثي لبكتريا *M. tuberculosis*

تم نشر المكون الوراثي الكامل Complete genome لبكتريا *M. tuberculosis* في عام 1998، وقد تبين انه حلقي الشكل ويتألف من 4.4 مليون زوج قاعدي يحتوي على حوالي 4000 موروث gene كما في الشكل (4-1) (Sala et al., 2009).



الشكل (4-1) يوضح الخريطة الكروموسومية لبكتريا *M. tuberculosis*

يعد المكون الوراثي لبكتريا *M. tuberculosis* ذو نسبة مرتفعة من القواعد النايتروجينية GC حيث تشكل نسبة 65.6% وهذا النسبة تمتاز بها عادةً الكائنات بدائية النواة الهوائية aerobic prokaryotes. وفي السنوات الأخيرة تم دراسة وظيفة 2058 من هذه الموروث أي ما يعادل 52% من الموروثات التي يحملها المكون الوراثي للبكتريا، وبينت الدراسة ان هذه البكتريا تمتلك جميع الجينات الضرورية لبناء الحوامض الامينية والفيتامينات والمرافقات الانزيمية enzym cofactors، وقد اوضحت الدراسات ايضاً ان هناك نسبة عالية من هذه الموروثات تشفر انزيمات تدخل في عملية تخليق وتحليل الدهون lipolysis, lipogenesis (Camus et al., 2002).

تمتلك المادة الوراثية DNA لبكتريا *M. tuberculosis* العديد من العناصر التكرارية repetitive DNA sequences ومن هذه العناصر عدة أنواع من تتابعات الغرس insertion sequences (IS) ومناطق التكرارات المباشرة direct repeat region (DR) والتتابعات المترادفة التكرارية الرئيسية Major polymorphic tandem repeats (MPTR) و التتابعات التكرارية المتغايرة الغنية بالكوانين والساييتوسين Polymorphic GC-rich repetitive sequence (PGRS)، وتعد الموروثات الواقعة ضمن منطقة PGRS و MPTR مرتبطة بالتنوع المستضدي Antigenic variability وضرواه هذه البكتريا (Cole et al., 1998; Karboul et al., 2006).

كشفت تحليل المكون الوراثي للعزلات المختبرية من العينات السريرية لبكتريا *M. tuberculosis* تماثل في تسلسل القواعد بدرجة عالية Sequence homogeneity. وقد اوضح الدراسة ان نسبة التشابه في تسلسلات الحامض النووي لهذه البكتريا اكبر من 99.9% وهذه التسلسلات المتشابهة تقع حتى ضمن الانواع المختلفة في مجموعه MTBC، حيث لا تتجاوز نسبة الاختلاف في تسلسل الحامض النووي DNA بين بكتريا *M. tuberculosis* و *m. bovis* 0.05% فقط (Magee et al., 2014).

أوضحت الدراسة التي أجراها Cole عام 1994 على المكون الوراثي لبكتريا *M. tuberculosis*، امتلاك البكتريا القدرة على الانتقال بين المسارات الأيضية حيث تحول من المسار الهوائي الفسفرة التاكسدية Oxidative phosphorylation إلى المسار اللاهوائي المعتمد على اختزال النترات Nitrate reduction. إن هذه المرونة في المكون الوراثي هي مهمة في المحافظة على بقاء *M. tuberculosis* عند تغير الظروف البيئية داخل جسم الإنسان من الظروف الهوائية داخل الحويصلات الهوائية الرئوية حيث يكون الأوكسجين متوفر بكثرة إلى الظروف اللاهوائية أو قليلة

الأوكسجين micro aerophilic الموجودة داخل تكيسات الرئة. ومن المميزات الأخرى للمكون الوراثي لهذه البكتريا هي وجود موروثات التي تساهم في بناء وتحطيم جميع أنواع الدهون من الحوامض الدهنية البسيطة إلى الجزيئات المعقدة مثل المايكولك. وإجمالاً هناك موروثات تشفر إلى 250 إنزيم معروف يساهم في المسارات الأيضية للحوامض الدهنية fatty acid.

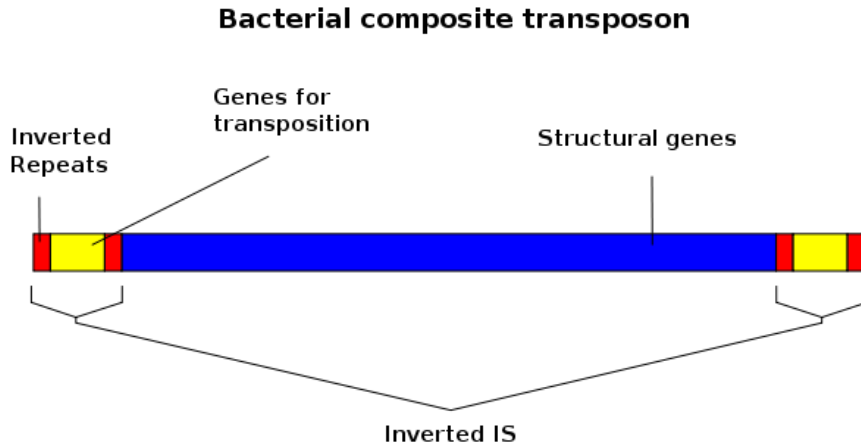
ومن بين عوائل الموروثات المشفرة للبروتين والمثيرة للاهتمام الموجودة في المكون الوراثي لبكتريا التدرن، موروثات PE،PPE التي تشكل حوالي 10% من المكون الوراثي لها وهذا الاسم اشتق من تسلسلات الحوامض الأمينية التي يشفر لها هذا الموروث مثل PE الذي يحتوي تسلسل Pro-Glu- وPPE يحتوي Pro-Pro-Glu ويعتقد ان لهذا البروتين دور مهم في الحفاظ على بقاء هذه البكتريا حية ويحافظ على استمرار تضاعف البكتريا ضمن مختلف البيئات (Marri et al.,2006).

ووجد 50 موروث يشفر إلى الحامض النووي الريبوسومي الوظيفي Functional ribose nucleic acid (mRNAs) (Kempsell et al.,1492). وهناك أوبرون operon واحد فقط يشفر للحامض النووي الريبوسومي ribosomalRNA (rRNA)، وان هذا الأوبرون يقع على بعد 1500 زوج قاعدي من منشا التكرار Ori locus وقد افترض أن هذا العامل يساهم في بطئ نمو عصيات *M. tuberculosis* (Brosch et al.,2002)، وقد كشفت الدراسات الجزيئية لسلاسل *M. tuberculosis* H37RV المعزولة من العينات السريرية ندره حدوث التغيرات الشكلية أحادية النيوكليوتيدية Single Nucleid poly morphohism وان كميات الحذف والإضافة insertion and deletion هي مصدر أساسي للتغير وتنشأ عمليات الحذف والإضافة بواسطة تتابعات الغرس والزيادة أو النقصان في تتابعات الدنا التكراري أو من أخطاء التكرار (Fleischmann et al.,2002).

10.2 عنصر الغرس insertion sequence

عنصر الغرس insertion sequence عبارة عن قطع قصيرة من الحامض النووي DNA لها القدرة على الانتقال من موقع لأخر على DNA (لذلك يطلق عليه أيضاً تسلسلات العناصر الانتقالية) يمتلك عنصر الغرس ميزتين مهمتين، انه صغير نسبياً مقارنة مع العناصر الانتقالية الأخرى (الذي يشكل طوله حوالي من 700 إلى 2500 زوج قاعدي)، وانه يشفر فقط إلى البروتينات التي تشارك في عملية النقل الفعال لهذا العنصر وهذا يختلف عن العناصر الانتقالية التي تحمل أيضاً موروثات إضافية مثل موروثات المقاومة للمضادات الحياتية. وهذه البروتينات المشفرة عادة هي بروتين الغرس transposase

الذي يقوم بتحفيز التفاعلات الإنزيمية التي تمكن حركة عنصر الغرس IS، وكذلك البروتينات التنظيمية regulatory protien التي تقوم بتنشيط او تثبيط فعالية الانتقال، وتكون هذه المناطق المشفرة من عنصر الغرس محاطة بالتتابعات الطرفية المعكوسة كما في الشكل (5-1) .
(Mahillon *et al.*, 1998; Campbell *et al.*, 2002; prescott *et al.*, 2002; Shulter *et al.*, 2002).



الشكل (5-1) يوضح دور تتابعات الغرس في تكوين العناصر الانتقالية في (wikipedia,2010b).

يصنف تتابع IS6110 ضمن عائلة IS3 Family لأنه يحتوي على تسلسلات تكرارية مشابه لتلك التسلسلات الموجودة ضمن هذه العائلة .

(Timmerman and Tu,1985;Lshiguro and Sota,1988)

يظهر عنصر الغرس IS6110 تماثلاً لتتابعات الغرس العائدة لعائلة IS3 حيث يكون طوله 1361 زوج قاعدي وتحتوي تتابعات مقلوبة غير تامة مؤلفة من 28 زوج قاعدي ، وعند طرفيه تحتوي على 3 مواقع لتطابق خاطئ ويحتوي كذلك تكرار مباشر من 3 أزواج قاعدية يحتمل أنها نشأت من تكرار التتابع الهدف . عديد النيوكلوويد المستخرج من هذا التتابع يستخدم للكشف عن بكتريا السل في العينات السريرية بعد إكثار DNA (MCAdam *et al.*,1990)

تم وصف عنصر الغرس IS6110 لأول مرة في بكتريا *M. tuberculosis* عام 1995 (Thierry *et al.*, 1995) و ان هذا العنصر موجود في المكون الوراثي لباقي الأنواع في مجموعه *Mycobacterium tuberculosis complex*. وهذا يدل على أن *M. tuberculosis* قد ورثت عنصر الغرس هذا من أسلافها من الكائنات الحية. وقد كشفت الدراسات الجزيئية لتحليل المكون الوراثي بان هناك 16 نسخة من عنصر الغرس IS6110 وهي موزعة بصورة غير متساوية عبر الكروموسوم

وهذا بدوره يقود إلى أن عنصر الغرس يهاجر بعيد عن منطقة DR بواسطة تضاعف عنصر الغرس (philipp *et al.*,1996).

أن الاختلاف في عدد نسخ عنصر الغرس IS6110 المعزول من العينات السريرية بالإضافة إلى الطبيعة العشوائية المفترضة لانتقال هذا العنصر وهذا قاد إلى إنشاء نظام موحد لبصمة الحامض النووي لبكتريا *M. tuberculosis* وذلك لتصنيف العزلات السريرية لبكتريا التدرن وفي التحاليل المتعلقة بالدراسة الوبائية لهذه البكتريا (Van Embden *et al.*,1993; Soolingen *et al.*,1994).

إن عدد عنصر الغرس IS6110 الموجود في المكون الوراثي يعتمد على النوع وعلى السلالة إذ إن معظم سلالات التدرن تحمل ما بين من 1-25 نسخة من هذا العنصر على مواقع مختلفة من المكون الوراثي على الرغم من تسجيل سلالات عديدة ذات نسخة واحدة (Sreevatasan *et al.*,1997).

11.2 علاج التدرن

قبل اكتشاف عصيات التدرن *M. tuberculosis* كان يعالج مرض التدرن في المنزل إذ لم يكن هناك علاج فعال له فاستعملت الزيوت والأعشاب واعتمد العلاج أن ذاك على قدرت الجهاز المناعي ومقاومة المريض للمرض وبعد اكتشاف *M. tuberculosis* من قبل العالم كوخ أوصى الأطباء بنقل المرضى إلى مناطق ذات مناخ معتدل وهواء نقي ومنذ ذلك الوقت أصبح علاج مرض السل في المصحات (Hurt,2002). إذ توفر المصحات الغذاء الصحي وسبل الراحة والتهوية الجيدة وانتشرت المصحات والحجر في أمريكا الشمالية وأوروبا وقد بني أول مصح في ألمانيا عام 1850 حيث طور هذه الفكرة من قبل برايمر هيرمان بعد أن تم شفائه خلال الانتقال إلى المناخ الجيد في جبال الهملايا (Condrau,2001). بعد ذلك وقبل ظهور الأدوية في علاج مرض التدرن استعملت العمليات الجراحية حيث يتم استئصال الجزء الرئوي المصاب بالمرض، أما في الوقت الحاضر فلا تستخدم العمليات الجراحية إلا في بعض حالات التدرن المقاوم للأدوية (Naidoos Reddi,2005).

وتم اكتشاف لقاح هذا المرض على يد العالمان Gurin & Calmette والذي اطلق عليه Bacillei-Calmette-Guerin وهو عبارة عن لقاح مضعف live attenuated vaccine مشتق من *M. bovis* تستعمل في تحفيز الجهاز المناعي لمنع انتشار بكتريا *M. tuberculosis* في المضائق الملقحة (Nicholes *et al.*,2006). وان هذا اللقاح غير فعال للبالغين حيث انه يستخدم في السنوات الأولى من عمر الطفل للوقاية من مرض التدرن (Kany *et al.*,2005).

يعد اكتشاف مضاد streptomycin من قبل العالمان Waksman & Schats عام 1944 الثورة الحقيقية في علاج مرض التدرن، وقد انتشر الدواء بصورة سريعة وخاصة في الولايات المتحدة ولسوء الحظ لم يستمر لفترة طويلة. نتيجة لاستخدام هذا المضاد لوحده لفترة طويلة في علاج المرض أدى إلى حدوث طفرة في بكتريا *M. tuberculosis* جعلها مقاومة لهذا المضاد ، فضلا عن حدوث ضرر في العصب القحفي الثامن عند الاستخدام الطويل لهذا المضاد. فيما بعد تم اكتشاف العديد من المضادات لعلاج مرض التدرن وقد استخدم أكثر من مضاد لتقليل المقاومة البكتيرية (Gillespie,2006).

يقسم علاج مرض التدرن إلى مستويين رئيسيين، المستوى الأول First line الذي يتكون من أربع مضادات Isoniazid , Rifampicin , Ethambutol , Pyrazinamide وقد يعطى بطورين أو برنامجين طور أولي مكثف يعطى أولاً ثم يتبع بطور القضاء. ويرمز له بالشكل الأتي 2HREZ/4HR3 الذي يعني إعطاء مضاد Isoniazid و Rifampicin و Ethambutol و Pyrazinamid يوميا ولمدة شهران وهو الطور الأولي ومن ثم يعطى Rifampicin, Isoniazid ثلاث مرات أسبوعياً لمدة أربعة أشهر (Edwards Nardell,2009).

ونتيجة لزيادة انتشار بكتريا *M. tuberculosis* المقاوم لمضادات الخط الأول ظهرت الحاجة لمضادات جديدة، فظهرت مضادات الخط الثاني second line والتي هي مشتقة من أنواع عديدة من المضادات مثل Streptomycin, Ciprofloxacin, Capreomycin, Ethionamid، D-cycloserine, Amikacin, Aminosalicylic acid والجدول (1-2) يوضح مضادات الخط الاول والثاني (Kolyva and karakousis,2012).

الجدول (1-2) يوضح مضادات التدرن وسنه الاكتشاف

Drugs	Discovery Year	Target	Activity
First-Line available drugs			
Rifampicin	1963	RNA Polymerase	Bactericidal
Isoniazid	1952	Cell wall	Bactericidal
Pyrazinamide	1952	Ribosome	Bactericidal
Ethambutol	1962	Cell wall	Bacteriostatic
Second-Line available druge			
Streptomycin	1944	Ribosome	Bactericidal
Ciprofloxacin	1987	DNA ayrase	Bactericidal
Capreomycin	1960	Ribosome	Bacterostatic

Ethionamide	1956	Cell wall	Bacteriostatic
Aminosalicyclic acid	1949	ThyA gene	Bacteriostatic
Amikacin	1970	rRNA	Bactericidal
D-Cycloserine	1955	Cell wall	Bacteriostatic

أما بالنسبة لعلاج مرض التدرن الكامن يستخدم العلاج الوقائي وهو عبارة عن إعطاء Isoniazid لمدة 9 أشهر وهذه فترة طويلة أو قد يعطى Isoinozid، Rifampicin، ولمدة 3 أشهر وهذا يكون مكافئ في التأثير لنظام 9 أشهر (Sterling et al.,2011).

12.2 برنامج العلاج قصير الأمد تحت الإشراف المباشر

بذلت منظمة الصحة العالمية جهود كبيرة من خلال تنفيذ إستراتيجية العلاج تحت الإشراف المباشر (DOTS) Directly observed therapy short – course هو مصطلح يطلق على إستراتيجية الشاملة والتي خدماتها الصحية منتشرة في جميع أنحاء العالم وهدفها الكشف عن مرض التدرن وعلاجه. وكجزء من إستراتيجية (DOTS) ويجب على العاملين الصحيين مراقبه وإرشاد مرضاهم عند تناولهم لكل جرعة دواء وكذلك مراقبة مدى تقدم حالة المريض حتى يشفى ويجب أن يستمر الإشراف لمدة شهرين ومن الناحية المثالية يجب أن يستمر 6 أشهر (WHO,1995).

أن السبب الرئيسي لنجاح هذه الإستراتيجية يكمن في عدم جعل المريض هو المسؤول عن اخذ العلاج والوصول للشفاء. إذ جعلت المسؤولية على المشرفين الصحيين، وذلك لأنه بعد عدة أسابيع من اخذ الدواء يشعر المريض بالتحسن فيتوقف عن اخذ العلاج وفي الحقيقة أن التخلص من عصيات *M. tuberculosis* يتطلب وقت طويل يستغرق عدة أشهر (Klaudt,1996).

طبقت هذه الإستراتيجية في العراق عام 1998 في مراكز قليلة ثم تم تعميمها لجميع المحافظات باستثناء إقليم كردستان حتى عام 2008 حيث شملت إقليم كردستان أيضاً (NTP,2011).

13.2 مقاومة بكتريا *M. tuberculosis* المتعددة لمضادات التدرن

بعد فترة قصيرة من استخدام العلاج ضد البكتريا *M. tuberculosis* (مثل Isoniazid و Stryptomycin و Para-aminsalicyclic) ظهرت المقاومة لهذا العلاج في البكتريا المعزولة من العينات السريرية (Raba et al.,2006)، ومن هنا ظهرت الحاجة إلى قياس ومراقبة المقاومة للمضادات وبدقة. وقد أظهرت الدراسات التي أجريت عام 1960 في بلدان مختلفة، إن الدول النامية كانت لديها نسبة الإصابة بالتدرن المقاوم للمضاد عالية (Espinal,2003).

وبعد ظهور علاج Rifampicin في نهاية عام 1960 و استخدامه مع خليط من مضادات أخرى في علاج مرض التدرن، فقد انخفضت نسبة المقاومة للمضادات في البلدان النامية. وبعدها انخفضت تمويل هذه الدراسات إذ لم يكن هناك رصد ملموس خلال 20 سنة التالية (Espinel,2003) وبعد ظهور الإصابة بمرض نقص المناعة المكتسب (HIV) زادت نسبة الإصابة بكتريا *M. tuberculosis* المقاوم للأدوية المتعددة (MDR-IB) وفي بداية التسعينات تم معاودة إجراء الدراسات في البلدان النامية لكن لم تكتمل المعلومات بشكل واضح عن بكتريا التدرن المقاومة (Cohn et al.,1997).

ويعرف (MDR-TB) على انه سلالات بكتريا *M. tuberculosis* التي تكون مقاومة على الأقل إلى اثنين من المضادات الحياتية على أن يكون Isoniazid و Rifampicin من ضمنها. وان البكتريا التي تكون مقاومة لأي مجموعة أخرى من الأدوية عدا Isoniazid ,Rifampicin لا تصنف على أنها MDR-TB (CDC,2013). أما بكتريا التدرن الشديدة المقاومة للمضادات Extensive drug resistance هي نوع نادر نسبيا من البكتريا المقاومة وتعرف على أنها البكتريا المقاومة لمضادات Rifampicin و Isoniazid بالإضافة إلى Fluoro quinalone وعلى الأقل واحد من مضادات الخط الثاني التي تشمل amikacin -kanamycin -capreamycin (Kolyva and kara kousis,2012). في حين وصفت المقاومة المفرطة للمضادات الحياتية Xtremelly-Drug resistant (EXDR) بأنها نقطة نهاية مقاومه البكتريا للمضاد وتعرف على أنها سلالات البكتريا إلى تكون مقاومة للمضادات الخط الأول والثاني (Andrews,2007).

كما يمكن تصنيف مقاومة البكتريا إلى مقاومة أولية ومقاومة مكتسبة أن إصابة المريض ببكتريا التدرن الحساسة للمضاد و تحولت لاحقا إلى مقاومة نتيجة التخلي عن العلاج قبل الفترة المحددة أو لأي سبب آخر تسمى المقاومة أولية. أما المقاومة المكتسبة هي إصابة الشخص السليم ببكتريا مقاومة للمضاد من شخص آخر مصاب بالتدرن المقاوم للعلاج، ويمكن أن يحدث هذا في الملاجئ والمستشفيات والسجون (Maryann et al.,1996). من أهم أسباب ظهور التدرن متعدد المقاوم طول فترة العلاج بمضادات الخط الأول وخاصة Rifampicin ,Isoniazid والتي تصل من 6 إلى 9 أشهر، عدم الانتظام في اخذ العلاج حيث يأخذ بشكل متقطع أو أن الأطباء يصنعون علاج لا يلائم المريض، أو عند نقص المناعة نتيجة الإصابة بفيروس العوز المناعي HIV (CDC,2010).

إن علاج التدرن المقاوم للأدوية ليس بالأمر السهل وذلك لكون مضادات الخط الثاني غير آمنة حيث تكون أكثر سمية من مضادات الخط الأول ولها أضرار جانبية خطيرة بالإضافة إلى التكلفة العالية الثمن. وتحتاج إلى برنامج متخصص يتكون من إعطاء على الأقل أربع مضادات من مضادات الخط الثاني ولمدة 8 أشهر (Sterling *et al*., 2011). وهنا يكون دور برنامج DOST مهم للغاية خلال فترة العلاج. ويجب أن يستمر اخذ العلاج عن طريق الفم لمدة عامين حتى يتم الحصول على نتيجة فحص قشع سالبة من مختبرات موثوق بها (Iseman *et al*., 2007; Kharsany *et al*., 2009).

14.2 مقاومة العلاج على الصعيد العالمي والعراق

بعد ظهور تهديد المقاومة الدوائية لمرض التدرن بدأت منظمة الصحة العالمية (WHO) بعد عام 1994 بمشروع المراقبة العالمي للمقاومة الدوائية وذلك (WHO, 2012). وفي عام 1997 نشر أول تقرير والذي يتضمن 35 منطقة جغرافية للفترة من (1994-1996) (WHO, 1997; Poblos-Mendez *et al*., 1998). وأوضح هذا التقرير بان مقاومة التدرن للمضاد موجودة عالميا وان نسبة MDR-TB تتراوح من 0-14% في حالات الإصابة الجديدة ومن (0-54) في حالات الإصابة بالتدرن المعالج مسبقا (Tukvadze *et al*., 2012).

