



جمهورية العراق  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
جامعة كربلاء  
كلية التربية للعلوم الصرفة - قسم علوم الحياة

**إنتشار جينات *hsp65* و *mpt64* في بكتيريا  
*Mycobacterium tuberculosis* في محافظة كربلاء**

رسالة مقدّمة

إلى مجلس كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء

وهي جزء من متطلبات نيل درجة الماجستير

من قبل الطالبة

**هبة سالم جواد كاظم**

بكالوريوس - علوم حياة - كلية التربية للعلوم الصرفة - جامعة كربلاء 2015-2016

بإشراف

**أ.م.د. هيام عبد الرضا كريم**

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وَتِلْكَ الْأَمْثَلُ نَضْرِبُهَا لِلنَّاسِ ۖ  
وَمَا يَعْقِلُهَا إِلَّا الْعُلَمَاءُ

صدق الله العلي العظيم

سورة العنكبوت  
آية 43

## الإهداء

أبي وأمي . . لا يعلو فضل على فضلكم ، أقبل تراب أقدامكم واليكم أهدي تخرجي .

إلى من وهبني الله نعمة وجودهم في حياتي . . أخوتي وأخواتي ،

إلى من كانت دعواتها الصادقة سر نجاحي . . والدة زوجي

إلى الروح التي سكنت روحي . . إلى قلعتي الحصينة وسندي في الحياة

إلى من كاتفني ونحن نشق الطريق نحو النجاح ، إلى رفيق دربي . . زوجي الحبيب

إلى ثمرة فؤادي وقرّة عيني وحصاد عمري . . أولادي نبض قلبي . .

"مصطفى . مرتضى . حسنين . باقر"

أهدي إليهم هذا جهدي .

## شُكر وتقدير

أول مشكور هو الله عز وجل ، لنعمته وفضله عليّ في إتمام هذا الجهد

ويسرني أن أوجه جزيل الشكر لعمادة كلية التربية للعلوم الصرفة و

رئاسة قسم علوم الحياة ، و تقديري وإمتناني للدكتورة الفاضلة هيام

عبد الرضا العواد على جهودها ودعمها المتواصل ومساندتي وإرشادي

بالنصح طيلة مسيرتي العلمية

وأشكر كل من نصحني أو أرشدني أو وجهني أو ساهم معي في إعداد هذا

البحث

## الخالصة

أجريت الدراسة لتسليط الضوء على علاقة الجينين *hsp65, mpt64* والإصابة بمرض السل ومدى انتشاره في محافظة كربلاء ، حيث شملت الدراسة 120 عينة من مجموع المراجعين وقد تم جمع العينات من مركز التدن والامراض الصدرية في محافظة كربلاء (1 تشرين الأول 2020 – 1 آذار 2021) وأجراء التصبيغ بطريقة Acid-fast stain وفحصها مجهريا ، كان عدد العينات المأخوذة 120 عينة و منها (50 عينة موجبة وبنسبة 41.7%) وعدد الحالات السالبة (70 عينة وبنسبة 58.3%) وصنفت العينات بحسب عينة الإصابة إلى Recurrent، Acute، Chronic ؛ كانت نتائج علاقة نوع الجنس مع نوع البيئة (حضر، ريف) تبين عدم وجود فروق معنوية بين المصابين الذكور من سكنة الحضر والريف و بين الإناث من سكنة الحضر والريف وكذلك اوضحت علاقة التدخين مع بيئة العينة (حضر ، ريف ) عدم وجود فروق معنوية بين المصابين المدخنين وغير المدخنين في الحضر والريف.

اوضحت نتائج دراسة علاقة نوع الجنس مع التدخين وجود فروق معنوية بين المدخنين الذكور والإناث حيث سجل الذكور 28 عينة بنسبة مئوية 100% بالمقارنة مع الإناث بصفر عينة وبنسبة 0% وسجل الإناث غير المدخنات إرتفاعاً معنوياً بـ16 عينة بنسبة 72.7% بالمقارنة مع الذكور بـ6 عينة ونسبة 27.3% و سجل الذكور المدخنين إرتفاعاً معنوياً بـ28 عينة وبنسبة 82.4% بالمقارنة مع غير المدخنين بـ6 عينة وبنسبة 17.6% وسجلت الإناث غير المدخنات إرتفاعاً معنوياً بـ16 عينة وبنسبة 100% بالمقارنة مع المدخنين صفر اي بنسبة 0% ؛ وسجلت علاقة نوع الجنس مع فئات مسحات البلغم لمصابين smear-positive sputum بعدم وجود فروقات معنوية بين الفئة +1 لدى الذكور والإناث بينما سجلت الفئة +2 إرتفاعاً معنوياً لدى الذكور بـ 12 عينة وبنسبة 66.7% مقارنة مع الإناث بـ6 عينة وبنسبة 33.3% , في حين سجلت الفئة +3 إرتفاعاً معنوياً لدى الذكور بـ12 عينة وبنسبة 100% مقارنة مع الإناث التي سجلت صفر عينة وبنسبة 0% في حين اوضحت علاقة التدخين مع الفئات المصابة وسجلت الفئة +3 إرتفاعاً معنوياً لدى المدخنين بـ12 عينة وبنسبة 42.9% تلتها الفئة +2 بـ10 عينة وبنسبة 55.6% ومن ثم الفئة +1 بـ6 عينة وبنسبة 30% ، بينما كانت عينات مع الفئات المصابة غير المدخنين ان الفئة +1 ذات إرتفاعاً معنوياً بـ14 عينة وبنسبة 70.0% تلتها الفئة +2 بـ8 عينات وبنسبة 44.4% بينما كانت نسبة الفئة +3 صفر عينة مقارنة مع باقي الفئات الاخرى و اشارت نتائج الدراسة علاقة نوع البيئة بالفئات المصابة حيث اشارت إلى وجود فروقات معنوية بين الفئة +1 لدى

الحضر 12 عينة بنسبة 60% والريف بـ 8 عينة وبنسبة 40% , في حين كانت الفئة +2 في الحضر 12 عينة وبنسبة 66.7% بالمقارنة مع الريف بـ 6 عينة وبنسبة 33.3% , وبالنسبة للفئة +3 في الحضر 12 عينة وبنسبة 100% بالمقارنة مع نسبة اصابة الريف 0% كما لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات لجين *hsp65* عن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن: Chronic والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 195 زوجاً قاعدياً و عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات لجين *mpt64* عن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم في المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن: Chronic والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 771 زوجاً قاعدياً ؛ وبينت نتائج الفحص المباشر باستخدام Acid Fast stain 56 عينة ايجابية بنسبة 50.9% بينما كانت النتائج باستخدام تقنية الـ PCR ايجابية في 50 عينة وبنسبة 45.45% حيث سجلت الحساسية والخصوصية 78% ومدى ثقى يتراوح 64.04-88.47% و 71.67% ومدى ثقى يتراوح 58.56-82.55% على التوالي.

## قائمة المحتويات

الصفحة	المحتويات
<b>الفصل الأول ( المقدمة )</b>	
2	المقدمة
<b>الفصل الثاني ( إستعراض المراجع )</b>	
5	1.2 بكتيريا المتفطرة السلية <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5	1.1.2 نبذة تاريخية
5	2.1.2 شكل وصفات بكتيريا المتفطرة السلية
6	3.1.2 تصنيف بكتيريا المتفطرة السلية
6	4.1.2 أنواع بكتيريا المتفطرة السلية
7	5.1.2 عامل فوعة بكتيريا المتفطرة السلية
9	2.2 مرض السل الرئوي
10	3.2 إنتشار السل الرئوي
11	4.2 إمراضية السل الرئوي
11	5.2 عدوى السل الرئوي
12	1.5.2 إصابة أولية
12	2.5.2 إصابة كامنة
12	3.5.2 إصابة مابعد الأولية
12	6.2 السل المقاوم للأدوية

13	7.2 أعراض مرض السل الرئوي
13	8.2 تشخيص مرض السل الرئوي
14	1.8.2 الأشعة السينية
14	2.8.2 الفحص المجهرى
14	3.8.2 زراعة المتفطرة السلية
14	4.8.2 التشخيص الجزيئى
15	9.2 العلاج والوقاية
<b>الفصل الثالث ( مواد وطرائق العمل )</b>	
18	1.3 المواد وطرائق العمل
18	1.1.3 الأجهزة المستخدمة
19	2.1.3 الأدوات المستخدمة
20	3.1.3 المواد المستخدمة
20	4.1.3 المحاليل والكواشف المستعملة في أستخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين
21	2.3 طرائق العمل
21	1.2.3 جمع العينات
21	2.2.3 مجاميع الدراسة
22	3.2.3 طريقة تصبغ البلغم
22	1.3.2.3 تحضير عينة من البلغم المحتوي على بكتيريا السل للتصبغ
22	2.3.2.3 طريقة التصبغ



23	4.2.3 المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي
23	5.2.3 العدة التشخيصية لخليط تفاعل سلسلة البوليميريز
24	6.2.3 البادئات النوعية المستخدمة في تفاعل سلسلة البوليميريز
24	1.6.2.3 تحضير البادئات النوعية في تفاعل سلسلة البوليميريز
25	2.6.2.3 تفاعل سلسلة البوليميريز الإعتيادي
27	3.3 مخطط الدراسة
28	4.3 الدراسة الجزيئية
28	1.4.3 طريقة إستخلاص الـ DNA بحسب تعليمات الشركة
29	2.4.3 الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز
30	5.3 التحليل الإحصائي
<b>الفصل الرابع ( النتائج والمناقشة )</b>	
32	1.4 نسبة الإصابة بإستخدام الفحص السريري
33	2.4 علاقة نوع الجنس مع منطقة السكن (حضر، ريف)
35	3.4 علاقة التدخين مع منطقة السكن (حضر، ريف)
36	4.4 علاقة نوع الجنس مع التدخين
38	5.4 عُصيات السل الرئوي في الحقل المجهرى
40	6.4 علاقة نوع الجنس مع الفئات المُصنفة بالفحص المجهرى
41	7.4 علاقة التدخين مع الفئات المُصنفة بالفحص المجهرى

43	8.4 إستخلاص الـDNA والتأكد من سلامة الـDNA المستخلص من عينات القشع للتعامل PCR الإعتيادي
43	1.8.4 إستخلاص وتنقية الـDNA لعينات القشع
44	2.8.4 تقدير تركيز ونقاوة الـDNA المستخلص حامض النووي المعزول من عينات القشع
44	9.4 الكشف عن الجينين المشفر <i>mpt64</i> ، <i>hsp65</i> بإستخدام تقنية سلسلة تفاعل البوليميريز الإعتيادي
50	10.4 الحساسية والخصوصية لفحص عينات السل الرئوي
<b>الإستنتاجات والتوصيات</b>	
54	الأستنتاجات والتوصيات
<b>الملاحق</b>	
56	إستمارة الأستبيان
<b>المصادر</b>	
58	المصادر العربية والأجنبية

### قائمة الجداول

8	جدول (1-2) التشابه بين جين <i>hsp65</i> والعزلات السريرية وانماط XhoI PRA
18	جدول (1-3) الأجهزة المستخدمة في الدراسة
19	جدول (2-3) الأدوات المستخدمة في الدراسة
20	جدول (3-3) المواد المستخدمة
20	جدول (4-3) مكونات المحاليل والكواشف للعدة التشخيصية في الدراسة الحالية
23	جدول (5-3) مكونات خليط تفاعل الـPCR (Master mix)

24	جدول (3-6) تسلسل القواعد النايتروجينية للبادئات المستخدمة في فحص الـ PCR
26	جدول (3-7) ظروف تحديد درجة الحرارة المثالية في تضخيم Duplex PCR
32	جدول (4-1) نسبة وعدد العينات المصابين السالبة والموجبة
34	جدول (4-2) علاقة نوع الجنس بنوع البيئة
35	جدول (4-3) علاقة التدخين بنوع منطقة السكن (حضر ، ريف)
37	جدول (4-4) علاقة نوع الجنس بالمدخنين وغير المدخنين
39	جدول (4-5) الفحص المجهرى لعُصيات السل الرئوي
40	جدول (4-6) تركيز العُصيات في الحقل المجهرى
42	جدول (4-7) علاقة التدخين بالفئات المصنفة
50	جدول (4-8) الحساسية والخصوصية للعينات

### قائمة الأشكال

27	شكل (3-1) يوضح مخطط الدراسة
39	شكل (4-1) عصيات السل الرئوي في الحقل المجهرى بقوة تكبير 100x
40	شكل (4-2) الفحص المجهرى لعُصيات السل الرئوي
43	شكل (4-3) يوضح حزم الحامض النووي منقوص الاوكسجين لثمان عينات DNA من القشع
45	شكل (4-4) الترحيل الكهربائي لجين <i>hsp65</i> (Monoplex) باستخدام تقنية الـ PCR
46	شكل (4-5) الترحيل الكهربائي لجين <i>hsp65</i> باستخدام تقنية الـ PCR
47	شكل (4-6) الترحيل الكهربائي لجين <i>mpt64</i> (Monoplex) باستخدام تقنية الـ PCR

48	شكل (7-4) ) الترحيل الكهربائي لجين <i>mpt64</i> باستخدام تقنية الـ PCR
49	شكل (8-4) يوضح نتائج تفاعل سلسلة البوليمريز المزدوج (Duplex-PCR) لثمان عينات DNA من القشع
51	شكل (9-4) الحساسية والخصوصية لفحص عينات السل الرئوي

### قائمة المختصرات

المختصر	الاسم العلمي
<b>ADTP</b>	American Degree Transfer Programme
<b>AFB</b>	Acid-fast bacillus
<b>AIDS</b>	Acquired immunodeficiency syndrome
<b>BCG</b>	Boston Consulting Group
<b>CRP</b>	C-reactive protein
<b>DCTP</b>	Deoxycytidine triphosphate
<b>DGTP</b>	Deoxyguanosine triphosphate
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic acid
<b>DTTP</b>	Deoxythymidine triphosphate
<b>EDTA</b>	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>HSP65</b>	Heat shock protein 65
<b>LJ</b>	Löwenstein – Jensen-media
<b>MDR</b>	Multiple drug resistance
<b>MPT64</b>	<i>Mycobacterium Tuberculosis 64</i>

---

<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>MTBC</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
<b>MOTT</b>	<i>Mycobacterium</i> other than tuberculosis
<b>PCR</b>	Polymerase chain reaction
<b>PTB</b>	Positive <i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>srRNA16</b>	16 S ribosomal Ribonucleic acid
<b>TBE</b>	Tris acetate EDTA
<b>TH1</b>	T helper cells
<b>ZN</b>	Ziehl–Neelsen stain

# الفصل الأول

## المقدمة

## Introduction

## المقدمة

يُعد مرض السل الرئوي Pulmonary Tuberculosis من الامراض المشتركة بين الانسان والحيوان (Lyon & Rossman,2017) فهو من المشاكل الصحية في العالم والمسؤول عن إصابة أعداد كبيرة من البشر ووفاتهم مقارنة بالامراض الاخرى (Hunter,2018) ، تحدث الإصابة نتيجة لتنفس القطيرات الهوائية الحاوية على العامل المسبب والتي تصل فيما بعد للشعب الهوائية (Wei & Li,2016) ؛ تختلف حدة الإصابة باختلاف مناعة المريض فهو إما ان يتطور لإصابة حادة (Acute infection) أو يتحول لإصابة كامنة (Latent infection) التي تتطور فيما بعد إلى إصابة فعالة (Active infection) (Warner,2015).

تعد عصيات *Mycobacterium tuberculosis* العامل الرئيس والمسؤول عن احداث هذا المرض اذ تمتاز بانها معقدة وتتداخل مع مضيف الانسان بشكل رئيس وبقدرتها على البقاء لمدة طويلة في خلايا البلعم الكبير الحوصلية ، تنمو ببطء جدا وتحتاج مدة طويلة تصل من 2-12 اسبوع اما خلاياها تتضاعف عند 25-32 ساعة وتتعلم قدرتها في افراز السموم داخليا وخارجيا والحقيقة هذه الاسباب تساهم في تاخير الاستجابة المناعية الخلوية لحين وصول عدد العصيات 103 عضية تقريبا (Cantres-Fonseca et al.,2019) ، تُصيب هذه العصيات الرئة بشكل اساسي إلا أنها لها القدرة على مهاجمة اجزاء اخرى من الجسم مثل الجهاز العصبي المركزي والجهاز اللمفاوي وجهاز الدوران والجهاز التناسلي البولي والجهاز الهضمي والعظام وكذلك الجلد (Koch & Mizrahi,2018) .

تُوصف بكتيريا التدرن الرئوي بأنها ذات خلايا عسوية الشكل مستقيمة او منحنية قليلا بطول 1.5-3.5 مايكرومتر وعرض 0.2-0.5 مايكرومتر تنتظم في حزم صغيرة او عصيات متوازية غير متحركة وغير مكونة للسبورات ولاحتوي محفظة (Natarajan et al.,2020) ؛ تمتلك البكتيريا جدار خلوي يمثل الهيكل الرئيس لضرورتها ويتكون بالاساس من مادة Peptidoglycan يحوي دهون معقدة تشكل اكثر من 60% من الجدار مما يجعلها غير قابلة للتصبغ باستخدام الصبغات العادية المستعملة مع أنواع أخرى من البكتيريا مثل صبغة غرام ويساهم في جعلها مقاومة لتأثير اغلب المضادات الحيوية المعروفة (Gagneux, 2018) .

إن استخدام تفاعل البلمرة المتقدم لتضخيم الحامض النووي سَمَحَ بإحراز تقدم كبير في التشخيص السريع والدقيق للعدوى بسبب الكائنات الحية التي لايمكن زراعتها في الوسائل المختبرية والتي تتطلب وسائط معقدة وأوقات حضانة طويلة (Mutingwende et al.,2015) .

تُعد الطريقة القائمة لتحديد الحمض النووي لأنواع المتفطرات حيث تم تضخيم جزء من *hsp65* (وهو الجين الذي يشفر بروتين صدمة الحرارة 65 كيلو دالتون) بواسطة تفاعل البوليميراز المتسلسل الذي تم تحليله عن طريق الهضم المقيد وهذا النهج المشار إليه يتطلب فقط معدات PCR روتينية وهلام الاغاروز ويمكن إكماله في غضون ساعات قليلة (Nath et al., 2017) ؛ يتم استخدام جين *hsp65* أيضا بنجاح لتحديد أنواع العزلات السريرية المستزرعة من جنس *Mycobacterium* على الرغم من وجود بعض العيوب في تطبيق الأساليب التي تستهدف الجين *hsp65* وهو جين نسخة واحدة ومع ذلك فإن التعريفات المستندة إلى هذا الجين تعتمد عادةً على تحليل تعدد الأشكال لطول جزء من البوليميراز المتسلسل (PCR) للجين (Bonato et al., 2017) وبسبب قلة الدراسات العربية والمحلية جاءت هذه الدراسة والتي تهدف إلى الكشف عن جينات *hsp65, mpt64* لدى المصابين ببكتيريا MTB ويتم تحقيق الهدف بواسطة المحاور الآتية :

1. عزل وتشخيص بكتيريا السل الرئوي بين المصابين المراجعين إلى مركز التدن الرئوي لمحافظة كربلاء المقدسة باستخدام طريقة Acid fast stain وجهاز GeneXpert.
2. التحري عن الجينين *hsp65, mpt64* بتقنية الـ PCR (polymerase chain reaction) .



# الفصل الثاني

## إستعراض المراجع

## Literature Review

## 1.2 بكتيريا المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis*

### 1.1.2 نبذة تاريخية Brief history

إكتشف روبرت كوخ لأول مرة في عام 1882 أن المتفطرة السلية لها طلاء شمعي غير عادي على سطح الخلية ويرجع ذلك أساساً إلى وجود Mycolic acid ونتيجة لذلك يُمكن أن تظهر المتفطرة السلية إما سالبة الجرام أو إيجابية الجرام (Koch and Mizrahi,2018) ؛ تُستخدم البقع المقاومة للأحماض مثل Ziehl-Neelsen أو البقع الفلورية مثل Auramine بدلاً من ذلك لتحديد مرض السل باستخدام المجهر وتكون فسيولوجيا المتفطرة السلية هوائية للغاية وتتطلب مستويات عالية من الأوكسجين في المقام الأول وهي أحد مسببات أمراض الجهاز التنفسي للثدييات فإنها تُصيب الرنتين (Leylabadlo *et al.*, 2016)

سميت الجرثومة الفطرية بهذا الاسم من البادئة الإغريقية myco- والتي تعني (فطر) إشارة إلى الطريقة التي لوحظ بها نمو الجرثومة الفطرية على سطح المستنبت بنمط يشبه نمو العفن (kerr and Barrett,2018).

