دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه دکتری حرفه‌ای پزشکی

عنوان:

بررسی مولکولی سویه های مقاوم به ایزونیازید در بین ایزوله های میکوباکتریوم جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت اردبیل

نگارش:

سید مهران صادقی

اساتید راهنما:

دکتر رقیه تیمورپور

دکتر شهرام حبیب زاده

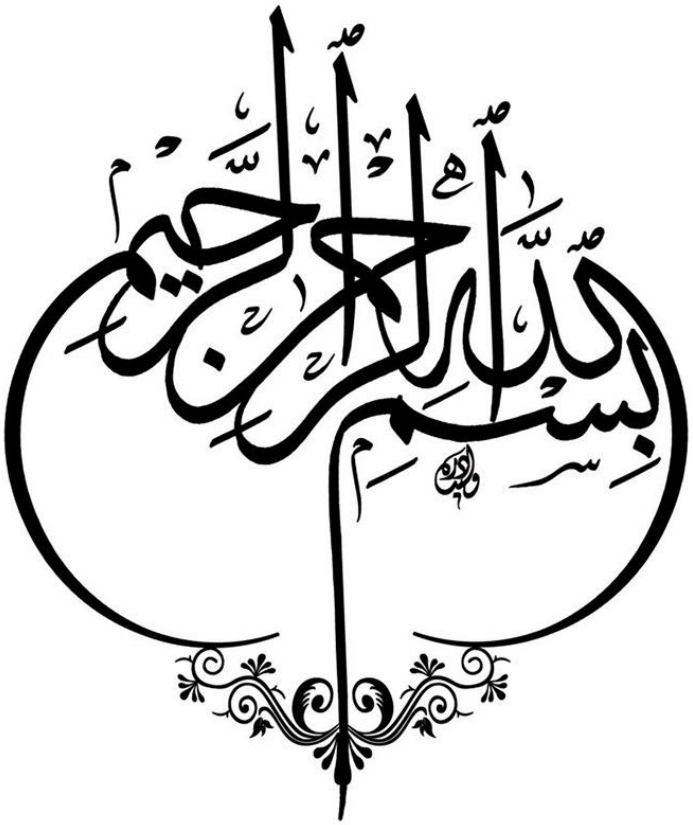
اساتید مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

دکتر جعفر محمدشاهی

مهر ۱۴۰۱

شماره پایان نامه: ۰۹۸۲


بسم الله الرحمن الرحيم

گواهی اصالت پایاننامه

بسمه تعالی

بدین وسیله اعلام می‌نماید که این پایان نامه بر اساس نتایج بررسی‌ها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب بوده و به وسیله خودم انشاء گردیده است و قبلاً به عنوان پایان نامه در سایر مقاطع و دوره‌های تحصیلی ارایه نگردیده است.

بدین وسیله اصالت (ORIGINALITY) و صحت نتایج این پایان نامه مورد تایید اینجانب، استاد راهنما می‌باشد.

به پاس تعبیر عظیم و انسانی شان از کلمه ایثار و از خودگذشتگان
به پاس عاطفه سرشار و گرمای امیدبخش وجودشان که در این
سردترین روزگاران بهترین پشتیبان است;
به پاس قلب‌های بزرگشان که فریادرس است و سرگردانی و ترس در
پناهشان به شجاعت می‌گراید;
و به پاس محبت‌های بی دریغشان که هرگز فروکش نمی کند;
این مجموعه را به پدر و مادر عزیزم تقدیم می‌کنم.

سپاس گزاری

بر خود واجب می‌دانم از استاد راهنما سرکار خانم دکتر تیمورپور
که به عنوان استاد راهنما در مراحل مختلف این پایانامه همواره با
سعه صدر و گشاده رویی در کنار من بودند و در طول مدت تحصیل
از راهنمایی‌های اخلاقی و علمی ایشان بهره جسته‌ام تشکر و قدردانی
نمایم.