على الرغم من الجهود الواسعة لمنظمة الصحة العالمية لتنفيذ إستراتيجية دحر التدرن لازال يعد مشكلة صحية رئيسية (WHO, 2008). وفي عام 2015 قررت منظمة الصحة العالمية ان هناك 3.9% من الحالات الجديدة و 21% من الحالات المعالجة مسبقا مصابة بالتدرن المقاوم المتعدد وكذلك المقاوم للمضاد Rifampicin (MDR/RP-TB) وقد أصيب ما يقدر بنحو 480,000 شخص بالتدرن المقاوم للأدوية المتعددة على الصعيد العالمي وفضلا عن ذلك نشأت مقاومة Rifampicin (أكثر أدوية الخط الأول فعالية) لدى 100,000 شخص تقريبا واحتاجوا إلى علاج التدرن المقاوم للأدوية المتعددة. ويقع عبئ التدرن المقاوم للأدوية المتعددة في 3 بلدان هي الهند والصين والاتحاد الروسي التي تشهد معا نصف الحالات الموجودة في العالم تقريبا. وفي عام 2014 تم الانتهاء من أول مسح للمقاومة الدوائية في العراق وأظهرت نتائج المسح أن مستويات المقاومة المتعددة للعلاج كانت منخفضة (1.1) لكنه بحاجة إلى رصد وذلك لان نسبة مقاومة مضاد

Rifampicin و Isoniazid كانت مرتفعة إذ تقدر بحوالي 7.6% و 5.9 على التوالي.(WHO,2015).

15.2 الآلية الجزيئية لمقاومة بكتريا *M. tuberculosis*

. إن دراسة وفهم المكون الوراثي لمختلف السلالات يساعدنا في معرفة آلية مقاومة البكتريا للعلاج (MDR-TB) وهذا يساعدنا في إتباع نهج جديد في تشخيص و تقديم علاج أفضل للمرض (Morgan et al., 2005; WHO,2013)

إن الاستخدام الغير منتظم للعلاج من قبل المريض ساعد على تطور ظهور سلالات البكتريا المقاومة نتيجة لوجود الضغط وحدوث طفرات كروموسومية في الموروثات المشفرة للهدف الذي يعمل عليه العلاج (Ahmad and mokaddas, 2009). وان تراكم الطفرات في الموروث الهدف يؤدي إلى تطور سلالات المقاومة المتعددة (MDR-TB) . (Ong et al.,2010; WHO,2010; Almutaril et al.,2011).

Isoniazid 1.15.2

اكتشف المضاد الحيائي Isoniazid (isonicotinic acid hydrozid) (INH) عام 1952 وهو من أهم العلاجات المستخدمة ضد بكتريا التدرن (Chandra et al .,2010). يعد التركيب الكيماوي للIsoniazid بسيط، حيث يتكون من hydrazid group المرتبطة ب pyridin ring وعلى عكس آلية عمله التي تكون معقدة جدا (Arjomand zadegan et al., 2012). يعد واحداً من العلاجات المفضلة ضد مرض التدرن مع Rifampicin و pyrazinamid. وان آلية عمله هي حجب تكوين حامض المايكولك الذي يعد المكون الأساسي لجدار البكتريا والذي يعطيها القابلية على مقاومة المواد الكيميائية، الجفاف ويمنع نشاط المضادات الحياتية الكارهة للماء بالإضافة إلى ذلك فان حامض المايكولك يساعد بكتريا *M. tuberculosis* النمو داخل الخلايا البلعمية macrophage مما يمكنها من تجنب الجهاز المناعي، وهذه الأسباب الرئيسية لاختيار حامض المايكولك كهدف للعلاج (Somasundaram et al., 2014).

ويعتقد أن INH يدخل بكتريا *M. tuberculosis* كعلاج أولي بواسطة الانتشار السلبي Passive diffusion ومن ثم ينشط بواسطة انزيم Gatalase -peroxidase الذي يشفر من قبل موروث *katG* حتى يولد الجذور الحرة السالبة التي تهاجم عدة مواقع في جدار البكتريا. أفضل هدف

لهذا الجذور الحرة في جدار الخلية هي حامض المايكولك وان الحامض النووي DNA، الكاربوهيدرات، الدهون ربما يستهدف أيضا العمليات الايضية للحامض النووي (Arjomandzadegan et al.,2012). يعد البروتين المشفر من قبل موروث *inhA* enoyl -acyl carrier protein (ACP) redutase واحد من الأهداف التي يعمل عليها علاج Isoniazid. ويقترح أن الـ *inhA* هدف اولي لمقاومة علاج Isoniazid. حيث أن Isoniazid المنشط يرتبط مع معقد NADD complex -InhA ليكون مركب ثلاثي الذي يعمل على تثبيط حامض المايكولك (Chandra et al., 2010). هناك 6 طفرات نقطية تحدث ضمن المورث *inhA* والمرتبطة بمقاومة مضاد INH لكنها لا تحدث بصورة متكررة في العزلات السريرية، اذا ان هناك طفرات اخرى اكثر تكرارا تحدث في حفاز الموروث *inhA* وتكون المسؤولة عن مقاومة INH وهذه الطفرات هي 8(T-G/A) و-16(A-G) و24(G-T) و15(C-T) (Santos,2012).

Rifampicin 2.15.2

يعد Rifampicin (methyl-1-piperazinamiyl) واحد من مضادات الطيف الواسع المحب للدهون broad spectrum lipophilic الذي يعمل على تنشيط بناء الحامض النووي RNA لبكتريا *M. tuberculosis* بواسطة الارتباط بالوحدة الثانوية بيتا β -subunit من انزيم بلمرة RNA المعتمد على DNA DNA-dependent RNA polymerase والذي يقوم باستنساخ RNA (Somasundaram et al.,2014).

وان سبب المقاومة لعلاج RIF هي طفرات تحدث في تسلسلات قصيرة مكونة من 18 زوج قاعدي في موروث *rpoB* الذي يشفر للوحدة الثانوية β -subunit الموجودة في انزيم بلمرة DNA (mokousov et al.,2003). وتعد الطفرات الحادثة في شفرة *rpoB* 526 وشفرة *rpoB* 531 وهي من أكثر الطفرات تكرارا (Noviaua et al., 2007).

وقد اشارت الدراسات ان 95% من الطفرات التي تؤدي إلى حدوث المقاومة ضد RIF تحدث ضمن منطقة طولها 81 زوج قاعدي الموجودة على موروث *rpoB*. وان معظم المحفزات التي تستخدم التقنية الجزيئية للتحري عن مقاومة بكتريا *M. tuberculosis* لعلاج RIF وتقوم بالتحري عن الطفرات في موقع 81 زوج قاعدي من هذا الموروث. والتي تسمى بالمنطقة المحدده لمقاومه الريفامبسين . RRDR Rifampin resistance determining region

(Madaniq *et al.*,2012;Veluchamy *et al.*, 2013).

16.2 الاختبارات والفحوصات الطبية

❖ الفحص بالأشعة Radiological examinad

تستخدم الأشعة السينية X-Ray لفحص صدر المرضى المصابين بالتدرن وهو من الإجراءات المهمة وخاصة في المرحلة الأولى من الإصابة بالمرض إذ يمكن من خلاله الاستدلال على درجة تطور المرض إذ يظهر بشكل اخدود او ظلال (CDC,2012). وقد اوضحت الدراسات بان التغيرات التي تطرأ على الفص العلوي للثة يكون مرتبط مع النتيجة الموجبة لفحص الاستنبتات الجرثومي لبكتريا *M. tuberculosis* (Wisnivesky *et al.*,2000).

❖ اختبار الجلد (Skin test)

وهو من الطرق التشخيصية التي تبين فيما إذا كان الشخص مصاب ببكتريا *M. tuberculosis* ويسمى أيضا اختبار التوبركيولان tuberculin حيث حقن 0.1 مليلتر من محلول بروتين منقى ومشتق من البكتريا (PPD) (Purified protein Derivative) تحت الجلد وبعد ذلك يتم قياس مساحة وحجم تفاعل الذي يظهر بعد 48-74 ساعة بشكل انتفاخ وان هذا الاختبار لا يمكن الاعتماد عليه كطريقه تشخيص مثالية وذلك لأنه يمكن ان يعطي نتائج خاطئة (Anderson *et al.*.,2006;CDC2009).

❖ الفحص المجهرى للقشع Microscopy

يعد التشخيص المجهرى هو التشخيص الاساسي في بلدان العالم الفقيرة ويتم فحص القشع اما باستخدام المجهر الضوئي light microscopy مع صبغة Ziehl-Neelsen اوباستخدام المجهر الوامض Fluorescent Microscope مع صبغة Auramine-rhodamine (Mizuno *et al.*,2009). وعند استخدام صبغة Ziehl-Neelsen يحتاج إلى وجود 10,000 عصية بالمليتر التي تظهر النتيجة موجبة. وتظهر *M. tuberculosis* بالون الاحمر. ويجب التصبغ لثلاث مرات متتالية فإذا كانت النتيجة موجبة فذلك يعني ان المريض مصاب بالتدرن وبالحالة النشطة و يكون ناقل للعدوى (Streingart and Henry,2006;Pasipauodya,2010).

❖ الاستنبتات الجرثومي Culture

يعد الاستنبتات الجرثومي هو مقياس عالمي في تشخيص مرض التدرن. وتكون حساسية هذا التشخيص اكبر بكثير من الفحص المجهرى حيث يحتاج إلى 10 عصيات من *M. tuberculosis* في المليمتر الواحد لتظهر النتيجة موجبة (Yeager *et al.*,1967). بالإضافة إلى حساسية هذا الاختبار

فيمكن ان يميز الصفات المظهرية وتحديد جنس البكتريا فضلا عن اجراء اختبار فحص الحساسية للدواء . ومن الاوساط التقليدية المستخدمة وسط Lowenstein Jensen medinmLJ المعتمد على البيض وسط middle brooks medium المعتمد على الاكار Agar ان الطرق المعتمدة على الاوساط التقليدية تحتاج إلى وقت طويل يستمر 6-8 اسابيع، لذلك تم التوصل حديثا إلى انظمة متطورة تتميز بحساسيتها العالية وقصر الوقت مقارنة بالأوساط الصلبة ومن هذه الأنظمة هي Bactecsystem مثل منظومة Bactec960 ومنظومة BacteGmIT960 . (Palomino *et al.*,2008; Muyoyeta *et al.*,2009 ;Parrish *et al.*,2009;Sorlozano *et al.*,2009)

❖ تقنيات بلمرة الدنا (PCR) Polymerase chain reaction

تم تطوير الاختبارات الوراثية لتحديد *M. tuberculosis* الناتجة من اختبار الاستنابات الجرثومي الموجب باستخدام تقنية تفاعل البلمرة التسلسلي (PCR) Polymerase chain reaction ومن الممكن التشخيص المباشر *M. tuberculosis complex* الموجودة في العينة بالاعتماد على تسلسلات معينة موجودة في الحامض النووي DNA للبكتريا. ومؤخرا تم تطوير الاختبار المعتمد على مضاعفة الحامض النووي إلى Gene Xpert MTB/RF حيث يمكن الكشف عن بكتريا *M. tuberculosis* والطفرة التي تعطي المقاومة لعلاج Rifampicin في وقت واحد في عينة القشع ضمن ساعتين وقد اظهر هذه الطريقة الحساسية 98.2% بالنسبة لعينات القشع ذات الفحص المجهرى الموجب ونسبة 72% بالنسبة لعينات القشع التي يكون الفحص المجهرى لها سالب (Boehme *et al.*,2010;Helb *et al.*,2010).

وتعد تقنية PCR من الطرق السريعة والمتخصصة حيث يتم الكشف عن البكتريا بعد عدة ساعات حتى لو كانت بكمية قليلة وهي سريعة جدا مقارنة بالطرق التقليدية الاخرى (Dinnes *et al.*,2007).

الفصل الثالث : المواد وطرائق العمل
Materials and Methods



الفصل الثالث: المواد وطرائق العمل Materials and Methods



1.3 المواد

1.1.3 الأجهزة و المستلزمات المختبرية

أُستخدمت الأجهزة والمستلزمات المختبرية المدرجة في الجدول (3- 1) في الدراسة الحالية .

جدول (1-3) : الأجهزة والمستلزمات المختبرية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة/ المنشأ	الأجهزة والمستلزمات المختبرية
Sigma 1-13,Harz,Germany	Cooling Centrifuge جهاز النبذ المركزي المبرد
Hirayama manufacturing Company,Tokyo,Japan	Autoclave الموصدة
Memmert,Germany	Oven الفرن الكهربائي
Memmert,Germany	Incubator الحاضنة
Olympus , Japan	Light microscope المجهر الضوئي
Kimo,24700Montpon, France	(BSC – II) حجرة الأمان
Sigma 1-13,Harz,Germany	Vortex mixer جهاز الرج الكهربائي
Sartorius ,Germany	Sensitive balance الميزان الحساس
Biomax ,Desaga ,Heidelberg , Germany	pH meter مقياس الأس الهيدروجيني
Gilson instrument ,France	Micropipettes الماصات الدقيقة
Schott , Germany	Screw-capped زجاجات ذات غطاء حلزوني
Schott , Germany	Flasks الدوارق
Schott , Germany	Slides الشرائح الزجاجية
BioMerieux	Falcon tube الأنابيب الفالكون
BioMerieux	Pasteur pipette ماصة باستور
Diora (Turkey)	Refrigerator ثلاجة
Memmert (Germany)	جهاز النبذ المركزي المبرد عالي السرعة High Speed Cold centrifuge
Helena (USA)	Electrophoresis set الترحيل الكهربائي
Herolab (Germany)	Gel documentation جهاز تصوير الهلام
Eppendorf (German)	Thermal Cycle جهاز البلمرة التسلسلي

الشركة المصنعة/ المنشأ	الأجهزة والمستلزمات المختبرية
Thermo (U.S.A)	Nanodrop specrophotometer جهاز القطرة النانوية
Herolab (Germany)	UV- transilluminator مصدر الأشعة فوق البنفسجية
Lab.Tech (Korea)	DdH ₂ O جهاز ماء منزوع الايونات
Promega (USA)	Blue, yellow and white tips (100 µL)
Brand (Germany)	Micropipettes ماصات دقيقة بأحجام مختلفة
China	Magnetic stirrer

2.1.3 المواد الكيميائية المستخدمة

أُستخدمت المواد الكيميائية المبينة في الجدول (2-3) خلال مدة الدراسة.

جدول (2-3) المواد الكيميائية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة	المادة
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق فوسفات أحادي البوتاسيوم Potassium mono phosphate powder KH ₂ PO ₄
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق كبريتات المغنيسيوم Magnesium sulfate MgSo ₄ powder
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق سترات المغنيسيوم Magnesium citrate powder
Becton Dickinso & company-USA	أسبارجين (حامض اميني) Asparagine (amino acid)
Scherman chemicals Ltd, Edmonton, London	Glycerol الجلسرول
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق صبغة أخضر الملاكايت Malachite green powder
Scherman chemicals Ltd, Edmonton, London	مسحوق صبغة الكاربول فوكسين القاعدي Carbol Fuchsin powder
B.D.H.(England)	Ethanol70% كحول الأيثانول
B.D.H.(England)	Phenol حبيبات الفينول
Scherman chemicals Ltd, Edmonton, London	Methyl blue powder مسحوق أزرق المثل
B.D.H.(England)	sulfuric acid Conc. حامض الكبريتيك المركز
B.D.H.(England)	حامض الهيدروكلوريك المدخن Fuming sulfuric acid 73%

الشركة المصنعة	المادة
Prolabo 12,Rue palee,75.Prolabo	محلول هيدروكسيد الصوديوم 4% NaOH
Himedia\ India	زيت الفحص Oil
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق بارانايترو بنزويك Para nitro benzoic powder (PNB)
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق ثايوبين 2- حامض كاربوكسيل المهدرج (TCH) Thiopene-2-carboxylic acid Hydrazide powder
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق فوسفات ثنائية الصوديوم sodium di phosphate Na ₂ HPO ₄
Becton Dickinso & company-USA	مسحوق بيروفات الصوديوم Pyruvate sodium powder
B.D.H.(England)	كلوريد الصوديوم NaCl
Becton Dickinso –USA	فوسفات احادي البوتاسيوم KH ₂ PO ₄
BDH (England)	كلوريد الباريوم المائي (BaCl ₂ .H ₂ O)
BDH (England)	اثيلين ثنائي أمين رباعي حامض الخليك Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
Fluka (Switzerland)	ترس حامضي (Tris-HCl)
Promega (USA)	اكاروز Agarose
Promega (USA)	صبغة بروميد الاثيديوم Ethidium Bromide
Promega (USA)	محلول بفر TBE-buffer (10x)
Promega (USA)	صبغة التحميل Loading dye

3.1.3 الأوساط الزرعية المستخدمة

أُستخدمت المستنبتات الجرثومية المبينة في جدول (3-3) خلال مدة الدراسة.

جدول (3-3): الوسط الزرعى المستخدم في الدراسة

المصدر	اسم الوسط الزرعى
HiMedia Laboratories Pvt. Limited,Mumbai-400 086, India	وسط لوفنشتاين جنسن Lowenstein Jensen media
دليل العمل المختبري، 2009	وسط ستون برينك Stone brink media
WHO, 1998	TCH media
WHO, 1998	PNB media

4.1.3. المضادات الحيوية (Antibiotics)

استخدمت المضادات الحيوية على هيئة مساحيق مجهزة من شركة (Sigma) لاختبار الحساسية الخاصة ببكتريا *M. tuberculosis* .

جدول (3-4) العدة الخاصة بمضادات التدرن للخط الدوائي الاول

التركيز	الرمز	المضاد الحياتي
40 µg / ml	RIF	Rifampicin
2 µg / ml	EMB	Ethambutol
4 µg / ml	STM	Streptomycin
0.2 µg / ml	INH	Isoniazid

5.1.3 العدة التشخيصية The diagnostic kits

جدول (3-5) : العدد المختبرية المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	العدة
Korea /Bioneer	Master Mix PCR
Promega (USA)	DNA Ladder 100bp/1000bp
Hain lifes scinence(Germany)	(GenoTypeMTBDRplus)
Becton Dickinso&company-USA	Taxo TB niacin test kit
Germany	Quantoflx nitrate/nitrite test kit

2.3 تحضير الصبغات والمحاليل والأوساط المستخدمة

1.2.3 تحضير صبغة زيل نلسون Ziehl – Nelson stain

1.1.2.3 تحضير محلول الكاربول فوكسين Carbol fuchsin

المحلول الأول : الكاربول فوكسين القاعدي Solution A : basic fuchsin أذيببت 0.3 غرام من مسحوق صبغة الكاربول فوكسين القاعدي إلى 100 مليلتر من الأيثانول المطلق في قارورة حجميه وطبقا لما ورد في(دليل العمل المختبري، 2009).

2.1.2.3 Phenol solution تحضير محلول الفينول

المحلول الثاني : Phenol solution :Solution B سُيلت 50 غرام حبيبات الفينول في قارورة في حمام مائي بتسخين خفيف ثم أُضيف إليها 950 مليلتر من الماء المقطر، بعد ذلك يمزج 100 مليلتر من المحلول A مع 900 مليلتر من المحلول B ، رُشحت الصبغة وحُفظت في زجاجة بنية اللون بعيدا عن الحرارة والضوء (دليل العمل أالمختبري، 2009) .

3.1.2.3 Decolorizing agent تحضير المحلول القاصر للصبغة

أُضيف 100مليلتر من حامض الكبريتيك المركز Conc.sulfuric acid إلى قارورة بحجم 1000 مليلتر تحوي على 300 مليلتر من الماء المقطر لتحضير 25% من حامض الكبريتيك المخفف وسُيل الحامض المركز ببطء على جدار القارورة لارتفاع حرارة المزيج، (دليل العمل أالمختبري، 2009) .

4.1.2.3 تحضير الصبغة المقارنة Counter Stain solution :

حُضر 0.3% من محلول أزرق المثلين بإضافة 0.3 غرامات من مسحوق صبغة أزرق المثلين إلى 100 مليلتر من الماء المقطر ثم تم مزجه لأذابته جيدا وحفظ تحت درجة حرارة 25 م بحسب طريقة التحضير المذكورة (Selvakumar, et al.,2002)

2.2.3 وسط لوفنشتاين جنسن Lowenstein Jensen media

❖ تحضير الأملاح وهي :

- فوسفات إحدادي البوتاسيوم (KH₂PO₄) (2.4) غم
- كبريتات المغنيسيوم (Mg SO₄) (0.24) غم
- سترات المغنيسيوم (0.6) غم
- إسبراجين (3.6) غم
- كليسيرول (12) مليلتر
- ماء مقطر (600) مليلتر

أُضيف الماء المقطر قبل إضافة الكليسيرول وأذيب الخليط في حمام مائي وبعد إضافة الكليسيرول أُذيبت الأملاح جيدا ثم عقت في الموصدة عند درجة حرارة (120) م° ولمدة (30) دقيقة.

❖ تحضير البيض (1) لتر

أستخدم بيض طازج وحديث الأنتاج (أسبوع أو أقل)، غسل البيض جيدا بالفرشاة ونقع في صابون سائل (5%) وترك لمدة (30) دقيقة . شطف بالماء الجاري لأزالة الصابون كليا ثم جفف ووضع في كحول (70%) لمدة (15) دقيقة. بعد ذلك كسر البيض كل على حدة في طبق بتري للتأكد من أنه طازج بوساطة ملعقة معقمة ووضع في دورق معقم ثم مزج صفار البيض بالبياض ورشح من خلال طبقات عدة من الشاش المعقم بوساطة قمع معقم .

❖ أخضر الملاكايت (20) مليلتر (2 %)

حُضِر في فلاسك معقم حيث يوزن (20) غم من أخضر الملاكايت + (100) مللتر ماء مقطر معقم وإذيب في حمام مائي ولايعقم في الموصدة .

- بعد أن تبرد الأملاح أضيف لها مزيج البيض (1) لتر والملاكايت الأخضر، بعد أن صب المزيج في زجاجات خاصة معقمة ذات غطاء حلزوني (screw Capped) ،

(6) مليلتر لكل زجاجة . ثم سُوي في فرن التسوية (Inspissator) في وضع مائل عند درجة حرارة (85) م° لمدة (50) دقيقة . بعد عملية التسوية يجب التأكد من : -

- تسوية المستتبت في حرارة (85) م° وليس أكثر والدليل على ذلك عدم وجود فقاعات هواء كثيرة .