### 2.1.2 شكل وصفات بكتيريا المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis*

تكون بكتيريا المتفطرة السلية عبارة عن عصية رقيقة منحنية قليلاً بطول 1.5-3.5 مايكرومتر و بعرض 0.2-0.5 مايكرومتر ، تنتظم في حزم صغيرة غير متحركة وغير مكونة للسبورات ولاحتوي محفظة (Wiens *et al.*,2018) ؛ تمتاز جنس المتفطرة بجدار خلوي غني بالدهون يجعلها غير قابلة للتصبغ بالصبغات العادية ويجعلها أكثر مقاومة لأغلب المضادات الحيوية ؛ تُعد المتفطرات طفيليات داخل خلوية تتسبب في كثير من الأمراض المعدية مثل الدرن الذي تسببه المتفطرة السلية والمتفطرة الجذامية.

تمتلك جداراً خلويًا من مكوناته هو المكون الدهني في trehaloses وهو المسؤول عن عامل ضراوة MTB من خلال تحفيز تفاعلات السيتوكين يمثل الهيكل الرئيس لضراوة البكتيريا ويحتوي على نسبة عالية جداً من الدهون مكون من مادة شمعية غنية بال- Mycolic acid ، وطبقة سميكة من Peptidoglycan الحاوي على دهون معقدة تشكل أكثر من 60% من جدارها الخارجي (Haddad *et al.*,2015) .

تقاوم البكتيريا التلوين بطريقة الجرام المعتادة ومع ذلك فإنها تقبل Fuchsin Stain الأساسية ولا يمكن إزالة اللون بسهولة حتى باستخدام الكحول الحمضي ، تسمى هذه المقاومة لإزالة اللون بمقاومة الحموضة وهذه الخاصية مشتركة فقط من قبل أفراد عائلة المتفطرات (Zondervan *et al.*,2018) .

### 3.1.2 تصنيف بكتيريا المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis*

تنتمي بكتيريا *Mycobacterium* لرتبة Actinomycetes عائلة *Mycobacteriaceae* الذي يضم أكثر من 80 نوعاً بكتيريا و هناك 14 نوعاً منها تقريبا لها قدرة إحداث المرض ( *M. tuberculosis* ، *M. avium* ، *M. asiaticum* ، *M. scrofulaceum* ، *M. xenopi* ، *M. africanum* ، *M. kansasii* ، *M. intracellulare* ، *M. chelonae* ، *M. malmoense* ، *M. thermosistibile* ، *M. szulgai* ، *M. simiae* و *M. fortuitum* ) (Shitikov et al.,2017).

### 4.1.2 أنواع بكتيريا المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis*

المتفطرة السلية (MTB) هي عامل السل بكل أشكاله والغدد اللمفاوية والعظام والمفاصل والاعشبية المصلية للرئة والصفن والسحايا والكلوتين والأمعاء والكظر والجلد ؛ هناك نوعان من السل يشمل السل البشري والسل البقري وأنواع أخرى مجهولة تسبب أيضاً أعراضاً رئوية وجلدية (Palmer et al.,2020).

### 5.1.2 عامل فوعة بكتيريا المتفطرة السلية *Mycobacterium tuberculosis*

تُعرف الفوعة بأنها جزيئات تفرز بواسطة بكتيريا أو فايروس أو الفطر المُمرض والتي تسمح لهم بتكوين مستعمرات و مراوغة الجهاز المناعي ومقاومته وثبيط مناعة الجسم والسماح بدخول الخلايا والخروج منها وبذلك يتم أخذ الغذاء من المُضيف ، عوامل الضراوة تكون عادة مسؤولة عن حدوث الأمراض في جسم المضيف لأنها تعطل وظائف معينة وبالنسبة للمتفطرات تعتمد على قدرتها على الإقامة داخل الخلايا المضيفة والتهرب من الآليات الميكروبية للبلاعم ؛ إن نتيجة الإصابة بالسل (TB) متغيرة للغاية ويبدو أن العلاقة الأقرب بين نوع المتفطرة والبشر قد شكلت جينوم المتفطرات لتفسير العوامل البكتيريا التي تعكس برنامجاً متطوراً ومنسقا للغاية لاستراتيجيات التهرب المناعي التي تتداخل مع كل من المتفطرات والمناعة التكيفية التي تسبب المرض حتى في العائل ذو الكفاءة المناعية الكاملة ، على الرغم من أن المتفطرة السلية (MTB) لا تحتوي على عوامل الفوعة الكلاسيكية إلا أنها وصفت العديد من الجينات المرتبطة بالفوعة وجينات نمط الحياة للفوعة من معقد المتفطرة السلية (MTBC) يعني مجموعة من أنواع البكتيريا العائدة لجنس *mycobacterium* التي تسبب مرض السل للإنسان والحيوان مثل *M. africanum* ، *M. bovis* ، *M. caprae* ، *M. cantti* ، *tuberculosis mycobacterium* (Orgeur and Brosch,2018) ؛ تقوم معظم

جينات الفوعة بتشفير إنزيمات العديد من مسارات دهون وبروتينات سطح الخلية وبروتينات أنظمة نقل الإشارة ومجموعة أخرى ذات صلة تشارك في بقاء المتفطرات داخل البيئة الميكروبية عدوانية للبلاعم المضيفة ، ان المتفطرات تفتقر إلى عوامل الضراوة الكلاسيكية مثل السموم التي تعد نموذجية من مسببات الامراض البكتيريا الأخرى (Perkowski *et al.*,2016) .

تعد عائلة بروتين الصدمة الحرارية البالغة 60 كيلودالتون HSP65 (Heat shock protein 65) بسبب هياكلها الاولية المحفوظة بشكل كبير وانتشارها في كل مكان ، علامات مفيدة للتطور الوراثي في العديد من الأجناس (Nour-Neamatollahie *et al.*,2017) ومن المعروف أيضا ان جميع الانواع البكتيرية لديها نسخة واحدة من جين *hsp65* في جينومها مما يعني أن هذا الجين لا ينتقل بسهولة من بكتيريا لأخرى ، وإن إستهداف هذا الجين من المحتمل ان يكون مناسباً لدراسات علم الوراثة للأنواع أو السلالات وثيقة الصلة (Gopinath *et al.*,2016) وتم إستخدام جين *hsp65* بنجاح لتحديد أنواع العزلات السريرية المستزرعة من جنس *Mycobacterium* ، وعلى الرغم من وجود بعض العيوب في تطبيق الأساليب التي تستهدف الجين *hsp65* (جين نسخة واحدة للكشف عن الكائنات الحية الفطرية السريرية ) فإن التعريفات لهذا الجين تعتمد على تحليل تعدد الأشكال لطول جزء من تفاعل البوليمريز المتسلسل (PCR) الذي يستهدف الجزء 441 زوجاً وبرغم اجراء الدراسات الوبائية الجزيئية والتطور على اساس تسلسل *hsp65* تم تحليل العلاقات التطورية لعدد محدود فقط من السلالات (Dass *et al.*,2020) و لوحظ تشابه بين الأنواع لتسلسل *hsp65* بين العزلات السريرية وأنماط XhoI PRA كما في الجدول (1-2) (Kim and Shin,2018)

توجد 30 عزلة تمثل 13 نمطا *PRA-hsp65* غير موجودة في قواعد البيانات المتاحة وتم حل الأنواع بالتسلسل ومصدر هذه العزلات وتحديد الأنواع بناءً على التسلسل في الأنماط الظاهرية المرصودة بما في ذلك الحساسية لمضادات الميكروبات وفي أربع حالات (NP1،NP11،NP14،NP17) تمثل *Mycobacterium terrae* و *Mycobacterium gordonae* و *Mycobacterium sherrisii* و *Mycobacterium arupense* (على التوالي) تم تحديد عزلات متعددة مع النمط (Nour-) . (Neamatollahie *et al.*,2017)

جدول (1-2) التشابه بين جين *hsp65* والعزلات السرييرية وانماط XhoI PRA

(Kim and Shin,2018)

Species	Sequence similarity (%)	Strains (n)	XhoI PRA pattern
<i>M. tuberculosis</i>	100	25	A
<i>M. leprae*</i>	100	16	B
<i>M. avium</i>	99.2–100	6	C
<i>M. intracellulare</i>	99.2–100	10	C
<i>M. scrofulaceum</i>	100	3	B
<i>M. szulgai</i>	98.7–100	8	C
<i>M. kansasii†</i>	99.2–100	18	B
<i>M. fortuitum</i>	98.2–100	5	D
<i>M. peregrinum</i>	100	3	D
<i>M. abscessus</i>	98.5–100	11	D
Total	98.2–100	105	

يُعد بروتين MPT64 (24 كيلودالتون) من البروتينات المهمة لتنشيط الاستجابة المناعية لدى الأشخاص المصابين بمرض السل (Gopalan et al., 2018) ويوفر الاختبار المعتمد على الحمض النووي لمرض السل مستوى عالٍ من الدقة التشخيصية ومع ذلك غالباً ما يكون النهج معقد من الناحية الفنية ويتطلب معدات متخصصة لأدائه بسبب التكلفة العالية لمثل هذه المقاييس الجزيئية التي تحول دون استخدامها في المناطق محدودة الموارد؛ إن بدائل الاختبار الأكثر بساطة وسهولة وسرعة هي فحوصات الكروماتوغرافي المناعي (ICT) القائمة على *mpt64* (*Mycobacterium Tuberculosis 64*) والتي تُستخدم للكشف عن *mycobacterium tuberculosis complex* ويُعد MPT64 مستضد خاص بـ MTBC يتم إفرازه أثناء نمو البكتيريا وثبت أنه هدف ممتاز للتمييز بين MTBC والبكتيريا المتفطرة الأخرى غير السلية (*Mycobacterium other than tuberculosis*) (Arora et al.,2015) وقد أثبت فائدته في تحديد MTB10 وكان *mpt64* المستهدف بتطبيق تقنية الـ PCR في هذه الدراسة على كل من البلازما والخلايا أحادية النواة أوضح قدرته للكشف عن عدوى السل الرئوي (Thakur et al.,2017).

في دراسة الباحث Gagneux لجين *mpt64* من L5 (lineage: 5 high levels of genetic diversity within the breed) في غانا اقترح أن L5 له تعدد أشكال أحادي النوكليوتيدات غير محدد (nSNP) في جين *mpt64* الذي يمكنه يؤثر سلباً على أداء مستضد MPT64 في الإختبار لإكتشاف L5 مما

يؤثر على البلدان التي يوجد فيها (Gagneux and Small,2007) ؛ ويتم احتواء العدوى في الرئة عن طريق تكوين الأورام الحبيبية حيث تحيط الخلايا الضامة المنشطة والخلايا المناعية الأخرى بموقع الإصابة للحد من تلف الأنسجة وتقييد انتشار البكتيريا الفطرية ، قد تظل بعض البكتيريا كامنة لعقود دون أي مرض سريري نشط (السل الكامن) ومع ذلك يمكن أن تصبح البكتيريا النائمة نشطة وتتكاثر وتنتشر في الرئة والأنسجة الأخرى (Kiran *et al.*,2016) .

## 2.2 مرض السل الرئوي Pulmonary Tuberculosis

يُعد مرض السل الرئوي من الأمراض المشتركة بين الإنسان والحيوان ( LyonandRossman, ) (2017) فهو من المشاكل الصحية في العالم والمسؤول عن إصابة اعداد كبيرة من البشر و وفاتهم مقارنة بالأمراض الأخرى (Pezzella,2019) ، تحدث الإصابة بهذا المرض نتيجة لتنفس القطيرات الهوائية الحاوية على العامل المسبب والتي تصل فيما بعد إلى الشعب الهوائية (Ragonnet *et al.*,2021) ؛ تختلف حدة الإصابة بهذا المرض باختلاف مناعة المريض فهو إما أن يتطور إلى إصابة حادة (Active Infection) أو يتحول لإصابة كامنة (Latent Infection) التي تتطور فيما بعد لإصابة فعالة (Martini *et al.*, 2018) ، وقد وصف الأطباء والعلماء مرض السل بأشكاله المتعددة و سَعُوا إلى تحديد أصول مرض السل من أجل استخدام هذه المعلومات في التشخيص والوقاية والعلاج الأفضل (Gautam *et al.*, 2018) .

يُعد مرض السل من الأمراض الإنتقالية ، عُرف منذ القدم بأشكال مختلفة بما في ذلك الشكل الذي يهاجم العظام ويسبب تشوهات الهيكل العظمي وعليه يمكن الحفاظ على الأنسجة الصلبة مثل العظام لآلاف السنين مما يتيح تحديداً شبه مؤكد للأفراد المصابين بالسل العظمي الذين ماتوا منذ أكثر من 4000 عاماً ؛ يشير تواتر الهياكل العظمية المكتشفة ذات التشوهات السلية الظاهرة في مصر القديمة على أن المرض كان شائعاً بين السكان آنذاك واكتشاف عظام مشوهة بالمثل في مواقع مختلفة من العصر الحجري الحديث في إيطاليا والدنمارك ودول في الشرق الأوسط يشير إلى أن السل تم العثور عليه في جميع أنحاء العالم منذ ما يصل إلى 4000 عاماً (Khan *et al.*, 2019) .

## 3.2 إنتشار السل الرئوي Prevalence of pulmonary tuberculosis

يُعد مرض السل الرئوي ثاني أخطر مرض في العالم بعد مرض الملاريا ، حيث يتسبب في موت الإنسان فهو مسؤول عن إصابة ثلث سكان الكرة الأرضية و فقط 5-10% من الأشخاص المصابين تتطور

إصابتهم إلى مرض فعال (Khan *et al.*,2019) ، يتسبب مرض السل الرئوي بإصابة شخص كل دقيقة و وفاة آخر كل 15 دقيقة في العالم وإن إهمال الشخص المُصاب وعدم علاجه يكون مسؤول عن إصابة 10-15 شخص آخر كل سنة (Ravimohan *et al.*,2018) .

يعد فايروس العوز المناعي (Human Immunodeficiency Virus) من أخطر العوامل المساعدة على إنتقال المرض (Ambadekar *et al.*,2015) ؛ في العراق تم تسجيل 11656 حالة من حالات السل في عام 2003 وأكثر من 60% كانت حالات مرض السل الرئوي وقدرت وزارة الصحة ومنظمة الصحة العالمية حدوث 130 حالة لكل 100000 شخص مما يجعل العدد السنوي للحالات أعلى بكثير من الرقم المبلغ عنه ؛ وارتفعت عدد حالات السل من 1637 حالة عام 1980 إلى 13123 حالة عام 2011 (Marzouk *et al.*,2011).

تتحمل البلدان النامية النسب الأكبر من الوفيات التي تصل إلى 90% والأطفال الذين تقل أعمارهم عن 5 سنوات هم الأكثر تضرراً ، يبلغ خطر الإصابة بمرض السل بعد الإصابة الأولية مدى الحياة 43% عند الرضع و 24% في الأطفال الذين تتراوح أعمارهم من 1 إلى 5 سنوات و 15% لدى المراهقين مقارنة بالبالغين ذوي الكفاءة المناعية ، الأشخاص الذين لديهم خطر مدى الحياة من 5% إلى 10% من الأطفال الأصغر سناً أيضاً تعاني من مرض أكثر شدة مثل التهاب السحايا (Grobelaar *et al.*,2019).

## 4.2 إمرضية السل الرئوي Pathogenicity of pulmonary tuberculosis

تُعد القناة التنفسية هي الطريق الرئيس لدخول قطيرات الهواء المحتوية على عصيات بكتيريا المتقطرة السلية لتصلها إلى الرئة التي تعد العضو الاول في الإصابة ، فإستنشاق هذه القطيرات (ذات قطر اكبر من 5 مايكرومتر) يؤدي بالتصاقها على غشاء القناة التنفسية العليا المخاطي (حويصلات الرئة) فتتم الإستجابة ضدها عن طريق الدفاعات الهدبية المخاطية ، أما القطيرات الأصغر (قطرها اقل من 5 مايكرومتر) تمتلك قدرة الوصول إلى الاسناخ الرئوية (Hunter,2018) .

تلهثم خلايا البلعم الكبير قطيرات الهواء الحاوية على عصيات بكتيريا السل وتبدأ بالتكاثر في موقعها الاول بؤرة كون (Cohen Focus) تنمو هذه العصيات ببطئ داخل الخلايا البلعمية وبسبب عدم افرازها للسموم فانها لاتحدث إستجابة مناعية مبكرة (HunterandActor,2019) تُهاجم العصيات من قبل الخلايا التشجيرية Dendritic Cells التي تنقلها إلى العقد اللمفاوية المنصفية منها الى المجرى الدموي وينقلها إلى

الأعضاء البعيدة في الجسم وعندها يبدأ تطور المرض في الجسم ؛ يتميز هذا المرض بظهور الدرنات (نواتج تجمع الخلايا البلعمية الميتة والعصيات ) اذ تتطور الإصابة الأولية إلى آفة مرضية بعد مرور ثمانية أيام من الإصابة يحدث نكس بعد مرور اسبوعين وتحاط الآفة بنسيج حبيبي وخلايا لمفاوية ويحتوي مركز الدرنه على مزيج من الأنسجة المتخثرة والعُصيات (Meijer,2016) .

## 5.2 مراحل عدوى السل الرئوي Stages Pulmonary tuberculosis infection

ينتشر مرض السل الرئوي عن طريق استنشاق قطيرات تحتوي على رذاذ بكتيريا المتفطرة السلية من الأشخاص المصابين وغير المعالجين ، تتراكم الكائنات الحية المستنشقة في الحويصلات الهوائية في الفصوص السفلية للرئتين و هناك ثلاث مراحل للعدوى تظهر في الاشخاص المصابين هي إصابة أولية ، إصابة كامنة (بدون أعراض) وإصابة ما بعد الأولية أو إعادة التنشيط ويجب معالجة الثلاثة جميعاً وأخذهم في الاعتبار عند ظهور أعراض إصابة السل الرئوي (Drain et al.,2018) .

### 1.5.2 إصابة أولية primary infection

يحدث خلالها التصاق العصيات على الطبقة المخاطية للحويصلات الرئوية بعد استنشاق القطيرات الهوائية الحاوية على البكتيريا ، تُطرد هذه العصيات خارج القناة التنفسية من خلال الفعالت الهدبية للطبقة المخاطية أو تتحرك إلى الأسناخ التنفسية أو الحويصلات الرئوية النهائية و بعدها تبدأ العصيات بالتضاعف فيتطور المرض في موقع الإصابة و هذه العمليات كلها تحدث في فصوص الرئة السفلية (Rangaka et al.,2015).

### 2.5.2 إصابة كامنة Latent infection

يحدث هذا النوع من الإصابة عندما تكون الاستجابة المناعية قوية و قادرة على محاربة البكتيريا ومنع نموها وتكاثرها بعد حدوث الإصابة الاولية ، يعتمد هذا النوع على عمر المريض والإصابة بالامراض الأخرى حيث ان 85-90% من الاشخاص تستمر اصابتهم مدى الحياة ولاكتشف الا بأختبار تيوبركلين ( Tuberculin test) ؛ تكون هذه الإصابة بشكل ندب في الفصوص العليا من الرئة والتي تشير للعلاقة بين العصيات والاستجابة المناعية الخلوية وان 15% من حالات الإصابة تتحول إلى سل فعال خارج الرئة دون الإصابة بها . (Kiazyk and Ball,2017) .



### 3.5.2 إصابة ما بعد الأولية Post Primary infection

يسمى هذا النوع من الإصابة بالسل الثانوي (secondary tuberculosis) يحدث نتيجة لضعف مناعة المصابين وتطور الإصابة الأولية إلى ثانوية من خلال استنشاق عصيات اضافية او تُنشط الإصابة ؛ الفصوص العليا والاجزاء العليا للفصوص السفلية هي المناطق الاكثر تضرر في هذه الإصابة ويصيب هذا النوع اجزاء الجسم الأخرى (Hunter,2018) ؛ فالاشخاص الذين يعانون من نقص المناعة المكتسب (AIDS) يؤدي بهم للوفاة بنسبة 50% و 25% تتحول لإصابة مزمنة و 20% حالات الشفاء (Sharma *et al.*,2021) .

