دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل

دانشگاه علوم پزشکی اردبیل

دانشکده پزشکی

پایان نامه جهت اخذ درجهٔ دکترای حرفه‌ای رشته پزشکی

عنوان:

بررسی مولکولی مقاومت به اتامبوتول با روش MAS-PCR در ایزوله های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت در شهر اردبیل، ۹۶-۹۹

نگارش:

زهرا وکیلی

اساتید راهنما:

دکتر رقیه تیمورپور

دکتر جعفر محمدشاهی

اساتید مشاور:

دکتر محسن ارزنلو

دکتر حافظ میرزانژاداصل

اردیبهشت ۱۴۰۲

شماره پایان نامه: ۰۱۰۳۳

دانشگاه علوم پزشکی
و خدمات بهداشتی، درمانی استان اردبیل

بسمه تعالی

گواهی اصالت پایان نامه

اینجانب ..... دانشجوی مقطع دکتری رشته پزشکی دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تایید می‌نمایم که:

- این پایان نامه بر اساس نتایج بررسیها/ تحقیقات انجام یافته توسط اینجانب تحت راهنمای ..... بوده و بوسیله **خودم** انشا گردیده است و در صورت استفاده از نتایج پژوهش ها و یا آثار دیگران بلافاصله به مرجع مورد استفاده استناد شده است و در قسمت منابع و مآخذ مشخصات مرجع به طور کامل ذکر گردیده است.
- مسئولیت صحت مطالب مندرج در این پایان‌نامه به طور کامل با اینجانب است.
- این پایان نامه قبلا برای دریافت هیچ مدرک تحصیلی (هم سطح، پایین تر یا بالاتر) درسایر دانشگاه ها و موسسات آموزش عالی ارائه نشده است.
- کلیه حقوق مادی و معنوی این پایان‌نامه و هر گونه محصول مستخرج از آن اعم از مقالات، چاپ کتاب و ثبت اختراع به دانشگاه علوم پزشکی اردبیل تعلق دارد و هرگونه استفاده از اطلاعات و یا نتایج، واگذاری اطلاعات به افراد دیگر، چاپ، تکثیر، نسخه‌برداری، ترجمه و اقتباس از این پایان‌نامه بدون اخذ اجازه کتبی از دانشگاه علوم پزشکی اردبیل ممنوع است.
- کلیه مقالات مستخرج از این پایان‌نامه تحت نام دانشگاه علوم پزشکی اردبیل (Ardabil University of Medical sciences) به عنوان وابستگی نویسنده اول یا مسئول و با اطلاع و اجازه تمامی اساتید راهنما و مشاور به چاپ رسیده یا خواهد رسید.
- چنانچه در هر مقطع زمانی، خلاف مواردفوق ثابت شود، عواقب ناشی ازآن را می پذیرم و دانشگاه مجاز است با اینجانب مطابق با ضوابط و مقررات رفتار نموده و در صورت برخورد قانونی، هیچ گونه ادعایی نخواهم داشت.

نام و نام خانوادگی دانشجو

امضا و تاریخ

- بدینوسیله **اصال و صحت** نتایج این پایان نامه مورد تأیید اینجانب، ..... استاد راهنما می باشد.

نام و نام خانوادگی استادراهنما

امضا و تاریخ

فهرست مطالب

عنوان *صفحه*

چکیده..... ۱

فصل اول مقدمه..... ۳

۱-۱- اهمیت موضوع و انگیزه تحقیق..... ٤

۱-۲- اهداف پژوهش..... ٦

۱-۲-۱- هدف کلی..... ٦

۱-۲-۲- اهداف اختصاصی..... ٦

۱-۳- سوالات و فرضیات مطالعه..... ٦

۱-٤- تعریف واژه‌ها..... ٦

فصل دوم بررسی متون..... ۸

۲-۱- مبانی نظری..... ۹

۲-۱-۱- توبرکلوز در جهان..... ۹

۲-۱-۲- توبرکلوز در ایران..... ۹

۲-۱-۳- مایکوباکتریوم..... ۱۰

۲-۱-٤- پاتوژنز مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ایجاد ضایعه..... ۱۱