- خلوها من التلوث بوضعها في الحضان لمدة (2 - 4) ايام عند درجة حرارة (37) م° ثم تحفظ بعد ذلك في الثلاجة . (دليل العمل المختبري، 2009 ; Elbir et al., 2008) .

3.2.3 تحضير 2 مليغرام/مليلتر من TCH

وُزن 0.206 غرام من مسحوق Thiophen-2-carboxylic Acid Hydrazide و نوبت في 120 مليلتر من الماء المقطر وبوساطة ماصة دقيقة سُحب منها 0.5 مليلتر وأضيفت إلى 4.5 مليلتر من الماء المقطر (التخفيف الأول) ومرة أخرى سُحب بالماصة الدقيقة 0.5 مليلتر من التخفيف الأول وأضيف إلى 4.5 مليلتر من الماء المقطر (التخفيف الثاني)، بوساطة ماصة دقيقة سُحب 4.8 مليلتر من التخفيف الثاني أُضيف إلى 240 مليلتر من وسط لوفنشتاين جنسن المحضر في الخطوة السابقة ليصبح التركيز النهائي 2 مايكروغرام/مليلتر، صُب بعدها المزيج في زجاجات خاصة معقمة ذات غطاء

حلزوني 6 screw capped مليلتر لكل زجاجة بعدها سُويت المستنبتات في فرن التسوية Inspissator في وضع مائل عند درجة حرارة (85) م لمدة (50) دقيقة . بعد عملية التسوية تم ملاحظة ما يلي :

- ❖ تسوية المستنبت في حرارة 85 م وليس أكثر والدليل على ذلك عدم وجود فقاعات هواء كثيرة.
- ❖ خلوها من التلوث بوضعها في الحاضنة لمدة (2-4) أيام عند درجة حرارة (37) م ثم حُفظت بعدها في الثلاجة (WHO,1998) .

4.2.3 تحضير 500 ملغرام/مليلتر من مسحوق PNB :

وُزن 5.1 غرام من مادة Para Nitro Benzoic (PNB) و نوبت في 100 مليلتر من proplean glycol ، أخذ 2.4 مليلتر بواسطة ماصة دقيقة من التحضير السابق و أُضيف إلى 240 مليلتر من وسط لوفنشتاين جنسن فأصبح التركيز النهائي 500 ملغرام/مليلتر.

صُبَّ المزيج بعدها في زجاجات خاصة معقمة ذات غطاء حلزوني 6 screw capped مليلتر لكل زجاجة بعدها سُويت المستنبتات في فرن التسوية Inspissator في وضع مائل عند درجة حرارة (85) م لمدة (50) دقيقة . بعد عملية التسوية تم ملاحظة ما يلي :

- ❖ تسوية المستنبت في حرارة 85 م وليس أكثر والدليل على ذلك عدم وجود فقاعات هواء كثيرة.
- ❖ خلوها من التلوث بوضعها في الحاضنة لمدة (2-4) أيام عند درجة حرارة (37) م ثم حُفظت بعدها في الثلاجة (WHO, 1998).

5.2.3 تحضير الوسط الزراعي الصلب ستون برينك Stonebrink media :

أُذيب 7 غرامات من فوسفات أحادية البوتاسيوم $KH_2 PO_4$ ، 4 غرامات من فوسفات ثنائية الصوديوم $Na_2 HPO_4$ و 12.5% من بيروفات الصوديوم في 1000 مليلتر من الماء المقطر و عُقمت بالموصدة تحت درجة حرارة 123 م° وضغط 15 باوند/الأنج المربع ولمدة 30 دقيقة،(دليل العمل المختبري،2009).

6.2.3 المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution

حُضِر بإذابة (8.5) غم من كلوريد الصوديوم في (900) مل من الماء المقطر و أكمل الحجم إلى لتر بالماء المقطر، ثم عُقِم بالموصدة و حُفظ في درجة 4 م لحين الإستعمال.

7.2.3 دارئ تريس-حامض الهيدروكلوريك Tris-HCl

حضر هذا المحلول بتركيز (2) مولار بأذابه (31.52) غم من الترس الحامضي في (80) مل من الماء المقطر، ثم عدل الرقم الهيدروجيني إلى (7.5) باستعمال حامض HCL المركز واكمل الحجم إلى (100) مل وعقم بالموصدة.

8.2.3 محلول دارئ TE

يتكون من (0.05) مولار من Tris-HCl و(0.05) مولار من EDTA، إذ حضر 100 مل منه بأخذ (2.5) من محلول Tris-HCl المحضر وفق الفقرة أعلاه وأكمل الحجم إلى (100) مل بالماء المقطر وعقم بالموصدة وحفظ بعدها في الثلاجة في (4)م.

9.2.3 تحضير محلول ماكفرلاند MCFrland solution

أستعمل هذا المحلول لإعطاء عدد تقريبي للخلايا البكتيرية عند إجراء فحص الحساسية للمضادات الحيوية و يتكون من جزئين :-

❖ الجزء الأول : حُصّر بإذابة (1.175) غم من مسحوق كلوريد الباريوم المائي ($BaCl_2 \cdot H_2O$) في (100)مليتر من الماء المقطر .

❖ الجزء الثاني : حُصّر بإضافة (1) مليلتر من محلول حامض الكبريتيك المركز H_2SO_4 إلى (100) مليلتر من الماء المقطر .

عند استخدام محلول ماكفرلاند أُضيف (0.5) مليلتر من المحلول الأول إلى (99.5) مليلتر من المحلول الثاني، (Brown,2007)

10.2.3 تحضير محلول التعادل في طريقة Petroff

مُزج 72 مليلتر من 73% محلول حامض الهيدروكلوريك المدخن مع 1 مليلتر من 1% محلول الفينول الأحمر في قارورة، أُضيف للمزيج 1000 مليلتر من ماء مقطر معقم، صُبّ بعدها الناتج في زجاجات معقمة ووضعت في جهاز الموصدة لغرض التعقيم تحت درجة حرارة 123م° وضغط 15 باوند على الأنج المربع، (دليل العمل ألمختبري،2009).

11.2.3 المحاليل الخزينة للمضادات المايكروبية

حضرت المحاليل الخزينة للمضادات المايكروبيه الخاصة بفحص الحساسية لبكتريا التدرن بحسب (منخي،2009 ; provvedi et al.,2008 ; who,2001; Sattie et al., 2010)وكالاتي:

مضادات التدرن الخط الاول

❖ **تحضير الريفامبيسين (Rifampicin)**

- أُذيب 21 ملغم من مضاد الريفامبيسين في 5 مليلتر أثيلين جليكول Ethylen glycol في حمام مائي عند درجة حرارة (70) م
- بعد تمام الذوبان عُقم باستعمال المرشح الغشائي ذي ثقب بقطر (0.22) مايكروميتر .
- يعد هذا المحلول (أ) أخذ منه 2 مليلتر وأضيف إلى 200 مل من الوسط المحض (L.J) ليكون التركيز النهائي 40 مايكروغرام/مل.

❖ **تحضير الأيثامبيتول (Ethambutol)**

- أُذيب 270.3 ملغم من المضاد في 20 مليلتر ماء مقطر (يعد هذا المحلول (أ)) .
- أخذ 0.5 مليلتر من المحلول (أ) واضيف إلى 4.5 مليلتر ماء مقطر معقم ليكون المحلول (ب) .
- أخذ 0.5 مليلتر من المحلول (ب) واضيف إلى 4.5 مليلتر ماء مقطر معقم ليكون المحلول (ج) .
- أخذ 4 مليلتر من محلول (ج) واضيف إلى 200 مليلتر من الوسط المحض (L.J) ليكون التركيز النهائي (2) مايكروغرام/ مل

❖ **تحضير الستروبتومايسين (Streptomycin)**

- أُذيب 263.8 ملغم من المضاد في 20 مليلتر من ماء مقطر (يعد هذا المحلول (أ)) .
- أخذ 0.5 مليلتر من محلول (أ) واضيف إلى 4.5 مليلتر من ماء مقطر معقم ليكون المحلول (ب) .
- أخذ 2 مليلتر من المحلول (ب) واضيف إلى 2 مليلتر ماء مقطر معقم ليكون المحلول (ج)
- أخذ 1.6 مل من المحلول (ج) واضيف إلى 200 مليلتر من الوسط المحض (L.J) ليكون التركيز النهائي (4) مايكروغرام/ مل .

❖ **تحضير الأيزونيازيد (Isoniazid)**

- أُذيب 200.2 ملغم في 20 مليلتر من ماء مقطر معقم (يعد هذا المحلول (أ)) .
- أخذ 0.5 مليلتر من المحلول (أ) واضيف إلى 4.5 مليلتر ماء مقطر معقم ليكون المحلول (ب) .

-أخذ 0.5 مليلتر من المحلول (ب) وأضيف إلى 4.5 مليلتر ماء مقطر معقم ليكون محلول (ج).

-أخذ 0.4 مليلتر من المحلول (ج) وأضيف إلى 200 مليلتر من الوسط المحضر (L.J) ليكون التركيز النهائي (0.2) مايكروغرام/مل.

3.3 النماذج Specimens

أجريت الدراسة في مركز الأمراض الصدرية والتنفسية التخصصي/المختبر المرجعي للتدرن الكائن في منطقته باب المعظم في بغداد للفترة من 2016/9/1 إلى 2017/1/1. وقد وزعت استمارة استبيان خاصة بالمريض الذي خضع للفحص ملحق (1)، تحتوي هذه الاستمارة على اسم المريض، وعمره، والجنس (ذكر، أنثى)، والعنوان حسب القطاع الذي يسكن فيه المريض، صنف المريض (قديم، جديد، ومقاوم) و نوع العينة (القشع Sputum، عينة غسيل القصبات Bronchial washing، عينة سائل الجنب Pleural fluid، السائل النخاعي Cerebrospinal Fluid)

4.3 جمع العينات specimen collection

جمعت من المرضى الوافدين إلى في مركز الأمراض الصدرية والتنفسية /المختبر المرجعي للتدرن في بغداد في عبوات بلاستيكية نظيفة شفافة محكمة الغطاء وذات فوهة واسعة. أجريت عليها الفحوصات المطلوبة، إذ تم إجراء الفحص المباشر للقشع لكل العينات بواسطة الصبغة المقاومة للحامض وتم زرع العينات السالبة والموجبة للصبغة على أربعة أوساط من لوفنشتاين جنسن (L.J) ووسط ستون برينك وحضنت في الحاضنة لمدة (6-8) أسابيع عند درجة حرارة (35-37) م، أجريت الفحوصات البايوكيميائية والتشخيصية للمستعمرات الموجبة للزرع وتم استنباتها على مجموعة الأوساط الزرعية الخاصة بالمضادات الحياتية للخط الدوائي الأول وحضنت في الحاضنة لمدة (6-8) أسابيع عند درجة حرارة (35-37) م. بعد استحصال نتائج الخط الدوائي الأول تم عزل DNA للكشف التشخيصي بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR، ودراسه الجزيئية للمقاومه المتعدده للمضاد.

5.3 تحضير اللطخات Smearing

تم عمل لطخات القشع بواسطة استخدام عيدان خشبية إذ فرش جزء من عينة القشع على الثلث الوسطي من الشريحة الزجاجية وبصورة منتظمة على شكل بيضوي في صورة دوائر متداخلة ومتكررة

وبمساحة 1 × 2 سم بحيث تكون المسحة متجانسة وغير سميكة ثم تترك المسحة لتجف في الهواء أو بوساطة مجفف، (دليل العمل المختبري، 2009).

6.3 صبغ الشرائح Staining

وضعت الشرائح على منصة التلوين مع ترك مسافة كافية بين الشرائح لمنع انتقال المواد من لطاخة إلى أخرى، تُبَتَّت اللطخات بتمرير مصباح بنزن لبرهة من الوقت ولعدة مرات، أُضيف محلول صبغة الكاربول فوكسين المحضر في الفقرة (1.1.2.3) بحيث غطى السطح بأكمله وسُخِن بمصباح بنزن حتى تصاعد البخار الأبيض منه ثم تُرِكَ لمدة خمس دقائق، بعد ذلك غُسلت الشرائح بتيار خفيف من ماء الحنفية و وضعت الشرائح بشكل مائل ليزاح ماء الشطف الزائد ثم غُطيت الشرائح بأكملها بحامض الكبريتيك المخفف 25% (H₂SO₄) المحضر في الفقرة (3.1.2.3) وتُركت لمدة دقيقتين حتى زال اللون الأرجواني للكاربول فوكسين القاعدي ، غُسلت الشرائح مرة أخرى بتيار خفيف من ماء الحنفية ووضعت الشرائح بشكل مائل لإزالة الماء الزائد غُطيت الشرائح بأزرق المثلين المحضر في الفقرة (4.1.2.3) وتُركت لمدة دقيقة واحدة، غُسلت الشرائح لمرة أخرى بماء الحنفية ثم جُففت وبعدها فُحصت بالمجهر الضوئي الاعتيادي بعد وضع قطرة من زيت السدر على اللطاخة وتم فحص 300 حقل منها تحت العدسة الزيتية فظهرت العصيات السلية بلون أحمر أو وردي مع خلفية زرقاء بشكل عصيات أو خيوط رفيعة أو بشكل حزم أو مجاميع، (دليل العمل المختبري، 2009).

7.3 زرع العينات Samples culture

اعتمدت طريقة Petroff decontamination لزرع العينات بحسب الطريقة التي وصفها دليل العمل المختبري (2009)، وتتلخص بما يلي :

أضيف حجم مساوي لعينة القشع من محلول 4% NaOH وأُبقيت لمدة 15 دقيقة في درجة حرارة الغرفة، رُجت المحتويات من أن إلى آخر بوضعها في جهاز الهزاز (Shaker) بعدها وضعت في جهاز الطرد المركزي المبرد لمدة 15 دقيقة وبسرعة (3000) GX، وتم إهمال الرائق ثم عُودِل الراسب باستخدام HCl المحضر في الفقرة (10.2.3) و بصورة تدريجية وباستخدام ماصة باستور إلى أن يتحول اللون إلى الأصفر وهي نقطة التعادل لُقحت أربع زجاجات من وسط لوفنشتاين جنسن (HiMedia, India) وزجاجة واحدة من وسط ستون برينك المحضر في الفقرة (5.2.3) بوضع (3-2) قطرة من الراسب المتعادل بوساطة ماصة باستور، (دليل العمل المختبري، 2009).

وضعت الأوساط الزرعية الملقحة في وضع مائل لمدة (2-4) أيام في الحاضنة حتى يتم توزيع الراسب على سطح المستنبت مع مراعاة عدم غلق الغطاء كاملاً، ثم غُذِلَ وضعها ببقية مدة الحضان التي استمرت (6-8) أسابيع عند درجة حرارة (35-37) م مع ضرورة غلق الغطاء بإحكام لمنع جفاف المستنبت، (دليل العمل المختبري، 2009).

قراءة النتائج Result

أُختبرت المزارع بعد مرور 72 ساعة للتأكد من تبخر السائل من المستنبت وأُغلقت الزجاجات بأحكام وفُحصت الزجاجات بعد أسبوع لتعيين عصيات Rapid grower Mycobacteria سريعة النمو حتى لا تختلط بالمتفطرات السُّلبية، ظهرت المستعمرات الدرنية للعصيات السُّلبية بعد مرور 6-8 أسابيع بلون ابيض سكري، خشنة السطح ومتعرجة كالقرنبيط، واخذ جزء منها بإبرة الزرع ومُزج بقطرة من محلول الملح الفسيولوجي على شريحة زجاجية (علماً إن العصية السلية لا تتأثر بالملح) وتُركت لتجف ثم تُثبتت على النار باستخدام مصباح بنزن وُصبغت بصبغة زيل نلسون فبدت بشكل عصيات حمراء أو وردية مع خلفية زرقاء بشكل عصيات أو خيوط رفيعة أو بشكل حزم أو مجاميع (دليل العمل المختبري، 2009).

8.3 الفحوصات الكيموحيوية

اعتمدت الاختبارات التشخيصية الواردة في (Central Tb division, 2009; Cho and Breean, 2009).

1.8.3 فحص النياسين Niacin Test

استعملت شرائط النياسين Niacin paper strip test لاختبار قدرة بكتريا التدرن *M. tuberculosis* على إفراز النياسين وكالاتي :

1. أضيف 1 مل من المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution المحضر وفق الفقرة (6.2.3) للمزرعة التي تحتوي على مستعمرات عددها لا يقل عن 50 مستعمرة .
2. وضع المزروع بشكل افقي حتى يغطي السائل سطح المزرعة كلياً .
3. تركت مدة 30 دقيقة حتى يفرز النياسين في السائل .

4. وضع المزروع بشكل عمودي لمدة 5 دقائق حتى يهبط السائل إلى الأسفل، ثم سحب 0,5 مل من السائل ووضع في انبوبة ذات غطاء محكم .
5. وضع شريط النياسين بالانبوبة ثم تركت في درجة حرارة الغرفة لمدة 15-20 دقيقة رجت الانبوبة ولن تقلب.
6. لوحظ لون السائل في قاع الانبوبة بوجود خلفية بيضاء (ورقة) ان ضهور لون اصفر يدل على نتيجة موجبة .

2.8.3 فحص اختزال النترات Nitrate reduction

استعملت شرائط Quantofix nitrate/nitrite test kit لاختبار قابلية العزلات البكتيرية على اختزال النترات كالتالي :

1. أضيف 1 مل من المحلول الملحي الفسلجي Physiological Saline Solution المحضر وفق الفقرة (6.2.3) للمزرعة التي تحتوي على مستعمرات عددها لا يقل عن 50 مستعمرة .
2. وضع المزروع بشكل افقي حتى يغطي السائل سطح المزرعة كليا.
3. وضع المزروع بشكل عمودي لمدة 5 دقائق حتى يهبط السائل إلى الأسفل، ثم سحب 0,5 مل من السائل ووضع في انبوبة ذات غطاء محكم .
4. وضع شريط النترات بالانبوبة ثم تركت في درجة حرارة الغرفة لمدة 1 دقيقة رجت الانبوبة ولن تقلب
5. قرن الشريط مع المقياس الوني المثبت على علبة الشريط، ولوحض تغير اللون. ان تغير اللون إلى اللون الاحمر الارجواني خلال خمس دقائق يدل على إيجابية الفحص.

3.8.3 فحص قابلية البكتريا على النمو في وسط لوفنشتاين جنس Lowenstein Jensen media

المحتوي على مادة (PNB) para nitro benzoic acid

1. لقع وسط (L.J) المحتوي على مادة (PNB) بتركيز 500 مايكروغرام/مل المحضر وفق (4.2.3) ووسط (L.J) غير محتوي (PNB) كسيطرة بعالق بكتريا *M.tuberculosis* قيد الاختبار.

2. حضنت الأوساط بدرجة 37 م لمدة 21 يوماً، اختبرت الأوساط بعد ثلاثة أيام من حضنها بصورة افقية وقد تم مراعاة اغلاق الانابيب باحكام لمنع جفاف الوسط الزراعي وحضنها بصورة عمودية لبقية مدة الحضانة.

3. قرأت النتائج بعد انتهاء مدة الحضانة بمراقبة ظهور النمو من عدمه
(Dekantor et al., 1998; Varma- Basil et al., 2007).

4.3.8 فحص قابلية البكتريا على النمو في وسط لوفنشتاين جنس Lowenstein Jensen medio

المحتوي على مادة Thiophen- 2-Carboxylic Acid Hydrazide(TCH)

1. اجري الفحص بنقل مستعمرة بكتريا (حديثه النمو) من وسط L.J بواسطة Loop معقم إلى انبوبة اختبار وعمل عالق بكتري وقد تم اجراء تخفيف 3-10 و 5-10 لعالق بكتريا *M. Tuberculosis* قيد الاختبار ولقحت بها وسط (L.J) المحتوي على مادة (TCH) بتركيز 2 مايكروليتر/مل المحضر وفق الفقرة (3.2.3) ووسط LJ غير المحتوي على (TCH) كسيطرة.

2. حضنت الأوساط بدرجة 37م لمدة 21 يوماً، اختبرت الأوساط بعد ثلاثة أيام من حضنها بصورة افقية وقد تم مراعاة اغلاق الانابيب باحكام لمنع جفاف الوسط الزراعي وحضنها بصورة عمودية لبقية مدة الحضانة.

3. عدت البكتريا مقاومة لمادة (TCH) إذا كان النمو في الوسط الحاوي (TCH) مساوي أو أكثر من 1% من النمو الظاهر على وسط السيطرة (Giampaglia et al., 2005).

5.8.3 اختبار حساسية عزلات بكتريا *M.tuberculosis* للمضادات المايكروبية

9.3 طريقة Proportion method لفحص الحساسية

اجري فحص الحساسية باستعمال طريقة Proportion method حسب (منخي, 2009; 2010, Martin & palomina) وكالاتي :-

أولاً : استعملت الانابيب (screw capped) المحتوية على المضادات المايكروبية الخاصة بفحص الحساسية لبكتريا *M. tuberculosis* المحضرة وفق فقرة (11.2.3).

ثانياً : تحضير العالق البكتري

1. اخذت مستعمرة نامية على وسط L.J تعود لبكتريا *Mycobacterium tuberculosis* وعلقت في 1 مل من ماء مقطر معقم داخل قنينة محكمة الغطاء محتوية Glass beads ذات قطر 3 ملم لمجانسة النموذج وفصل الخلايا عن بعضها.
2. وضعت الانابيب في جهاز المازج (Vortex) لمدة دقيقة واحدة بعدها تركت الانابيب لمدة عشر دقائق لكي تترسب المحتويات.
3. اهمل الراسب وانقل (1) مل من الرائق في كل انبوبة إلى انبوبة ثانية ولحين ظهور عكورة بالوسط الزرعي قورنت عكرة النمو البكتيري مع عكرة محلول ثابت العكرة قياسي المحضر وفق فقرة (9.2.3).
4. حضرت التخفيف اللازمة لعملية الزرع، حيث اخذت خمسة انابيب معقمة وضع في كل انبوبة (4,5) مليلتر من الماء المقطر واخذ (0,5) مليلتر من العالق البكتيري المحضر واضيف إلى انبوبة رقم (1)، نقلت الكمية نفسها من ابوبة رقم (1) إلى انبوبة رقم (2) وهكذا إلى انبوبة رقم (5) واهمل اخر (0,5) مايكروليتر من الانبوبة رقم (5).
5. أهملت الأنوبتان (2) و (4) ونقل (100) مايكروليتر من التخفيف 1-10 والتخفيف 3-10 والتخفيف 5-10 للزرع على الأوساط الزرعية الحاوية على المضادات المايكروبية (الخط الأول) وهي Isoniazid و Ethambutol و Rifampicin و Streptomycin المعدة لدراسة حساسية وكذلك للزرع على الأوساط الزرعية غير محتوية على مضادات مايكروبية كأنايبب سيطرة (Control tubes).
6. أغلقت الانابيب وحضنت بشكل افقي لمدة 2-3 أيام في الحاضنة حتى تم توزيع المزروع البكتيري مع مداعاة عدم غلق الغطاء كاملا ثم وضعت بشكل عمودي بقية مدة الحضن التي استمرت (6-8) أسابيع بدرجة حرارة 37 م مع ضرورة غلق الغطاء باحكام لمنع جفاف الوسط الزراعي.
7. لوحظ وجود نمو من عدمه بمقارنة النتائج مع أنبوبة السيطرة باستعمال السلالة القياسية *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC27294).
8. تمت قراءة النتائج بأعتبار العزلة مقاومة اذا كان النمو في الوسط الزرعي الحاوي على المضاد المايكروبي في التخفيف 3-10 اكبر من النمو على الوسط الزرعي غير الحاوي على المضاد في التخفيف 5-10 وعدت العزلة حساسة اذا كان النمو في الوسط الزرعي الحاوي على المضاد

الحيوي في تخفيف 3-10 اقل من النمو على الوسط الزرعي غير الحاوي على مضاد في التخفيف 5-10.