### 6.2 السل المقاوم للأدوية Drug-resistant tuberculosis

تعد مقاومة الأدوية في مرض السل مصدر قلق كبير لبرامج مكافحة السل حيث لا يوجد علاج لبعض سلالات المتفطرة السلية المقاومة للأدوية المتعددة (Multidrug-resistant TB) هناك قلق من أن هذه السلالات يمكن أن تنتشر في جميع أنحاء العالم مما يؤكد الحاجة إلى تدابير تحكم إضافية مثل طرق التشخيص الجديدة وأدوية أفضل للعلاج ولقاح أكثر فعالية (World Health Organization,2016) .

يُعرف السل المقاوم للأدوية المتعددة بأنه مقاوم لما لا يقل عن ريفامبيسين (Rifampicin) وإيزونيازيد (Isoniazid) وهو عامل مركب للسيطرة على المرض حيث يجب إدخال المصابين بسلالات MDR من المتفطرة السلية في نظم العلاج البديلة التي تشمل الأدوية الأكثر تكلفة وسمية والأقل فاعلية (W.H.O. ,2016) ظهرت مشكلة السلالات شديدة المقاومة للأدوية (Extensively drug-resistant) تُعرف بالإضافة إلى كونها MDR في البداية على أنها مقاومة لثلاثة على الأقل من الفئات الست الرئيس من أدوية الجيل الثاني (Para- , cycloserine , thioamides , fluoroquinolone , polypeptides , aminoglycosides) (W.H.O. ,2019) (Amino Salicylic Acid).

تشاور فريق العمل العالمي لمنظمة الصحة العالمية بشأن السل الشديد المقاومة للأدوية وتم الاتفاق على تعريف الحالة المختبرية بأن السل الشديد المقاومة للأدوية يظهر مقاومة على Rifampicin و Isoniazid بالإضافة إلى Fluoroquinolone واحد من الأدوية الثلاثة ( capreomycin, kanamycin and amikacin) القابلة للحقن المستخدمة في العلاج المضاد للسل (Koch and Mizrahi,2018) .

## 7.2 أعراض مرض السل الرئوي Symptoms of pulmonary tuberculosis

لا تظهر أي أعراض على الشخص المصاب بعدوى السل الرئوي لكنه لا يحمل مرض السل النشط أما الشخص المصاب بالسل الرئوي النشط تظهر عليه بعض الأعراض التالية أو جميعها وقد لا تظهر عليه أي منها وهذه الأعراض (سعال مستمر، فقدان الوزن، حمى، فقدان الشهية، إجهاد، تعرق ليلي، ضيق النفس و بلغم مصبوغ بالدم) و الشخص المصاب بمرض السل خارج الرئة فتظهر عليه الأعراض العامة مثل فقدان الوزن والحمى والتعرق الليلي (Cheng *et al.*,2015).

## 8.2 تشخيص مرض السل الرئوي Diagnosis of pulmonary tuberculosis

يتم التشخيص للأشخاص المستوفين معايير الإصابة السريرية عن طريق أشعة الصدر فظهور نتائج إيجابية عند إجراء التصوير توحى بتأثر الرئتين بمرض السل ويعتمد تشخيص السل على المعايير الآتية :

- الأشعة السينية X ray
- الفحص المجهرى Microscopy
- التشخيص الجزيئي Molecular Diagnostics

### 1.8.2 الأشعة السينية X ray

تعد الأشعة السينية من أفضل طرق التشخيص لمرض السل الرئوي ففي الإصابة الأولية تُظهر الأشعة تأثر الرئة في الفصوص السفلية وفي الإصابة الكامنة يكون التأثر في الفصوص العليا للرئة أو يُلجأ لـ (Tuberculin test) ؛ الفصوص العليا و اعلى الفصوص السفلية من الرئة هي المناطق الاكثر تأثر في إصابة ما بعد العدوى الأولية (Pasa *et al.*,2019).

### 2.8.2 الفحص المجهرى Microscopy

يُعد الفحص المجهرى لعينة البلغم المباشرة هو الطريقة الاكثر استخدام في تشخيص مرض السل الرئوي و متاح في معظم مختبرات الرعاية الصحية الأولية ، تُأخذ مسحات البلغم من الشخص المُصاب بحثا عن العصيات الحمضية AFB (Acid-fast bacillus) ويتم تصبيغ العينة بواسطة Ziehl-Neelsen (ZN) فوجود العُصيات دليل الإصابة بمرض السل (Singhal and Myneedu,2015).

يكون الوقت الأمثل لجمع العينات في الصباح الباكر بعد ان يتم غسل الفم بالماء لتقليل تلوث العينة بالبكتيريا الطبيعية للفم (Cudahy and Shenoi,2016) وعند الكشف عن (AFB) في المسحات المصبوغة نلاحظ وجود البكتيريا في العينة السريرية وهو الإجراء الأسهل والأسرع الذي يوفر للطبيب تأكيداً كميّاً للعصيات التي يتم افرازها وإن هذه المسحة ذات اهمية سريرية ووبائية حيوية في تقييم عدوى المريض (Kanda et al.,2015).

### 3.8.2 زراعة المتفطرة السلية *Cultivation of Mycobacterium tuberculosis*

يُعد الحصول على تشخيص نهائي لمرض السل من خلال استنبتات عينات اكلينيكية ترتبط مع العينات السريرية بمعدلات أعلى للكشف عن الحالات لان حساسية الزرع أعلى من حساسية الفحص المجهري لمسحة البلغم ويمكن زراعة البلغم وسوائل غسل القصبات الهوائية على وسط استزراع محدد ، تتوفر ثلاثة انواع من هذه الوسائط منها (LJ) Löwenstein – Jensen-media ، Agar plate و Middlebrook 7H12 أو 7H11 أو 7H10 يمكن تحويل كل منها إلى اوساط انتقائية عن طريق اضافة مضادات حيوية (Kandha and Stephen,2015) .

كان أول اختبار تشخيص مناعي يستخدم في التعرف على مرض السل هو اختبار التوبركولين الجلدي (TST) لكن هذا الاختبار عديم القدرة على التمييز بين المرض النشط والحساسية السابقة و له عدة عيوب تقلل من حساسيته ويرجع ذلك إلى أما نتيجة سلبية كاذبة في حالة الإصابة بمرحلة ما قبل الحساسية في حين يتطلب هذا الاختبار 4 أسابيع على الأقل بعد الإصابة لإعطاء نتيجة إيجابية أو بسبب نتيجة إيجابية كاذبة في حالة رد الفعل المناعي للقاح Bacillus-Calmette-Guérin (BCG) والبكتيريا الفطرية غير السلية ( Altet et al.,2015) .

### 4.8.2 التشخيص الجزيئي *Molecular Diagnostics*

يُعتبر إدخال تقنية الـ PCR (Polymerase chain reaction) أكثر التطورات في علم الأحياء الجزيئي في السنوات الأخيرة وقد أحدثت هذه التقنية القادرة على تضخيم كميات دقيقة من الحمض النووي إلى ملايين النسخ المتطابقة ثورة في أبحاث البيولوجيا الجزيئية وقد أثار اهتماما كبيرا بالطب السريري ( Cabibbe et al.,2015) ، يمكن اكتشاف التسلسلات المضخمة بسهولة عن طريق الترحيل الكهربائي واذا لم يكن تسلسل الحامض النووي المستهدف موجود في العينة التي تم فحصها فإن البادئات ليس لديها ماترتبط به ولا يحدث

التضخيم وبالتالي فان تفاعل PCR يوفر حساسية خصوصية لامثيل لها بعيداً عن نسخ تسلسل الحامض النووي عدة مرات (Nguyen *et al.*,2019).

## 9.2 العلاج والوقاية Treatment and prevention

يعتمد الأطباء اختيار الدواء المناسب وطول مدة العلاج للشخص المُصاب بالأعتماد على عمره ، صحته العامة ، مقاومته المحتملة للبكتيريا ضد الدواء وموقع العدوى في الجسم ففي حال الإصابة بمرض السل الكامن يلزم أخذ نوع أو نوعين على الأكثر من أدوية السل (Kendall *et al.*,2017) ، يتطلب علاج السل النشط (خاصة إذا كان من سلالة مقاومة للأدوية) أخذ أدوية متعددة في آن واحد ومن الأدوية الأكثر شيوعاً المستخدمة في علاج مرض السل :

- إيزونيازيد Isoniazid
- ريفامبين Rifadin ، Rimactane
- إيثامبوتول Ethambutol
- بيرازيناميد Pyrazinamide

تستخدم مجموعة المضادات الحيوية المسماة الفلوروكينولونات والأدوية القابلة للحقن في حالة الإصابة بمرض السل المقاوم للأدوية مثل Amikacin أو Capreomycin (Capastat) لمدة تتراوح بين 20 و30 شهراً وبسبب تطور بعض أنواع السل ومقاومتها لهذه الأدوية تُضاف بعض الأدوية للنظام العلاجي مثل Sirturo و Zyvox (W.H.O.,2020) .

يجب أخذ بعض الأمور بنظر الإعتبار للوقاية من مرض السل الرئوي منها وقف انتشار العدوى فبما أن بكتيريا السل تكون محمولة بالهواء فإن التهوية الجيدة بهواء نقي يُقلل من تركيزها ويحد من انتشارها كما يجب علاج العدوى في اسرع وقت ممكن قبل أن يصبح المرض نشط فعلاج الأشخاص الذين أظهر اختبار التوبركولين الجلدي نتيجة إيجابية لديهم ضروري جداً حتى وإن كانوا لا يعانون من أعراض ؛ يُستخدم لقاح Bacille Calmette-Guerin (BCG) في معظم الدول المتقدمة بهدف الوقاية من حدوث مضاعفات خطيرة فإن الأشخاص الذين جرى تلقيحهم عند الولادة بلقاح BCG كثيراً ما تظهر لديهم نتائج إيجابية كاذبة

في اختبار التوبركولين الجلدي ويرفض الكثير من الناس فكرة أنهم يحملون عدوى هاجعة وغير نشطة من المرض (Sadykova *et al.*,2019).

BCG هو اللقاح الوحيد المتاح للوقاية من مرض السل لدى البشر ، تم الحصول عليه بعد 230 ممراً متتالياً في المختبر بين عامي 1908 و1921 من سلالة ممرضة من *M. bovis* ، إنه لقاح غير مكلف تم تطبيقه منذ أوائل العشرينات وتم إعطاؤه لأكثر من 2.5 مليار شخص منذ عاماً 1948 ، يمكن إعطاؤه للأشخاص عند الولادة أو في أي وقت بعد ذلك (W.H.O.,2018) ؛ أظهرت الدراسات الحديثة مع المتابعة طويلة الأمد للهنود الأمريكيين أن جرعة واحدة في الطفولة تحافظ على التحصين لمدة تصل إلى 50-60 عاماً بعد التطعيم (Whittaker *et al.*,2018) و إن خصوصية التطعيم للاختبارات المصلية مع تحضير المستضد الخام منخفضة للغاية بالنسبة للتطبيق السريري ولكن استخدام المستضدات المنقاة يمكن أن يزيد هذه الخصوصية (Fitzpatrick *et al.*,2019).

# الفصل الثالث

## المواد وطرائق العمل

Materials and methods

**1.3 المواد وطرائق العمل Materials and Methods****1.1.3 الأجهزة المستخدمة Used Devices**

تم استخدام الأجهزة والأدوات المذكورة في الجدول (1-3) :

جدول (1-3) الأجهزة المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	The devices	الأجهزة	ت
China – LG	Refrigerator	ثلاجة	.1
(German) Memmert	Incubator	حاضنة	.2
Memmert	Water bath	حمام مائي	.3
(Germany) Hettich EBA 20	Eppendrofe Centrifuge	جهاز الطرد المركزي	.4
(Uk)Shandod Scientific Co.	Gel electrophoresis	جهاز الترحيل الكهربائي	.5
(Europen) ECX-15.m	Thermocycler apparatus	جهاز المبلر الحراري	.6
(Germany) MWG- Biotech	Translluminator Ultraviolet	جهاز مولد الأشعة فوق البنفسجية	.7
( Japan) OgawaSeiki	Water distillator	جهاز التقطير	.8
( Japan)	Photo documentation (system)	جهاز توثيق فوتوغرافي	.9
GallenKamp	Hot plate with magnetic Stirrer	جهاز تسخين مع محرك مغناطيسي	.10
Memmert	Electric Oven	فرن كهربائي	.11

(England) GallenKamp	Laminair -flow cabinet	كابينة الزرع	.12
(Japan) Sony	Digital Gamara	كاميرا رقمية	.13
Memmert	Vortex Mixer	مازج دوار	.14
China	Microwave	مايكروويف	.15
China	Optical microscope	مجهر ضوئي	.16
(Sweedden) Pharmacia	Electrophoresis power Supply	مجهر القوة الكهربائية	.17
(England) GallenKamp	Sensitive balance	ميزان حساس	.18
(Germany) Stermite	Autoclave	مؤسسة	.19

### 2.1.3 الأدوات المستخدمة The Equipments

تم استخدام الادوات المختبرية في الجدول (2-3) :

جدول (2-3) الأدوات المستخدمة في الدراسة

الشركة المصنعة والمنشأ	Tools	الأدوات	ت
(England) Sigma	Eppendrofe tubes	أنابيب أبندروف	1
India	Medical Cotton	قطن طبي	2
(U.S.A)Eppendrof Oxford	Micropipettes (different-volumes)	ماصات دقيقة مختلفة الأحجام	3
India	Syringes	محاقن (سرنجات)	4
(England) Sigma	Milipores Filters	مرشحات دقيقة	5



## 3.1.3 المواد المستخدمة Used Materials

جدول (3-3) المواد المستخدمة

ت	المواد	Materials	إسم الشركة والمنشأ
1	عدة خليط تفاعل ال-PCR	PCR master mix kit	Intron biotechnology Korea
2	أكاروز	Agarose	BIO BASIC Canada
3	حامض نووي معلوم الوزن الجزيئي	(DNA Ladder)	Bioneer Korea
4	صبغة اثيديوم برومايد	Ethidium bromide	Sigma U.S.A
5	كحول ايثانول مركز	%99 Ethanol	الولايات المتحدة U.A.E
6	ماء مقطر	Distilled water	Jordan

## 4.1.3 المحاليل والكواشف المستعملة في استخلاص الحامض النووي منقوص الاوكسجين

المحاليل المستخدمة في إستخلاص ال-DNA إستخدمت عدة (Kit) المُجهزة من شركة Intron

biotechnology الكورية في إستخلاص الحامض النووي من بكتيريا السل الرئوي .

جدول (4-3) مكونات المحاليل والكواشف للعدة التشخيصية في الدراسة الحالية

ت	المحاليل	الحجم
.1	GB Buffer	25ml
.2	W1 Buffer	30ml
.3	W2 Buffer	12ml
.4	Elution Buffer	10ml
.5	Proteinase K**	2*22mg

100pcs	Spin Columns*	.6
200 pcs	Collection Tubes	.7
1pcs	Insteuction Manual	.8

### 2.3 طرائق العمل

#### 1.2.3 جمع العينات

جمعت 120 عينة بلغم من مركز التدنن والأمراض الصدرية في محافظة كربلاء المقدسة خلال المدة (1 تشرين الأول 2020 – 1 اذار 2021) ، دُرست حالات مرضية لمرضى السل مقارنة بالأشخاص غير المصابين بعد جمع العينات اذ شملت مجموعة المصابين 50 شخصاً ومجموعة غير المصابين 70 شخصاً مع ملاحظة الأعراض المرضية بالإعتماد على التشخيص السريري من قِبل الطبيب المختص والتأكد منها مجهرياً باستخدام ZN و جهاز GeneXpert .

تم جمع المعلومات من المصابين شملت (العمر، الجنس ، الحالة الاجتماعية للمريض و البيئة) (ملحق رقم 1) و تم وضعت تلك العينات في أنابيب سعة 10 مليلتر و حُفظت في ثلاجة لحين ما تم إستخدامها وإجراء عملية إستخلاص الدنا DNA منها ؛ قسمت العينات على مجموعتين وكانت مجموعة المصابين 50 شخصاً شملت 38 ذكر و 12 أنثى تتراوح أعمارهم من 20-75 سنة ، ومجموعة غير المصابين 70 شخصاً شملت 43 ذكر و 27 أنثى تتراوح أعمارهم من 10-75 سنة .

#### 2.2.3 مجاميع الدراسة

تم تصنيف المرضى قيد الدراسة الى Recurrent (متكرر : يحدث مرض السل المتكرر عندما يصاب المرضى الذين عولجوا سابقاً من مرض السل بنوبة مرضية جديدة ، إما بسبب الانتكاس (تكرار العدوى القديمة) أو الإصابة مرة أخرى بسلالة جديدة ) ، Acute (ناكس : تكرار المرض بعد فترات طويلة من الخمول اذا لم يتم علاجه بشكل كامل) و Chronic (مزمن : المريض الذي تناول العلاج لفترات طويلة) (Panicker *et al.*, 2018).

### 3.2.3 طريقة تصبغ البلغم Sputum staining method

#### 1.3.2.3 تحضير عينة من البلغم المحتوي على بكتيريا السل للتصبغ (Erokhina et al., 2019)

- اتخذت الاحتياطات اللازمة (قفازات وكمامة ونظارات)
- جهزت شريحة زجاجية جديدة
- سخن ال-Loop و ترك حتى يبرد وأخذت كمية مناسبة من البلغم المحتوي على قيقح ودم وفردت بدائرة قطرها 2-3 سم بشكل متساوي الفرد (يكون من المستحسن داخل كابينة معقمة)
- تركت الشريحة لتجف وثبتت .
- جُهزت الشريحة للتصبغ .

#### 2.3.2.3 طريقة التصبغ

- غمرت الشريحة المحضرة من البلغم بالكاربول فوكسين Carbol fuchsin وعمل لهب تحت الصبغة بدرجة حرارة 60 ° مئوية من اجل تسخين (بدون غليان فقط تسخين) الصبغة الى ان تصاعد البخار من الشريحة المحتوية على صبغة Carbol fuchsin وبعد تصاعد البخار تركت الشريحة لمدة ٥ دقائق بعد عملية التسخين
- يجب الا تجف الصبغة خلال عملية التسخين لمنع ذلك يتم التأكد من ان الشريحة مغمورة تماماً بمحلول الكاربول فاكسين ولا تصل درجة الحرارة الى درجة الغليان.
- غسلت الشريحة بالماء بعد ذلك غمرت باسيد الكحول (HCl 3% in 95% Ethanol) بمزيل اللون لمدة خمس دقائق حتى أختفى اللون الاحمر (اذا لم يختفي يُضاف مرة اخرى اسيد الكحول الى ان يختفي) وبعد ذلك غسلت بالماء.
- غمرت الشريحة بالميتلين الأزرق Methylene Blue وتركت لمدة دقيقتين وغسلت بالماء وتركت لتجف.
- بعد ان جفت الشريحة وضعت قطرة من الزيت على الشريحة وفحصت بالعدسة x ١٠٠

### 4.2.3 المحاليل المستخدمة في الترحيل الكهربائي

حضرت المحاليل وفقاً لتعليمات الشركة المصنعة

1- دارىء EDTA (M 0.5) : حضر هذا الدارىء من إذابة 18,612 غم من EDTA في 80 مل من الماء المقطر ومن ثم اكمل الحجم الى 100 مل عدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وعقم بالمؤصدة بعدها حفظ بدرجة 4 C° حتى الأستعمال .

2- دارىء (TBE-10X) Tris borate EDTA buffer : حضر من أذابة 3.8 غم من Tris-OH و 2.7 غم من حامض البوريك (Boric acid) و 2 مل من EDTA (M0.5) في 50 مل من الماء المقطر ثم عدل الرقم الهيدروجيني الى 8 وعقم بالمؤصدة بعدها حفظ في درجة 4 c° لحين الاستعمال.

3- دارىء TBE (1X) : حضر هذا المحلول من خلال مزج 10 مل من TBE (10X) Stock و اكمل الحجم الى 100 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ بدرجة 4C° لحين الاستعمال .

4- دارىء تحميل الـ DNA loading buffer : حضر بإذابة 4 غم سكروز و 0.25 غم من صبغة بروموفينول الازرق (Bromophenol Blue) في 10 مل من الماء المقطر المعقم وحفظ في عبوة معقمة عند درجة حرارة الغرفة لحين الاستعمال .

5- محلول صبغة بروميد الاثيديوم ( 0.5% ) Ethidium bromide : حضر هذا المحلول بإذابة 0.25 غم من صبغة بروميد الاثيديوم في 50 مل من الماء المقطر المعقم في قنينة معقمة للحصول على التركيز النهائي 5 مليغرام / مليلتر.

### 5.2.3 العدة التشخيصية لخليط تفاعل لسلسلة البوليميريز

تتضمن عدة التفاعل التضاعفي لسلسلة الدنا (PCR Kit) والمجهزة من شركة (Promega) (USA) كما في الجدول (5-3) .

