

DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of pulmonary tuberculosis patients in Markazi province by PGRS-RFLP method

Rafiee B(M.Sc)¹, Mosavari N(Ph.D)^{2*}, Farazi AA(M.D)³, Nazari R(Ph.D)¹, Keshavarz R(Vet)²,
Tadayon K(Ph.D)²

1- Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran

2- Department of PPD Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

3- Department of Infectious Diseases, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 26 Nov 2011, Accepted: 3 Jan 2011

Abstract

Background: Tuberculosis is an old problem that is currently considered a great challenge. Noticing Iran's borders with Afghanistan and Pakistan, which are among the 22 high burden countries around the world, the present study was conducted to analyze the current molecular epidemiology of TB and survey genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains in Markazi province, Iran.

Materials and Methods: In this experimental study, 57 sputum specimens from smear positive patients admitted to health centers in Markazi province were cultured on specific mycobacterial culture media. Genomic DNA was extracted by standard protocols of WHO and digested separately by *PvuII* and *AluI*. Electrophoresis was performed and DNA fragments were transferred to positively charged nylon membrane by southern blotting method and hybridization by PGRS probe. The hybridized strains were subsequently detected by enzymatic reaction and analyzed.

Results: Genotyping of the isolates by PGRS-RFLP with *Pvu II* and *AluI* displayed a wide range of genetic diversity so that 50 and 45 genotypes were identified, respectively.

Conclusion: Noticing the great diversity of PGRS in the *Mycobacterium tuberculosis* strains, it can be concluded that in the study population, the majority of the patients had tuberculosis with different etiologies. Therefore, it seems that reactivation of latent infection has had the main role in the spread of tuberculosis.

Keywords: DNA fingerprinting, *Mycobacterium tuberculosis*, Reactivation, RFLP

*Corresponding author:

Address: Department of PPD Production, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran
Email: nmosavari@yahoo.com

انگشت نگاری ژنومی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های جدا شده از بیماران سل ریوی استان مرکزی به روش PGRS-RFLP

بهنام رفیعی¹، نادر مصوری^{2*}، علی اصغر فرازی³، راضیه نظری⁴، روح اله کشاورز⁵، کیوان تدین²

- 1- کارشناس ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
- 2- استادیار، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالین، کرج، ایران
- 3- استادیار، متخصص عفونی، گروه بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
- 4- استادیار، دکترای میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
- 5- کارشناس ارشد، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالین، کرج، ایران

تاریخ دریافت: 90/9/6 تاریخ پذیرش: 90/10/14

چکیده

زمینه و هدف: سل معضلی قدیمی است که هم اکنون به عنوان چالشی جدید مطرح شده و با توجه به همسایگی ایران با دو کشور افغانستان و پاکستان که در زمره 22 کشور دارای بیشترین شیوع سل در دنیا هستند ضرورت توجه بیش از پیش ما را به این بیماری متذکر می کند. بنابر این به منظور آگاهی از اپیدمیولوژی مولکولی سل و بررسی میزان تنوع ژنتیکی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان مرکزی، مطالعه حاضر انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی تعداد 57 نمونه خلط از بیماران سل ریوی اسمیر مثبت مراجعه کننده به مرکز بهداشت و درمان استان مرکزی، بر روی محیط های اختصاصی کشت داده شدند. سپس DNA ژنومیک جدایه ها طبق پروتکل استاندارد سازمان بهداشت جهانی استخراج گردید و با استفاده از روش PCR تعلق این جدایه ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تأیید گردید، سپس DNA ژنومیک توسط آنزیم های *PvuII* و *AluI* مورد هضم آنزیمی قرار گرفت و محصول هضم، الکتروفورز شده و قطعات DNA از طریق ساترن بلائینگ به غشاء نایلونی با شارژ مثبت منتقل گردیدند و سپس هیبریداسیون با پروب PGRS انجام پذیرفت. در خاتمه قطعات هیبرید شده با استفاده از واکنش آنزیمی شناسایی و مورد آنالیز قرار گرفتند.

یافته ها: در طی تایپینگ این جدایه ها به روش RFLP، با استفاده از دو آنزیم *PvuII* و *AluI* و پروب PGRS، گستره وسیعی از تنوع ژنتیکی نمایان گردید به طوری که به ترتیب 50 و 45 تیپ ژنتیکی شناسایی شد. **نتیجه گیری:** با توجه به تنوع بالای PGRS در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می توان نتیجه گیری کرد که در جمعیت مورد بررسی اکثر افراد با منشا متفاوت به بیماری سل مبتلا شده اند، بنابراین فعال شدن مجدد عفونت نقش بیشتری را در گسترش بیماری سل در استان مرکزی داشته است.