۲-۱-۵- ریسک فاکتورها..... ۱٦

۲-۱-٦- مدیریت توبرکلوز..... ۱۷

۷-۱-۲- مقاومت دارویی در توبرکلوز..... ۱۸

۸-۱-۲- مقاومت توبرکلوز در مقابل اتامبوتول..... ۱۹

۲-۲- بررسی متون..... ۲۱

فصل سوم مواد و روش کار..... ۲۳

۱-۳- نوع پژوهش..... ۲٤

۲-۳- جمعیت مورد مطالعه..... ۲٤

۳-۳- نمونه برداری و روش نمونه‌گیری و گردآوری اطلاعات..... ۲٤

٤-۳- روش تجزیه و تحلیل داده‌ها و بررسی آماری..... ۲۵

۵-۳- معیارهای ورود به مطالعه..... ۲۵

٦-۳- معیار خروج از مطالعه..... ۲۵

۷-۳- ملاحظات اخلاقی..... ۲۵

۸-۳- جدول متغیرهای مطالعه..... ۲٦

۹-۳- طرح مطالعه..... ۲٦

۱۰-۳- روش کار..... ۲۷

۱-۱۰-۳- رنگ آمیزی زیل نلسون..... ۲۷

۲-۱۰-۳- استخراج DNA کروموزومی..... ۲۸

۳-۱۰-۳- تهیه TRIS-HCL 100 MM..... ۲۸

٤-۱۰-۳- آماده سازی پرایمر..... ۳۰

۵-۱۰-۳- شناسایی ژن IS6110 برای تایید سویه های کمپلکس سلی..... ۲۹
۶-۱۰-۳- محاسبه دمای اتصال(ANNELING)..... ۲۹
۷-۱۰-۳- الکتروفورز محصولات PCR..... ۳۱
۸-۱۰-۳- تهیه بافر TBE 10X..... ۳۱
۹-۱۰-۳- شناسایی ژن EMBB306..... ۳۱
فصل چهارم نتایج..... ۳۳
۱-٤- اطلاعات دموگرافیک..... ۳٤
۲-٤- تایید سویه های کمپلکس سلی..... ۳۸
۳-٤- تصاویر ژن EMBB306..... ۳۹
٤-٤- نتایج توالی یابی ژن های *IS6110* و *EMBB306*..... ٤۰
فصل پنجم بحث..... ٤٤
۱-۵- بحث..... ٤۵
۲-۵- محدودیت‌های مطالعه..... ۵۲
۳-۵- نتیجه‌گیری..... ۵۳
٤-۵- پیشنهادات..... ۵٤
منابع..... ۵٦

فهرست جدول‌ها

جدول ۱-۳: متغیرهای مطالعه..... ۲۶

جدول ۲-۳: پرایمر مورد استفاده برای ژن IS6110..... ۲۹

جدول ۳-۳: مواد لازم برای واکنش PCR ۳۰

جدول ٤-۳: پرایمر های مورد استفاده برای تکثیر ژن embB306..... ۳۲

جدول ۱-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس جنس..... ۳٤

جدول ۲-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس بیماری زمینه ای..... ۳۵

جدول ۳-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس محل سکونت..... ۳۵

جدول ٤-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس طول دوره درمان..... ۳٦

جدول ۵-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس سطح تحصیلات..... ۳٦

جدول ٦-٤: توزیع فراوانی بیماران براساس پیامد بیماری..... ۳۷

جدول ۷-٤ :نتایج دموگرافیک نمونه های مقاوم بر اساس متغیرها..... ٤۲

فهرست شکل‌ها و نمودارها

شکل ۱-٤: نمونه تصویری از ژن IS6110 محصول PCR بر روی ژل آگاروز..... ۳۸

شکل ۲-٤: نتایج الکتروفورز محصول برای بررسی ژن embB306 بر روی ژل آگاروز... ۳۹

فهرست علائم اختصاری

AFB: Acid-fast bacillus

AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome

DNA: Deoxyribonucleic acid

DTH: Delayed-type hypersensitivity

EMB: Ethambutol

HIV: Human immunodeficiency virus

IFN: Interferons

INH: Isoniazid

MAS-PCR: Multiplex allele specific polymerase chain reaction

MDR: Multidrug-resistant

MDR-TB: Multidrug-resistant tuberculosis

Mtb: Mycobacterium tuberculosis

NaoH : Sodium hydroxide

NTM: Nontuberculous mycobacteria

PCR: polymerase chain reaction

PCR-SSCP: Polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism

PRR: Pattern Recognition Receptors

PZA: Pyrazinamide

RIF: Rifampicin

RNA: Ribonucleic acid

SLD: Second-line drugs

SPSS: Statistical Package for Social Sciences

TB: Tuberculosis

TLR: Toll-Like Receptor

XDR-TB: Extensively drug-resistant tuberculosis

WHO: World Health Organization

بررسی مولکولی مقاومت به اتامبوتول با روش MAS-PCR در ایزوله های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران مراجعه کننده به مرکز بهداشت در شهر اردبیل، ۹۶-۹۹

چکیده

زمینه: از اهداف سازمان بهداشت جهانی کاهش شیوع بیماری سل به کمتر از یک مورد در هر یک میلیون نفر تا سال ۲۰۵۰ می باشد. برای رسیدن به این هدف تشخیص سریع بیماری، ارائه درمان موثر و شناسایی سویه های مقاوم به دارو اهمیت بسیاری دارد. بر این اساس این مطالعه با هدف شناسایی مقاومت نسبت به اتامبوتول در بیماران مسلول مراجعه کننده به مرکز بهداشت اردبیل طراحی گردید.

هدف: تشخیص مولکولی مقاومت به اتامبوتول در بیماران مسلول مراجعه کننده به مرکز بهداشت اردبیل

مواد و روش کار: در این مطالعه مقطعی -توصیفی، بین سال های ۹۹- ۹۶، ۷۱ نمونه خلط 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 اتامبوتول بررسی گردید.

یافته‌ها: از ۷۱ نمونه مورد بررسی ۶نمونه NTM (۸.۴۵٪)بودند. از کل نمونه های مورد بررسی، ۳۶ نمونه (۵۰.۷٪) دارای موتاسیون ژن *embB306* بودند که از این تعداد ۳ نمونه NTM بودند (کل مقاوم های NTM ۵۰٪ بود). در بین ایزوله های مقاوم به اتامبوتول، در ۶ نمونه لود باکتری ۱ مثبت بود (۱۶.۶۷٪)، در ۸ نمونه لود باکتری ۲ مثبت بود (۲۲.۲۲٪) و در بقیه همگی ۳ مثبت یا بالاتر بودند (۶۱.۱۱٪).

نتیجه گیری: در این مطالعه میزان فراوانی مقاومت نسبت به اتامبول ۵۰.۷٪بود که درصد بالایی را نشان می دهد. همچنین این مطالعه نشان داد که روش MAS-PCR روشی سریع، ارزان و موثر برای شناسایی مقاومت نسبت به داروهای خط اول سل مانند اتامبوتول می باشد. به کمک این روش می توان همزمان مقاومت نسبت بقیه داروهای خط اول را نیز بررسی کرد و با تشخیص سریع مقاومت های آنتی بیوتیکی و درمان موثر تر سویه های مقاوم از گسترش سویه های مقاوم در جامعه پیشگیری کرد.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، DNA، اتامبوتول.