جدول (5-3) مكونات خليط تفاعل الـ PCR (Master mix)

العنصر	الكمية
Taq DNA polymerase	1 U/ µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	250 mM
Tris-HCl (pH 9.0)	10 mM

30 mM	<b>KCl</b>
1.5 mM	<b>MgCl<sub>2</sub></b>
	<b>Stabilizer and tracking dye</b>

\* المحلول (X2 Green Master mixed) والتي تضمنت : Taq DNA Polymerase أنزيم تضاعف الدنا بتركيز 1 وحدة/مايكروليتر .

\* Green Taq DNA Polymerase buffer 2x ذي الرقم الهيدروجيني 5 , 8

\* مزيج القواعد النايتروجينية ثلاثية الفوسفات dNTPS MIX الذي يحوي على 250 مايكروليتر من كل من dCTP , dGTP ,dATP ,dTTP .

\* محلول كلوريد المغنيسيوم 1.5 مليمولر ( MgCl<sub>2</sub> mM ) .

### 6.2.3 البادئات النوعية المستخدمة في تفاعل سلسلة البوليميريز

وهي البادئات النوعية التي تستهدف التسلسل النوعي لجين *mpt64* ، *hsp65* وفقاً لما ذكرَ في ( Singh *et al.*,2019) و (Kim *et al.*,2008) على التوالي كما في جدول (3-6) .

جدول (3-6) تسلسل القواعد النايتروجينية للبادئات المستخدمة في فحص الـPCR

حجم التفاعل	تسلسل القواعد النايتروجينية للبادئ	موقع البادئ	البادئات
771 bp	5-ACCGAACAACACTCATTTC CGC-3	البادئ الأمامي	<i>mpt64</i>
	5-CTACTCCCGGAGGAATTT CG-3	البادئ الخلفي	
195 bp	5-TGCTCGAGAAGGTCATCGGA-3	البادئ الأمامي	<i>hsp65</i>
	5-TCACCTGACCACCGGTGAGA-3	البادئ الخلفي	

### 1.6.2.3 تحضير البادئات النوعية في تفاعل سلسلة البوليميريز

أولاً : تحضير البوادئ preparation Primers

حضرت البادئات بحسب تعليمات الشركة المجهزة وذلك بأذابة كلا من البادئتين الأولى والثانية من الماء المقطر الخالي من الأيونات وحسب تعليمات الشركة المصنعة للحصول على محلول خزين بتركيز 100 بيكومولر/ مايكروليتر لكل منهما.

## ثانياً : تخفيف البوادئ Primers Dilution

جُهزت جميع البوادئ من شركة (Apha DNA) وحُضرت محلول الخزن Stock solution ومحلول العمل Working solution بحسب تعليمات الشركة ؛ تم تحضير محلول الخزن بعد طرده مركزياً ولمدة قليلة بعد ذلك أضيف الماء مزال الأيون Deionized water للحصول علي التركيز النهائي للعالق Working solution (100 picomols/  $\mu$ l) تم تحضيره بواسطة سحب 10 $\mu$ l من محلول الخزن (100 picomols/ $\mu$ l) وتخفيفه ب 90 $\mu$ l من الماء المزال الأيون للحصول علي التركيز النهائي لمحلول العمل والذي هو (10 picomols/  $\mu$ l) .

## 2.6.2.3 تفاعل سلسلة البوليميريز الاعتيادي Polymerase Chain Reaction Conventional

أجري العمل تحت ظروف معقمة مع حفظ المحاليل كافة على الثلج , إذ تم تطبيق المؤشر الجزيئي المعتمد في هذه الدراسة في تقنية الـ PCR الاعتيادي وفق الخطوات الآتية :

1- تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الاعتيادي:

❖ وذلك من خلال استعمال مكونات عدة الـ PCR ومحاليل البادئات مع مراعاة التبريد بوضع العدة في صندوق ثلجي .

❖ اضيف 5 $\mu$ l من الدنا القالب في انبوبة معقمة سعة 0.5 مل معلمة بأسم العزلة المراد فحصها.

❖ اضيف خليط التفاعل الرئيسي (Green master mix) بمعدل 12.5 $\mu$ l.

❖ اضيفت البوادئ من محلول الخزن بمعدل 1 مايكرو لتر لكل بادئ لانبوب الأبندروف الحاوي على الخليط.

❖ مزجت مكونات التفاعل بأستخدام الماصة الدقيقة من خلال تحريكها بشكل دائري

❖ نبذت الانابيب بواسطة جهاز الطرد المركزي لجمع القطرات الملتصقة في الجدران لضمان ضبط تراكيز مواد التفاعل.

❖ اكمل الحجم بالماء المقطر الخالي من الايونات ليصبح الحجم النهائي لمحلول التفاعل 25  $\mu$ l.

2- تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات PCR الثنائي:

تم تحضير محاليل العمل اليومي لاجراء تفاعلات الـ DuplexPCR ، أستخدمت الطريقة الجزيئية الـ

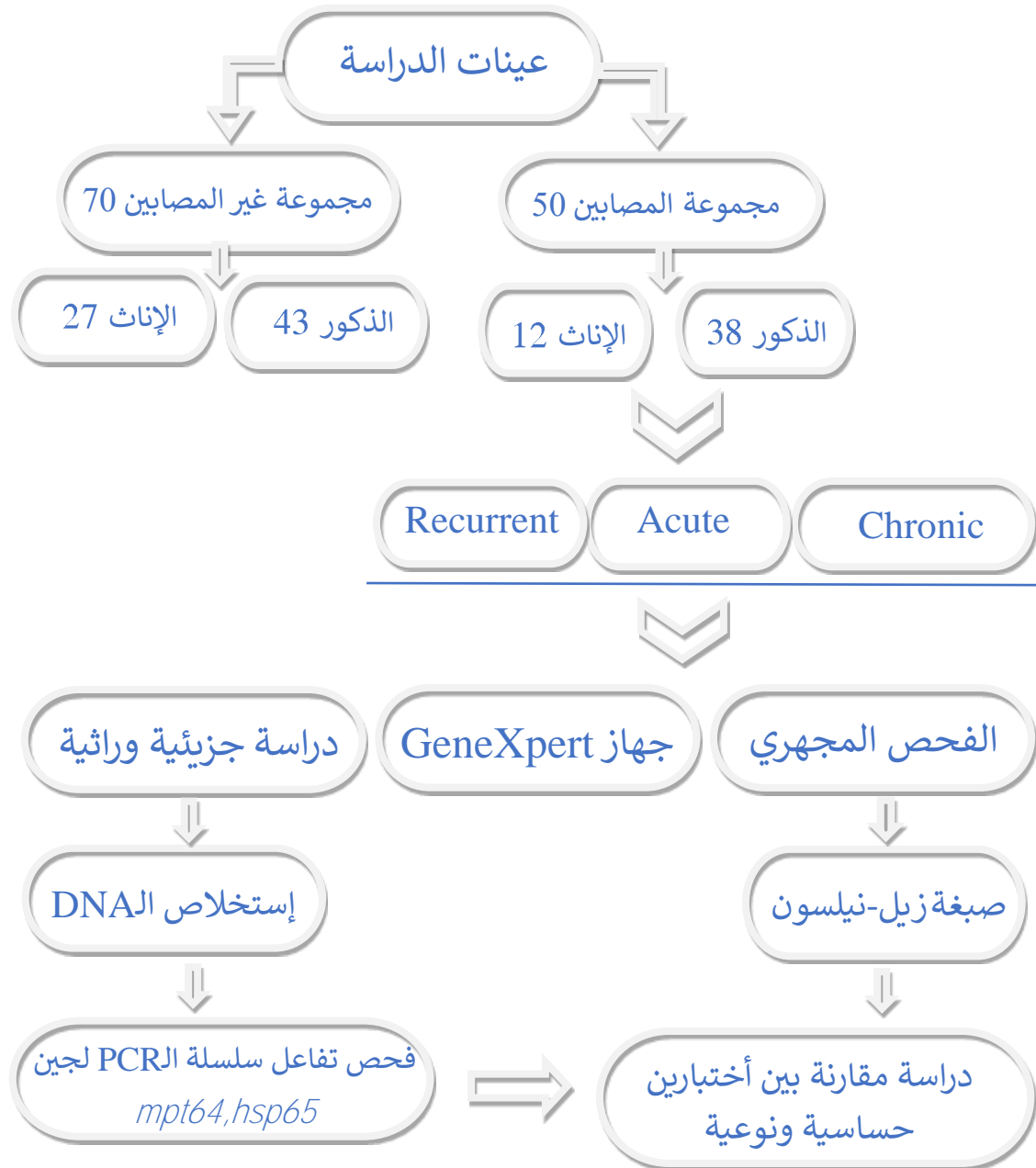
DuplexPCR للكشف عن جين *mpt64*، *hsp65* لدى المصابين ببكتيريا المتفطرة السلية

*Mycobacterium tuberculosis* وحسب الظروف المستخدمة في جدول (7-3).

جدول (7-3) ظروف تحديد درجة الحرارة المثالية في تضخيم Duplex PCR

stage	Cycle	Step	Temperature	Function	Time
1	1	1	95.0	Pre- denaturation	<b>5:00min</b>
		1	95.0	denaturation	<b>0.30s</b>
2	35	2	59	annealing	<b>0.30s</b>
		3	72.0	Elongation	<b>0.45s</b>
3	1	1	72.0	Extension	<b>5:00min</b>
		2	4.0	Elongation	<b>HOLD</b>

## 3.3 مخطط الدراسة



شكل (1-3) يوضح مخطط الدراسة



### 4.3 الدراسة الجزيئية

#### 1.4.3 طريقة إستخلاص الـ DNA حسب تعليمات شركة Intron biotechnology

أولاً : تحضير العينة Sample preparation

- نُقل 200µl من البلغم لانبوبة إندروف وقياس 1.5 ml
- أُضيف 30µl من بروتينيز k ( 10 mg/ml ) الى الأنبوبة الدقيقة الحاوية علي عينة البلغم مع الخلط بشكل جيد ثم حضنت لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة  $60^{\circ}C$  في الحمام المائي

ثانياً : تحليل الخلية Cell lysis

- أُضيف 200 µl من المحلول المنظم BL buffer الي العينة وُخلطت جيد
- وضعت العينة في حمام مائي لمدة 15 دقيقة عند درجة حرارة  $70^{\circ}C$  لغرض تحليل العينة خلال عملية الحُضن وتقليب العينة كل 3 دقائق

ثالثاً : الإرتباط Binding

- أُضيف 200 µl من الإيثانول (96-100%) الي العينة ويُخلط جيداً لمدة 10 دقائق في حال وجود ترسبات
- وُضعت أنابيب spin column في انابيب جامعة بقياس 2 مل ، ثم نُقل اليها العينات الخالية من أي ترسبات بأنابيب spin column و طُردت مركزياً لمدة 5 دقائق عند اعلي سرعة (13000 دورة بالدقيقة) ثم طُرح الراسب مع انبوبة الجمع ثم وُضعت انبوبة spin column في انبوبة جامعة جديدة بقياس 2 مل

رابعاً : طريقة الغسل Washing

- أُضيف 500µl من المحلول المنظم نوع W1-buffer الي إنبوبة أبندروف ثم طُرد مركزياً لمدة دقيقة واحدة عند نفس السرعة السابقة ثم طرح الراسب ايضاً
- أُضيف 500µl من المحلول المنظم W2-buffer الي نفس انبوبة الجمع السابقة مع غسل الأنبوبة و طُردت مركزياً ايضاً لمدة دقيقة واحدة بنفس السرعة السابقة مع طرح الراسب ايضاً
- رجعت إنبوبة أبندروف الي نفس إنبوبة الجمع و طردت مركزياً لمدة 3 دقائق بنفس السرعة السابقة لغرض تجفيف إنبوبة أبندروف .

## خامساً : حفظ الـ DNA

- وُضعت إنبوبة spin column الجافة في إنبوبة ابندروف بقياس 1.5 مل جديدة
- أُضيف ( 50-100µl ) من محلول Elution الموضوع سابقاً في الحمام المائي ثم طُردت مركزياً لمدة 3 دقائق بنفس السرعة السابقة للحصول علي قطع DNA في إنبوبة الأبندروف
- حُفظت العينة الحاوية على الـ DNA في درجة حرارة  $0^{\circ}C -20$

## 2.4.3 الترحيل الكهربائي في هلام الأكاروز Agarose Gel Electrophoresis

## أولاً : تحضير جل الأكاروز

- تم إذابة (0.5 غم) من الأكاروز في (50 مل) من 0.5 X TBE بوساطة تسخين المزيج إلى درجة الغليان باستخدام صفيحة حرارية الى أن تم إذابة كل دقائق الجل ، إذ يبدو المزيج صافي من دون أي دقائق عالقة من المسحوق
- أُضيف 2µl من بروميد الأثيديوم الى سائل الأكاروز
- حرك سائل الأكاروز لكي يمتزج ولتجنب حدوث فقاعات
- صب المزيج في صفيحة الإسناد وبعد غمس المشط comb قرب إحدى نهايتي الصفيحة
- ترك المزيج ليتصلب في درجة حرارة الغرفة
- أزيل المشط بهدوء وكذلك مساند الصفيحة
- وضعت الصفيحة في مسندها في وحدة الترحيل الكهربائي ثم غطيت ببفر الترحيل 1 X TBE ارتفاع ( 1 ملم) فوق سطح الجل

## ثانياً : تحضير صبغة بروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue

حُضرت من خلال إضافة 5 مل من الماء المقطر D.W الي 4 غم من السكروز sucrose مع إضافة 0.25 غم من صبغة Bromophenol Blue ثم اكمل الخليط الى 10 مل من الماء المقطر تبعاً لطريقة كل من (Sambrook and Russell,2001)

## ثالثاً : تحميل الـ DNA والترحيل الكهربائي DNA loading &amp; Electrophoresis

مزج 5µl من DNA مع 3µl من صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol Blue إذ حُملت العينات في الحفر المفردة من الجل ؛ تترحل العينات علي طاقة كهربائية مقدارها ( 70 فولت) ولمدة ساعة ، إذ تم الترحيل من الكاثود (-) إلي الأنود (+)، ثم أستخدم جهاز مطياف الأشعة فوق البنفسجية

UV light transillminator لغرض مشاهدة حزم الـ DNA وان الحزم الملونة بصبغة برومايد الإثيديوم صُورت بأستخدام جهاز التوثيق الفوتوغرافي Photo documentation system .

### 5.3 التحليل الإحصائي

تم إستخدام مربع كاي سكوير (Chi-Square) لتحليل البيانات إحصائياً كما حددت المعدل والانحراف المعياري لمجاميع البلغم التي حلتت بإستخدام t.test وحددت الفروقات المعنوية تحت مستوى معنوي  $p < 0.05$  بإستخدام البرنامج الإحصائي (spss. version 25)

# الفصل الرابع

## النتائج والمناقشة

## Results and Discussion

## 1.4 نسبة الإصابة باستخدام الفحص السريري

جمعت عينات البلغم من المرضى في مركز التدرب والامراض الصدرية في محافظة كربلاء المقدسة ودرست الحالات المرضية لمرضى السل الرئوي مقارنة بالأشخاص غير المصابين حيث كان عدد المصابين 50 شخصاً و عدد غير المصابين 70 شخصاً بعدد كلي بلغ (120 عينة) من مجموع المراجعين خلال مدة الدراسة الممتدة ما بين 1 تشرين الأول 2020 إلى 1 آذار 2021 ومن كلا الجنسين ومن مختلف الفئات العمرية وجميع الحالات الموجبة هي إصابات مؤكدة من قبل الاطباء الاختصاصيين إعتتماداً على التشخيص السريري والأشعة السينية للصدر من قبل الطبيب المختص في المركز ومراحل تطور المرض التي طرأت على المصابين خلال المتابعة الدورية أثناء مدة العلاج .

أظهرت الدراسة الحالية وكما مبين في جدول (1-4) عدم وجود فروق معنوية ( $P>0.05$ ) بين مجموع عدد الحالات السالبة بـ70 عينة وبنسبة 58.3% مقابل عدد الحالات الموجبة بـ50 عينة بنسبة 41.7% .

الجدول (1-4) نسبة وعدد العينات المصابين السالبة والموجبة

تحليل إحصائي	%	المجموع	Chronic	Acute	Recurrent	صنف المريض
X <sup>2</sup> =7.119 DF=4 P=0.112	58.3	70	13	7	50	عدد الحالات السالبة
	41.7	50	7	11	32	عدد الحالات الموجبة
	100	120	20	18	82	المجموع
	16.6	15	11.6	35.8	20.8	%

أشارت نتائج الدراسة الحالية إلى عزل 50 إصابة موجبة من بين 120 عينة (موجبة وسالبة) وبنسبة بلغت 41.7% أشار الباحث (Almahdawi *et al.*, 2018) إلى جمع 10 عزلات على وسط لونيشتاين جنسن (LJ) من المركز التخصصي لأمراض الصدر والجهاز التنفسي (بغداد) وتم استخلاص الحمض النووي لها واخضاعها لفحص التوصيف الجيني لحين IS5110 بطريقة PCR .

في دراسة للباحث (Atiyah *et al.*, 2018) جمعت 11 عينة سريرية مختلفة من المرضى الوافدين إلى مركز الامراض الصدرية والتنفسية / سامراء لفحص العينات المصابة ببكتريا التدرن وتم تسجيل 80 عينة موجبة الفحص بنسبة 72.1% باستخدام الاشعة السينية وزرعت على الوسط الصلب Lowenstein Jensen media L.J . في حين سجل الباحث (Abdulsahib *et al.*, 2015) فحص 629 عينة من المرضى المشكوك بأصابتهم بالسل وأشار إلى وجود 56 عينة وبنسبة (8.9%) عينة موجبة للفحص المجهرى المباشر بينما سجل 537 عينة وبنسبة (91.1%) عينة كانت سالبة لهذا الفحص اختير منها 56 عينة موجبة للكشف المجهرى المباشر و40 عينة سالبة للكشف المجهرى المباشر لاغراض الدراسة الجزيئية التي سجلت 48 حالة إصابة بـ *M.tuberculosis* بنسبة (85.72%) و 2 عينة بنسبة (3.57%) مريض مصاب بخليط من *M. tuberculosis* و *M. bovis*

أكد الباحث (Springer *et al.*, 1996) ان الاعتماد على التميز التقليدي بين أنواع *M.tuberculosis* لملفات الاختبارات البيوكيميائية للاوساط النقية ، وطرق العمل المرهقة وتتطلب 3 إلى 6 أسابيع قبل أن يتمكن مختصي الأحياء الدقيقة المجهرية من تأكيد النتائج لا يعد النمط الظاهري لأحد الأنواع خاصية مطلقة وقد يُظهر تنوعاً ملحوظاً تماماً ، وتقتصر قاعدة بيانات الخصائص المظهرية على الأنواع الشائعة بسبب تباين النمط الظاهري والمقايسة البيئية ، غالباً ما يكون من الصعب تحديد ما إذا كانت العزلات التي لا يمكن تخصيصها لأنواع محددة على أساس التفاعلات الكيميائية الحيوية تعكس فقط النمط الظاهري أو تقلب المقايسة أو تمثل نوعاً غير معروف سابقاً ويعد الفحص الجزيئي المتسلسل للRNA16 هو هدف لغرض تحديد النمط الجيني إنها خاصية مستقرة ، وتحتوي على معلومات الحمض النووي التي تسمح بتحديد البكتيريا *M.tuberculosis* على مستوى الأنواع بالإضافة إلى التعرف السريع على مسببات مرض السل الرئوي غير الموصوفة سابقاً .

## 2.4 علاقة نوع الجنس مع منطقة السكن (حضر، ريف)

لاختبار تأثير البيئة التي يعيش فيها المرضى واعتمادا على جنس المصاب تم اختبار تأثير نوع البيئة (حضر ، ريف) على نوع الجنس ووضحت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية ( $P>0.05$ ) بين المصابين الذكور من سكنة الحضر والريف ولا بين الاناث من سكنة الحضر والريف كما في جدول (1-4).