فهرست اختصارات:

RNA: Ribonucleic acid

PZA: Pyrazinamide

MDR-TB: Multi-drug- resistant tuberculosis

RpoB: The rpoB gene encodes the β subunit of bacterial RNA polymerase

PCR: polymerase chain reaction

TB: Tuberculosis

HIV: Human immunodeficiency virus

DOTS: Directly Observed Treatment Short-course Strategy

XDR: Extensively drug-resistant

BAL: Bronchoalveolar lavage

NTM: Nontuberculous mycobacteria

inhA: inhibin 2-trans-enoyl-acyl carrier protein reductase

فهرست مندرجات و ضمایم

عنوان **صفحه**

مقدمه:..... ۴

۱-۱-مقدمه و بیان مسئله: ۴

۱-۲-اهداف طرح: ۶

۱-۲-۱-هدف کلی طرح: ۶

۱-۲-۲-اهداف اختصاصی طرح: ۶

۱-۲-۳-هدف کاربردی طرح: ۷

۱-۳-سوالات طرح: ۷

۱-۴-تعریف واژه های اختصاصی: ۸

مروری بر متون:..... ۱۱

۲-۱-کلیات: ۱۱

۲-۱-۱-سل: ۱۱

۲-۱-۲. اپیدمیولوژی سل ۱۲

۲-۱-۳-انتقال بیماری ۱۳

۲-۱-۴-انواع سل ۱۵

۲-۱-۵-تشخیص ۱۷

۲-۱-۶-عوامل مرتبط با تاخیر در تشخیص بیماران مبتلا به سل ریوی ۱۷

۲-۲-پیشینه تحقیق: ۱۹

مواد و روش کار:..... ۲۲

۳-۱- نوع مطالعه: ۲۲

۳-۲- جامعه آماری و روش نمونه گیری: ۲۲

۳-۳- روش نمونه گیری و جمع آوری اطلاعات ۲۲

۳-۴- روش تجزیه و تحلیل داده ها و بررسی آماری: ۲۳

۳-۵- ملاحظات اخلاقی: ۲۳
۳-۶- طرح مطالعه: ۲۴
۳-۷- روش کار ۲۴
۳-۷-۱-رنگ آمیزی زیل نلسون: ۲۴
۳-۷-۲- استخراج DNA کروموزومی: ۲۵
۳-۷-۳-تهیه Tris-Hcl 100 mM ۲۵
۳-۷-۴-آماده سازی پرایمر ۲۶
۳-۷-۵-شناسایی ژن *IS6110* برای تایید سویه های کمپلکس سلی ۲۶
۳-۷-۶-محاسبه دمای اتصال(Anneling) ۲۷
۳-۷-۷-الکتروفورز محصولات PCR ۲۸
۳-۷-۸-تهیه بافرTBE 10x ۲۹
۳-۷-۹-شناسایی ژن های *KatG ,inhA* ۲۹
۳-۷-۱۰-محاسبات آماری ۳۰
یافته ها..... ۳۳
۴-۱-نتایج اطلاعات دموگرافیک ۳۳
۴-۲-تایید سویه های کمپلکس سلی ۳۴
۴-۳-تصاویر ژن های *KatG ,inhA* ۳۵
۴-۴-نتایج توالی یابی ژن های *IS6110*، *KatG*، *inhA* به همراه تصویر ۳۷
بحث: ۴۴
۵-۱-محدودیت های مطالعه : ۵۰
۵-۲-نتیجه گیری کلی: ۵۱
۵-۳ -پیشنهادات: ۵۲
منابع: ۵۴

فهرست جداول، اشکال و نمودارها

جدول ۱-۳: پرایمر مورد استفاده برای ژن *IS6110* ۲۶

جدول ۲-۳: مواد لازم برای واکنش PCR ۲۸

جدول۳-۳: پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر ژن های *KatG,InhA* ۲۹