10.3 التشخيص الجزيئي بتقنية PCR

1.10.3 عزل Genomic DNA من البكتريا

تم استخلاص Genomic DNA من وسط (LJ) بواسطة عدة الاستخلاص المجهزة في (GenoTypeMTBDRplus) وحسب التعليمات المثبتة في طريقه العمل

1. كشتت مستعمرات البكتريا من وسط LJ باستخدام Loop واضيف إلى انابيب ابندروف تحتوي على 1.5 من محلول TB .
2. رسبت خلايا البكتريا بالطرد المركزي بسرعه 10000دوره/دقيقه لمدة 5 دقائق وسحب العالق بواسطة ماصه وترك الراسب.
3. علق الراسب باضافة 100 مايكروليتر من Lysis buffer (A-LYSIS) ثم وضع في حمام مائي بدرجه حراره 95 م لمدته 5 دقائق.
4. أضيف 100 مايكروليتر من (A-NB) Neutralization Buffer وتم مجانسة المحلول جيد باستخدام المازج ثم وضع في الجهاز الطرد المركزي بسرعه 14000 دوره/دقيقه لمدة 5 دقائق.
5. بعد الطرد المركزي نقل العالق إلى انبوبة ابندروف جديده ويحفظ بدرجه حراره -20م لحين الاستعمال.

2.10.3 تقدير تركيز الدنا ونقاوته Estimation DNA Concentration and Purity

قدر تركيز الدنا في العينة باستخدام جهاز مطياف القطرة النانوية Nanodrop specrophotometer ، وذلك بإضافة 1µl من الدنا المستخلص إلى الجهاز لتقدير التركيز في النانوغرام / مايكروليتر (ng/µl)، وقدرت النقاوة من خلال الامتصاصية 260/280 nm، لتحديد في ما اذا كانت العينة ملوثة بالبروتينات أو بالحامض النووي الرايبوسومي RNA، وتتراوح نسبه قيم الامتصاصية (260/280) لتركيز الدنا النقي بين 1.8 - 2 نانوميتر (Russel and Sambrook,2001).

3.10.3 تحضير البادئات Primers Preparation

جُهزت البادئات من قبل شركة (Bioneer) على شكل (lyophilized). وأُذيت هذه البادئات بالماء المقطر خالي الايونات Deionized distilled water لتحضير محلول التخزين الذي يكون بتركيز (100 pmol/μl) وتحفظ عند 20-م° لحين الاستعمال، استخدمت هذه البادئات بتحضير محلول (working solution) وذلك بأخذ (10μl) من محلول التخزين (stock solution) واضافته إلى 90μl من الماء المقطر خالي الايونات (ddH₂O) للحصول على تركيز (10pmol/μl) من محلول (working solution) الجدول (3-6) يوضح أسماء وتتابعات البوادئ المستخدمة .

جدول (3-6) تتابعات البوادئ لجينات المستخدمة

Target	Primer	Sequence	Source
16sr RNA	F	5' ACG GTGGGTACTAGG TGTGGGTTTC'3	Richard <i>et al.</i> , 2003
	R	5' TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTT'3	
IS6110	F	5'CGTGAGGGGCATCGAGGTGGC'3	Van Embden <i>et al.</i> , 1993
	R	3'AAACAGTGGCTGCGGATGCG'5	
IS6110	F1	5'CGCCAGAGACCAGCCGCC'3	Niemark <i>et al.</i> , 1996
	F2	3'ACGCACTCGCCCGCCACGCC'5	
<i>rpoB</i>	F	AGCGGATGACCACCCAGGAC	Rzenteno-cuevas <i>et al.</i> , 2009
	R	TCAGGGGTTTCGATCGGGCA	
<i>katG</i>	F	GCAGATGGGGCTGATCTACG	Rzenteno-cuevas <i>et al.</i> , 2009
	R	AACTCGTCGGCCAATTCCTC	
InhA	F	TGGTCAGCTTCCTGGCTTCC	Shu-ting tesng <i>et al.</i> , 2015
	R	GACCGTCATCCAGTTGTAG	

4.10.3 تحضير وسط تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل والكميات التي تم مزجها موضحة في جدول (3-7).

جدول (3-7) مكونات وسط التفاعل المستخدمة لتضاعف الدنا DNA

PCR Master mix	Volume
DNA template	1µl
Forward primer (10pmol)	1µl
Reveres primer (10pmol)	1µl
PCR water	17µl
Total volume	20µl

مكونات التفاعل المذكورة أعلاه توضع في الأنابيب الموجودة في العدة القياسية (Accupower PCR primer kit) والتي تحتوي على جميع المكونات الاخرى اللازمة لأجراء التفاعل وهي (Stabilizer، Mgcl₂، KCL، dNTPs، Tris-Hcl PH 9.0، Tag DNA Polymerase، tracing dye PCR، وجميع أنابيب التفاعل مزجت بواسطة Vortex وبسرعة rpm3000 ولمده 3 دقائق وبعد ذلك وضعت في جهاز PCR Thermocycler وباستخدام النظام Conventional PCR thermocycler system والخاص بكل جين.

جدول (3-8) برمجة جهاز PCR

Gene	Initial denaturation	No. Of Cycle	denaturation	Annealing	Extention	Final Extention
16sr RNA	95C° for 5min.	30	94C° for 1 min.	60C°for 1min	72 C° for 1 min.	72 C° for 10min.
IS6110	94C° for 5min.	35	94C° for 1 min.	65C°for 1min	72 C° for 2min.	72 C° for 5min.
IS6110	94C° for 5min.	35	94C° for 1 min.	58C°foe 1min	72 C° for 1 min.	72 C° for 7min.
<i>rpoB</i>	94C° for 5min.	30	94C° for 1 min	65C for 1 min	72 C° for 1 min	72 C° for 7min
<i>katG</i>	94C° for 5min.	30	94C° for 1 min	65C for 1 min	72 C° for 1 min	72 C° for 7min
InhA	94C° for 5min.	30	94C° for 1 min	55 for 1min	72 C° for 1 min	72 C° for 7min

5.10.3 الكشف عن نواتج تفاعل البلمرة بتقنية الترحيل الكهربائي

حضر هلام الاكاروز بتركيز 1.5% وذلك بإذابة 0.7 غرام من مسحوق الاغاروز في 50 مل من محلول (1X TBE buffer). سُخن المحلول حتى الغليان وتم مجانسة المحلول حتى يتحول إلى شكل رائق، وبعدها ترك ليبرد بدرجة حراره 50م، يُضاف 1مايكروليتر من صبغة بروميد الاثيديوم 0.3mg/ml للمحلول ويمزج بشكل جيد؛ وذلك برج المحلول برفق. يصب الخليط في لوح التحميل (Tray) والذي يكون مثبت به مسبقا المشط (Combo) الخاص بتكون الحفر اللازمة لتحميل عينات الدنا، ويترك في درجة حرارة الغرفة ليتصلب لمدة 45 دقيقة، ينقل الهلام المتصلب إلى حوض الترحيل (Gel tank) ويرفع المشط بهدوء، وتوضع تحت حوض الترحيل صفيحة سوداء معتمة لظهور الحفر بشكل واضح و يملأ حوض الترحيل بمحلول (1X TBE buffer) حتى تغطي الهلام. توضع عينات الدنا في الحفر بواسطة ماصة دقيقة (Micropipette) وبحجم 10 ماكروليتر من كل عينة مع مراعاة عدم خروج العينة من سطح الحفرة ويوضع الدليل الحجمي (DNA ladder) في الحفرة المخصصة له على أحد جانبي الهلام وبحجم 7 مايكروليتر ويمزج مع 3 مايكروليتر من دارء التحميل، بعدها تجرى عملية الترحيل الكهربائي (Electrophoresis) بإيصال أقطاب التيار الكهربائي ويجهز بقدره 65 فولت ويتم الترحيل باتجاه القطب الموجب وبعد 1 ساعة وعند وصول الصبغة الزرقاء إلى ما قبل نهاية الهلام يتم إيقاف الترحيل ونُقل الهلام إلى جهاز الأشعة فوق البنفسجية (UV Trans-illuminator) وعلى طول موجي 320 نانومتر لرؤية حزم الدنا وتقدير حجمه الجزيئي بالمقارنة مع الدليل الحجمي وصوّر الهلام باستعمال جهاز التصوير (Russel and Sambrook,2001).

الفصل الرابع : النتائج والمناقشة
Results and Discussions



الفصل الرابع : النتائج والمناقشة Result and discussion



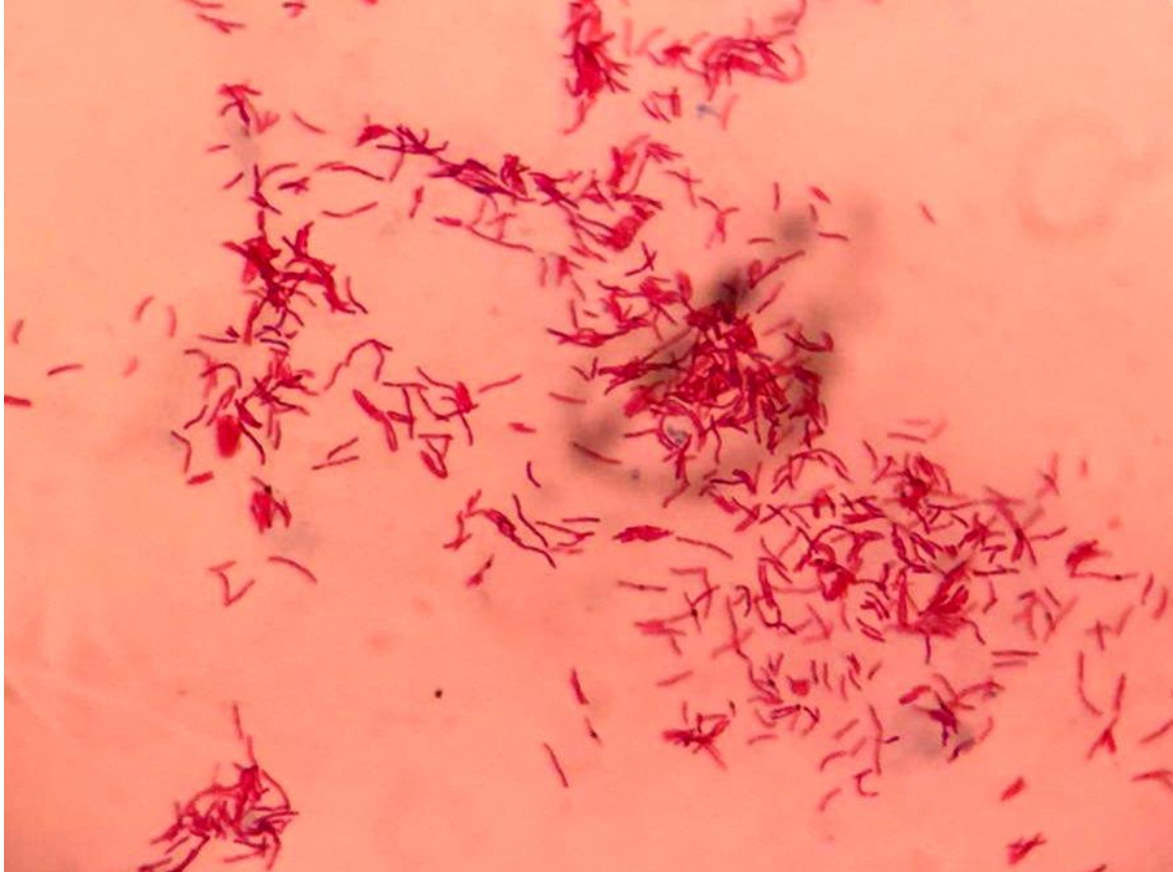
1.4 عزل وتشخيص بكتريا *Mycobacterium tuberculosis*

جمعت 500 عينة سريرية مختلفة من المرضى الوافدين إلى مركز الأمراض الصدرية والتنفسية التخصصي/ بغداد للفترة من (9/1 / 2016) إلى (2017/1/1) للكشف عن الإصابة بمرض التدرن وكان العدد الأغلب عينات القشع SP إذ شكلت %66.6 يليها عينات غسيل القصبات BRW %15.8 وعينات سائل الجنب PLF %12.4 ثم عينات Ascitic fluid (ASF) %4 وكان عدد عينات pus وعينات السائل النخاعي (CSF) 3 عينة لكل واحدة . فحصت العينات بطريقة تصبغ المسحات بصيغة Ziehl-Neelsen والفحص المباشر ، وتم التعرف على البكتريا من شكلها تحت المجهر الضوئي وبقوه X100 حيث ظهرت بشكل عصيات رفيعة مستقيمة أو منحنية قليلاً ذات لون أجمر أو وردي مع خلفيه زرقاء كما في الشكل (1-4).

أعطت هذه الدراسة 67 عينة (%12.8) نتائج موجبة وكانت عينات القشع هي الاعلى ايجابية للفحص بنسبة %15.9 ويليها عينات السائل النخاعي %33.3 ثم عينات غسيل القصبات %8.9 ثم عينات سائل الجنب %4.8 ولم يسجل إصابة في عينات ASF وعينات PUSS وكانت الفروق بين العينات في ايجابية النتائج ذات معنوية عالية ($P<0.05$)

جدول(1-4) نتائج الفحص المجهرى لبكتريا التدرن

العينات	العدد	الفحص المجهرى		النسبة المئوية للنتيجة الموجبة
		+VE	-VE	
Sp	333	53	280	15,9%
BRw	79	7	72	8,9%
PLF	62	3	59	4,8%
ASF	20	0	20	0%
CSF	3	1	2	33,3%
PUSS	3	0	3	0%
Total	500	67	436	12,8
$P>0.01$				



شكل (1-4) يُبين بكتريا التدرن تحت المجهر الضوئي عند استخدام صبغة (Z.N)

وتم زراعة جميع العينات على وسط (L.J) Lowenstein Jensen media وبينت نتائج الزرع ظهور نمو حقيقي في 90 عزلة بنسبة 18% والجدول (2-4) يوضح نتائج الزرع اعتماداً على نوع العينة وقد تم تشخيص بكتريا التدرن بعد تنميتها على وسط (L.J) اعتماداً على لون المستعمرة وشكلها وقوامها، حيث ظهرت المستعمرة عديمة اللون مائلة إلى الصفرة خشنة السطح ومتعرجة تشبه زهرة القرنابيط كما في الشكل (2-4).

أوضحت نتائج الزرع على وسط (L.J) أن هناك (27) عزلة كانت سالبة للفحص المجهرى المباشر وأعطت نمو بكتيريا ، وهذا يبين أن زرع العينات على الوسط الصلب أكثر حساسية في الكشف عن بكتريا التدرن من الفحص المجهرى المباشر ، حيث تتراوح حساسية الفحص المجهرى المباشر من 22-76% وتحتاج على الأقل وجود (5000-10,000) عضية /مل لتشخيص البكتريا، وعلى الرغم من ذلك يعد الفحص المجهرى وسيلة مهمة في الكشف عن بكتريا التدرن لسرعة وسهولة تحضيرها وقلة كلفتها وبساطة طريقة عملها (Ajobiewe and Tiri, 2013).

الجدول (2-4) يوضح نتائج الزرع على وسط (L.J)

العينة	العدد	الفحص المجهرى		النسبة المئوية للنتيجة الموجبة
		+VE	VE-	
SP	333	77	256	23,1%
BRW	79	8	71	10,1%
PLF	62	4	58	6,5%
ASF	20	0		0%
CSF	3	1	2	33,3%
PUSS	3	0		0%
Total	500	90	410	18%

P > 0,01



الشكل (2-4) شكل مستعمرات بكتريا التدرن على وسط (L.J)

2.4 الفحوصات الكيموحيوية Biochemical Tests

أجريت الأختبارات الكيموحيوية المعتمدة وتضمنت (فحص اختزال النترات، فحص إنتاج الناسين) لتمييز بكتريا *M. tuberculosis* عن الأنواع البكتيرية الأخرى إذا كانت جميع العزلات موجبة لفحص النياسين الشكل (3-4a)، وان جميع العزلات موجبة لفحص اختزال النترات (3-4b)، ومن جهة أخرى أظهرت جميع العزلات قابليتها على النمو على وسط (L.J) الحاوي على مادة (TCH) إذ تعد صفة مميزة لهذا النوع كذلك لا يظهر نمو البكتريا عند زرع العزلات على وسط (L.J) الذي يحتوي على مادة (PNB) حيث تثبط هذه البكتريا الشكل (3-4c).

تختلف سلالات بكتريا التدرن في نتائج بعض الاختبارات الكيموحيوية حيث لا يمكن لبعض الاختبارات أن تعطي نتائج دقيقة جدا وذلك لان العديد من سلالات البكتريا تعطي نتائج موجبة في حين ونتائج سالبة في الحين الأخر، وكذلك تعطي *M. tuberculosis*, *M.microti*, *M.africanum* نفس النتائج (أما موجبة أو سالبة) إلى فحص النياسين والنترات (Vincent et al., 2008).

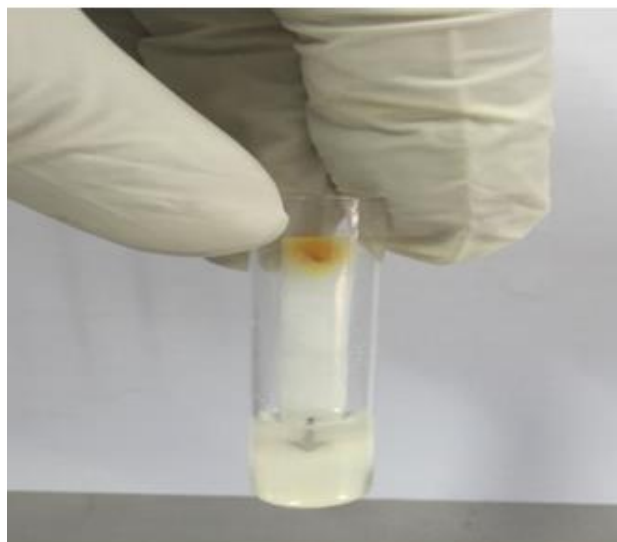
إن امتلاك بكتريا *M. tuberculosis* القدرة على اختزال النترات يعطي القابلية على تمييز هذه البكتريا عن بعض أنواع البكتريا الأخرى التي تمثل نفس الصفات مثل شكل المستعمرة ولونها وكذلك معدل النمو.

أنتاج النياسين يلعب دور مهم في تفاعل الأكسدة والاختزال التي تحدث خلال العمليات الأيضية في جميع Mycobacteria ، إذ إن *M. tuberculosis* تنتج كميات كبيرة من النياسين وان الكشف عن هذه المواد المتجمعة ضروري في تشخيص هذا النوع (Wellman Ribon, 2012).

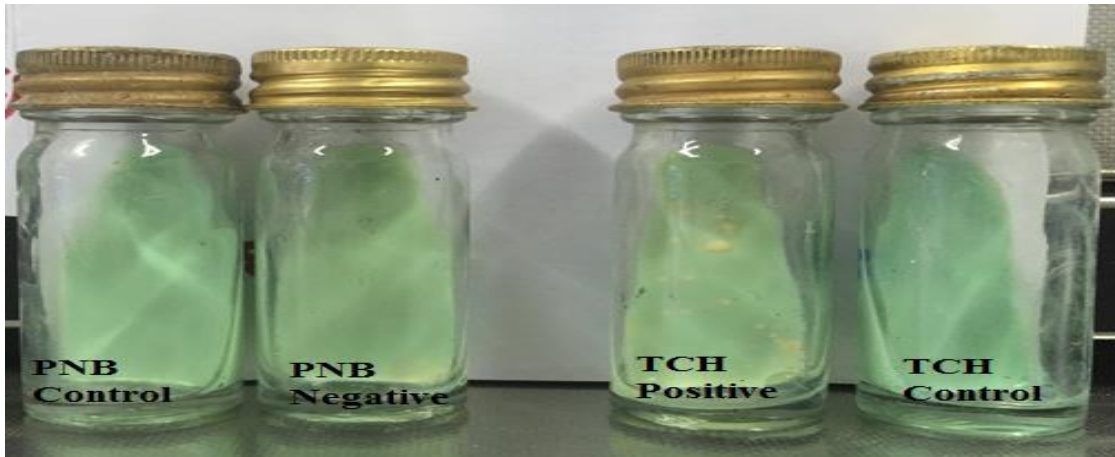
أن وسط (L.J) الحاوي على مادة (PNB) يثبط نمو العديد من الأنواع Mycobacterium tuberculosis complex مثل *M. tuberculosis*, *M.africaum*, *M.bovis*, *M.microti* وأن الوسط الحاوي على مادة (TCH) يساعد على نمو *M. tuberculosis* ويثبط الانواع الاخرى وهذا مفيد في تمييز هذه البكتريا عن باقي انواع Mycobacterium tuberculosis complex (Sharma et al.,2010).