الجدول (2-4) علاقة نوع الجنس بنوع البيئة

Total	الجنس		العدد والنسبة	البيئة
	انثى	ذكر		
<b>36</b>	<b>10</b>	<b>26</b>	العدد	حضر
100.0%	27.8%	72.2%	النسبة	
<b>14</b>	<b>6</b>	<b>8</b>	العدد	ريف
100.0%	42.9%	57.1%	النسبة	
<b>50</b>	<b>16</b>	<b>34</b>	العدد	Total
100.0%	32.0%	68.0%	النسبة	
	<b>0.31</b>	<b>1.05</b>	Chi & p.v	

اوضحت نتائج الدراسة الحالية بعدم وجود علاقة بين نوع الجنس وبيئة الحضر وأختلفت مع الدراسات الأخرى حيث سجل الذكور اعلى نسبة بـ 34 عينة وبنسبة 68% مقارنة مع الاناث التي سجلت 16 عينة وبنسبة 32% واتفقت الدراسة الحالية مع (Sultan & Al-Jebouri, 2010) بتسجيله 17 عينة للذكور بنسبة مئوية 43.3% بينما سجلت الاناث 13 عينة بنسبة بلغت 43.3% وكذلك توافقت نتائجنا مع باحث في محافظة النجف الاشرف بتسجيله 116 عينة اصابة بالسل الرئوي للذكور بنسبة 52.9% اما الاناث فسجلت 104 عينة وبنسبة 47.2% وسجل الباحث (Ramadhan & Mankhi, 2014) في بغداد وجود ارتفاعاً معنوياً لدى الذكور 106 عينة وبنسبة 68.4% بالمقارنة مع الاناث التي سجلت 49 عينة بنسبة 31.6% .

اشارت نتائج الدراسة إلى تسجيل السكان الحضر 36 عينة وبنسبة 72 % بينما سجلت اصابات الارياف 14 اصابة وبنسبة 28% واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Salih et al., 2011) في محافظة صلاح الدين بتسجيله 891 حالة اصابة بالسل الرئوي وكانت العينات الموجبة الفحص 57% وتوزعت الاصابات في مدينة تكريت بشكل اكبر بتسجيل سكانها 83 حالة اصابة في حين سجلت المناطق الريفية في احياء واقضية المحافظة (الشرقاط 40 حالة بيجي 30 حالة بلد 29 حالة طوزخرماتو 16 حالة الدجيل 13 حالة الدور 7 حالة) . بينما اوضحت دراسة (Mahmood,2019) في محافظة الموصل أن أعلى نسبة لحالات السل الرئوي كانت في قطاعات الحضر في محافظة نينوى لعام 2010: (25%) كانت في القطاع الأيمن و (25%) في اليسار تليها الارياف (13.7%) سنجار (8.4%) في تلعفر، (7.6%) في الحمدانية، (6.6%) في القيارة، (4.9%) في البعاج، (3.5%) في تلكيف، (2%) في مخمور، (1.7%) في شيخان وأخيراً (1.6%) في الحضر.

سجل الباحث (Mutembo et al., 2019) 16791 حالة اصابة بالسل الرئوي في المناطق الحضرية في حين سجلت المناطق الريفية 8742 حالة اصابة و عدا ذلك يعد عبء مرض السل بشكل عام أعلى في المناطق الحضرية منه في المناطق الريفية بسبب الاكتظاظ وانتشار فيروس نقص المناعة البشرية وانتقاله من خلال العمل وبسبب الاختلافات في المعايير الاجتماعية والاقتصادية وكذلك الاختلافات في إمكانية الوصول وجودة الرعاية الصحية بين المكانين يعد تقديم خدمات الرعاية الصحية أفضل في سكان الحضر لأن المراكز الصحية يسهل الوصول إليها بينما يجب على المرضى الريفيين السفر لمسافات طويلة، يوجد في المناطق الحضرية مقدمو رعاية صحية أكثر مهارة ولديهم المزيد من الخبرة السريرية في إدارة السل وفيروس نقص المناعة البشرية والوصول إلى تشخيصات أفضل (Zambia,2013).

### 3.4 علاقة التدخين مع منطقة السكن (حضر ، ريف)

اوضحت نتائج الدراسة الحالية وبحسب الجدول (3-4) تأثير عامل التدخين (مدخن ، غير مدخن) على نوع البيئة (حضر، ريف) حيث اشارت النتائج إلى عدم وجود فروق معنوية ( $P>0.05$ ) ولم يسجل التدخين بين المصابين الحضر والريف اي فروق معنوية وبين المصابين المدخنين وغير المدخنين في الحضر والريف كذلك.



الجدول (3-4) علاقة التدخين بنوع منطقة السكن (حضر ، ريف)

Total	التدخين		العدد والنسبة	العينة
	غير مدخن	مدخن		
<b>36</b>	<b>14</b>	<b>22</b>	العدد	حضر
100.0%	38.9%	61.1%	النسبة	
<b>14</b>	<b>8</b>	<b>6</b>	العدد	ريف
100.0%	57.1%	42.9%	النسبة	
<b>50</b>	<b>22</b>	<b>28</b>	العدد	Total
100.0%	44.0%	56.0%	النسبة	
	<b>0.24</b>	<b>1.33</b>	Chi & p.v	

أوضحت نتائج الدراسة الحالية عدم وجود فروق معنوية لمتغير نوع البيئة (حضر، ريف) وحالة التدخين (مدخن ، غير مدخن ) حيث كان هنالك ارتفاع في عدد السكان الحضريين المدخنين بالنسبة للمدخنين الحضريين وغير المدخنين الحضريين بالنسبة للغير مدخنين سكنة الريف واتفقت الدراسة مع Sultan & Al-Jebouri, (2010) بدراسته في مدينة الزاب/كركوك التي شملت 30 مريض (17 ذكر، 13 انثى) بمتوسط عمر 30.2 سنة ، سجل المدخنين المصابين 11 حالة بنسبة 36.6% مقابل غير المدخنين 19 حالة بنسبة 63.4% وأشار لعدم وجود فروق معنوية بين عامل التدخين والاصابة بالسل الرئوي وأشار أن التدخين عامل خطر للإصابة بالسل وليس سبب رئيس للإصابة بالسل الرئوي ؛ واختلفت النتائج مع (Gleeson et al., 2018) بتسجيله 253 إصابة توزعت بنسبة 54.4% مدخنين و 46.6% غير المدخنين على التوالي و أجرى الباحث الكثير من الارتباطات لدى المرضى مع عوامل و متغيرات اخرى منها نوع الجنس والحالة الاجتماعية والعمر والوزن وتناول الكحول والتاريخ المرضي للعائلة والشخص مع عامل التدخين وأوضح ان بعد الإصابة بـ (MTB) ، تحول الملتهمات macrophages البشرية عملية الأيض الخاصة بها نحو نمط ظاهري أكثر تحلل السكر وهو أمر حاسم للدفاع المبكر للمضيف ضد العامل الممرض وتظهر الحويصلات الرئوية السنخية للمدخنين (AM) smokers' alveolar macrophages ضعف الاستجابة المناعية لمسببات الأمراض التنفسية بما في ذلك المصابين بالسل الرئوي .

## 4.4 علاقة نوع الجنس مع التدخين

اوضحت نتائج الدراسة الحالية وبحسب الجدول (4-4) علاقة تأثير التدخين على الجنس (ذكور، اناث) وجود فروق معنوية بين المدخنين الذكور والاناث حيث سجل الذكور 28 عينة بنسبة مئوية 82.4% بالمقارنة مع الاناث بصفر عينة وبنسبة 0% وسجل الاناث غير المدخنين إرتفاعاً معنوياً بـ16 عينة بنسبة 72.7% بالمقارنة مع مع الذكور بـ6 عينة ونسبة 27.3% .

في حين سجل الذكور المدخنين إرتفاعاً معنوياً بـ28 عينة وبنسبة 82.4% بالمقارنة مع غير المدخنين بـ6 عينة وبنسبة 17.6% وسجلت الاناث غير المدخنات إرتفاعاً معنوياً بـ16 عينة وبنسبة 100% بالمقارنة مع المدخنات صفر اي بنسبة 0%.

الجدول (4-4) علاقة نوع الجنس بالمدخنين وغير المدخنين

Total	التدخين		العدد والنسبة	الجنس
	غير مدخن	مدخن		
34	6	28	العدد	ذكر
100%	%17.6	82.4%	النسبة	
16	16	0	العدد	انثى
100%	%100	0.0%	النسبة	
50	22	28	العدد	Total
100%	%44.0	56.0%	النسبة	
	0.000	29.95	Chi & p.v	

سجلت نتائج الدراسة الحالية وجود فروقات معنوية إرتفاعاً معنوياً للذكور المدخنين مع غير المدخنين واوضحت النتائج كذلك ان الاناث غير المدخنات سجلت اعلى الاصابات مقارنة مع المدخنات و اشارت نتائج الدراسة الحالية وبشكل واضح مع (Dujaili et al. 2011) الذي سجل وجود فروق معنوية لدى المدخنين الذكور بـ270 اصابة وبنسبة (98.3%) مقابل 99 حالة وبنسبة 39.6% للذكور غير المدخنين وسجلت الاناث الغير مدخنات اعلى اصابة 151 حالة وبنسبة 60.4% بالمقارنة مع الاناث المدخنات 4 حالة اصابة وبنسبة

1.5% وأشارت نتائج الدراسة الحالية مع دراسة (Khan *et al.* 2015) في باكستان بتسجيله 472 حالة إصابة بالسل الرئوي بين المدخنين وغير المدخنين توزعت علاقتها مع الاجناس فكان الذكور غير المدخنين 182 حالة بنسبة 76.5% والمدخنين 56 إصابة بنسبة 23.5% بينما سجلت الاناث الغير مدخنات 222 حالة وبنسبة 94.9% مقابل 12 حالة للمدخنات بنسبة 5.1% وأفاد مسح صحي وطني في باكستان أن انتشار التدخين بين مرضى السل كان 15.2% 12 أفاد المسح نفسه أن انتشار التدخين كان 28.6% بين الرجال و 3.4% بين النساء وأفادت الدراسات ذات التصميمات الدراسية المختلفة التي أجريت حول العالم بوجود ارتباط بين تدخين التبغ والسل على الرغم من أن الآلية الدقيقة التي يقوم عليها دور التبغ في السل غير معروفة ، إلا أنه يُعتقد أن النيكوتين الموجود في دخان التبغ قد يتداخل مع الاستجابة المناعية للمضيف لـ *Mycobacterium tuberculosis* وقد أفادت دراسة للسيطرة على الحالات في الهند بوجود ارتباط بين دخان التبغ و تطور مرض السل الرئوي وذكر أن دخان التبغ كان أحد عوامل الخطر المحتملة لتطور السل (Gajalakshmi *et al.* 2003) وسجل الباحث (Jee *et al.* 2009) في كوريا الجنوبية 132525 حالة بين عامي 1992-1995 توزعت على نوع الجنس وسجل الذكور المدخن 483561 حالة بنسبة 58.4% مقارنة مع النساء غير المدخنات 19289 وبنسبة 4.1% في حين سجل المدخنين سابقا للذكور 171732 حالة وبنسبة 20.8% مقارنة مع النساء المدخنات سابقا 9997 وبنسبة 2.1% في حين سجل عدم التدخين لدى الاناث إرتفاعاً معنوياً بـ 437.885 حالة إصابة للاناث الغير مدخنات وبنسبة 93.7% مقارنة مع الذكور 172040 حالة إصابة وبنسبة 20.8% لقد وجد الباحث أن الجنس له دور بمخاطر الإصابة بمرض السل الحادث المرتبط بالتدخين بحيث لم يكن لدى النساء زيادة في المخاطر بينما كان لدى المدخنين الحاليين الذكور زيادة في الخطر بنسبة 50% تقريباً ومع ذلك ، فإن المدخنين من الذكور والاناث لديهم مخاطر متزايدة للوفاة من السل. وتختلف الخصائص الوبائية لمرض السل بحسب الجنس مع انتشار أعلى بين الرجال في جميع الأعمار في الدراسات الاستقصائية التي أجريت في جميع أنحاء العالم (Ottmani & Uplekar, 2008) وبحسب الجنس يمكن أن يعكس ارتفاع معدل العدوى الكامنة في الذكور تتوافق المقارنة بين مخاطر الوفيات المرتبطة بالتدخين عند الذكور والاناث مع هذه الفرضية الدراسات الأخرى المنشورة حتى الآن لم تتناول تعديل تأثير التدخين بحسب الجنس يعد تعاطي الكحول وهو أكثر شيوعاً بين المدخنين أحد عوامل الخطر المعروفة لمرض السل (Friedman *et al.*, 1996).

## 5.4 عُصيات السل الرئوي في الحقل المجهرى

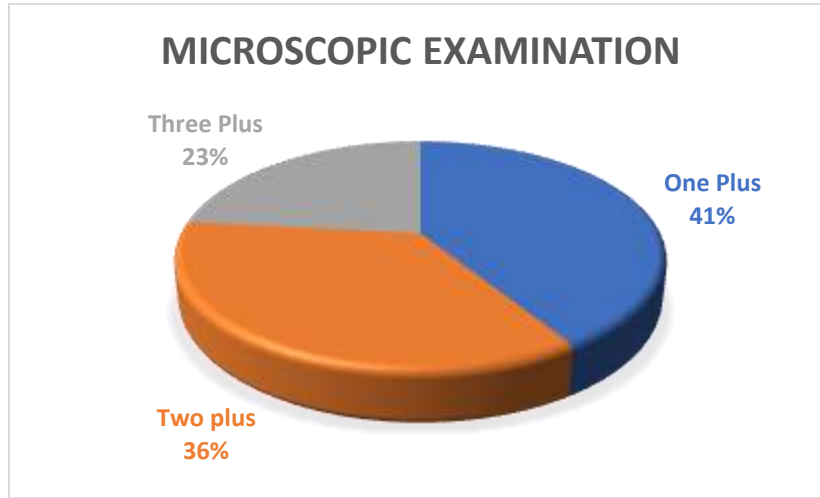
أظهرت الدراسة الحالية عند التصبغ المباشر لعينة من القشع باستخدام طريقة Acid fast stain في الشكل (1-4) إن أكثر حالات الإصابة +1 أي بمعنى 10-99 عُصية متفرقة موجودة في 100 حقل مجهرى حيث أظهرت النتائج بأن 30 مريض اعطى +1 في الفحص المباشر للقشع بعد التصبغ وبنسبة 41% وتلته +2 لكل حقل مجهرى بنسبة 36% و +3 بنسبة 23% كما موضح في الجدول (4-5) والشكل (4-2).



شكل (1-4) عصيات السل الرئوي في الحقل المجهرى بقوة تكبير 100X

جدول (4-5) الفحص المجهرى لعصيات السل الرئوي

النسبة المئوية	النتائج	الفحص المجهرى
41%	32	1+
36%	28	2+
23%	18	3+
100%	78	المجموع



شكل (4-2) الفحص المجهرى لعُصيات السل الرئوي

ان هذا التغير في الاعداد بالنسبة للفحص المجهرى للعُصيات يعزى إلى زيادة تركيز العُصيات الموجودة في القشع وهذا ما اوضحه (Tomen,1979) بانه كل 100 حقل مجهرى يعطي اكثر من 1000 لكل 1 مل قشع واحتمالية إعطاؤها نتائج موجبة هي أقل من 10% كما موضح في الجدول (4-6) .

جدول (4-6) تركيز العُصيات في الحقل المجهرى

تركيز القراءة	الحقل المجهرى	عدد العُصيات
+1	100 حقل مجهرى	عصية 99-10
+2	حقل مجهرى	عصية 10-1
+3	حقل مجهرى	عصية >10

#### 6.4 علاقة نوع الجنس مع الفئات المصنفة بالفحص المجهرى

اوضحت نتائج الجدول (4-7) علاقة نوع الجنس بالفئات +1 (من 99-10 عصية / 100 حقل مجهرى ) و +2 (من 10-1 عصية / حقل مجهرى) و +3 (اكثر من 10 عصية / حقل مجهرى ) بعدم وجود فروقات معنوية بين الفئة +1 لدى الذكور والاناث بينما سجلت الفئة +2 ارتفاعاً معنوياً لدى الذكور بـ 12 عينة وبنسبة 66.7% مقارنة مع الاناث بـ 6 عينة وبنسبة 33.3% في حين سجلت الفئة +3 ارتفاعاً معنوياً لدى الذكور بـ 12 عينة وبنسبة 100% مقارنة مع الاناث التي سجلت صفر عينة وبنسبة 0% .

اتفقت الدراسة مع (Chang *et al.* 2013) بعدم وجود فروق معنوية بين الفئات AFB of sputum 1+ (11 حالة وبنسبة 11.3%) والفئة 2+ (76 حالة وبنسبة 78.4%) والفئة 3+ (8 حالة وبنسبة 8.2%) لما مجموعه 10 566 مسحة بلغم مصاب من 4427 مريض التي سجل الذكور 55 حالة اصابة وبنسبة (56.7%) وعزلت العينات من مستشفى الجامعة يونك مانج الوطني في تايوان National Yang-Ming University Hospital.

واشارت النتائج مع (Soedarsono & Subiantoro 2019) الذي جمع 30 عينة من المرضى المصابين بالسل الرئوي للذكور للاعمار من 15-70 سنة وعزلت العينات من مستشفى سويتومو العام في صربيا Soetomo General Hospital Surabaya وسجلت الفئة 2+ (16) عينة ونسبة 53% تلتها الفئة 3+ بـ 8 عينة وبنسبة (27%) ومن ثم 1+ (2 عينة ونسبة 7%) أن درجة تصنيف (+1 +2 +3) AFB لها علاقة مع مستويات مصل البروتين التفاعلي CRP هذا يعني أن المرضى الذين يعانون من مستوى البلغم AFB 3 لديهم مستويات أعلى من المرضى الذين يعانون من مستوى البلغم AFB 2p، 1p ان البكتيريا TB في الرئة لمرضى السل الرئوي تتعلق بعملية التهابات أنسجة الرئة التي ترتبط بتغيرات مستويات بروتين سي التفاعلي ومع ذلك فإن عملية الالتهاب الرئوي لم تتأثر فقط بالعدد الكبير من جراثيم السل ولكن وجود عمليات تلف الرئة أثر بشكل أكبر على معدل التهاب أنسجة الرئة التي أثرت على مستوى مصل بروتين سي التفاعلي الأعلى .

سجل الباحث (Azarkar *et al.* 2016) 85 مسحة موجبة من المرضى المصابين بالسل الرئوي الذكور في افغانستان وكانت فروقات معنوية طفيفة بين الفئات 1+ (1.32±0.56 خلال شهر) و 2+ (2.56±1.12 شهر) و 3+ (1.71±0.85 شهر) بينما اشار الباحث (Bisognin *et al.* 2019) إلى جمعه 89 عينة موجبة الفحص لمرضى السل الرئوي من خلال مسحات البلغم في وحدة الامراض المعدية في المستشفى الجامعي S. Orsola-Malpighi في بولونيا (ايطاليا) بعدم وجود فروق معنوية بين الفئات وسجلت الفئة 1+ (13 حالة بنسبة 14.6%) والفئة 2+ و 5+ (25 حالة بنسبة 28.1% لكلاهما) والفئة 3+ (26 حالة بنسبة 29.2%).

#### 7.4 علاقة التدخين مع الفئات المصنفة بالفحص المجهرى

اوضحت نتائج الجدول (4-7) علاقة التدخين بالفئات 1+ (من 10-99 عصية / 100 حقل مجهرى) و 2+ (من 1-10 عصية / حقل مجهرى) و 3+ (اكثر من 10 عصية / حقل مجهرى) وسجلت الفئة 3+ ارتفاعاً

معنوياً لدى المدخنين بـ12 عينة وبنسبة 42.9% تلتها الفئة +2 بـ10 عينة وبنسبة 55.6% ومن ثم الفئة +1 بـ6 عينة وبنسبة 30% بينما سجلت عينات غير المدخنين ان الفئة +1 كانت ذات إرتفاعاً معنوياً بـ14 عينة وبنسبة 70.0% تلتها الفئة +2 بـ8 عينات وبنسبة 44.4% بينما سجلت الفئة +3 صفر عينة .