واژگان کلیدی: انگشت نگاری ژنومی، فعالیت مجدد عفونت، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، RFLP

* نویسنده مسئول: کرج موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالین

مقدمه

بیماری سل یکی از مسائل اصلی بهداشتی در سطح جهان می باشد به طوری که طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال 2009، حدود 9/4 میلیون مورد جدید بیماری سل در دنیا رخ داده است (1). با توجه به این که ردیابی عفونت در ایران شامل یک سری روش های معمول مانند اطلاعات بیمار و آزمایش های میکروب شناسی است و این روش ها در اپیدمیولوژی بیماری از ارزش کمی برخوردار می باشند لذا یافتن منشأ عفونت و ردیابی مسیر آلودگی از این طریق امکان پذیر نمی باشد. بنابراین می توان از ژنوتایپینگ سویه های کمپلکس مایکوباکتریوم توبریکولوزیس جهت اپیدمیولوژی مولکولی که ابزار مهمی برای ردیابی مسیر انتقال بیماری سل است استفاده نمود (2، 3). تکنیک انگشت نگاری DNA یا همان آنالیز به روش RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) روش استاندارد و رایج ترین روش برای تقسیم بندی مایکوباکتریوم از نظر اپیدمیولوژی می باشد. از این روش عمدتاً برای تایپینگ اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبریکولوزیس استفاده می شود، همچنین از آن برای تایپینگ اعضای مایکوباکتریوم آویوم نیز استفاده شده است (4).

ژنوم مایکوباکتریوم ها دارای مقادیر زیادی بازهای گوانین و سیتوزین (G+C) می باشند به طوری که به صورت توالی های چند شکلی تکرار شونده غنی از GC در بیش از 80 درصد ژنوم موجود می باشند، این قطعات PGRS (Polymorphic GC-rich Repetative Sequences) به صورت پراکنده در قسمت های مختلف ژنوم با تعداد کمی زیاد پراکنده اند به طوری که در 26 جایگاه در کروموزوم مایکوباکتریوم توبریکولوزیس حضور دارند، این توالی ها در برخی از پلازمیدها مانند pTBN12 نیز وجود دارند که از این پلازمید به عنوان پروب برای RFLP نیز استفاده می گردد (5-7).

در این تحقیق با هدف شناسایی تنوع ژنتیکی سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبریکولوزیس، از روش PGRS-RFLP استفاده شد و میزان پلی مورفیسم سویه ها

بر اساس قطعات غنی از توالی های GC مورد آنالیز قرار گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی طی اسفند ماه 1388 تا فروردین ماه 1390 تعداد 65 نمونه خلط از بیماران سل ریوی اسمیر مثبت از مرکز بهداشت و درمان استان مرکزی جمع آوری شد و پس از آلودگی زدایی به روش N - استیل L - سیستم جهت تکثیر و بررسی سرعت رشد در محیط های شیب دار لوونشتاین جانسون حاوی گلیسرین دار و پیرووات دار (Merck - آلمان) کشت داده شدند (8). در نهایت 57 نمونه در محیط ها رشد کرد که 43 نمونه مربوط به بیماران شهر اراک بود که 3 تبعه افغانی نیز در بین آنها بود. 6 نمونه مربوط به شهر شازند و 4 نمونه مربوط به کمیجان و 2 نمونه مربوط به خمین و 2 نمونه مربوط به شهر ساوه بود و جهت افتراق گونه ها آزمون های بیوشیمیایی شامل تولید نیاسین، احیاء نیترات و فعالیت کاتالازی در دو دمای 62 و 68 درجه سانتی گراد و کشت در محیط حاوی تیوکسی فن 2- کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) انجام گرفت.