الشكل (3-4b) اختبار اختزال النترات



الشكل (3-4a) اختبار النياسين



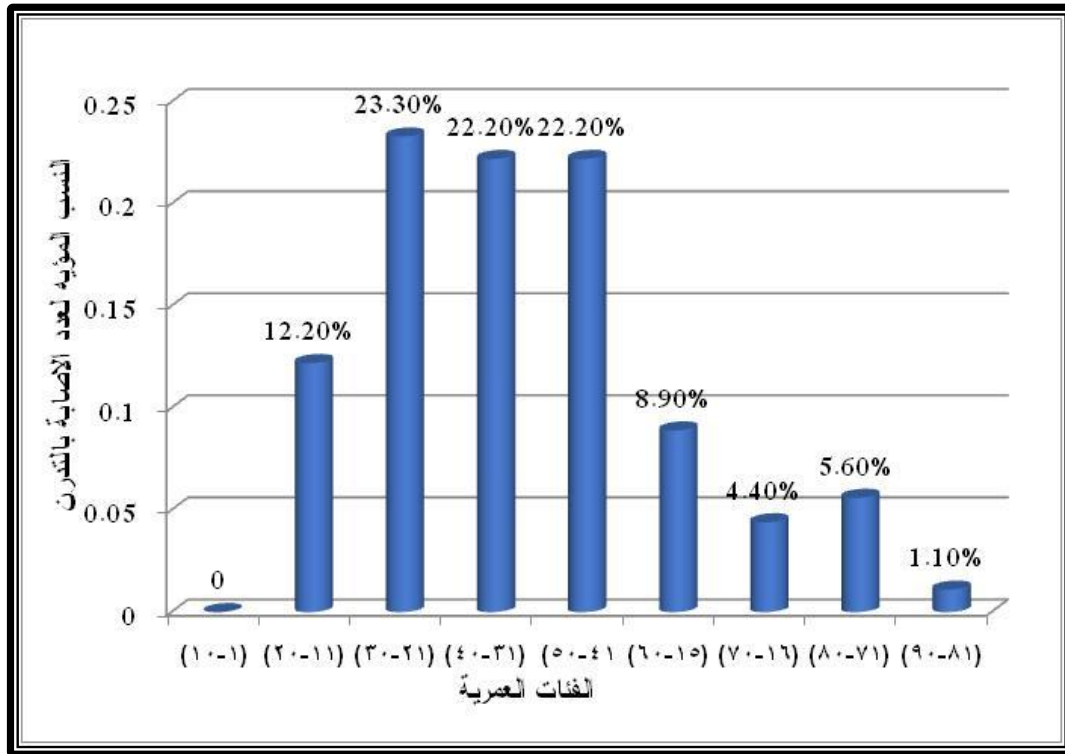
الشكل (3-4c) الأوساط الزرعية التفريقية لبكتريا التدرن

3.4 علاقة العمر بمرض التدرن

تتراوح أعمار المرضى المشمولين بالدراسة الحالية من سنة واحدة إلى 96 سنة، إذ وزعت إلى فئات عمرية والشكل (4-4) يوضح تغيرات أعداد المرضى في كل فئة عمرية وبفروق معنوية عند مستوى ($p < 0.01$) إذا لا توجد إصابة للفئات العمرية من (1-10) وكانت أعلى أعداد لمرضى التدرن ضمن الفئة العمرية (21-30) سنة والتي بلغت 23.3% تليها الفئات العمرية (31-40)، (41-50) إذ بلغت 22,2% أما أقل نسبة فكانت للمرضى الذين كانت أعمارهم تتراوح فوق 85 سنة حيث بلغت 1,1% من مجموع 500.

إن عدم وجود إصابة في الفئة العمرية (1-10) قد يعزى إلى إعطاء الأطفال لقاح BCG ، أما نسب الإصابة المرتفعة في الدراسة الحالية والتي سجلت في الفئات العمرية (21-30) و(31-40)، (41-50) قد تكون مرتبطة بعدة أسباب منها التدخين والعوامل المؤدية إلى تثبيط الجهاز المناعي الأخرى مثل بعض الأمراض. وهذا يتوافق مع ما أشارت إليه دراسات أخرى مثل الدراسة التي أجراها الربيعي (2011) حيث وجد أن أعلى نسبة للإصابة بالتدرن في أشخاص متوسط أعمارهم 35 سنة، وتتفق أيضا مع الدراسة التي أجراها Khalida (2008) في بغداد حيث سجل أعلى نسبة للإصابة في الفئة العمرية (21-30) سنة وبلغت 36.6% . وعلى مستوى العالم أشارت دراسات أجريت في جنوب أفريقيا إلى أن وبائية التدرن متباينة عمريا وبحسب المناطق الجغرافية ففي البلدان المتقدمة التي تتصف بالشيخوخة السكانية تكون أعلى حالات التدرن في فئة كبار السن (أكبر من 65) سنة أما في البلدان النامية تحدث

في الأطفال الرضع الذين تكون أعمارهم اقل من سنة حيث يكون الجهاز المناعي غير ناضج وضعيف وضعف برامج التطعيم الوقائي (schaff et al., 2010).



$P>0.0$

شكل (4-4) يمثل النسب المئوية لحالات التدرن حسب الفئات العمرية

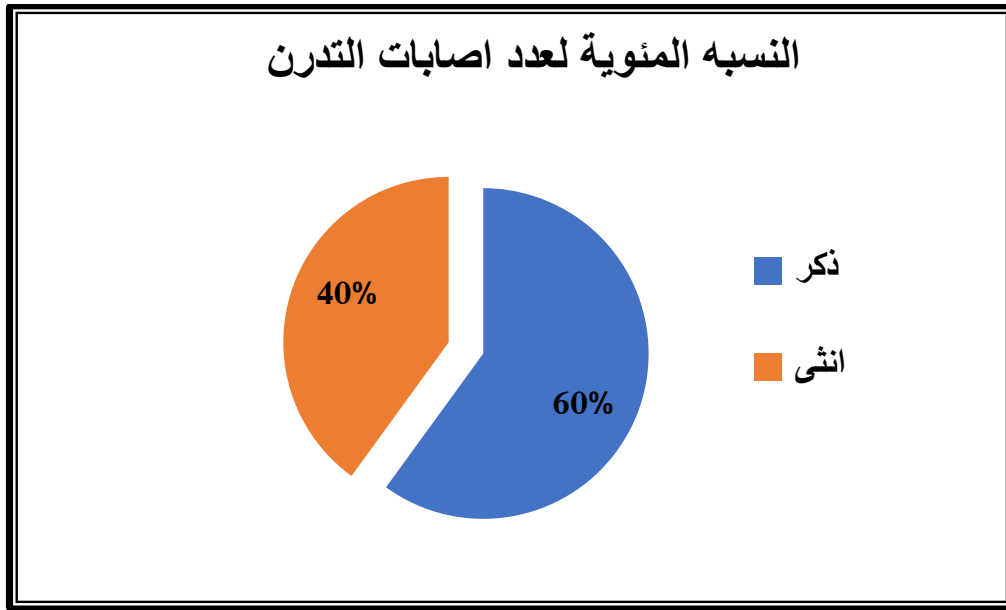
4.4 علاقة الجنس بمرض السل

أظهرت نتائج الدراسة الحالية فروق معنوية وعند مستوى معنوية ($P>0.05$) بين نسبة الأصابة بالتدرن في كلا الجنسين حيث سجل ارتفاع نسبة الأصابة عند الذكور فبلغت 60% مقارنة بالأنث التي بلغت 40% كما موضح في الشكل (4-5).

تقترب هذه النتائج مع ما توصل اليه بديوي (2011) اذ سجل نسبة الإصابة بالذكور أعلى من الإناث حيث كانت نسبة الأصابة بالذكور 65,42% أما نسبة الأصابة بالأنث فبلغت 34,58% وكذلك تتفق هذه النتائج مع نتائج الجبوري (2006) الذي أشار إلى أن نسبة الإصابة بالذكور أعلى من الأنث ويعود سبب ذلك ان الذكور تكون اكثر تماس اجتماعي من الأنث وهذا بسبب الظروف المحيطة اذ

يكون الذكر هو المسؤول عن كسب لقمة العيش مما يجعله أكثر عرضة لمرض التدرن وأشارت منظمة الصحة العالمية (2012) WHO, ان الأصابة بمرض التدرن والوفيات الناتجة عن هذا المرض تكون في الرجال اعلى من الأناث، ويعد مرض التدرن من اهم الأمراض المعدية والمسببة للوفيات بين أنحاء العالم، حيث بلغ نسبة الوفيات في النساء حوالي 750,000 امرأة بسبب هذا المرض وأصابة حوالي 3 ملايين امرأة.

بينما لا تتفق نتائج هذه الدراسة مع الدراسة التي أجراها (2004) Abood والتي بينت نسبة الإصابة بمرض التدرن عند الإناث تفوق نسبة إصابة المرض عند الذكور، وعلى النقيض من ذلك فقد وجد Rosales وجماعته (2010) أن نسبة الإصابة بمرض التدرن في الذكور تكون 66.5% وهي أعلى من نسبة الإصابة بالاناث 33,5% في هندوراس.



P>0.05

الشكل(4-5) النسب المئوية لحالات التدرن حسب الجنس

5.4 حساسية بكتريا *M. tuberculosis* لمضادات الخط الأول

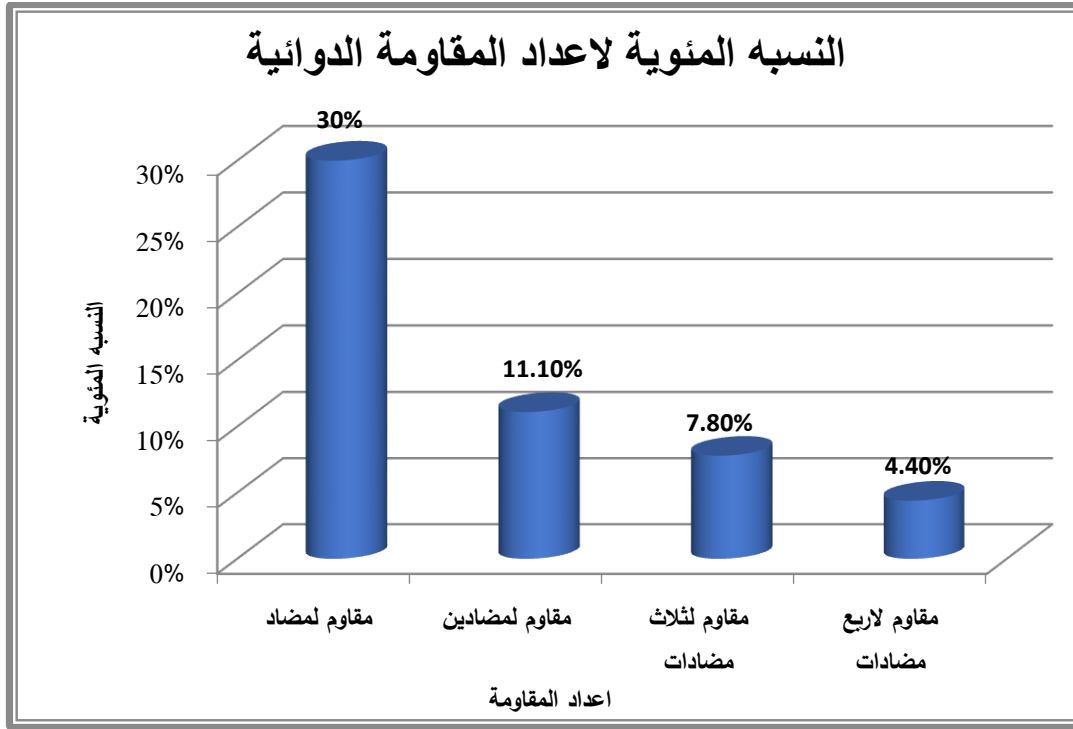
اختبرت حساسية (90) عزلة من بكتريا *M. tuberculosis* للخط الأول للمضادات المايكروبية المستخدمة لعلاج التدرن والتي هي للمضادات المايكروبية الآتية Isoniazid(I) و Rifampicin(R) و Ethambutol(E) و Streptomycin(S) ، يوضح شكل (4-6) اختبار حساسية بكتريا التدرن

لمضادات الخط الأول وذلك بطريقة proportion method إذ تحوي هذه الأوساط الزرعية على تركيز المثبط الأدنى لمضادات التدرن المذكورة فضلا عن وسطين Control خالين من المضاد، ويتم التحري عن المقاومة الدوائية لبكتريا التدرن اعتمادا على النمط المظهري لمستعمرات البكتريا على الأوساط الزرعية الصلبة.



شكل (4-6) اختبار حساسية بكتريا التدرن لمضادات الخط الاول

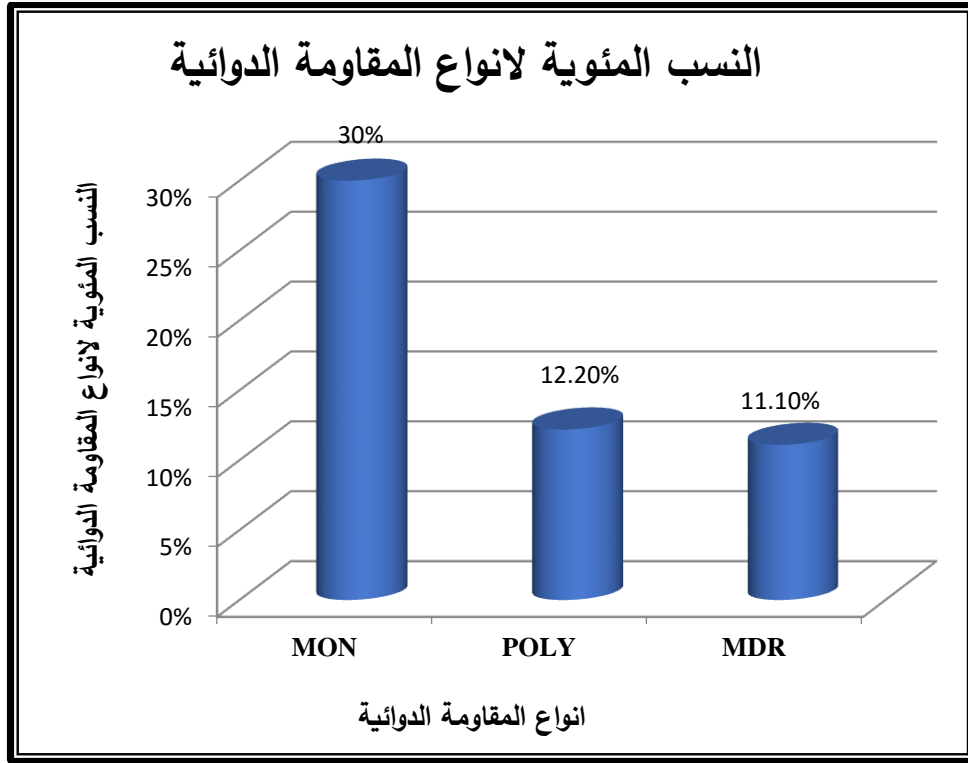
يبين الشكل (4-6) ان اعلى نسبة مقاومة كانت لنوع واحد من المضادات المايكروبية اذ بلغ 30% وان اقل نسبة مقاومة كانت لأربع أنواع من المضادات حيث بلغت 4,4% اما نسبة المقاومة لنوعين من المضادات المايكروبيه فكانت 11,1% وشكلت 7,8% نسبه المقاومه لثلاث أنواع من المضادات المايكروبية. اتفقت هذه النتائج مع نتائج دراسة بديوي (2011) اذ كانت اعلى نسبة للمقاومة لنوعين من المضادات المايكروبية وبنسبة 37,8% اما اقل نسبة للمقاومة فكانت لأربع مضادات مايكروبية وبنسبة 3,9%. ولم تتفق هذه الدراسة مع نتائج دراسة الجبوري(2006) اذ كانت المقاومة للمضادات الأربعة تشكل اعلى نسبة 40% اما اقل نسبة فكانت تشكل 4% وهي المقاومة لمضاد مايكروبي واحد.



$P < 0.01$

الشكل (4-6) النسب المئوية لأعداد المقاومة الدوائية لبكتريا التدرن

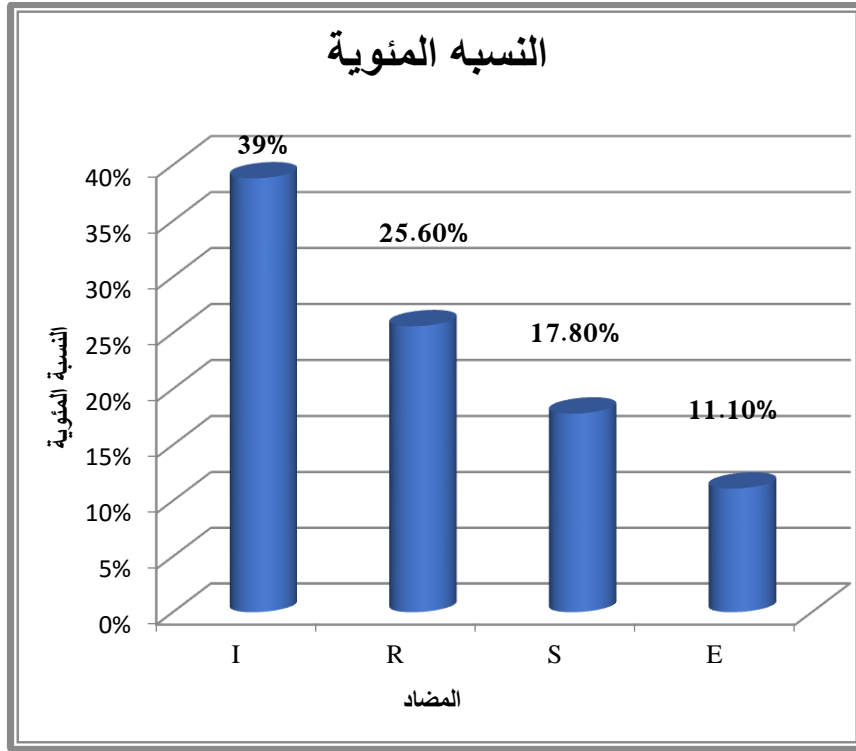
أظهرت نتائج الدراسة الحالية لفحص الحساسية فروقا معنوية عالية عند مستوى ($P > 0.01$). كان عدد العزلات المقاومة لمضاد مايكروبي واحد (27) عزلة من مجموع (90) عزلة وبنسبة 30%، أما العزلات المقاومة لأكثر من مضاد كانت (11) عزلة من أصل (90) عزلة وبنسبة 12,20% وان 10 عزلات كانت متعددة المقاومة الدوائية وبنسبة 11.1% بينما كان 43 عزلة حساسة لجميع أنواع المضادات المذكوره اعلاه وشكلت نسبة 47,8% من مجموع 90 عزلة كما في الشكل (4-7). تتفق هذه النتائج جزئيا مع دراسة أجريت في النيبال (Bijaya, et al.,2012) اذا كانت النسبة المئوية لفردى المقاومة هي الأعلى اذ بلغت 19,2% من أصل 50 عزلة وشكلت عدد العزلات المتعدد المقاومة الدوائية النسبة الأقل حيث شكلت 16,1% من مجموع 50 عزلة.



$P > 0.01$

الشكل (4-7) يبين النسب المئوية لمقاومة بكتريا التدرن للمضادات المتعددة

ومن جانب آخر تشكل نسبة المقاومة لمضاد Isoniazid أعلى نسبة مقاومة إذ بلغت 35 عزلة من مجموع 90 عزلة ونسبة 38,9%، أما المقاومة لمضاد Rifampicin فبلغت 23 عزلة من أصل 90 عينة ونسبة 25,6%، أما نسبة المقاومة لمضاد Streptomycin كانت 16 عزلة من أصل 90 عزلة ونسبة 17,8%، أما أقل نسبة مقاومة فكانت لمضاد Ethambutol إذ شكلت 10 عزلات من أصل 90 عزلة ونسبة 11,1% كما في الشكل (4-8).



P>0.01

الشكل (4-8) شكل المقاومة الأحادية لبكتريا التدرن لمضادات الخط الاول

تتفق نتائج الدراسة الحالية مع ما توصل إليه ناصر (2006) إذ اظهرت دراسته بأن أعلى نسبة للمقاومة كانت لمضاد الايزونيازيد ومع دراسة الكعبي (2008) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 4,5% ولم تتفق هذه النتائج مع ما توصل اليه بديوي (2011) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 21,05%.

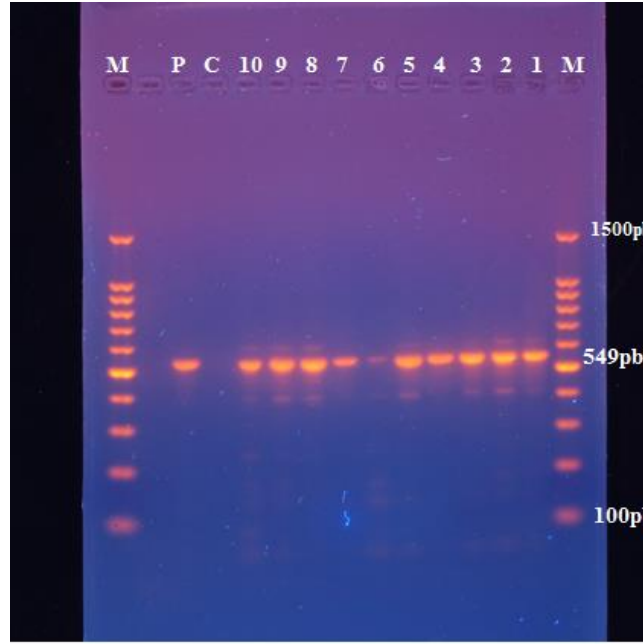
أما مقاومة العزلات لمضاد الريفامبسين فكانت بنسبة 25,6% تتفق هذه الدراسة مع نتائج دراسة الكعبي حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 67,64% ولم تتفق مع نتائج دراسة البديوي حيث كانت نسبة المقاومة لهذا المضاد 6,7%. أما مقاومة العزلات لمضاد streptomycin فقد كانت بنسبة 17,8% وتتفق نتائج هذه الدراسة مع ما توصل اليه البديوي (2011) إذ بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 22% Streptomycin. ومن جانب آخر فقد سجلت هذه الدراسة أقل نسبة مقاومة لمضاد Ethambutol فقد بلغت 11,1% وتختلف هذه النتائج مع ما توصل إليه الجبوري (2006) حيث لم يظهر أي عزلة مقاومة لمضاد Etham butol. ، وأتفقت هذه النتائج مع نتائج دراسة بديوي (2011) فقد بلغت نسبة المقاومة لهذا المضاد 5,27% وكانت الأخيرة بالنسبة لمقاومة المضادات الأربعة.