الجدول (4-7) علاقة التدخين بالفئات

Total	الفئة			العدد والنسبة	التدخين
	3 +	2 +	1 +		
28	12	10	6	العدد	مدخن
100.0%	42.9%	35.7%	21.4%	النسبة	
22	0	8	14	العدد	غير مدخن
100.0%	0.0%	36.4%	63.6%	النسبة	
50	12	18	20	العدد	Total
100.0%	24.0%	36.0%	40.0%	النسبة	
		0.001	14.91	Chi & p.v	

أشارت الدراسة الحالية مع (Gullón *et al.* 2009) عزلت العينات من الجمعية الإسبانية لأمراض الرئة وجراحة الصدر (SEPAR) وسجل الباحث إرتفاعاً معنوياً لدى الفئة +3 و+4 لدى المدخنين (ذكور 39 عينة وبنسبة 50.6%: اناث 9 عينة وبنسبة 50%) بينما تلتها الفئة +1 ( ذكور 17 عينة وبنسبة 23.3% : اناث 2 عينة وبنسبة 11.1%) ثم الفئة +2 (الذكور 5 عينة بنسبة 6.5%: الاناث 2 بنسبة 11.1%) واتفقت نتائج الدراسة الحالية مع (Bouti *et al.* 2013) في بتسجيل المدخنين من الفئة +3 و+4 (37 عينة وبنسبة 31.1% 55 عينة وبنسبة 46.2% على التوالي) اعلى معنوياً تلتها الفئة +2 التي سجلت 19 عينة وبنسبة (16%) ثم الفئة +1 بـ8 عينة وبنسبة (6.7%) عازياً ذلك ان التورط الإشعاعي الثنائي والآفة التدخين كانت عوامل خطر مستقلة لتأخر تحويل المسحة بسبب العبء الأساسي المرتفع لعصيات هؤلاء المرضى في البلغم. واختلفت النتائج مع الباحث (Magee *et al.* 2014) في جورجيا وأشار إلى ان الفئة +1 من المدخنين سجلت اعلى الاصابات بـ508 عينة وبنسبة 29.8% تلتها الفئة +2 بتسجيلها 281 عينة وبنسبة 16.5% ومن

ثم +3 ب242 وبنسبة 14.2% ووضح الباحث ان الدلائل الموجودة تشير بقوة إلى أن التدخين هو عامل خطر للإصابة بالسل النشط ويرتبط بفشل علاج مرض السل .

اختلفت النتائج مع الباحث (Abal *et al.* 2005) خلال دراسته جمع 339 مريضاً من اصل 529 مريض موجب الفحص للبلغم في دولة الكويت ووضح عدم تسجيله فروق معنوية بين الفئة +1 لدى المدخنين 124 عينة وبنسبة 91.1% وغير المدخنين 118 عينة وبنسبة 95.8% وكذلك لم توجد فروق معنوية بين الفئة +2 لدى المدخنين 38 عينة وبنسبة 92.1% وغير المدخنين 26 عينة وبنسبة 84.6% ولم تسجل الفئة +3 أي فرق معنوي بين المدخنين 21 عينة وبنسبة 66.7% وغير المدخنين 12 وبنسبة 100% .

#### 8.4 استخلاص الـ DNA والتأكد من سلامة الـ DNA المستخلص من عينات القشع لتفاعل

##### PCR الاعتيادي

#### 1.8.4 استخلاص وتنقية الـ DNA لعينات القشع

تم استخلاص الـ DNA من القشع لكل من Recurrent, Acute , Chronic في الدراسة الحالية وذلك باستعمال عدة استخلاص Extraction Kit مجهزة من قبل شركة Korea/intron وكما موضح في الشكل (3-4) الذي يوضح حزم الحمض النووي الجيني لثمانية عينات DNA من القشع باستخدام 1.5% جل أجاروز عند 75 فولت لمدة نصف ساعة .



الشكل (3-4) يوضح حزم الحمض النووي منقوص الاوكسجين لثمان عينات DNA من القشع عند استخدام هلام الاكاروز ذو تركيز 1.5% وفق جهد 75 فولت ولمدة نصف ساعة.



المسار M: سلم الدنا المعلم (DNA Marker) المسار الاول والثاني والسابع والثامن : Chronic ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار الرابع والخامس: Recurrent

#### 2.8.4 تقدير تركيز ونقاوة الـ DNA المستخلص الحامض النووي المعزول من عينات القشع

تم التقدير النوعي للعينات المدروسة باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وبعد ترحيل العينات كهربائيا اذ يظهر الـ DNA ذو النوعية الجيدة على شكل حزمة Band ، بينما يكون الـ DNA سيء النوعية مبعثر (Sierra& Escarpa 2019) .

و تم التقدير الكمي من خلال قياس تركيز الحمض النووي DNA في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer (Nzilibili et al. 2018) ؛ ان النسبة بين قراءة الموجة 260 نانومتر والموجة 280 نانومتر تساعد في تقدير نقاوة الحامض النووي اذ يجب ان تتراوح هذه النسبة بين 1.7-2.0 (Saadedin et al. 2019)

#### 9.4 الكشف عن الجينين *mpt64* , *hsp65 gene* باستخدام تقنية سلسلة تفاعل البوليميريز

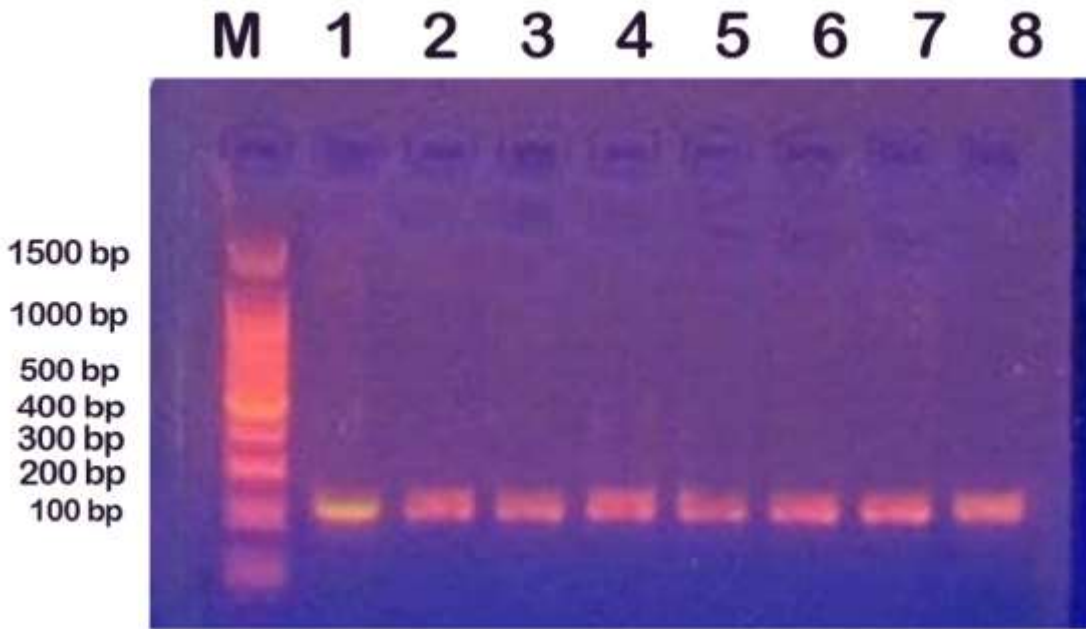
##### الاعتيادي

يتم التحري عن المورثات المحتمل وجودها في عزلات السل الرئوي باستخدام تقنية الـ PCR الاعتيادي (MonoPlex PCR) والـ PCR الثنائي (Duplex PCR) باستخدام اسلوبين جزيئيين للكشف عن عينات السل الرئوي وكما موضح كالاتي :

- الاسلوب الاول : الكشف بأستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز Monoplex PCR ، وجد عند الفحص باستخدام جهاز الترحيل الكهربائي على هلام الاكاروز وفحص النتائج تحت الأشعة فوق البنفسجية.

لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات لجين *hsp65* عن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم للجين في عينات جميع الأشخاص المصابين ( المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن: Chronic ) والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 195 زوجاً قاعدياً كما موضح في الشكل (4-4) و (5-4) .

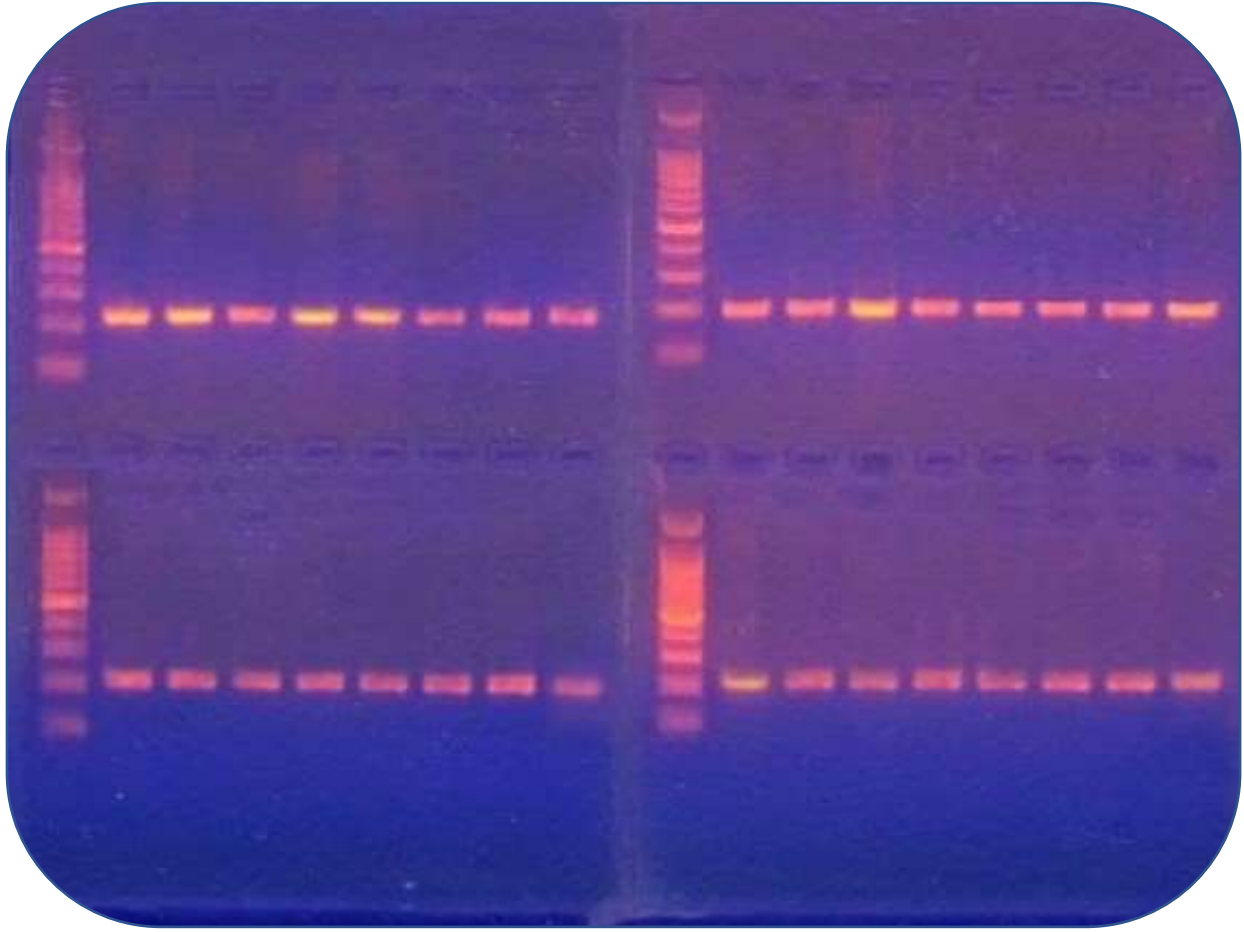
جين *hsp65* يشفر بروتين الصدمة الحرارية بما أن الجينات والبروتين هي مركب حيوي في الحياة فتساعد على بناء العلاقة بين النمط الجيني والنمط الظاهري في علم الوراثة وتُفسر هذه العلاقة الجزيئية من قبل فرضية الجينات (Francis Crick) أول شخص وصف تدفق المعلومات في الخلايا وهو الأمر الذي يحول النمط الجيني لنمط ظاهري (Cobb,2017) ؛ جميع الأنواع البكتيرية لديها نسخة واحدة من جين *hsp65* في جينومها لذا لا ينتقل بسهولة من بكتيريا إلى أخرى وإن تسلسل جين *hsp65* لديه القدرة على أن يكون وسيلة دقيقة وفعالة لتحديد العزلات الفطرية السريرية والبيئية (Kim *et al.*,2005).



شكل (4-4) الترحيل الكهربائي لجين *hsp65* (Monoplex) باستخدام تقنية الـ PCR عند استخدام هلام الاكاروزنو تركيز 1.5% وفق جهد 75 فولت ولمدة نصف ساعة.

المسار M : سلم الدنا المعلم DNA Marker

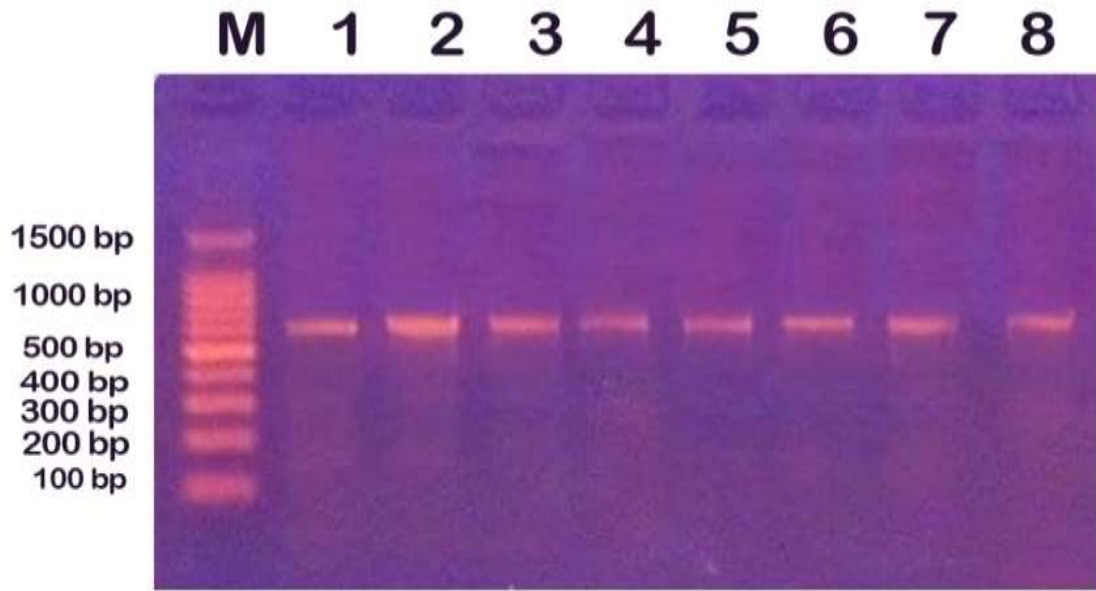
المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن : Chronic



شكل (4-5) الترحيل الكهربائي لجين *hsp65* باستخدام تقنية الـ PCR عند إستخدام هلام الأكاروز بتركيز 1.5 % وفرق جهد 75V ولمدة نصف ساعة

ولوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات لجين *mpt64* عن وجود حزمة ناتجة عن عملية التضخم لجين *mpt64* في كل عينات المصابين (50 عينة موجبة) المسار المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن: Chronic والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 771 زوجاً قاعدياً كما موضح في الشكل (4-6) و(4-7) .

تُعد البروتينات التي يتم افرازها عبر جدار الخلية للبكتيريا المتفطرة مستضدات مهمة تم التعرف عليها في إستجابة المضيف للعدوى الفطرية ، والبروتينات هي جزيئات بايولوجية الأكثر تنوعاً مع وظائف مختلفة بما في ذلك تحفيز الإنزيم والدفاع والنقل والدعم والحركة والتنظيم والتخزين ، يتم تحديد هيكل البروتين (الذي وحدته الوظيفية والهيكلية هي الأحماض الأمينية ) من قبل جين معين في الجسم ؛ إن جين *mpt64* يثير إستجابات الخلايا التائية التي تم تأكيد تفاعلها للبروتين من خلال قدرته على تحفيز خطوط الخلايا البشرية (Lindestam *et al.*,2013).

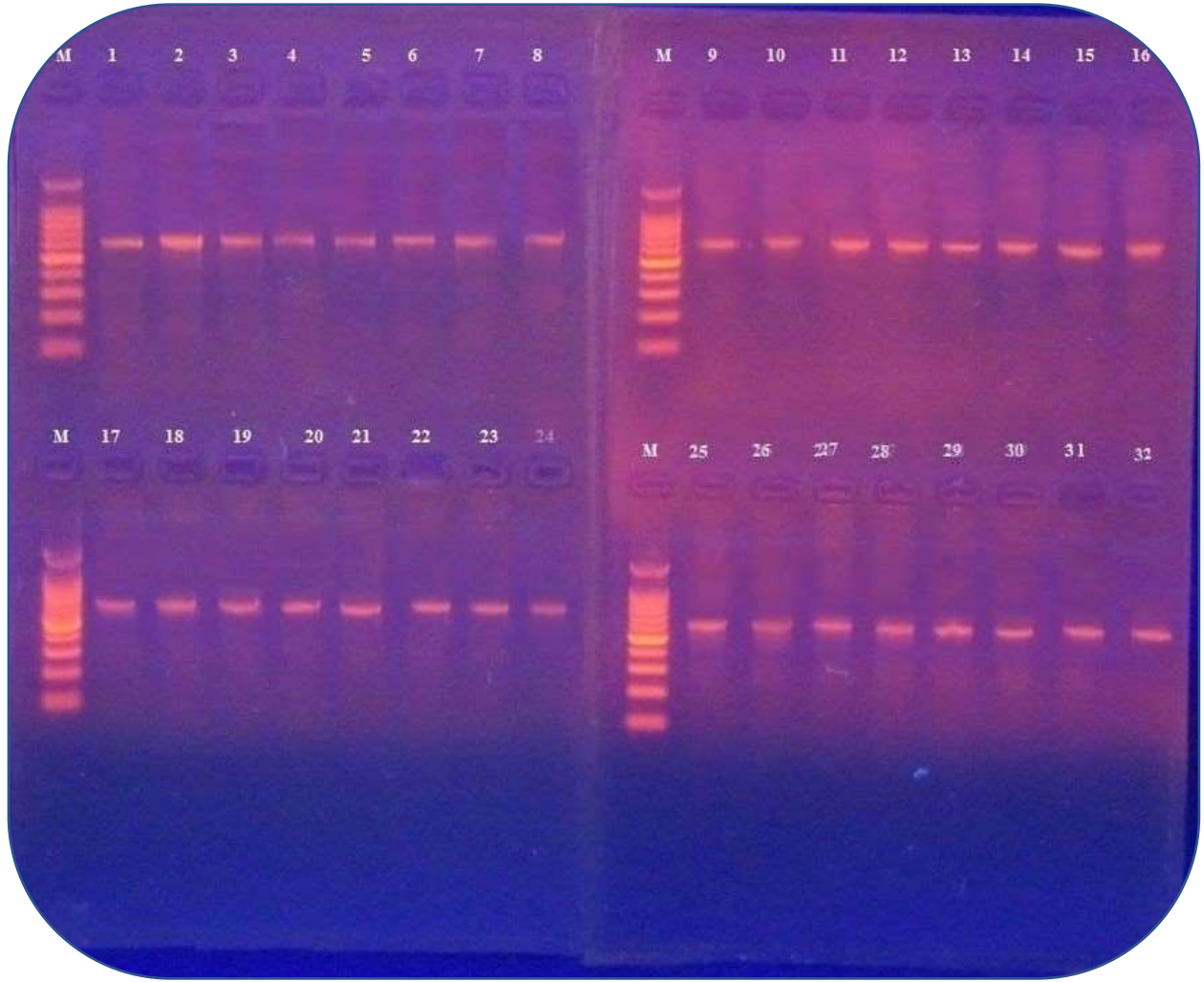


شكل (4-6) الترحيل الكهربائي لجين *mpt64* (Monoplex) باستخدام تقنية الـ PCR عند استخدام هلام الاكاروزنو تركيز 1.5% وفق جهد 75 فولت ولمدة نصف ساعة.