جهت استخراج DNA ژنومیک باکتری ها، از استاندارد ون سولینگن استفاده شد (9). به طوری که در این روش، DNA ژنومیک به طور کامل و بدون کوچک ترین شکستگی استخراج و جهت RFLP استفاده می گردد لذا جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده از الکتروفورز کوتاه مدت و اسپکتروفوتومتری با دستگاه نانودراپ (Nanodrop - آمریکا) استفاده گردید (10). نمونه هایی که DNA آنها در مراحل استخراج دچار شکستگی گشت از مطالعه حذف گردیده و دوباره استخراج DNA انجام پذیرفت که معمولاً شکستگی DNA به خاطر عدم دقت در زمان استخراج و یا در زمان استفاده از کشت های کهنه اتفاق می افتد بنابراین در این مطالعه از کشت های تازه استفاده گردید.

محصولات هضم آنزیمی به مدت 24 ساعت در ژل آگار 1 درصد در ولتاژ 30 ولت الکتروفورز گردیدند.

ساترن بلا تینگ (Southern blotting)

جهت ساترن بلا تینگ ژل آگارز حاوی قطعات DNA برش خورده توسط آنزیم محدود کننده، توسط محلول‌های ویژه دپورینه، دنیچره و نوترالیزه گردید و سپس به مدت یک شب از طریق انتقال موئینه‌ای به روش ساترن بلا تینگ به غشای نایلونی با شارژ مثبت (Roche - آلمان) انتقال داده شدند و در نهایت به مدت 30 دقیقه در دمای 120 درجه سانتی گراد در دستگاه فور (Memert - آلمان)، قطعات DNA بر روی غشاء تثبیت گردیدند.

هیبریداسیون و شناسایی

غشاهای حاصل از مرحله ساترن بلا تینگ با استفاده از محلول پری هیبریداسیون در دمای 65 درجه سانتی گراد در دستگاه آون هیبریداسیون (Thermohybrid - انگلستان) قرار گرفتند، سپس برای انجام هیبریداسیون با افزودن پروب PGRS نشاندار شده با دیگوکسیژین، غشاء به مدت 24 ساعت در دمای 65 درجه سانتی گراد در دستگاه باقی ماند، سپس شستشوی لازم جهت از بین بردن اتصال‌های غیراختصاصی پروب برای غشاء صورت گرفت و سپس آنتی بادی ضد دیگوکسیژین کتروگه شده با آلکالین فسفاتاز (Roche - آلمان) به غشاء نایلونی اضافه شده و در نهایت جهت آشکارسازی از سوبستراهای NBT/BCIP، (Roche - آلمان) استفاده شد و باندهای شناسایی شده توسط پروب، قابل رؤیت گردیدند. از تصاویر مرئی روی غشاء توسط دستگاه اسکنر تصویربرداری شد. آنالیز تصاویر حاصله از هیبریداسیون پروب با قطعات برش خورده DNA، علاوه بر مشاهده و آنالیز چشمی توسط نرم افزار تخصصی (Gel Pro Analyzer Media cybernetics . Millan Italy) براساس تعداد و اندازه باندها مورد آنالیز دقیق جهت تعیین تیپ‌های ژنتیکی قرار گرفت و پلی مورفیسم قطعه PGRS در سویه‌های مختلف شناسایی شد.

تعیین هویت مولکولی به روش PCR - IS 6110

تعلق سویه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم ترپوکلوژیس با استفاده از پرایمرهای جدول 1 صورت گرفت (11). مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل موارد زیر بود: 4/5 میکرولیتر از بافر 10x، حاوی MgCl₂ و KCl، 0/5 میکرولیتر مخلوط dNTPs، 1 میکرولیتر پرایمر رفت، 1 میکرولیتر پرایمر برگشت، 0/25 میکرولیتر آنزیم Taq polymerase، 3 میکرولیتر DNA (با غلظت 100 نانوگرم به ازای هر میکرولیتر) و 15 میکرولیتر آب مقطر استریل که حجم نهایی واکنش 25 میکرولیتر بود. تمامی واکنشگرهای فوق ساخت شرکت سیناژن - ایران بود.

جدول 1. پرایمرهای پیشرونده و معکوس جهت شناسایی قطعه IS6110

پرایمر	سکانس نوکلئوتیدی
پیشرونده	5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC3'
معکوس	5'GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA3'

از تکنیک‌های جدید مولکولی، انگشت نگاری DNA یا آنالیز به روش RFLP برای شناسایی دقیق و متمایز نمودن جدایه‌های مایکوباکتریوم می‌باشند. برای انجام انگشت نگاری ژنومی جدایه‌ها در ابتدا غلظت DNA های استخراج شده توسط دستگاه نانودراپ (700-3000 نانوگرم به ازای هر میکرولیتر) تعیین گردید.