6.4 التشخيص الجزيئي لبكتريا التدرن المتعددة المقاومة الدوائية Molecular

Diagnosis of MDR-TB

1.6.4 الكشف عن *M. tuberculosis* بواسطة PCR

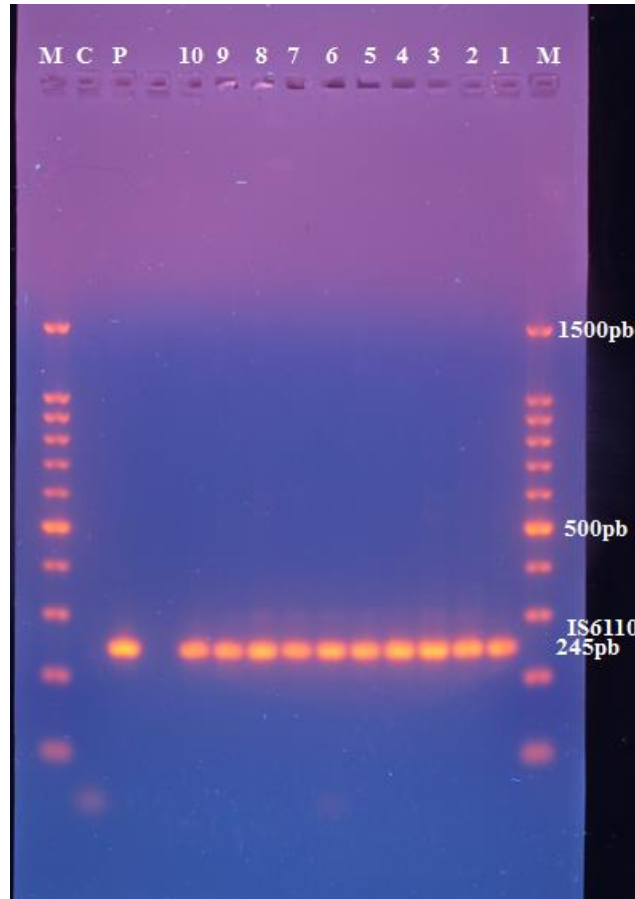
تتراوح تراكيز الحامض ونقاوة الحامض النووي المستخلص من عزلات البكتريا ذات المقاومة المتعددة (10 عزلات) بين 500-900 نانوغرام لكل مايكروليتر وطبقت النقاوة بالاعتماد على قيم الامتصاصية 260/280 تتراوح بين (1.4-1.8) ملحق 1 وهذه النتائج بينت ملائمة طريقة الاستخلاص المستخدمة للدراسة الجزيئية . وقد تم الكشف الجزيئي عن بكتريا *M. tuberculosis* من خلال الكشف عن الجين 16S rRNA الخاص بها بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR باستخدام برايمرات متخصصة لهذه البكتريا حيث تعطي نواتج تفاعل حجوما 549 زوج قاعدي من خلال الشكل (4-9)، وقد ثبت من خلال النتائج أن جميع العزلات المستخدمة في هذه الدراسة تنتمي إلى *Mycobacterium tuberculosis complex*. إن تضخيم جين 16srRNA الخاص ببكتريا التدرن يستخدم لتأكيد وجود *Mycobacterium tuberculosis complex* في العينات السريرية (Hanetal, 2003). توافقت هذه الدراسة مع دراسة علي (2013) إذ كانت نسبة العزلات التي تحتوي على هذا الجين 96,6 من اصل 344 عزلة.



الشكل (4-9) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا التدرن لجين 16S rRNA بحجم 549 زوج قاعدي. تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل PCR ، C السيطرة السالبة، P السيطرة الموجبة

2.6.4 تشخيص بكتريا التدرن من خلال الكشف عن وجود عنصر الغرس IS6110 في بكتريا *M. tuberculosis*

تم الكشف عن بكتريا *M. tuberculosis* من خلال الكشف عن وجود عنصر الغرس IS6110 حيث استخدم برايمرات متخصصة لبكتريا التدرن لغرض الكشف عن هذا العنصر الخاص ببكتريا *M. tuberculosis*. اذ اظهرت الدراسة الحالية ان جميع العزلات كانت تحتوي على هذا العنصر والذي يكون على شكل حزمة 245 زوج الشكل (4-10). إن الكشف عن وجود عنصر الغرس IS6110 يمكن ان يستخدم كبصمة وراثية لبكتريا *M. tuberculosis* ولأجل تشخيص المرض بصورة متخصصة أيضاً (willi et al., 1999) ، توافقت نتائج الدراسة الحالية مع الدراسة التي اجراها الجبوري (2006) حيث كانت جميع العزلات حاوية على عنصر الغرس IS6110.

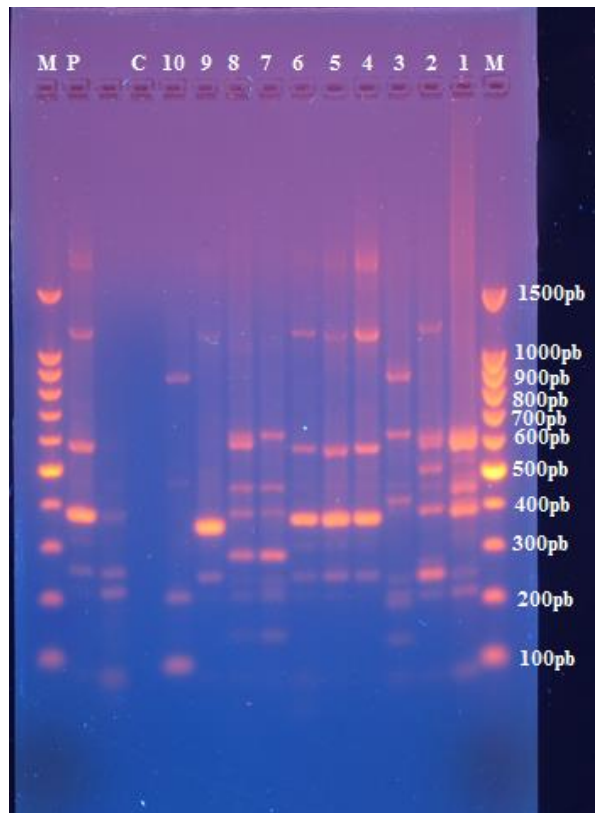


الشكل (4-10) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا التدرن لعنصر الغرس IS6110 بحجم 245 زوج قاعدي. تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (10-1) النتائج الموجبة لتفاعل PCR ، C السيطرة السالبة ، P السيطرة الموجبة

PCR Finger printing 3.4.6

استخدام الطرق الجزيئية الحديثة للتمييز الوراثي بين سلالات بكتريا *M. tuberculosis* ساعد في استخدامها كأداة في معرفة التغيرات polymorphism بين العزلات العائدة لمناطق جغرافية مختلفة وفي الدراسات الوبائية، وباعتماد على عنصر الغرس IS6110 وجد ان هناك صنفين لنمط البصمة الوراثية في العراق النمط الأول يحتوي على نسخ قليلة من عنصر النرس والثاني يحتوي على نسخ متعددة من هذا العنصر (الجبوري، 2006). تم الكشف عن التغيرات الوراثي في هذه الدراسة بالاعتماد على عدد عنصر الغرس IS6110 التابعة للمكون الوراثي لبكتريا *M. tuberculosis* بواسطة تفاعل البلمرة المتسلسل ومن خلال وجود أو عدم وجود الحزم والتباين في كثافة الحزم فقد أوضحت نتائج الدراسة

الحالية أن 80% من العزلات تحتوي على (6-10) نسخة من عنصر الغرس المذكور ونسبه 20% تحتوي على (1-5) نسخة الشكل (4-11) وهذا يعني أن هناك تباين بين العزلات بالاعتماد على عدد نسخ عنصر الغرس هذا. وتقترب نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة الجبوري (2006) حيث وجد ان 28% من العزلات تحتوي على نسبة قليلة من عنصر الغرس IS6110 اقل من 6 بينما كانت نسبة العزلات الحاوية على نسخ متعددة اكثر من 6 نسخة 72%. وقد بينت هذه الدراسات بأن *M. tuberculosis* المعزولة من العراق هي مشابهة للبكتيريا المعزولة من البلدان الأخرى (Soini and James, 2001).



الشكل (4-11) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتيريا التدرن لإعداد عنصر الغرس IS6110. تركيز الهلام 1.51.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل PCR، C السيطرة السالبة، P السيطرة الموجبة

4.6.4 تتابع سلسلة قواعد جين 16SrRNA و عنصر الغرس IS6110

تم تحليل التسلسل التتابعي للقطعة المضاعفة من جين 16srRNA و عنصر الغرس IS6110 لبكتيريا *M. tuberculosis* باستخدام جهاز التحليل الوراثي وقورنت مع التسلسل الجين نفسه الموجود في

موقع NCBL وذلك لتأكيد التشخيص الجزيئي الناتج عن تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي Conventional PCR وتمييز بكتريا *M. tuberculosis* عن باقي أنواع *Mycobacterium tuberculosis complex*. وقد أظهرت نتائج الدراسة الحالية بأن نسبة التطابق لجين 16srRNA كانت 99% وان نسبة تطابق عنصر الغرس Is6110 مع العنصر الأصلي 100% كما مبين في الشكل (4-12) و (4-13)

Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome
Sequence ID: gi|448814763|NC_000962.3 Length: 4411532 Number of Matches: 1

Range 1: 1472719 to 1473180 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
848 bits(459)	0.0	461/462(99%)	0/462(0%)	Plus/Plus
Query 1	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC	60		
Sbjct 1472719	GCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGC	1472778		
Query 61	GGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCA	120		
Sbjct 1472779	GGCGGAGCATGTGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCA	1472838		
Query 121	CAGGACCGCTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGACGGTGGTGCATGGCTGT	180		
Sbjct 1472839	CAGGACCGCTCTAGAGATAGGCGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGACGGTGGTGCATGGCTGT	1472898		
Query 181	CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCA	240		
Sbjct 1472899	CGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCTCA	1472958		
Query 241	TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG	300		
Sbjct 1472959	TGTTGCCAGCACGTAATGGTGGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAG	1473018		
Query 301	GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATG	360		
Sbjct 1473019	GTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCCAGGGCTTACACATGCTACAATG	1473078		
Query 361	GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT	420		
Sbjct 1473079	GCCGGTACAAAGGGCTGCGATGCCGCGAGGTTAAGCGAATCCTTAAAAGCCGGTCTCAGT	1473138		
Query 421	TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTTAAGTCGGAGTCG	462		
Sbjct 1473139	TCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTTAAGTCGGAGTCG	1473180		

الشكل (4-12) نتائج تحليل التسلسل التتابعي لجين 16SrRNA على موقع NCBI للعينة رقم (1)

Mycobacterium tuberculosis H37Rv, complete genome

Sequence ID: [NZ_CP009480.1](#) Length: 4396119 Number of Matches: 16

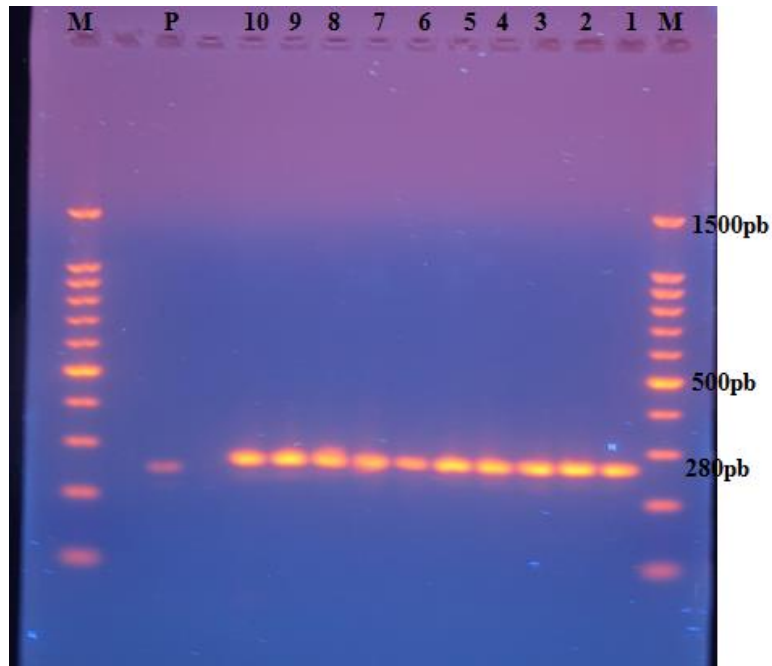
Range 1: 888085 to 888267 [GenBank](#) [Graphics](#) ▼ Next Match ▲ Previous I

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
339 bits(183)	1e-91	183/183(100%)	0/183(0%)	Plus/Plus
Query 1	CAAACTCGGCCTGTCCGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCGCAGGACCACGATCGCTGATCC	60		
Sbjct 888085	CAAACTCGGCCTGTCCGGGACCACCCGCGGCAAAGCCCGCAGGACCACGATCGCTGATCC	888144		
Query 61	GGCCACAGCCCGTCCC GCCGATCTCGTCCAGCGCCGCTTCGGACCACCAGCACCTAACCG	120		
Sbjct 888145	GGCCACAGCCCGTCCC GCCGATCTCGTCCAGCGCCGCTTCGGACCACCAGCACCTAACCG	888204		
Query 121	GCTGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGACCTGGGCAGGGTTCGCCTACGTGGCCTT	180		
Sbjct 888205	GCTGTGGGTAGCAGACCTCACCTATGTGTCGACCTGGGCAGGGTTCGCCTACGTGGCCTT	888264		
Query 181	TGT 183			
Sbjct 888265	TGT 888267			

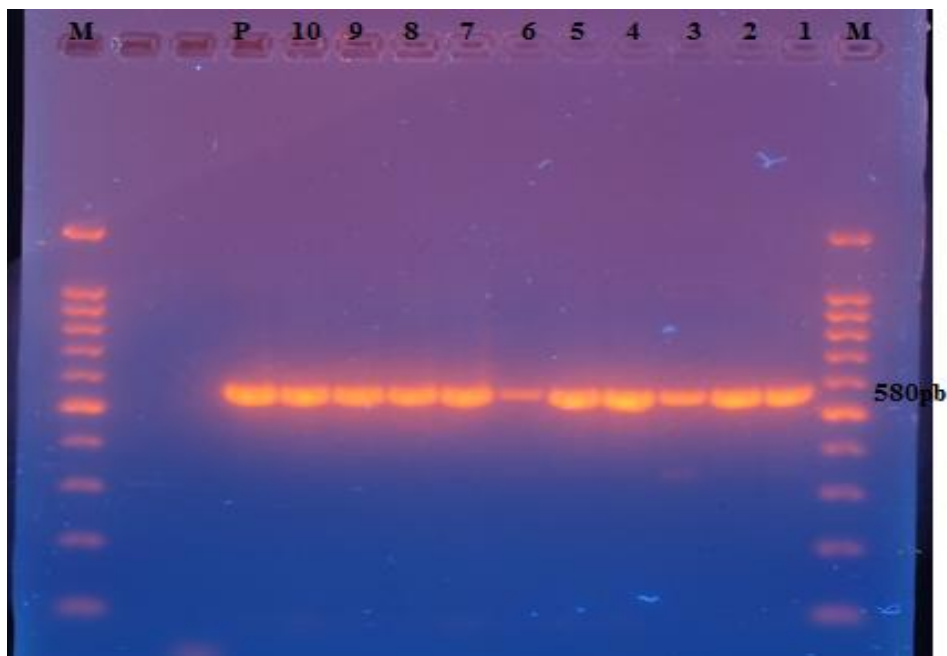
شكل (4-13) نتائج تحليل التسلسل التتابعي على موقع NCBI للعينة رقم (1)

5.6.4 دراسة التسلسل التتابعي لجينات *inhA* *gen*, *katG* *gen*, *rpoB* *gen*

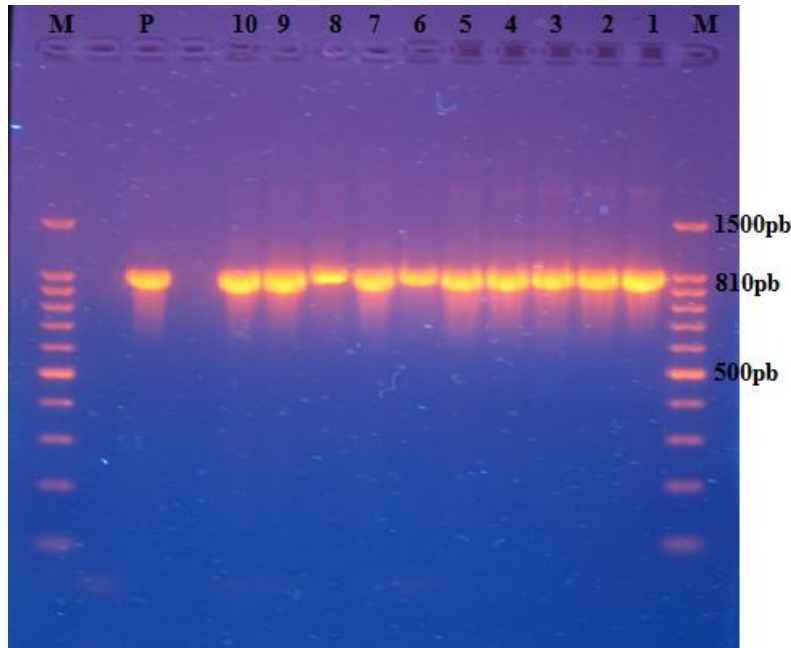
تم الكشف عن وجود جينات *rpoB* و *katG* و *inhA* لـ 10 عزلات اظهرت المقاومة لمضاد Rifampicin و Isoniazid على الاوساط الصلبة ثم تم دراسة التسلسل التتابعي لهذه الجينات باستخدام جهاز التحليل الوراثي من قبل شركه Magro gene company وقورنت مع التسلسل التتابعي للجين نفسه الموجود على موقع NCBI تحت رقم (NC_000962.3) لعزله Mycobacterium tuberculosis H37Rv وذلك للكشف عن الطفرات الحاصلة في هذه الجينات والمسؤولة عن المقاومة لمضاد R و I وكذلك تم مطابقة التسلسل التتابعي للقواعد النايروجينية المترجمة مع تسلسل الحوامض الامينية الذي يشفر له هذا الجين. كان حجم الجينات الناتجة من تفاعل الـ PCR بعد المقارنة مع الدليل الحجمي هي 280 لجين *rpoB* كما في الشكل (4-16) و 580 لجين *katG* كما في الشكل (4-17) و 810 لجين *inhA* كما في الشكل (4-14)



الشكل (4-14) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا التدرن لجين rpoB تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل PCR، C السيطرة السالبة، P السيطرة الموجبة



شكل (4-15) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا التدرن لجين katG تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل PCR، C السيطرة السالبة، P السيطرة الموجبة



شكل (4-16) شكل الترحيل الكهربائي لنتائج تفاعل PCR لبكتريا التدرن لجين *inhA* تركيز الهلام 1.5، الفولتية 75 فولت لمدة 45 دقيقة، M، الدليل الحجمي (100) زوج قاعدي، (1-10) النتائج الموجبة لتفاعل PCR، C السيطرة السالبة، P السيطرة الموجبة

يوضح الجدول (3-4) الطفرات الحاصلة في هذه الجينات والتغير الحاصل على مستوى القواعد والحامض الاميني في 10 عزلات اذ ان جميع العزلات كانت تحتوي على طفره في جين *rpoB* وهو المسؤول عن المقومه لمضاد Rifampicin وكانت 80% من الطفرات حاصله في الشفرة TGC والتي تشفر للحامض الاميني Ser، وان 40% من هذه الطفرات حاصله في شفرع TCC والتي تشفر للحامض الاميني Ser. اما الطفرات المسؤله عن المقاومع لمضاد Isoniazid تحدث في جين *katG* و *inhA* حيث ان 80% من الطفرات تحدث في جين *katG* وتحديدا في شفره AGC التي تشفر للحامض الاميني Ser بنسبه 80% و بنسبه 30% في شفره CCA و شفره ATG التي تشفر للحامض الاميني Met و Gle على التوالي و 30% في جين *inhA* بنسبه 10% في شفره GTC التي تشفر للحامض الاميني Ieu و 20% في شفره ATG التي تشفر للحامض الاميني Met

الجدول (3-4) نتائج التحليل الوراثي للتسلسل المتتابعي

العينة	<i>rpoB</i> gen		<i>KatG</i> gen		<i>inhA</i> gen	
	AA change	Nucleotide change	AA change	Nucleotide change	AA change	Nucleotide change
1	S-L	TCG-TTG	—	—	I-V	GTC-ATC
2	S-L	TCG-TTG	S-T	AGC-ACC	—	—
3	S-L	TCG-TTG	S-T	AGC-ACC	—	—
4	S-W	TCC-TGG	S-T Q-K	AGC-ACC CCA-CAA	—	—
5	S-W	TCC-TGG	S-T Q-K	AGC-ACC CCA-CAA	—	—
6	S-W	TCC-TGG	S-T M-I	AGC-ACC ATG-ATT	M-I	ATG-ATA
7	S-W	TCC-TGG	S-T	AGC-ACC	—	—
8	S-L	TCG-TTG	—	—	M-I	ATG-ATT
9	S-L	TCG-TTG	S-T M-I	AGC-ACC ATG-ATT	—	—
10	S-L	TCG-TTG	S-T M-I Q-K	AGC-ACC ATG-ATT CCA-CAA	—	—

لم تتفق نتائج الدراسة الحالية مع نتائج دراسة علي (2013) حيث وجد أن 82.5% من الطفرات حاصل في شفره TCG من جين *rpoB* المسؤولة عن المقاومة لمضاد Rifampicin ونسبة 42% من الطفرات حاصله في جين *katG* المسؤول عن مقاومه Isoniazid، ولكن اتفقت مع هذه الدراسة في نسبة الطفرات الحاصلة في جين Isoniazid حيث كانت 37.3% ، ولم تتفق مع نتائج دراسة Zenteno (2009) حيث وجد أن نسبة الطفرات الحاصلة في جين *rpoB* كانت 47% ونسبه الطفرات الحاصلة في جين *katG* هي 52% ولم يتم دراسة الطفرات الحاصلة في جين *inhA* .

الاستنتاجات والتوصيات

Conclusions & Recommendation



الاستنتاجات والتوصيات Conclusions and Recommendation



الاستنتاجات Conclusions

1. أن أعلى نسبة لعزلات بكتريا *M. tuberculosis* كانت من عينات القشع مقارنة بالعينات السريرية الأخرى.
2. ارتفاع نسب الإصابة بالتدرن في الذكور مقارنة بالإناث وارتفاع نسبة الإصابة بمرض التدرن في فئة الشباب مقارنة بفئات كبار السن.
3. وجود نسبة عالية من عزلات بكتريا التدرن مقاومة لمضادات الخط الأول، إذ كانت أعلى نسبة مقاومة لمضاد Isoniazid وقلها في Ethambutol.
4. لا توجد هناك سلالات لا تحتوي على عنصر الغرس IS6110 لذلك يمكن أن تستخدم كأدات تشخيص.
5. هناك صنفين لنمط البصمة الوراثية لسلالات بكتريا التدرن في العراق اعتمادا على أعداد عنصر الغرس IS6110 النمط الأول يحتوي على نسخ قليلة من عنصر الغرس والثاني يحتوي على نسخ متعددة من هذا العنصر.
6. إن الطفرات الحاصلة في جين *rpoB* هي المسؤولة عن مقاومة بكتريا التدرن لمضاد Rifampicin، أما الطفرات الحاصلة في جين *katG* و *inhA* فهي المسؤولة عن المقاومة لمضاد Isoniazid .