المسار M : سلم الدنا المعلم DNA Marker

المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع

والثامن : Chronic

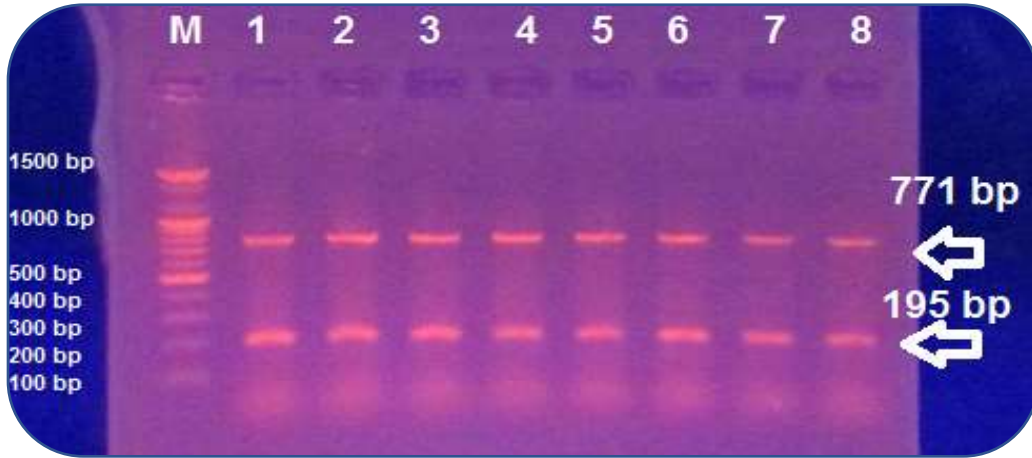


شكل (4-7) الترحيل الكهربائي لجين mpt64 باستخدام تقنية الـ PCR عند استخدام جل الأكاروز بتركيز 1.5% وفرق جهد 75V ولمدة نصف ساعة

• الإسلوب الثاني : الكشف بإستخدام سلسلة تفاعل البوليميريز الثنائي (Duplex PCR)

في هذه العملية تم إستخدام إثنين من البوادئ الشائعة الإستخدام في الكشف عن جينين *hsp65* ، *mpt64* باستخدام بادئين لكل جين ؛ حيث يعتبر الجين هو الوحدة الأساسية للمعلومات الوراثية التي تقع على الكروموسوم في موقع وراثي محدد وعادة ما يتم نسخ المعلومات الوراثية الموجودة في موضع محدد (Chen and Gonçalves,2018).

لوحظت النتائج عند استخدام بادئات متخصصة في الكشف عن البادئات لجين *mpt64* وبادئات جين *hsp65* عن وجود حزميتين ناتجة عن عملية التضخم في كل المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent ، المسار الثاني والثالث: Acute ، المسار السادس والسابع والثامن: Chronic والتي تظهر وجود قطعة الـ DNA عند الوزن الجزيئي المتوقع لهذا الموروث الموافق لـ 771 زوجاً قاعدياً و 195 زوج قاعدياً على التوالي كما موضح في الشكل (4-8).



شكل (4-8) يوضح نتائج تفاعل سلسلة البوليميريز المزدوج (Duplex-PCR) لثمان عينات DNA من القشع عند استخدام هلام الاكاروز ذو تركيز 1.5% وفق جهد 75 فولت ولمدة نصف ساعة.

المسار M : سلم الدنا المعلم DNA Marker

المسار الاول والرابع والخامس: Recurrent

المسار الثاني والثالث: Acute

المسار السادس والسابع والثامن: Chronic

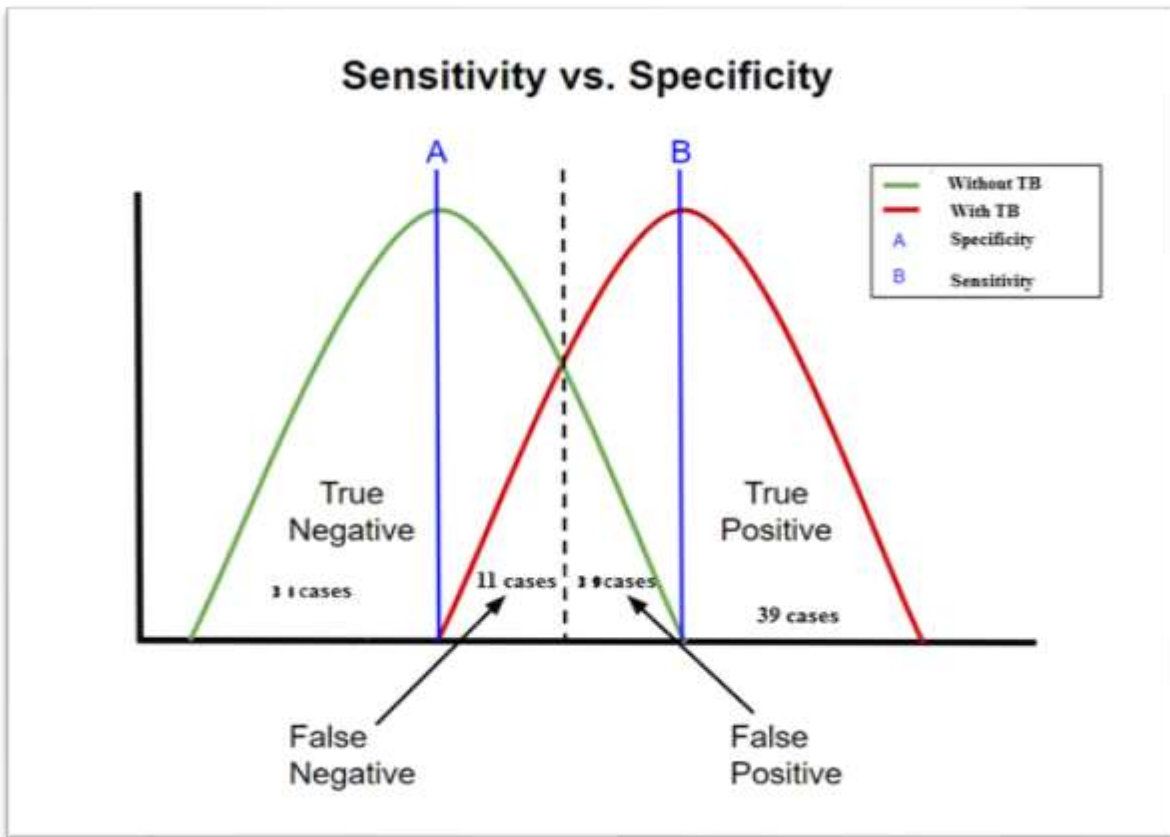
#### 10.4 الحساسية والخصوصية لفحص عينات السل الرئوي

تُعرف حساسية الإختبار هي نسبة الإيجابيات الحقيقية إلى مجموع الإيجابيات الحقيقية والسلبيات الخاطئة ، الحساسية بنسبة 100% في حالة الإختبار الطبي تعني أن سيتم تشخيص جميع الأشخاص المرضى الذين يعانون بشكل عام من الإضطراب المحدد الذي يتم البحث عنه ، حيث يتم تفسير المصطلح على أنه قدرة الإختبار على التشخيص الصحيح للمرض في مكان حدوثه ؛ أما خصوصية الإختبار هي نسبة السلبيات الحقيقية إلى مجموع السلبيات الحقيقية والإيجابيات الزائفة ، إن التحديد بنسبة 100% يعني أن جميع الأشخاص الاصحاء في الأختبار التشخيصي الذي تم إجراءه سيتم تصنيفهم على أنهم اصحاء (Kudo *et al.*,2018) إن كل من حساسية وخصوصية الإختبار هي مؤشرات مهمة على دقة الإختبار لكن لاتعطي الصورة الكاملة إلا معاً ، حيث تعطي فكرة عن درجة الثقة التي يمكن وضعها في الإختبار .

أوضحت نتائج الفحص المباشر باستخدام العدة الخاصة بصبغة ZN كانت إيجابية في عينات 56 مريضاً وبنسبة 50.9% ثم فحص جميع عينات القشع الموجبة والسالبة لفحص القشع المباشر باستخدام تقنية تفاعل سلسلة البوليميريز وظهرت نتائج إيجابية في 50 مريضاً بنسبة 45.45% حيث سجلت حساسية الفحص المجهرية 78% ومدى الثقة يتراوح 64.04-88.47% والخصوصية 44.29% ومدى ثقة يتراوح 32.41-56.66% على التوالي ؛ وبحسب المعلومات المتوفرة لدينا من الدراسة الأولى لتقييم التقنيات المختلفة والمستخدمة في تشخيص مرض السل الرئوي في محافظة كربلاء ( علماً أنه تحول الإهتمام إلى استخدام التقنية الجزيئية إلى استخدام تفاعل سلسلة البوليميريز والتقنيات ذات الصلة بالحامض النووي الجزيئي والتي تتميز بسرعة التشخيص والحساسية والنوعية العالية في دول العالم ) تتطلب هذه الطرق خبرة وتكون مفيدة اذا تم استخدامها للتشخيص الروتيني لمرض السل في المراكز الصحية الأولية ، لذلك كان الهدف من الدراسة الحالية هو معرفة مدى قوة الحساسية والنوعية بين الفحص المجهرية والفحص الجزيئي (PCR) حيث اظهرت نتائجه 50% ومدى ثقة يتراوح 61.53-83.46% و خصوصية 73.81% بمدى ثقة يتراوح 57.09-86.14% و كما في جدول (4-8) وشكل (4-9) .

جدول (8-4) الحساسية والخصوصية للعينات

المجموع	PCR		الفحص المجهرى
	+	-	
78	39 موجبة صحيحة	39 موجبة كاذبة	+
42	11 سالبة كاذبة	31 سالبة صحيحة	-
120	50	70	المجموع



شكل (9-4) الحساسية والخصوصية لفحص عينات السل الرئوي



اختلفت النتائج مع ماوضحه (Horita) حيث وجد ان الفحص المجهرى عالي الحساسية والخصوصية 85%،90% على التوالي مقارنة مع فحص اشعاع الصدر Chyt-radrgraphy وايضاً اختلفت مع (Chadha,2019) الذي أوضح بانها ال X-ray اشعة سينية تمتلك نوعية 77% وخصوصية 97% بينما قشع الفحص المباشر كانت لديه الحساسية والخصوصية 46%، 99% على التوالي .

إن سبب هذا الإختلاف بين الإختبارين يعود إلى وجود نتائج إيجابية كاذبة (false positive) والتي عددها 39 عينة وهذا ماورده الباحث (Norddoak) حيث اوضح اختلاف مستويات الحساسية والخصوصية بشكل كبير يعود مستويات عالية من الايجابية الكاذبة والتي تراجعت من 3-20% عند استخدام تفاعل سلسلة البوليمريز في تشخيص المتفطرة السلية .

# الإستنتاجات والتوصيات

Conclusions and Recommendations

## الاستنتاجات

- إن نسبة إصابة الذكور في بيئة الحضركانت مرتفعة أكثر من الإناث .
- يعد التدخين عامل خطر للإصابة بالسل الرئوي وليس سبب رئيس .
- للتدخين علاقة مع جنس وفئة المصاب حيث كان إرتفاعاً في نسب إصابة الذكور المدخنين وكانت الفئة الثالثة أكثر الفئات بعامل التدخين .
- لم يسجل التدخين بين المصابين الحضر والريف اي فروق معنوية .
- كان هناك علاقة طردية بين بيئة المصاب وفئات الإصابة .
- سجلت نسبة الاصابة من النوع الثاني +2 Acide fast stain ارتفاعاً معنوياً في الذكور مقارنة مع الإناث .
- مرض السل الرئوي مرض شديد الفوعة يصيب البالغين والمسنين وكلا الجنسين .
- الكشف عن الجينين *mpt64, hsp65* في جميع العينات الموجبة .

## التوصيات

- إجراء دراسات جزيئية لحينات أخرى ذات علاقة بمرض السل الرئوي .
- دراسة تأثير الإصابة بفايروسات الجهاز التنفسي مثل فايروس COVID-19 في المصابين بالسل الرئوي .
- الكشف عن تأثير بعض المعايير المناعية عند الإصابة بالسل الرئوي.
- إتاحة العلاج الوقائي المضاد للسل للسكان الأكثر تعرضاً لخطر الإصابة بالمرض .
- استخدام فحص تفاعل سلسلة البوليمريز أو مقايسة المناعية للتحري العدوى بالسل الرئوي .
- دراسة علاقة الجين *mpt64* بأنواع وسلالات أخرى ذات صلة ببكتيريا السل الرئوي .

الملاحق

Supplement

## أستمارة أستبيان

ملحق رقم (1)

(( أستمارة معلومات ))

العمر:

أسم المريض :

البيئة: حضر ( ) ، ريف ( )

الجنس: ذكر ( ) ، إنثى ( )

التدخين: نعم ( ) ، لا ( )

تحليل Acid Fast Stain :

تصنيف حالة المريض :

( ) Chronic ( ) Acute ( ) Recurrent

### العنوان

القضاء :

الناحية :

القرية :

المحلة :

أقرب نقطة دالة :

تاريخ المراجعة : / /

رقم الهاتف :

### الفحوصات

فحص الحساسية الدوائية (DST) : نعم ( ) ، لا ( )

فحص التدرن المقاوم (MDR) : نعم ( ) ، لا ( )

فحص نقص المناعة (HIV) : نعم ( ) ، لا ( )

المصادر

References

## References:

- Abal, A., Jayakrishnan, B., Parwer, S., El Shamy, A., Abahussain, E., & Sharma, P. (2005). Effect of cigarette smoking on sputum smear conversion in adults with active pulmonary tuberculosis. *Respiratory medicine*, 99(4), 415-420.
- Abdulsahib, S. S., Al-kazaz, A. K. A., & Al-Faham, M. A. (2015). Rapid Direct Detection and Differentiation of Mycobacterium tuberculosis complex in Sputum by Real-Time PCR. *Iraqi Journal of Science*, 56(4A), 2862-2866.
- Abubakar, I., Crofts, J., Gelb, D., Story, A., Andrews, N., & Watson, J. (2008). Investigating urban–rural disparities in tuberculosis treatment outcome in England and Wales. *Epidemiology & Infection*, 136(1), 122-127.
- Ahrberg, C. D., Manz, A., & Chung, B. G. (2016). Polymerase chain reaction in microfluidic devices. *Lab on a Chip*, 16(20), 3866-3884.
- Almahdawi, M. A., Mankhi, A. A., & Kdban, M. M. (2018). Molecular diagnosis and DNA fingerprinting based on IS6110 of Mycobacterium tuberculosis isolated from patients in Iraq. *Iraqi journal of biotechnology*, 17(1).
- Altet, N., Dominguez, J., Souza-Galvão, M. L. D., Jiménez-Fuentes, M. Á., Milà, C., Solsona, J., ... & Caylà, J. (2015). Predicting the development of tuberculosis with the tuberculin skin test and QuantiFERON testing. *Annals of the American Thoracic Society*, 12(5), 680-688.
- Ambadekar, N. N., Zodpey, S. P., Soni, R. N., & Lanjewar, S. P. (2015). Treatment outcome and its attributes in TB-HIV co-infected patients registered under Revised National TB Control Program: a retrospective cohort analysis. *Public health*, 129(6), 783-789.

- Arora, J., Kumar, G., Verma, A. K., Bhalla, M., Sarin, R., & Myneedu, V. P. (2015). Utility of MPT64 antigen detection for rapid confirmation of Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal of global infectious diseases*, 7(2), 66.
- Atiyah, A. A. (2018). Study of the isolation and diagnosis of Mycobacterium tuberculosis and its resistance to antibiotics in the city of Samarra. *Journal of Education and Scientific Studies*, 1(12).
- Azarkar, Z., Sharifzadeh, G., Ebrahimzadeh, A., & Olumi, S. (2016). Time to sputum smear conversion in smear-positive pulmonary tuberculosis patients and factors for delayed conversion. *Iranian journal of medical sciences*, 41(1), 44.
- Berhe, G., Enqueselassie, F., Hailu, E., Mekonnen, W., Teklu, T., Gebretsadik, A., Aseffa, A. (2013). Population-based prevalence survey of tuberculosis in the Tigray region of Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 13(1), 448. doi: 10.1186/1471-2334-13-448
- Bisognin, F., Amodio, F., Lombardi, G., Reggiani, M. B., Vanino, E., Attard, L., Dal Monte, P. (2019). Predictors of time to sputum smear conversion in patients with pulmonary tuberculosis under treatment. *New Microbiol*, 42(3), 171-175.
- Bouti, K., Aharmim, M., Marc, K., Soualhi, M., Zahraoui, R., Benamor, J., Iraqi, G. (2013). Factors influencing sputum conversion among smear-positive pulmonary tuberculosis patients in Morocco. *International Scholarly Research Notices*, 2013.
- Cabibbe, A. M., Miotto, P., Moure, R., Alcaide, F., Feuerriegel, S., Pozzi, G. & Cirillo, D. M. (2015). Lab-on-chip-based platform for fast molecular



- diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis. *Journal of clinical microbiology*, 53(12), 3876-3880.
- Cantres-Fonseca, O. J., Rodriguez-Cintrón, W., Olmo-arroyo, F. D., & Baez-Corujo, S. (2019). Extra Pulmonary Tuberculosis: An Overview. *Role of Microbes in Human Health and Diseases*, 1-16.
  - Cao, L., Cui, X., Hu, J., Li, Z., Choi, J. R., Yang, Q., ... & Xu, F. (2017). Advances in digital polymerase chain reaction (dPCR) and its emerging biomedical applications. *Biosensors and Bioelectronics*, 90, 459-474.
  - Chang, C.-Y., Hong, J.-Y., Yuan, M.-K., Chang, S.-J., Lee, Y.-M., Chang, S.-C., . . . Cheng, S.-L. (2013). Risk factors in patients with AFB smear-positive sputum who receive inappropriate antituberculous treatment. *Drug design, development and therapy*, 7, 53.
  - Chen, X., & Gonçalves, M. A. (2018). DNA, RNA, and protein tools for editing the genetic information in human cells. *Iscience*, 6, 247-263.
  - Cheng, J., Wang, L., Zhang, H., & Xia, Y. (2015). Diagnostic value of symptom screening for pulmonary tuberculosis in China. *PloS one*, 10(5), e0127725.
  - Cobb, M. (2017). 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS biology*, 15(9), e2003243.
  - Cudahy, P., & Sheno, S. V. (2016). Diagnostics for pulmonary tuberculosis. *Postgraduate medical journal*, 92(1086), 187-193.
  - Dass, S. A., Norazmi, M. N., Acosta, A., Sarmiento, M. E., & Tye, G. J. (2020). TCR-like domain antibody against *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) heat shock protein antigen presented by HLA-A\* 11 and HLA-A\* 24. *International journal of biological macromolecules*, 155, 305-314.

- Drain, P. K., Bajema, K. L., Dowdy, D., Dheda, K., Naidoo, K., Schumacher, S. G., ... & Sherman, D. R. (2018). Incipient and subclinical tuberculosis: a clinical review of early stages and progression of infection. *Clinical microbiology reviews*, 31(4), e00021-18.
- Dujaili, J. A., Sulaiman, S. A. S., Awaisu, A., Muttalif, A. R., & Blebil, A. Q. (2011). Outcomes of tuberculosis treatment: a retrospective cohort analysis of smoking versus non-smoking patients in Penang, Malaysia. *Journal of Public Health*, 19(2), 183-189.
- Erokhina, M. V., Lepekha, L. N., Voronezhskaya, E. E., Nezhlin, L. P., Avdienko, V. G., & Ergeshov, A. E. (2019). Application of Laser Scanning Confocal Microscopy for the Visualization of *M. tuberculosis* in Lung Tissue Samples with Weak Ziehl–Neelsen Staining. *Journal of clinical medicine*, 8(8), 1185....
- Fitzpatrick, M., Ho, M. M., Clark, S., Dagg, B., Khatri, B., Lanni, F., ... & Walker, B. (2019). Comparison of pellicle and shake flask-grown BCG strains by quality control assays and protection studies. *Tuberculosis*, 114, 47-53.
- Friedman LN, Williams MT, Singh TP, et al. Tuberculosis, AIDS, and death among substance abusers on welfare in New York City. *N Engl J Med*. 1996;334(13):828–833.
- Gagneux, S. (2018). Ecology and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Reviews Microbiology*, 16(4), 202.
- Gagneux, S., & Small, P. M. (2007). Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis product development. *The Lancet infectious diseases*, 7(5), 328-337.

- Gajalakshmi V, Peto R, Kanaka T, et al.(2003). Smoking and mortality from tuberculosis and other diseases in India: retrospective study of 43 000 adult male deaths and 35 000 controls. *Lancet* 362: 507–15.
- Gautam, U. S., Foreman, T. W., Bucsan, A. N., Veatch, A. V., Alvarez, X., Adekambi, T., ... & Mehra, S. (2018). In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(1), E62-E71.
- Gautam, U. S., Foreman, T. W., Bucsan, A. N., Veatch, A. V., Alvarez, X., Adekambi, T., ... & Mehra, S. (2018). In vivo inhibition of tryptophan catabolism reorganizes the tuberculoma and augments immune-mediated control of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(1), E62-E71.
- Gleeson, L. E., O’Leary, S. M., Ryan, D., McLaughlin, A. M., Sheedy, F. J., & Keane, J. (2018). Cigarette smoking impairs the bioenergetic immune response to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 59(5), 572-579.
- Gopinath, S. C., Perumal, V., Kumaresan, R., Lakshmipriya, T., Rajintraprasad, H., Rao, B. S., ... & Hashim, U. (2016). Nanogapped impedimetric immunosensor for the detection of 16 kDa heat shock protein against *Mycobacterium tuberculosis*. *Microchimica Acta*, 183(10), 2697-2703.
- Grobbelaar, M., Louw, G. E., Sampson, S. L., van Helden, P. D., Donald, P. R., & Warren, R. M. (2019). Evolution of rifampicin treatment for tuberculosis. *Infection, Genetics and Evolution*, 74, 103937.