جدول ۴-۳: جدول متغیرات ۳۰

تصویر۱-۴: نمونه تصویری از ژن *IS6110* (bp۱۳۰)محصول PCR بر روی ژل آگارز۱٪؛ ۳۴

تصویر۲-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن *KatG* برروی ژل آگاروز۱٪؛ ۳۵

تصویر۳-۴: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن *inhA* برروی ژل آگاروز۱٪؛ ۳۶

تصویر ۴-۴: نتایج توالی یابی ژن های *IS6110* ۳۷

تصویر ۴-۴: نتایج توالی یابی ژن های *katG* ۳۸

تصویر ۴-۴: نتایج توالی یابی ژن های *inhA* ۳۹

جدول ۱-۴ :جدول دموگرافیک ۱۲ نمونه مقاوم بر اساس متغیر ها ۴۰

جدول ۲-۴ :جدول فراوانی دموگرافیک ۱۲ نمونه مقاوم بر اساس متغیر ها ۴۱

جدول ۴-۴: توزیع فراوانی رژیم درمانی گروه مورد: ۴۲

بررسی مولکولی سویه های مقاوم به ایزونیازید در بین ایزوله های میکوباکتریوم جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت اردبیل

چکیده:

زمینه: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* یک گونه پاتوژن در خانواده مایکوباکتریاسه و عامل بیماری سل است. این باکتری برای اولین بار در سال ۱۸۸۲ توسط رابرت کخ شناسایی شد. بر طبق مطالعات اپیدیمولوژیک تقریبا یک سوم از مردم دنیا با این باکتری آلوده هستند. ظهور سویه های MDR [۱] و XDR [۲] و عفونت همزمان این باکتری با HIV اهمیت مطالعه بر روی این گونه باکتریایی را دو چندان کرده است.

هدف: این مطالعه با هدف شناسایی سویه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مقاوم به ایزونیازید انجام شده است.

مواد و روش ها: در این مطالعه مقطعی توصیفی ، بین سالهای ۹۹- ۹۶، ۱۱۱ نمونه خلط و BAL [۳] از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت اردبیل جمع آوری شد. نمونه ها ابتدا با روش میکروسکوپیک بررسی شده سپس با روش جوشاندن، DNA استخراج شد. به کمک پرایمر های اختصاصی و تکنیک PCR حضور سویه های کمپلکس سلی و به دنبال آن مقاومت نسبت به ایزونیازید بررسی گردید.

یافته ها: از ژن *IS6110* برای شناسایی سویه های کمپلکس سلی استفاده گردید که ۱۷ (۱۵.۳٪) نمونه ها جزء کمپلکس سلی نبودند و جزء NTM [۴] ها طبقه بندی میشوند. از کل

[1] Multidrug-resistant TB
[2] Extensively drug-resistant TB
[3] Bronchoalveolar lavage
[4] Nontuberculous mycobacteria

نمونه های مورد بررسی ، ۱۹ نمونه (۱۷٪) دارای موتاسیون های ژن های *inhA*, *katG* بودند. که از این تعداد ۷ موتاسیون مورد به ژن *inhA* (۳۶.۷۴٪)، ۸ موتاسیون مربوط به ژن *katG* (۴۲.۱) و ۴ مورد مربوط به موتاسیون در هر دو ژن(۲۱.۰۵٪) بوده است.

نتیجه گیری: در مطالعه ما فراوانی مقاومت نسبت به ایزونیازید ۱۷٪ بود که به نتایج بدست آمده در کل ایران قرابت دارد. از طرفی دیگر ۱۵.۳ ٪ از ایزوله ها NTM بودند که این یافته اهمیت استفاده از تکنیک های مولکولی درکنار بررسی مستقیم و کشت را جهت تشخیص و افتراق این دسته از سویه های نشان می دهد.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم* توبرکلوزیس، PCR، ایزونیازید، مقاومت آنتی بیوتیکی