التوصيات Recommendation

1. التحري المستمر عن عزلات بكتريا *M. tuberculosis* ذات المقاومة المتعددة للمضاد-MDR TB وكذلك الواسعة المقاومة للمضاد XDR-TB .
2. الحد من الاستعمال الغشائي للمضادات الميكروبية تجنباً لمقاومه بكتريا *M. tuberculosis* لهذه المضادات .
3. استخدام تقنيه تفاعل البلمرة المتسلسل PCR في التحري المبكر لبكتريا *M. tuberculosis* وفي فحص الحساسية للمضادات مباشرة من عينات القشع والعينات السريرية الأخرى .

4. إجراء دراسة وراثية حول لانتقال الأفقي للجينات والمسؤولة عن مقاومه البكتريا للمضاد .
5. استعمال طرق البصمة الوراثية الأخرى Finger printing مثل RFLP و DR probes و AFLP و Spoligotyping والمقارنة بينهم .
6. من الضروري توثيق التاريخ الطبي والوبائي للمرض ونوعيه العلاج المستخدم .
7. دراسة الطفرات المسؤولة عن المقاومة للمضادات الأخرى .

الفصل الخامس : المصادر

References



الفصل الخامس : المصادر References



1.5 المصادر العربية

- ❖ **أبن سينا** ، أبو علي الحسين بن عبدالله . (2004) . القانون في الطب . المجلد الثاني ، الكتاب الثالث . تحقيق : أدوار القش . مؤسسة عزالدين للطباعة والنشر : 1728 صفحة .
- ❖ **الجبوري** ، أزهر صبحي (2006) . المقاومة المتعددة في مجموعة بكتريا التدرن المعزولة من المرضى العراقيين . رسالة ماجستير ، كلية التقنيات الصحية والطبية .
- ❖ **دليل العمل المختبري لبرنامج التدرن في العراق** . (2009) .
- ❖ **الرازي** ، أبي بكر محمد بن زكريا . (2000) . الحاوي في الطب . المجلد الثاني ، الجزء الرابع : في أمراض الرئة . مراجعة وتصحيح : د. محمد محمد إسماعيل . منشورات محمد علي بيضون ، دار الكتب العلمية ، بيروت لبنان .
- ❖ **العامري** ، عباس عطية حمودي علي (2005) . دراسة الأصابات البكتيرية في الجهاز التنفسي لمرضى زرع الكلى . رسالة ماجستير ، جامعة بغداد ، كلية التربية أبن الهيثم .
- ❖ **الكريمي** ، خالدة كريم (2008) . دراسة وبائية لمقاومة عصيات بكتريا السل لمضادات المكروبات وتأثير ثنائي الأستيل . رسالة ماجستير ، جامعة بغداد ، كلية الطب .
- ❖ **بديوي سلوى غالي** . (2011) . تقييم مقاومة بكتريا التدرن Mycobacterium tuberculosis للمضادات الحيوية والتحري عن البكتريا المرافقة في المصابين . جامعة بغداد ، كلية العلوم للبنات . 101 - 86 M.S.C.\Thesis
- ❖ **منخي** ، احمد أسمر . (2009) . دليل العمل المختبري لبرنامج التدرن في العراق .
- ❖ **ناصر** ، عصام جمعه (2006) . إستخدام التقنيات المتطورة (BACTEC MAGIT 965 وتفاعل سلسلة البوليميريز) في عزل ، تشخيص ، وأختبار الحساسية للمضادات الحيوية للبكتريا الفطرية . رسالة ماجستير ، كلية التقنيات الصحية والطبية .

2.5 المصادر الأجنبية

A

- ❖ **Akira**, S. S. ; Uematsu, T. O. (2006) . Pathogen recognition and innate immunity, Cell, V. 124, N. 4, P. 783–801.
- ❖ **Alexander**, K.; Laver, P.; Michel, A.; Williams, M.; van Helden, P. and Warren, R. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, M. mungi. Emerg. Infect. Dis. 16(8): 1296-1299.
- ❖ **American Lung Association** (2013). Trends in Tuberculosis Morbidity and Mortality. Research and Health Education Epidemiology and Statistics Unit. U.S.A.
- ❖ **Anderson**, S.T. ; Williams, A.J. & Brown, J.R. (2006). Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* undetected by tuberculin skin Testing. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 173:1038–1042.
- ❖ **Andrews**, J. Shah, N. Gandhi, N. Moll, T. and Friedland, G.(2007). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: implications for the HIV epidemic and antiretroviral therapy rollout in South Africa. Journal of Infectious Disease. 3:482-490.
- ❖ **Annelies**, VR.; Warren, R.; Mshanga, I.; Jordaan, AM.; Spuy, GD.; Richardson, M.; Simpson, J.; Gie, RP.; Enarson, DA.; Beyers, N.; van Helden, PD.; Victor, TC. (2001). Analysis for a limited number of gene codons can predict drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in a high-incidence community. J Clin Microbiol, 39(2):636–641.
- ❖ **Aragón**, Im.; navarro, f.; heiser, v.; garrigó, m.; español ,m.; coll, p. (2006). Rapid detection of specific gene mutations associated with isoniazid or rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates using non-fluorescent low-density DNA microarrays. J. antimicrob chemother. 2006 may; 57(5):825-31.
- ❖ **Arjomandzadegan**, M.; Titov, L.; Surkova, L.; Farnia, P.; Sheikholeslami, F., and Owlia, P. (2012). Determination of principal genotypic groups among susceptible, MDR and XDR clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Belarus and Iran. Tuberk Toraks. 60 (2):153-159.

B

- ❖ **Bhatt, A. ; Molle, V. ; Besra, G. S. ; Jacobs Jr W. R. and Kremer, L.(2007).** The *Mycobacterium tuberculosis* FAS-II condensing enzymes: their role in mycolic acid biosynthesis, acid-fastness, pathogenesis and in future drug development. *Molecular Microbiology* 64(6): 1442–1454.
- ❖ **Boehme, C.; Nabeta, P.; Hillemann, D.; Nicol, M.; Shenai, S.; Krapp, F. et al. (2010).** Rapid molecular detection of tuberculosis and rifampin resistance. *N. Engl. J. Med.* 363: 1005-1015
- ❖ **Bozzano, F. Marras, F. and Andrea, D. (2014).** Immunology of Tuberculosis. *Mediterranean Journal Of Hematology and Infectious Diseases*, 6: 27-38.
- ❖ **Brennan, P. J. (2003) .** Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *V. 83, Issue 1, P. 91- 97.*
- ❖ **Brosch, R. Devlin, T. Feltwell, S. and Gentles, N. (2002).** A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99: 3684-3689.

C

- ❖ **Campbell, Neil A. and Reece, Jane B. (2002).** "Biology" (6th ed.), pp. 345-346. San Francisco: Benjamin Cummings. ISBN 0-8053-6624.
- ❖ **Camus, J.; Pryor, M.; Medigue, C. and Cole, S. (2002).** Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*.148:10: 2967-2973.
- ❖ **Centers for Disease Control and Prevention(CDC) (2013).** Core Curriculum on Tuberculosis: What the Clinician Should Know. 6th ed. National Center for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, STD, and TB Prevention Division of Tuberculosis Elimination. USA
- ❖ **Centers for Disease Control and Prevention, CDC. (2005).**Surveillance reports: reported tuberculosis in the United States.
- ❖ **Centers for Disease Control and Prevention,CDC, (2004) .**Interactive Core Curriculum on Tuberculosis. (Web-based) .

- ❖ **Centers for Disease Control and Prevention, CDC.** (2009) Transmission and pathogenesis of tuberculosis.
- ❖ **Centers for Disease Control and Prevention, CDC.** (2010). Multidrug-Resistant Tuberculosis (MDR TB).
- ❖ **Chandra, K.; Haripriya, M., and Shaik, M.** (2010). 2D Qsar, Pharmacophore and Docking Studies of *Mycobacterium tuberculosis* Enoyl Acyl Carrier Protein Reductase Inhibitors. JGPT. 2 (5):73-89.
- ❖ **Cohn, D.L. Bustreo, F. and Raviglione, M.C.** (1997). Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. Clin. Infect. Dis. 24(1)1: 121-130.
- ❖ **Cole, S.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S., and Eiglmeier, k.** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature. 393: 537-544.
- ❖ **Condrau, F.** (2001) ‘Who Is the Captain of All These Men of Death’: The Social Structure of a Tuberculosis Sanatorium in Postwar Germany,”. J. Interdisc. Hist. 32: 243-263.

D

- ❖ **Daniel, Th.** (2004). The impact of tuberculosis on civilization. Infectious Disease Clinics of North America, 18:157-165.
- ❖ **Dennis, Pringle** (2009). The resurgence of tuberculosis in the Republic of Ireland: Perceptions and reality. Social Science & Medicine 68 620–624.
- ❖ **Dheda, K. ; Booth, H. and Huggett, J. F.** (2005) . Lung remodeling in pulmonary tuberculosis. J Infect ;192:1201–1210.
- ❖ **Dinnes, J.; Deeks, J.; Kunst, H.; Gibson, A.; Cummins, E.; Waugh, N.; Drobniowski, F. & Lalvani, A.** (2007). A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. J. Health Technol. Assess.11 (3): 1–314.
- ❖ **Dye, C. and Williams, B.G.** (2010). The Population Dynamics and Control of Tuberculosis. Science, 328: 856-861.

E

- ❖ **Edward**, A. and Nardell, MD. (2009). The merck manual online medicine, Tuberculosis, Last full review/revision last modified September.
- ❖ **El-Etr**, S. H. and Cirillo, J. D.(2001). Entry mechanisms of mycobacteria, Front Biosci, V. 6, P. D737–747
- ❖ **Esko**, J. D. ; Tamara, L. ; Doering, and Christian, R. H. (2008). in Essentials of Glycobiology. Cold Spring Harbor Press. pp. Ch. 20.
- ❖ **Espinal**, M. (2004). What is the "fall and rise" phenomenon and the "sequential regimen" mechanism? In: Frieden T, editor. Toman's tuberculosis:case detection, treatment, and monitoring-questions and answers. 2nd ed. Geneva, Switzerland: WHO,:200-202.

F

- ❖ **Ferguson**, J. S. ; Weis, J. J. ; Martin, J. L. and Schlesinger, L. S.(2004) . Complement protein C3 binding to *Mycobacterium tuberculosis* is initiated by the classical pathway in human bronchoalveolar lavage fluid. InfectImmune. 72: 2564–2573.
- ❖ **Fleischmann**, R. ; Alland, D.; Eisen, J. ; Carpenter, L.; White, O.; Peterson, J.; DeBoy, R.; Dodson, R.;Gwinn, M.; Haft, D.; Hickey, E.; Kolonay, J.; Nelson, W.; Umayam, L.; Ermolaeva, M.; Salzberg, S. ; Delcher, A.; Utterback, Jacobs, J. ; Venter, J. and Fraser, C. (2002). Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J. Bacteriology. 184 (19): 5479-5490.T

G

- ❖ **Ghosh**; Jaydip; Pontus Larsson; Bhupender Singh; B M Fredrik Pettersson; Nurul M Islam; Sailendra Nath Sarkar; Santanu Dasgupta and y Leif A Kirsebom (2009). Sporulation in mycobacteria. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, no. 26 (Junio 30): 10781-1078.

- ❖ **Gillespie**, S.H. & Hawkey, P.M. (2006) Principles and Practice of Clinical Bacteriology (2nd) ed. John Wiley & Sons Ltd, England:159-171.
- ❖ **Golden**, M.P & Vikram, H.R. (2005). “Extrapulmonary tuberculosis: an overview.”American family physician. 72 (9): 1761–8.
- ❖ **Guinn**, K. M. ; Hickey, M. J. and Mathur, S. K. (2004) . Individual RD1- region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, Molecular Microbiology, V. 51, N. 2, P. 359–370.

H

- ❖ **Hanekom**, M.; van der Spuy, G.; Streicher, E.; Ndabambi, S. McEvoy, C. and Kidd, M. (2007). A recently evolved sublineage of the *Mycobacterium tuberculosis* Beijing strain family is associated with an increased ability to spread and cause disease. J. Clin.Microbiol.45:1483-1490
- ❖ **Harding**, C. V. and Boom, W. H.(2010). Regulation of antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis*: a role for Toll-like receptors, Nature Reviews Microbiology, V. 8, N. 4, P. 296–307.
- ❖ **Herrmann**, J. and Lagrange, P. (2005). Dendritic cells and *Mycobacterium tuberculosis*: which is the Trojan horse?. Pathol Biol (Paris) 53 (1): 35–40.
- ❖ **Hung**, N.; Sy,D.; Anthony, R.; Cobelens, F.; and van Soolingen, D. (2007). Fluorescence microscopy for tuberculosis diagnosis. Lancet Infect Dis 7: 238-239.
- ❖ **Hurt**, R. (2004). “Tuberculosis sanatorium regimen in the 1940s: a patient’s personal diary,”. J. Royal. Soc. Med. 97:350-353.

I

- ❖ **Iseman**, M.;Kasperbaur, H.; Blackburn, D.; William, B.; Chan, E. and David, C.(2009). The Denver TB course at National Jewish Health.Denver. Colorado. 2: 18-19

- ❖ **Ishiguro**, N. and Sato, G. (1988). Nucleotide sequence of insertion sequence IS34 1 I, which flanks the citrate utilization determinant of transposon Tn34 1 I. J Bacteriol 170, 1902-1906.

J

- ❖ **Jo**, E. K. (2008). Mycobacterial interaction with innate receptors: TLRs, C-type lectins, and NLRs, Current Opinion in Infectious Diseases, V. 21, N. 3, P. 279–286 .

K

- ❖ **Kang**, P. B. ; Azad, A. K. and Torrelles, J. B. (2005a) . The human macrophage mannose receptor directs *Mycobacterium tuberculosis* lipoarabinomannan-mediated phagosome biogenesis,” Journal of Experimental Medicine, V. 202, N. 7, P. 987–999.
- ❖ **Karboul**, A.; van Pittius, N.; Namouchi, A.; Vincent, V.; Sola, C.; Rastogi, N.; Suffys, P.; Fabre, M.; Cataldi, A.; Huard, R.; Kurepina, N.; Kreiswirth, B.; Ho, J.; Gutierrez, M., and Mardassi, H. (2006). Insights into the evolutionary history of tubercle bacilli as disclosed by genetic rearrangements within a PE_PGRS duplicated gene pair. BMC Evolutionary Biology. 6 (107).
- ❖ **Kethireddy**, S.; Nalgonda, D., and Pradesh, A. (2010). Tuberculosis-A Review of Clinical Features, Differential Diagnosis and Treatments available. IJPT. 2 (2):206-244.
- ❖ **Kharsany**, A.; Connolly, C.; Olowolagba, A. and Abdulkarrim, Q . (2007). TBtreatment outcomes following directly observed treatment at an urbanoutpatient TB facility in South Africa .Tropical. doctor. 36(1):23-25
- ❖ **Kim**, J.; Jiao, L.; Oh, J.; Ha, N. and Kim, Y. (2014). Crystal structure and functional implications of LprF from *Mycobacterium tuberculosis* and *M. bovis*ActaCrystallogrD. Biol. Crystallogr. 70(10):2619-2630.
- ❖ **Klaudt**, K. (1996). Tuberculosis today. The tuberculosis treatment, GTB, WHO, Geneva. 5: 1-5.

- ❖ **Kolyva, A. and Karakousis, P. (2012).** Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance .Understanding Tuberculosis-New Approaches to Fighting Against Drug Resistance, 209-229.
- ❖ **Kolyva, A. and Karakousis, P. (2012).** Old and New TB Drugs: Mechanisms of Action and Resistance .Understanding Tuberculosis-New Approaches to Fighting Against Drug Resistance, 209-229.
- ❖ **Korf, J. E. (2006) .** American Journal of respiratory and critical care medicine. V. 174, P. 152-160 .
- ❖ **Kumar, V. ; Abbas, A. K. ; Fausto, N. and Mitchell, R. N. (2007).** Robbins Basic Pathology (8th ed.). Saunders Elsevier. P. 516-522.

L

- ❖ **Li, Y. ; Petrofsky, M. and Bermudez, L. E. (2002) .** Mycobacterium tuberculosis uptake by recipient host macrophages is influenced by environmental conditions in the granuloma of the infectious individual and is associated with impaired production of interleukin-12 and tumor necrosis factor alpha. Infect Immun.;70:6223–6230.
- ❖ **Loddenkemper, R.; Sagebiel, D. and Brendel, A. (2002).** Strategies against multidrug-resistant tuberculosis. vol. 20 no. 36 suppl 66s-77s.

M

- ❖ **Madania, A.; Habous, M.; Zarzour, H.; Ghoury, I., and Hebbo, B. (2012).** Characterization of Mutations Causing Rifampicin and Isoniazid Resistance of *Mycobacterium tuberculosis* in Syria. Polish Journal of Microbiology. 61 (1):23–32.
- ❖ **Magee, D.; Conlon, K.; Nalpas, N.; Browne, J.; Pirson, C.; Healy, C.; McLoughlin, K.; Chen, J.; Vordermeier, H.; Gormley, E.; MacHugh, D., and Gordon, S. (2014).** Innate cytokine profiling of bovine alveolar macrophages reveals commonalities and divergence in the response to *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* Infection. Tuberculosis. 94:441-450.

- ❖ **Mahillon**, J. and Chandler, M. (1998). Microbiology and Molecular Biology Reviews" 62 (3), 725-774. Retrieved January 11, 2006. [http://mibr.asm.org/cgi/content/full/62/3/725 "Insertion sequences].
- ❖ **Mahon**, C.R; Lehman, D.C. and .Manuselis, G. (2007). Text book of Diagnostic Microbiology, 3rd. Ed. Elsevier, New Delhi, Accession no-754. ISBN- 978 81 312 0460 3.
- ❖ **Margaret**, C. (2009). Director-General of the World Health Organization: Preventing and managing M/XDR-TB: a global health imperative.
- ❖ **Marri**, P., Bannantine, J. and Golding, G. (2006). Comparative genomics of metabolic pathways in Mycobacterium species: gene duplication, gene decay and lateral gene transfer. FEMS. Microbiol. Rev. 30: 906-25.
- ❖ **McAdam**, R.A., Hermans, P.W., van Soolingen, D., Zainuddin,Z.F., Catty, D., van Embden , J.D., et al., (1990). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence belonging to the IS3 family. Mol Microbiol 4: 1607±1613.
- ❖ **McCann**. (2009). Secreted and Exported Proteins Important to Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis. Bacterial Secreted Proteins: Secretory Mechanisms and Role in Pathogenesis.Caister Academic Press.
- ❖ **Ministry of health of Iraq (MOH)** - Notional TB programme TB (2013). Epidemiological Situation in Iraq, Fifth National Conference of tuberculosis / Al- Basra.
- ❖ **Moreira**, J.; Mann, J.; Neidle, S.;McHugh, T. andTaylor, P.(2013).Antibacterial activity of head-to-head bis-benzimidazoles.Int. J.Antimicrob.Agents. 42(4):361-366.
- ❖ **Morgan**, M.; Kalantri, S.; Flores, L., and Pai, M. (2005). A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. BMC Infectious Diseases. 5:62. doi:10.1186/1471-2334-5-62.
- ❖ **Murray**, P. R. ; Rosenthal, K. S. and Pfaller, M. A. (2005). Medical Microbiology. Elsevier Mosby. P. 960, 6th ed.
- ❖ **Muyoyeta**, M.; Schaap, J. ; De, Mwanza, H. ; Muvwimi, W.; Godfrey-Faussett, M., and Ayles, H. (2009). Comparison of four culture systems

for *Mycobacterium tuberculosis* in the Zambian National Reference Laboratory. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 13(4): 460-465.

N

- ❖ **Naidoo, R. & Reddi, A. (2005).** “Lung resection for multidrug-resistant tuberculosis”. J. Asian Cardiovasc. Thorac. Ann.13 (2): 172–74.
- ❖ **Nakajima, C.; Rahim, Z.; Fukushima, Y.; Sugawara, I.; van der Zanden, A.; Tamaru, A., and Suzuki, Y. (2010).** Identification of *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates in Bangladesh by a species distinguishable multiplex PCR. BMC Infectious Diseases.10:118.
- ❖ **Neimark, M.; B. A. Mirza and Carlton, S. (1996):** Direct identification & Typing of *Mycobacterium tuberculosis* by PCR. . J. Clin. Microbiol.Oct.P.2454-2459.
- ❖ **Nigou, J.; Zelle-Rieser, C. ; Gilleron, M. ; Thurnher, M. and Puzo, G.(2001)** Mannosylated lipoarabinomannans inhibit IL-12 production by human dendritic cells: evidence for a negative signal delivered through the mannose receptor,” The Journal of Immunology, V. 166, N. 12, P. 7477–7485.
- ❖ **Noviana, H.; Nurachman, Z.; Ramdan, M., and Noer, A. (2007).** Multiplex PCR for Rapid Detection of Rifampin and Isoniazid Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolated from Bandung, Indonesia. Microbiol Indones. 1 (3):114-118.
- ❖ **NTP. (2011).** Overview of National Tuberculosis Control Program. Vision goals and stop TB strategy Burden of Tuberculosis in Iraq.

O

- ❖ **Ong, D.; Yam, W.; Siu, G., and Lee, A. (2010).** Rapid Detection of Rifampicin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* by High-Resolution Melting Analysis. J Clin Microbiol. 48 (4):1047–1054.

P

- ❖ **Pablos-Meadez**, A. Raviglione, M. Laszlo, A. Binkin, N. Rieder, H. Bustreo, F. et al. (1998). Global surveillance of anti-tuberculosis-drug resistance. 1994-1997, N. Engl. J. Med. 338: 1641-1649.
- ❖ **Palomino**, J.; Martin, A.; Von, G., and Portaels, F. (2008). Rapid culture-based methods for drug-resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Microbiol. Methods. 75(2):161-166.
- ❖ **Palomino**, J.C.; Leão, S.C., and Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007 from basic science to patient care. 1st ed. Tuberculosis Textbook. Brazel.
- ❖ **Parrish**, N.; Dionne, K.; Sweeney, A.; Hedgepeth, A.; and Carroll, K. (2009). Differences in time to detection and recovery of *Mycobacterium* spp. between the MGIT 960 and the BacT/ALERT MB automated culture systems. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 63(3): 342-345.
- ❖ **Pasipanodya**, J. (2010). Tuberculosis and other Mycobacterial diseases. In:Bope ET, et al. Conn's Current Therapy.Philadelphia, Pa.: Saunders Elsevier.
- ❖ **Philipp**,W.J.;Poulet,S.;Eiglmeier,K.;Pascopella,L.; Balasubramanian, V.; Heym, B.; et al. (1996). An integrated map of the genome of the tubercle bacillus, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, and comparison with *Mycobacterium leprae*. Proc Natl Acad Sci USA 93: 3132±3137.
- ❖ **Prescott**, Lansing M.; Harley, John P.; and Klein, Donald A. (2002). "Microbiology" (5th ed.), pp. 298-299. New York: McGraw-Hill.