- Gullón, J., Suárez, I., Lecuona, M., Fernández, R., Rubinos, G., Medina, A., González, I. (2009). Time to culture conversion in smokers with pulmonary tuberculosis. *Monaldi Archives for Chest Disease*, 71(3).
- Haddad, M. B., Mitruka, K., Oeltmann, J. E., Johns, E. B., & Navin, T. R. (2015). Characteristics of tuberculosis cases that started outbreaks in the United States, 2002–2011. *Emerging infectious diseases*, 21(3), 508.
- Hill, A., Barber, M., Gotham, D., Fortunak, J., Nath, S., & Pozniak, A. (2017). Generic treatments for HIV, HBV, HCV, TB could be mass produced for < \$90 per patient. *J Int Aids Soc*, 20(Suppl 5).
- Horton, K. C., MacPherson, P., Houben, R. M., White, R. G., & Corbett, E. L. (2016). Sex differences in tuberculosis burden and notifications in low- and middle-income countries: a systematic review and meta-analysis. *PLoS medicine*, 13(9), e1002119.
- Hunter, R. L. (2018). The pathogenesis of tuberculosis: the early infiltrate of post-primary (adult pulmonary) tuberculosis: a distinct disease entity. *Frontiers in immunology*, 9, 2108.
- Hunter, R., & Actor, J. (2019). The pathogenesis of post-primary tuberculosis. A game changer for vaccine development. *Tuberculosis*, 116, S114-S117.
- James H. Kerr and Terry L. Barrett, "Atypical Mycobacterial Diseases" *Military Dermatology Textbook*, p. 401
- Jasenosky, L. D., Scriba, T. J., Hanekom, W. A., & Goldfeld, A. E. (2015). T cells and adaptive immunity to *Mycobacterium tuberculosis* in humans. *Immunological reviews*, 264(1), 74-87.
- Jee, S. H., Golub, J. E., Jo, J., Park, I. S., Ohrr, H., & Samet, J. M. (2009). Smoking and risk of tuberculosis incidence, mortality, and recurrence in

- South Korean men and women. *American journal of epidemiology*, 170(12), 1478-1485.
- Kanda, R., Nagao, T., Van Tho, N., Ogawa, E., Murakami, Y., Osawa, M., ... & Nakano, Y. (2015). Factors affecting time to sputum culture conversion in adults with pulmonary tuberculosis: a historical cohort study without censored cases. *PloS one*, 10(11), e0142607.
  - Kandhakumari, G., & Stephen, S. (2015). Extra pulmonary tuberculosis: Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* grown in *Mycobacterium* growth indicator tube 960 and Lowenstein-Jensen media, employing Standard diagnostics Bioline *Mycobacterium tuberculosis* protein 64 antigen detection kit. *Indian journal of medical microbiology*, 33, S122-S125.
  - Kassa, G. M., Merid, M. W., Muluneh, A. G., & Fentie, D. T. (2021). Sputum smear grading and associated factors among bacteriologically confirmed pulmonary drug-resistant tuberculosis patients in Ethiopia. *BMC infectious diseases*, 21(1), 1-7.
  - Kendall, E. A., Azman, A. S., Cobelens, F. G., & Dowdy, D. W. (2017). MDR-TB treatment as prevention: The projected population-level impact of expanded treatment for multidrug-resistant tuberculosis. *PloS one*, 12(3), e0172748.
  - Khan, A. H., Aftab, R. A., Israr, M., Khan, A., & Khan, T. M. (2015). Smoking on treatment outcomes among tuberculosis patients. *The American journal of the medical sciences*, 349(6), 505-509.
  - Khan, M. K., Islam, M. N., Ferdous, J., & Alam, M. M. (2019). An Overview on Epidemiology of Tuberculosis. *Mymensingh medical journal: MMJ*, 28(1), 259-266.

- Kiazzyk, S., & Ball, T. B. (2017). Tuberculosis (TB): Latent tuberculosis infection: An overview. *Canada Communicable Disease Report*, 43(3-4), 62.
- Kim, B. J., Park, J. H., Lee, S. A., Kim, H., Cha, C. Y., Kook, Y. H., ... & Yim, J. J. (2008). Differentiation of mycobacteria in sputa by duplex polymerase chain reaction for mycobacterial hsp65 gene. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 62(2), 193-198.
- Kim, H., Kim, S. H., Shim, T. S., Kim, M. N., Bai, G. H., Park, Y. G., ... & Kim, B. J. (2005). Differentiation of Mycobacterium species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65). *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(4), 1649-1656.
- Kim, S. H., & Shin, J. H. (2018). Identification of nontuberculous mycobacteria using multilocus sequence analysis of 16S rRNA, hsp65, and rpoB. *Journal of clinical laboratory analysis*, 32(1), e22184.
- Kiran, D., Podell, B. K., Chambers, M., & Basaraba, R. J. (2016, March). Host-directed therapy targeting the Mycobacterium tuberculosis granuloma: a review. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 38, No. 2, pp. 167-183). Springer Berlin Heidelberg.
- Koch, A., & Mizrahi, V. (2018). Mycobacterium tuberculosis. *Trends in microbiology*, 26(6), 555-556.
- Leylabadlo, H. E., Kafil, H. S., Yousefi, M., Aghazadeh, M., & Asgharzadeh, M. (2016). Pulmonary tuberculosis diagnosis: where we are?. *Tuberculosis and respiratory diseases*, 79(3), 134.
- Lindestam Arlehamn, C. S., Gerasimova, A., Mele, F., Henderson, R., Swann, J., Greenbaum, J. A., ... & Sette, A. (2013). Memory T cells in latent Mycobacterium tuberculosis infection are directed against three antigenic

- islands and largely contained in a CXCR3+ CCR6+ Th1 subset. *PLoS pathogens*, 9(1), e1003130.
- Lyon, S. M., & Rossman, M. D. (2017). Pulmonary tuberculosis. *Microbiology spectrum*, 5(1), 5-1.
  - Lyon, S. M., & Rossman, M. D. (2017). Pulmonary tuberculosis. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*, 283-298.
  - Magee, M. J., Kempker, R. R., Kipiani, M., Tukvadze, N., Howards, P. P., Narayan, K. V., & Blumberg, H. M. (2014). Diabetes mellitus, smoking status, and rate of sputum culture conversion in patients with multidrug-resistant tuberculosis: a cohort study from the country of Georgia. *PloS one*, 9(4), e94890.
  - Mahmood, K. A. (2019). Histological and Epidemiological study on *Mycobacterium tuberculosis* in Nineveh Governorate. *Tikrit Journal of Pure Science*, 24(1), 13-22.
  - Martini, M., Gazzaniga, V., Behzadifar, M., Bragazzi, N. L., & Barberis, I. (2018). The history of tuberculosis: the social role of sanatoria for the treatment of tuberculosis in Italy between the end of the 19th century and the middle of the 20th. *Journal of preventive medicine and hygiene*, 59(4), E323.
  - Marzouk, M., Kahla, I. B., Hannachi, N., Ferjeni, A., Salma, W. B., Ghezal, S., & Boukadida, J. (2011). Evaluation of an immunochromatographic assay for rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in clinical isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 69(4), 396-399.

- Meijer, A. H. (2016, March). Protection and pathology in TB: learning from the zebrafish model. In *Seminars in immunopathology* (Vol. 38, No. 2, pp. 261-273). Springer Berlin Heidelberg.
- Mekonnen, A. (2014). Smear-positive pulmonary tuberculosis and AFB examination practices according to the standard checklist of WHO's tuberculosis laboratory assessment tool in three governmental hospitals, Eastern Ethiopia. *BMC Research Notes*, 7(1), 295. doi: 10.1186/1756-0500-7-295
- Mutembo, S., Mutanga, J. N., Musokotwane, K., Kanene, C., Dobbin, K., Yao, X., . . . Whalen, C. C. (2019). Urban-rural disparities in treatment outcomes among recurrent TB cases in Southern Province, Zambia. *BMC infectious diseases*, 19(1), 1087-1087. doi: 10.1186/s12879-019-4709-5
- Mutingwende, I., Vermeulen, U., Steyn, F., Viljoen, H., & Grobler, A. (2015). Development and evaluation of a rapid multiplex-PCR based system for *Mycobacterium tuberculosis* diagnosis using sputum samples. *Journal of microbiological methods*, 116, 37-43.
- Natarajan, A., Beena, P. M., Devnikar, A. V., & Mali, S. (2020). A systemic review on tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*.
- Nguyen, T. N. A., Berre, A. L., Bañuls, A. L., & Nguyen, T. V. A. (2019). Molecular diagnosis of drug-resistant tuberculosis; a literature review. *Frontiers in microbiology*, 10, 794.
- Nour-Neamatollahie, A., Ebrahimzadeh, N., Siadat, S. D., Vaziri, F., Eslami, M., Sepahi, A. A., ... & Fateh, A. (2017). Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR-RFLP. *Saudi journal of biological sciences*, 24(6), 1380-1386



- Orgeur, M., & Brosch, R. (2018). Evolution of virulence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Current opinion in microbiology*, 41, 68-75.
- Ottmani SE, Uplekar MW.(2008). Gender and TB: pointers from routine records and reports. *Int J Tuberc Lung Dis.*;12(7): 827–828.
- Palmer, M. V., Thacker, T. C., Rabideau, M. M., Jones, G. J., Kanipe, C., Vordermeier, H. M., & Waters, W. R. (2020). Biomarkers of cell-mediated immunity to bovine tuberculosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 220, 109988.
- Panicker, R. O., Kalmady, K. S., Rajan, J., & Sabu, M. K. (2018). Automatic detection of tuberculosis bacilli from microscopic sputum smear images using deep learning methods. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, 38(3), 691-699.
- Pasa, F., Golkov, V., Pfeiffer, F., Cremers, D., & Pfeiffer, D. (2019). Efficient deep network architectures for fast chest X-ray tuberculosis screening and visualization. *Scientific reports*, 9(1), 1-9.
- Perkowski, E. F., Miller, B. K., McCann, J. R., Sullivan, J. T., Malik, S., Allen, I. C., ... & Braunstein, M. (2016). An orphaned Mce-associated membrane protein of *Mycobacterium tuberculosis* is a virulence factor that stabilizes Mce transporters. *Molecular microbiology*, 100(1), 90-107.
- Pezzella, A. T. (2019). History of pulmonary tuberculosis. *Thoracic surgery clinics*, 29(1), 1-17.
- Pineros, A. R., Campos, L. W., Fonseca, D. M., Bertolini, T. B., Gembre, A. F., Prado, R. Q., ... & Bonato, V. L. D. (2017). M2 macrophages or IL-33 treatment attenuate ongoing *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Scientific reports*, 7(1), 1-12

- Ragonnet, R., Flegg, J. A., Brilleman, S. L., Tiemersma, E. W., Melsew, Y. A., McBryde, E. S., & Trauer, J. M. (2021). Revisiting the natural history of pulmonary tuberculosis: A Bayesian estimation of natural recovery and mortality rates. *Clinical Infectious Diseases*, 73(1), e88-e96.
- Ramadhan, A. T., & Mankhi, A. A. (2014). The Pattern of Drug Resistance in Iraqi Pulmonary Tuberculosis Patients Referred to the Specialized Center for Chest and Respiratory Disease. *Iraqi postgraduate Medical Journal*, 13(2).
- Rangaka, M. X., Cavalcante, S. C., Marais, B. J., Thim, S., Martinson, N. A., Swaminathan, S., & Chaisson, R. E. (2015). Controlling the seedbeds of tuberculosis: diagnosis and treatment of tuberculosis infection. *The Lancet*, 386(10010), 2344-2353.
- Ravimohan, S., Kornfeld, H., Weissman, D., & Bisson, G. P. (2018). Tuberculosis and lung damage: from epidemiology to pathophysiology. *European Respiratory Review*, 27(147).
- Sadykova, L., Abramavičius, S., Maimakov, T., Berikova, E., Kurakbayev, K., Carr, N. T., ... & Stankevičius, E. (2019). A retrospective analysis of treatment outcomes of drug-susceptible TB in Kazakhstan, 2013–2016. *Medicine*, 98(26)....
- Salih, Y. I., Ibraheem, M., & Subhi, R. (2011). Epidemiological characters of Tuberculosis in Salahaldeen Governorate during 2008. *Tikrit Medical Journal*, 17(1).
- Sharma, S. K., Mohan, A., & Kohli, M. (2021). Extrapulmonary tuberculosis. *Expert Review of Respiratory Medicine*, (just-accepted).
- Shitikov, E., Kolchenko, S., Mokrousov, I., Bespyatykh, J., Ischenko, D., Ilina, E., & Govorun, V. (2017). Evolutionary pathway analysis and unified

- classification of East Asian lineage of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scientific reports*, 7(1), 1-10.
- Singh, K., Kumari, R., Tripathi, R., Gupta, A., & Anupurba, S. (2019). Mutation in MPT64 gene influencing diagnostic accuracy of SD Bioline assay (capilia). *BMC infectious diseases*, 19(1), 1-6.
  - Singhal, R., & Myneedu, V. P. (2015). Microscopy as a diagnostic tool in pulmonary tuberculosis. *International journal of mycobacteriology*, 4(1), 1-6.
  - Soedarsono, S., & Subiantoro, M. C. (2019). Changes of CRP serum levels in pulmonary TB patients with AFB smear-positive sputum before and two months after receiving anti-tuberculosis drug treatment. *Indian Journal of Tuberculosis*, 66(1), 134-138.
  - Springer, B., Stockman, L., Teschner, K., Roberts, G. D., & Böttger, E. (1996). Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *Journal of Clinical Microbiology*, 34(2), 296-303.
  - Sultan, H. I., & Al-Jebouri, M. M. (2010). Pulmonary tuberculosis in Alzab district. *Tikrit Medical Journal*, 16(1), 37-41.
  - Takasaki, J., Manabe, T., Morino, E., Muto, Y., Hashimoto, M., Iikura, M., ... & Kudo, K. (2018). Sensitivity and specificity of QuantiFERON-TB Gold Plus compared with QuantiFERON-TB Gold In-Tube and T-SPOT. TB on active tuberculosis in Japan. *Journal of infection and chemotherapy*, 24(3), 188-192.
  - Thakur, H., Kaur, N., Sabherwal, P., Sareen, D., & Prabhakar, N. (2017). Aptamer based voltammetric biosensor for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* antigen MPT64. *Microchimica Acta*, 184(7), 1915-1922.

- Warner, D. F. (2015). *Mycobacterium tuberculosis* metabolism. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 5(4), a021121.
- Wei, J., & Li, Y. (2016). Airborne spread of infectious agents in the indoor environment. *American journal of infection control*, 44(9), S102-S108.
- Whittaker, E., Nicol, M. P., Zar, H. J., Tena-Coki, N. G., & Kampmann, B. (2018). Age-related waning of immune responses to BCG in healthy children supports the need for a booster dose of BCG in TB endemic countries. *Scientific reports*, 8(1), 1-10.
- Wiens, K. E., Woyczynski, L. P., Ledesma, J. R., Ross, J. M., Zenteno-Cuevas, R., Goodridge, A., ... & Hay, S. I. (2018). Global variation in bacterial strains that cause tuberculosis disease: a systematic review and meta-analysis. *BMC medicine*, 16(1), 1-13.
- World Health Organization. (2016). WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis. World Health Organization.
- World Health Organization. (2018). BCG vaccine: WHO position paper, February 2018—recommendations. *Vaccine*, 36(24), 3408-3410.
- World Health Organization. (2019). WHO consolidated guidelines on drug-resistant tuberculosis treatment (No. WHO/CDS/TB/2019.7). World Health Organization.
- World Health Organization. (2020). WHO operational handbook on tuberculosis: module 1: prevention: tuberculosis preventive treatment.
- Zambia, M. (2013). The 2012 List of Health Facilities in Zambia: Preliminary Report, v15. Lusaka: Zambia.
- Zondervan, N. A., Van Dam, J. C., Schaap, P. J., Martins dos Santos, V. A., & Suarez-Diez, M. (2018). Regulation of three virulence strategies of

---

Mycobacterium tuberculosis: a success story. International journal of molecular sciences, 19(2), 347.

## Summary :

The study was conducted to illuminate on the relationship of the two genes *hsp65* and *mpt64* and the incidence of tuberculosis and its prevalence in the Karbala governorate, where the study included 120 samples from the total auditors. Staining by Acid-fast stain and microscopic examination. The number of samples taken was 120 samples, including (50 positive samples, 41.7%) and negative cases (70 samples, 58.3%) The samples were classified according to the injury sample into Chronic, Acute, Recurrent; The results of the relationship of gender with the type of environment (urban, rural) showed that there were no significant differences between the injured males of urban and rural residents and between females of urban and rural residents, as well as the relationship of smoking with the sample environment (urban, rural) showed no significant differences between the injured Smokers and non-smokers in urban and rural areas.

The results of the study of the relationship of gender with smoking showed that there were significant differences between male and female smokers, as males recorded 28 samples with a percentage of 100% compared to females with zero samples and 0%, and non-smoking females recorded a significant increase with 16 samples with a percentage of 72.7% compared to males with 6 samples and a percentage of 27.3 Male smokers recorded a significant increase with 28 samples, or 82.4%, compared to non-smokers with 6 samples, or 17.6%, and female non-smokers recorded a significant increase with 16 samples, with a percentage of 100%, compared to zero smokers, i.e. 0%; And the relationship of gender with the categories of sputum smears for smear-positive sputum patients was recorded, with no significant differences between the group +1 for males and females, while the

group +2 recorded a significant increase in males with 12 samples at a rate of 66.7% compared with females with 6 samples at a rate of 33.3%, while Category +3 recorded a significant increase in males with 12 samples at a percentage of 100% compared to females who recorded zero samples at a percentage of 0%, while the relationship of smoking with the affected groups was clarified, and category +3 recorded a significant increase in smokers with 12 samples at a rate of 42.9%, followed by category +2 with 10 samples. At a rate of 55.6%, then category +1 with 6 samples and a percentage of 30%, while the samples with the infected groups were non-smokers, the group +1 had a significant increase of 14 samples and 70.0%, followed by category +2 with 8 samples and at a rate of 44.4%, while the percentage of category +3 was zero A sample compared with the rest of the other groups.

The results of the study indicated the relationship of the type of environment with the affected groups, as it indicated that there were significant differences between the group +1 in urban 12 samples with a percentage of 60% and rural with 8 samples at a percentage of 40%, while the category +2 in urban was 12 samples at a rate of 66.7 % compared to the countryside with 6 samples, with a percentage of 33% 3%, and for the +3 category in urban 12 samples at 100% compared to 0% in rural areas. The results were also observed when using specialized primers to detect primers of the *hsp65* gene for the presence of a package resulting from the inflation process in the first, fourth and fifth paths: Recurrent, path The second and third: Acute, Sixth, Seventh and Eighth Paths: Chronic, which shows the presence of a piece of DNA at the expected molecular weight of this gene corresponding to 195 base pairs. When using specialized primers to detect primers of the *mpt64* gene, the presence of a bundle resulting from the amplification process

in the first and fourth pathways Fifth: Recurrent, pathways two and three: Acute, pathways six, seven and eight: Chronic, which show the presence of a piece of DNA at the expected molecular weight of this gene corresponding to 771 base pairs; The results of the direct examination using Acid Fast stain showed 56 positive samples with a percentage of 50.9%, while the results using the PCR technique were positive in 50 samples and at a rate of 45.45%, where the sensitivity and specificity recorded 78%, and a confidence range ranging from 64.04-88.47% and 71.67%, and a confidence range ranging from 58.56-82.55% Straight.



The Republic of Iraq

Ministry of Higher Education and Scientific Research

Karbala University

College of Education for Pure Sciences

Department of Biology



**Prevalence of *hsp65* and *mpt64* genes in bacteria  
*Mycobacterium tuberculosis* in Karbala province**

A thesis

submitted to the Council of the College of Education / University  
of Karbala on partial fulfillment of the requirements for a master's  
degree in Biology / Microbiology

By

**Hiba Salim Jawad Alkhuzaie**

B.Sc. Biology , University of Karbala , 2015

Supervisor By

**Dr. Hiyam AbdulRidha kareem**

2021 A.D.

1443 A.H.