هضم آنزیمی

به منظور انجام هضم آنزیمی در داخل یک میکروتیوب استریل 2 میکرولیتر DNA (با غلظت 1500 نانوگرم به ازای هر میکرولیتر)، به همراه 1 میکرولیتر آنزیم محدود کننده (Roche - آلمان) و یا PvuII (Roche - آلمان) اضافه گردید سپس 2 میکرولیتر بافر آنزیم 10x اضافه کرده و در نهایت 15 میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی به 20 میکرولیتر برسد، سپس میکروتیوب‌های حاوی مواد فوق به مدت یک شب در 37 درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. در مرحله بعد

یافته ها

در طی این مطالعه تعداد 57 سویه مایکوباکتریوم به دست آمد که مربوط به 54 بیمار ایرانی (94/7 درصد) و 3 بیمار افغانی (5/3 درصد) بودند که از میان این بیماران 30 نفر زن (52/6 درصد) و 27 نفر مرد (47/4 درصد) بودند و دامنه سنی بیماران از 20 تا 89 سال متغیر و میانگین سنی آنها 60 سال محاسبه گردید.

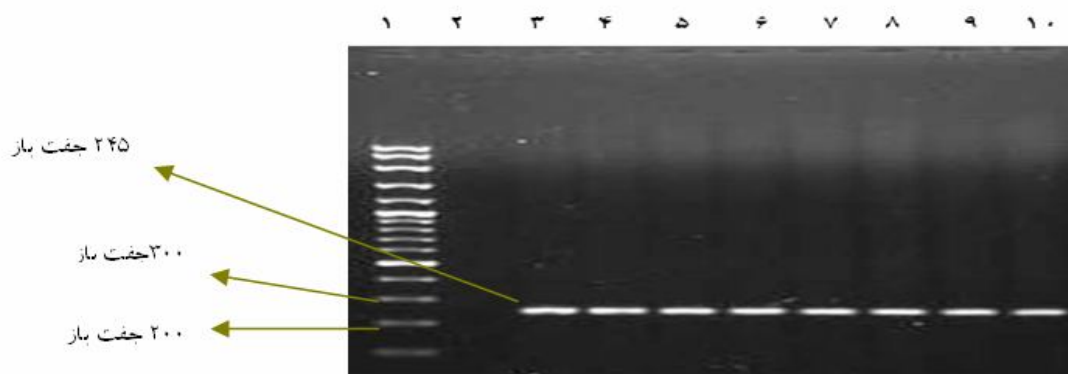
نتایج آزمون های بیوشیمیایی

آزمون های تعیین هویت بیوشیمیایی در مورد همه 57 سویه انجام گرفت که نتایج این آزمون ها به این ترتیب بود: آزمون تجمع نیاسین، واکنش احیاء نیترات، تولید کاتالاز در دمای 22 درجه سانتی گراد، و کشت در محیط 2 تیوفن کربوکسیلیک هیدازید اسید مثبت بود و همگی فاقد

رنگدانه بودند و در محیط لونشتاین جانسون گلیسرینه رشد خوبی داشتند ولی تولید کاتالاز در دمای 68 درجه سانتی گراد منفی بود که این نتایج مشخص کرد که تمام نمونه های مورد مطالعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند.

نتایج آزمون PCR-IS 6110

در روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی IS6110 و مشاهده یک بانده الکتروفورزی به اندازه 245 جفت بازی، نشان دهنده این بود که همگی 57 سویه، جزء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند و با سویه های استاندارد C و BCG نیز مقایسه شدند (شکل 1).