R

- ❖ **Raman**, K. ; Rajagopalan, P. and Chandra, N. (2005) . Flux Balance Analysis of Mycolic Acid Pathway: Targets for Anti-Tubercular Drugs. PLoS Computational Biology 1(5): 349:358 .
- ❖ **Reddington**, K.; Zumla, A.; Bates, M.; van Soolingen, D.; Niemann, S.; Barry, T., and O,Grady, J. (2012). SeekTB, a Two-Stage Multiplex Real-Time-PCR-Based Method for Differentiation of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex. Journal of Clinical Microbiology. 50(7):2203–2206

- ❖ **Riley, L.** (2006). Of mice, men, and elephants: *Mycobacterium tuberculosis* cell envelope lipids and pathogenesis. *J. Clin. Invest.* 116(6):1475-1478
- ❖ **Rosenkrands, I. ; Slayden, R. A. and Crawford, J.** (2002). Hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis* studied by metabolic labeling and proteome analysis of cellular and extracellular proteins. *J. Bacteriol* ;184:3485–3491.
- ❖ **Ruiz, M.; Torres, M.; Llanos, A.; Arroyo, A.; Palomares, J., and Aznar, J.** (2004). Direct Detection of Rifampin- and Isoniazid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Auramine-Rhodamine-Positive Sputum Specimens by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42 (4):1585-1589.
- ❖ **Ryan, K. J. and Ray, C. G.** (2004). *Sherris Medical Microbiology.* (4th ed.). McGraw Hill. P. 396–401.

S

- ❖ **Sala, C.; Haouz, A.; Saul, F.; Miras, I.; Rosenkrands, I.; Alzari, P. and Cole, S.** (2009). *Mol. Microbiol.* 71(5): 1102-1116.
- ❖ **Santos, L.** (2012). Review: The Molecular Basis of Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *OJMM.* 2:24-36.
- ❖ **Shuler, Michael L. and Kargi, Fikret** (2002). "Bioprocess Engineering: Basic Concepts" (2nd ed.), p. 220. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall PTR. ISBN 0-13-081908-5.
- ❖ **Somasundaram, S.; Ram, A., and Sankaranarayanan, L.** (2014). Isoniazid and Rifampicin as Therapeutic Regimen in the Current Era: A Review. *Journal of Tuberculosis Research.* 2:40-51.
- ❖ **Somoskovi, A.** (2000). Accessory function and costimulatory molecule expression of alveolar macrophages in patients with pulmonary tuberculosis. *Immunobiology.* 201(3-4): 450-460.
- ❖ **Sorlozano, A.; Soria, I.; Roman, J.; Huertas, P.; Soto, M. ; Piedrola, G., and Gutierrez, J.** (2009). Comparative evaluation of three culture

methods for the isolation of mycobacteria from clinical samples, J. Microbiol. Biotechnol. 19 (10): 1259-1264.

- ❖ **Sreevatsan, S.;** Pan, X.; Stockbauer, K. E.; Connell, N. D.; Kreiswirth, B. N.; Whittam, T. S. & Musser, J. M. (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 94: 9869-9874.
- ❖ **Sterling, T.;** Villarino, M.; Borisov, A.; Shang, N.; Gordin, F.; Bliven-Sizemore, E.; Hackman, J.; Hamilton, C.; Menzies, D. and Kerrigan, A. (2011). Three months of rifapentine and isoniazid for latent tuberculosis infection. N. Engl. J. Med. 365(23):2155-2166
- ❖ **Streingart, K. & Henry, M. V.** (2006). Fluorescence versus conventional sputum smear microscopy for tuberculosis: a systematic review. J. Lancet Infect. Dis. 6 (9): 570–81.

T

- ❖ **Takayama, K. ;** Wang, C. and Besra, G. S. (2005) Pathway to synthesis and processing of mycolic acids in *Mycobacterium tuberculosis*. Clinical Microbiology Reviews 18: 81–101.
- ❖ **Tanja, K.** Rimma, A. Abigail, W. Galimzhan, R. and Stefan, N. (2006). *Mycobacterium bovis* Isolates with *M. tuberculosis* Specific Characteristics. Emerging Infectious Diseases, 12: 763-765.
- ❖ **Timmerman, K. P.** and Tu, C.-P. D. (1985). Complete sequence of IS3. Nucleic Acids Res 13, 2127-2139.
- ❖ **Todar, K.** (2009). *Mycobacterium tuberculosis* and Tuberculosis. Todar's Online textbook of bacteriology. University of Wisconsin – Madison Department of Bacteriology. P. 4.
- ❖ **Traag, BA.;** Driks, A.; Stragier, P.; Bitter, W.; Broussard, G.; Hatfull, G.; Chu, F.; Adams, KN.; Ramakrishnan, L. and Losick, R. (2010). Do mycobacteria produce endospores? Proc Natl Acad Sci U S A. 107(2):878-81.

- ❖ **Tukvadze**, N. Kempker, RR. Kalandadze, I. Kurbatova, E. Leonard, MK. et al. (2012). Use of a molecular diagnostic test in AFB smears positive tuberculosis suspects greatly reduces time to detection of multidrug resistant tuberculosis. PloS One 7(2): 31563.

V

- ❖ **Van Embden**, J.D.; Cave, M.D.; Crawford, J.T.; Dale, J.W.; Eisenach, K.D.; Gicquel, B.; Hermans, P.; Martin, C.; McAdam, R.; Shinnick, T.M. and Small, P.M.(1993). Strain identification of *M. tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J. Clin. Microbiol. 31: 406-409.
- ❖ **Van Soolingen**, D.; de Haas, P.E.; Hermans, P.W. and van Embden, J.D. (1994) DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. Methods Enzymol; 235: 196-205.
- ❖ **Veluchamy**, M.; Madhavan, R.; Narayanan, S., and Rajesh, L. (2013). katG Gene as a Surrogate Molecular Marker Leading to Cause Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. American Journal of Infectious Diseases and Microbiology.1 (5):86-91.

W

- ❖ **WHO** (1995). Tuberculosis fact sheet. 93. 1-2.
- ❖ **WHO** (2002). Gender and Tuberculosis. World Health Organization Department of Gender and women's Health 20, Avenue Appia Geneva, Switzerland.
- ❖ **WHO** (2004). Global TB control. WHO report. P 12.
- ❖ **WHO** (2008). Anti-tuberculosis drug resistance in the world. Fourth Global Report. The WHO/IUATLD Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance 2002-2007.
- ❖ **WHO** (2012) Global Tuberculosis Report. France.
- ❖ **WHO** (2013). Global Tuberculosis Report 2013. World Health Organization. Geneva, Switzerland.
- ❖ **WHO** (2013). World Health Organisation Global Tuberculosis Report.

- ❖ **WHO** (2015). Global TB control. WHO report.
- ❖ **WHO** (2016). Global TB control. WHO report.
- ❖ **Wikipedia**, (2010), Insertion sequence, last modified on 13 July.
- ❖ **Wisnivesky, J.; Kaplan, J.; Henschke, C.; McGinn, T. and Crystal, R.** (2000). Evaluation of clinical parameters to predict *Mycobacterium tuberculosis* in inpatients. Arch. Intern. Med. 160 (16): 2471-2476
- ❖ **World Health Organization report on TB epidemic**(1997). Global TB program. Geneva.
- ❖ **World Health Organization**, (2007). Tuberculosis infection and transmission fact sheet 104.WWW.document.URL
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/>

الملاحق



الملاحق



الملحق (1) : البيانات الأولية وفحص القشع والزرع على وسط LJ

زرع	مجهرى	الحالة	العينة	العمر	الجنس	ت
pos	sca	mdr	sp	60	ذكر	1
pos	3	old	sp	48	ذكر	2
pos	ne	old	sp	17	انثى	3
pos	ne	mdr	sp	25	انثى	4
pos	ne	new	plf	23	انثى	5
pos	2	new	sp	70	انثى	6
pos	1	new	brw	50	انثى	7
pos	1	mdr	sp	40	انثى	8
pos	ne	new	bal	39	انثى	9
pos	1	mdr	sp	41	ذكر	10
pos	ne	mdr	SP	26	ذكر	11
pos	2	old	اشتباه	60	ذكر	12
pos	1	new	sp	25	ذكر	13
pos	3عصية	mdr	sp	55	ذكر	14
pos	ne	old	sp	45	ذكر	15
pos	ne	mdr	sp	20	انثى	16
pos	2	new	sp	17	ذكر	17
pos	1	new	brw	37	ذكر	18
pos	2	old	sp	40	ذكر	19
pos	sca	mdr	sp	40	ذكر	20
pos	1	old	sp	58	انثى	21
pos	sca	new	sp	41	ذكر	22
pos	ne	new	plf	58	ذكر	23
pos	sca	mdr	sp	30	ذكر	24
pos	1	mdr	sp	42	انثى	25
pos	sca	mdr	sp	25	ذكر	26
pos	1	mdr	sp	40	ذكر	27

زرع	مجهري	الحالة	العينة	العمر	الجنس	ت
pos	ne	new	sp	45	ذكر	28
pos	2	mdr	sp	48	ذكر	29
pos	1	new	bal	73	انثى	30
pos	ne	old	brw	69	انثى	31
pos	1	old	sp	35	ذكر	32
pos	1	mdr	sp	22	انثى	33
pos	1	old	sp	15	انثى	34
pos	2	new	sp	20	انثى	35
pos	2	mdr	sp	43	ذكر	36
pos	sca	old	sp	50	انثى	37
pos	ne	new	plf	21	انثى	38
pos	ne	mdr	sp	30	انثى	39
pos	1	mdr	sp	25	انثى	40
pos	sca	new	sp	11	ذكر	41
pos	1	اشتباه	sp	39	ذكر	42
pos	ne	new	csf	36	انثى	43
pos	1	old	sp	28	انثى	44
pos	ne	new	brw	45	ذكر	45
pos	ne	new	sp	58	انثى	46
pos	ne	mdr	sp	45	ذكر	47
pos	2	old	sp	40	ذكر	48
pos	ne	new	sp	74	انثى	49
pos	1	old	sp	35	ذكر	50
pos	ne	old	sp	40	ذكر	51
pos	1	mdr	sp	43	ذكر	52
pos	1	new	sp	45	ذكر	53
pos	ne	mdr	sp	35	ذكر	54
pos	sca	new	sp	50	ذكر	55
pos	ne	new	brw	76	ذكر	56
pos	sca	old	sp	25	ذكر	57
pos	1	old	sp	61	انثى	58
pos	1	old	sp	33	ذكر	59

زرع	مجهري	الحالة	العينة	العمر	الجنس	ت
pos	ne	new	sp	45	ذكر	60
pos	ne	new	SP	96	ذكر	61
pos	ne	new	sp		انثى	62
pos	sca	mdr	sp	19	انثى	63
pos	ne	new	sp	20	انثى	64
pos	ne	mdr	sp	30	انثى	65
pos	sca	mdr	sp	35	انثى	66
pos	1	old	sp	45	انثى	67
pos	sca	mdr	sp	48	انثى	68
pos	ne	new	sp	72	ذكر	69
pos	sca	mdr	sp	30	ذكر	70
pos	2	old	sp	55	ذكر	71
pos	1	old	sp	22	انثى	72
pos	sca	mdr	sp	35	ذكر	73
pos	1	mdr	sp	40	ذكر	74
pos	1	mdr	sp	38	ذكر	75
pos	1	new	sp	23	انثى	76
pos	sca	old	sp	50	انثى	77
pos	sca	old	sp	20	انثى	78
pos	1	old	sp	30	ذكر	79
pos	ne	mdr	sp	40	انثى	80
pos	ne	new	brw	25	انثى	81
pos	sca	mdr		30	انثى	82
pos	3	old	sp	18	ذكر	83
pos	sca	puss	sp	67	انثى	84
pos	1	mdr	sp	47	ذكر	85
pos	ne	new	sp	74	ذكر	86
pos	3	mdr	sp	30	انثى	87
pos	1	new	sp	60	ذكر	88
pos	ne	old	plf	35	انثى	89
pos	2	old	sp	17	انثى	90

الملحق (2): الاختبارات الكيموحيوية

NIT	NIACIN	TCH	PYRO	PNB	ت
POS	POS	R	S	S	1
POS	POS	R	S	S	2
POS	POS	R	S	S	3
POS	POS	R	S	S	4
POS	POS	R	S	S	5
POS	POS	R	S	S	6
POS	POS	R	S	S	7
POS	POS	R	S	S	8
POS	POS	R	S	S	9
POS	POS	R	S	S	10
POS	POS	R	S	S	11
POS	POS	R	S	S	12
POS	POS	R	S	S	13
POS	POS	R	S	S	14
POS	POS	R	S	S	15
POS	POS	R	S	S	16
POS	POS	R	S	S	17
POS	POS	R	S	S	18
POS	POS	R	S	S	19
POS	POS	R	S	S	20
POS	POS	R	S	S	21
POS	POS	R	S	S	22
POS	POS	R	S	S	23
POS	POS	R	S	S	24
POS	POS	R	S	S	25
POS	POS	R	S	S	26
POS	POS	R	S	S	27
POS	POS	R	S	S	28
POS	POS	R	S	S	29
POS	POS	R	S	S	30
POS	POS	R	S	S	31
POS	POS	R	S	S	32
POS	POS	R	S	S	33
POS	POS	R	S	S	34
POS	POS	R	S	S	35
POS	POS	R	S	S	36
POS	POS	R	S	S	37
POS	POS	R	S	S	38
POS	POS	R	S	S	39
POS	POS	R	S	S	40

NIT	NIACIN	TCH	PYRO	PNB	ت
POS	POS	R	S	S	41
POS	POS	R	S	S	42
POS	POS	R	S	S	43
POS	POS	R	S	S	44
POS	POS	R	S	S	45
POS	POS	R	S	S	46
POS	POS	R	S	S	47
POS	POS	R	S	S	48
POS	POS	R	S	S	49
POS	POS	R	S	S	50
POS	POS	R	S	S	51
POS	POS	R	S	S	52
POS	POS	R	S	S	53
POS	POS	R	S	S	54
POS	POS	R	S	S	55
POS	POS	R	S	S	56
POS	POS	R	S	S	57
POS	POS	R	S	S	58
POS	POS	R	S	S	59
POS	POS	R	S	S	60
POS	POS	R	S	S	61
POS	POS	R	S	S	62
POS	POS	R	S	S	63
POS	POS	R	S	S	64
POS	POS	R	S	S	65
POS	POS	R	S	S	66
POS	POS	R	S	S	67
POS	POS	R	S	S	68
POS	POS	R	S	S	69
POS	POS	R	S	S	70
POS	POS	R	S	S	71
POS	POS	R	S	S	72
POS	POS	R	S	S	73
POS	POS	R	S	S	74
POS	POS	R	S	S	75
POS	POS	R	S	S	76
POS	POS	R	S	S	77
POS	POS	R	S	S	78
POS	POS	R	S	S	79
POS	POS	R	S	S	80
POS	POS	R	S	S	81
POS	POS	R	S	S	82

NIT	NIACIN	TCH	PYRO	PNB	ت
POS	POS	R	S	S	83
POS	POS	R	S	S	84
POS	POS	R	S	S	85
POS	POS	R	S	S	86
POS	POS	R	S	S	87
POS	POS	R	S	S	88
POS	POS	R	S	S	89
POS	POS	R	S	S	90

الملحق (3) : فحص الحساسية

TYPE	S	I	R	E	ت
SEN	S	S	S	S	1
POLY	R	S	R	S	2
MONO	S	S	R	S	3
MONO	S	R	S	S	4
POLY	R	R	S	R	5
SEN	S	S	S	S	6
POLY	S	S	R	R	7
MDR	R	R	R	R	8
MONO	S	R	S	S	9
MONO	S	S	R	S	10
SEN	S	S	S	S	11
SEN	S	S	S	S	12
POLY	R	S	R	S	13
MONO	S	S	R	S	14
SEN	S	S	S	S	15
SEN	S	S	S	S	16
SEN	S	S	S	S	17
MDR	R	R	R	R	18
MDR	R	R	R	R	19
SEN	S	S	S	S	20
SEN	S	S	S	S	21
POLY	S	R	S	R	22
SEN	S	S	S	S	23
MONO	S	S	R	S	24
SEN	S	S	S	S	25
MONO	S	R	S	S	26
MONO	S	R	S	S	27
POLY	R	S	R	R	28
SEN	S	S	S	S	29
SEN	S	S	S	S	30
MONO	S	S	R	S	31

TYPE	S	I	R	E	ت
MONO	S	R	S	S	32
MONO	S	R	S	S	33
MDR	R	R	R	R	34
SEN	S	S	S	S	35
SEN	S	S	S	S	36
SEN	S	S	S	S	37
SEN	S	S	S	S	38
SEN	S	S	S	S	39
SEN	S	S	S	S	40
SEN	S	S	S	S	41
SEN	S	S	S	S	42
SEN	S	S	S	S	43
SEN	S	S	S	S	44
SEN	S	S	S	S	45
POLY	R	R	S	R	46
SEN	S	S	S	S	47
MONO	S	S	R	S	48
SEN	S	S	S	S	49
MDR	R	R	R	R	50
SEN	S	S	S	S	51
MDR	R	R	R	R	52
MONO	S	R	S	S	53
MONO	S	R	S	S	54
MONO	S	R	S	S	55
MONO	S	R	S	S	56
SEN	S	S	S	S	57
MDR	R	R	R	R	58
MDR	R	R	R	R	59
SEN	S	S	S	S	60
SEN	S	S	S	S	61
MONO	S	R	S	S	62
SEN	S	S	S	S	63
MONO	S	R	S	S	64
MDR	R	R	R	R	65
SEN	S	S	S	S	66
SEN	S	S	S	S	67
SEN	S	S	S	S	68
SEN	S	S	S	S	69
SEN	S	S	S	S	70
MONO	S	R	S	S	71
MONO	S	R	S	S	72
MONO	S	R	S	S	73
MONO	S	R	S	S	74
MONO	S	S	R	S	75
MONO	S	S	R	S	76

TYPE	S	I	R	E	ت
MONO	S	R	S	S	77
MONO	S	R	S	S	78
SEN	S	S	S	S	79
SEN	S	S	S	S	80
SEN	S	S	S	S	81
MDR	R	R	R	R	82
MONO	S	R	S	S	83
SEN	S	S	S	S	84
SEN	S	S	S	S	85
SEN	S	S	S	S	86
MONO	S	R	S	S	87
SEN	S	S	S	S	88
SEN	S	S	S	S	89
MONO	S	R	S	S	90

الملحق (4) : تراكيز الحامض النووي DNA وقيم الامتصاصية في جهاز Nanodrop spectrophotometer

التركيز/ μng	الامتصاصية 260/280	رقم العينة
600	1.68	1
800	1.54	2
900	1.70	3
689	1.40	4
570	1.8	5
900	1.85	6
780	1.53	7
689	1.83	8
789	1.67	9
	1.37	10

Summary



SUMMARY



This study was conducted in the specialized center for chest and respiratory disease/Baghdad from (1/9/2016) to (1/1/2017), it was included 500 different clinical sample were collected from both sexes and different age of patients to investigated mycobacterium tuberculosis by using conventional and molecular methods, study polymorphism among isolates and study mutation that cause multidrug resistant (MDR-TB).

The result of Direct smear examination of Zeihl-Nelsen stain for the clinical sample have shown that 63 sample 12.8% out of 500 sample were positive, all sample were cultured on sold Lowen-stein Jensen media, a result of 90 sample that represent 18.9% from 500 sample were showing a real growth that belong to mycobacterium tuberculosis and the largest proportion of direct microscopy and bacterial growth on L.J was from sputum sample (15.9% and 23.1) respectively, the result of biochemical test showed all isolates was belong to *M.tuberculosis*

A result showed there was significant difference at the level ($p<0.05$) in the number of tuberculosis patient among male 60% compared to female 40% and the result showed a significant value at the level ($p<0.01$) in the number of TB-infection by age group, (21-30) has highest rate of TB-infection follow (31-40) and (41-50) recorded 22.20% ,

From 90 sample isolates tested to first line drug (Isoniazid, Rifampicin, Streptomycin, Ethambutol) we found 48 isolates 53.30% were resistant to antimicrobial drug by using traditional proportion method, and the highest percentage of single resistance was to Isoniazid (38.9%) follow the resistance to rifampicin was (25.60%), and the resistance of streptomycin was (17.80%), while the lowest rate of resistance was to Ethambutol was 11.10% at the significant value at level ($p<0.01$) . On the other side 27 isolates have highest

rate 30% resistant to one type of antibiotic and 11 isolates 12% resistance to more than one antimicrobial while the percentage of multidrug resistance (MDR-TB) was 10 isolate 11.1%

The genomic DNA of 10 isolates that shown multi drug resistant (MDR-TB) on (L.J) media was extracted to molecular diagnosis by polymerase chain reaction (PCR) using 16S rRNA and insertion sequence IS6110, the result of gel electrophoresis showed all isolate was positive of the 16s rRNA, and all isolates contain insertion sequence after that the product for PCR sequences in the sequencing unit of the MACROGEN COMPANY to confirm the diagnosis of *M.tuberculosis* , the result show 99% identity of 16s rRNA and 100% identity of IS6110 with same gen and insertion sequence on NCBI

In this study the polymorphism of *M.tuberculosis* has analyzed to study the diversity between them, depended on the copy number of insertion sequence the result show some isolate has large copy of IS6110 80% and the other has low copy of is6110 and this show there was diversity between isolates of *M.tuberculosis*.

The PCR product of *rpoB*, *katG* and *inhA* gene sequences to detect the presence of mutation that responsible of multidrug resistance, the sequence analysis show there was mutation in *rpoB* in all isolate 100% that responsible of Rifampicin mutation and mutation in *katG* and *inhA* (80% and 30%) respectively that responsible of Isoniazid mutation.

This result show that all isolate of mycobacterium positive for 16s rRNA and IS6110 and the identity on NCBI was 99% and 100% respectively, there was diversity between isolates of *M.tuberculosis* and there was related between the mutation on *rpoB* and rifampicin resistance and *katG* and *inhA* and isoniazid reactance .



Republic of Iraq
Ministry of Higher Education
and Scientific Research
Diyala University
College of Science



Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* and characterization of MDR

A Thesis

Submitted to the Department of Biology, College of Science, Diyala University, in Partial Fulfillment of Requirements for the Degree of Master of Science in Biology

By

MOHAMMED MUSTSFA KDBAN

Supervised By

**B.S.c Biology..college of science
Diyala University 2014**

Dr. Mothanna A. salih

Dr. hammed A. Mankhi

2017 A. D.

1438 A.H