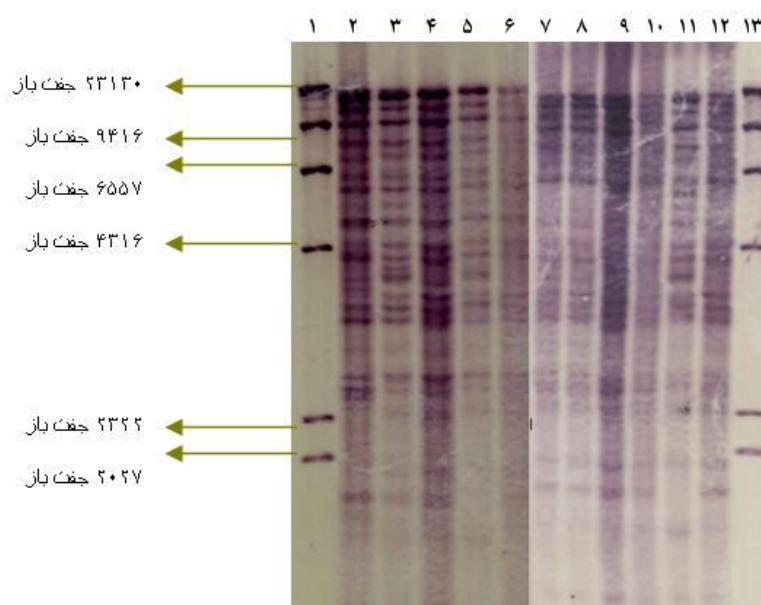
شکل 1. الکتروفورز محصول PCR برای سکانس 245 جفت بازی IS6110:

ستون 1: سایز مارکر 100 جفت بازی، ستون 2: کنترل منفی، ستون های 3 و 4: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C (ATCC 38808) و سویه استاندارد BCG (ATCC 1173 p 2)، ستون های 5-10: سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از استان مرکزی

نتایج RFLP

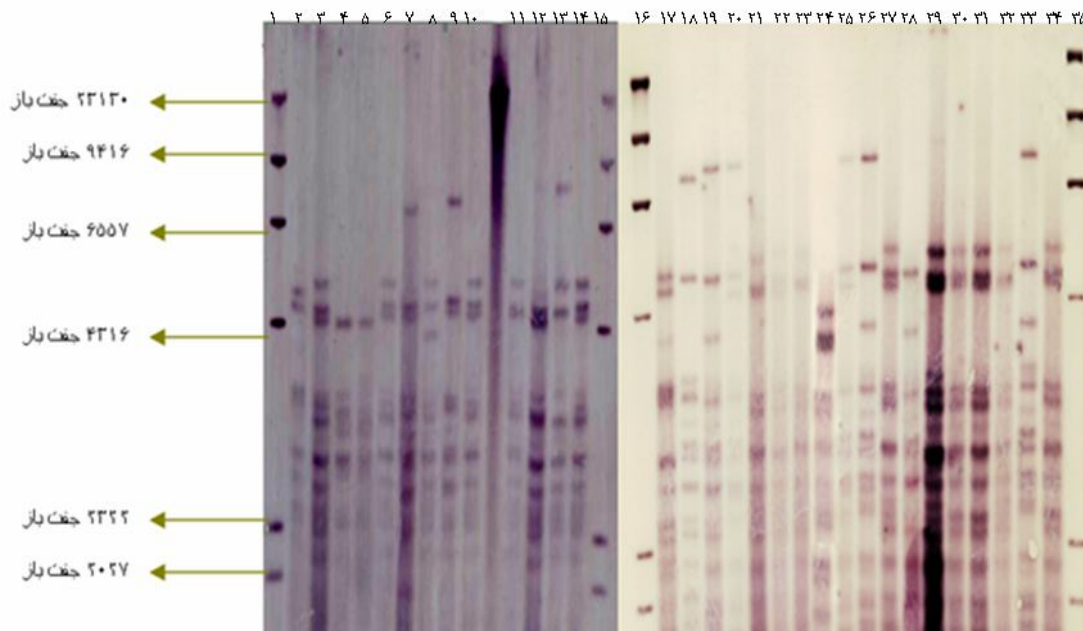
آمد که 44 تیپ به صورت منحصر به فرد بودند (شکل 2)، هم چنین از 57 سویه هضم شده با آنزیم محدود کننده *AluI* و هیبرید شده با پروب PGRS تعداد 45 تیپ ژنتیکی به دست آمد که 37 تیپ به صورت منحصر به فرد بودند (شکل 3).

با مقایسه چشمی باندهای با وزن مولکولی بالا (2027 تا 23130 جفت باز) و با استفاده از نرم افزار ژل پرو از 57 سویه هضم شده با آنزیم محدود کننده *PvuII* و هیبرید شده با پروب PGRS تعداد 50 تیپ ژنتیکی به دست



شکل 2. آزمون RFLP بر مبنای مارکرهای PGRS و آنزیم PvuII

ستون 1: سایز مارکر شماره 2، ستون 2: سویه استاندارد C (ATCC 38808) ، ستون 3: نمونه شماره 1، ستون 4: نمونه شماره 5، ستون 5: نمونه شماره 8، ستون 6: نمونه شماره 11، ستون 7: نمونه شماره 16، ستون 8: نمونه شماره 17، ستون 9: نمونه شماره 19، ستون 10: نمونه شماره 22، ستون 11: نمونه شماره 26، ستون 12: نمونه شماره 30، ستون 13: سایز مارکر شماره 2



شکل 3. آزمون RFLP بر مبنای مارکرهای PGRS و آنزیم AluI

ستون 1: سایز مارکر شماره 2، ستون 2: سویه استاندارد C (ATCC 38808) ، ستون های 3 تا 14: نمونه های شماره 1 تا 12، ستون 15: سایز مارکر شماره 2، ستون 16: سایز مارکر شماره 2، ستون 17 تا 23: نمونه های شماره 30 تا 36، ستون 24: نمونه شماره 40، ستون 25: نمونه شماره 41، ستون 26: نمونه شماره 16، ستون 27: نمونه شماره 44، ستون 28: نمونه شماره 43، ستون شماره 29: نمونه شماره 51، ستون 30: نمونه شماره 45، ستون 31: نمونه شماره 48، ستون 32: نمونه شماره 49، ستون 33: نمونه شماره 17، ستون 34: نمونه شماره 56، ستون 35: سایز مارکر شماره 2

HAP26	HPP27	اراک	30
HAP27	HPP28	اراک	31
HAP28	HPP29	اراک	32
HAP29	HPP30	اراک	33
HAP30	HPP31	اراک	34
HAP31	HPP32	اراک	35
HAP32	HPP33	اراک	36
HAP33	HPP34	اراک	37
HAP33	HPP34	اراک	38
HAP34	HPP35	اراک	39
HAP35	HPP36	اراک	40
HAP36	HPP37	اراک	41
HAP30	HPP38	اراک	42
HAP37	HPP39	اراک	43
HAP37	HPP39	شازند	44
HAP38	HPP40	شازند	45
HAP39	HPP41	شازند	46
HAP40	HPP42	شازند	47
HAP41	HPP43	شازند	48
HAP42	HPP44	شازند	49
HAP31	HPP45	کمیجان	50
HAP43	HPP46	کمیجان	51
HAP44	HPP47	کمیجان	52
HAP45	HPP48	کمیجان	53
HAP41	HPP43	خمین	54
HAP39	HPP49	خمین	55
HAP41	HPP50	ساوه	56
HAP37	HPP39	ساوه	57

* بیماران افغانی، شباهت ژنتیکی کامل بین نمونه شماره 16 و 17 مشاهده گردید که نمونه شماره 17 مربوط به بیمار افغانی است

بحث

در این مطالعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس های جدا شده از بیماران سل ریوی از تنوع ژنتیکی گسترده ای برخوردار بودند که این موضوع از لحاظ اپیدمیولوژیکی قابل تأمل می باشد به طوری که با استفاده از آنزیم محدود کننده *PvuII* و پروب PGRS تعداد 50 تیپ ژنتیکی به دست آمد که 44 تیپ به صورت منحصر به فرد بودند و با استفاده از آنزیم محدود کننده *AluI* و پروب PGRS تعداد 45 تیپ ژنتیکی به دست آمد که 37 تیپ به صورت منحصر به فرد بودند. همان طور که می دانیم بروز بیماری سل به عواملی مانند میزان شیوع سل در منطقه، مدت عفونت در

در این میان یک تشابه ژنوتایپی بین یک سویه از بیمار افغانی مقیم شهر اراک و یک جدایه از بیمار ایرانی مقیم شهر اراک نیز وجود داشت (شکل 2: ستون های 7 و 8 - شکل 3: ستون های 26 و 33)، ولی هیچ یک از 3 جدایه بیماران افغانی از لحاظ ژنتیکی به هم تشابهی نداشتند. به طور قراردادی الگوهای ژنتیکی به دست آمده با نام های HPP و HAP (H حرف اول ابتدای Human و P و یا A حرف دوم ابتدای آنزیم *Pvu II* یا *AluI* و P آخر ابتدای پروب PGRS) نامگذاری گردیدند (جدول 2).

جدول 2. توزیع ژنوتایپی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اساس RFLP مبتنی بر پروب PGRS و آنزیم های *PvuII* و *AluI*

شماره بیمار	منطقه جغرافیایی	الگوی ژنتیکی با آنزیم <i>PvuII</i>	الگوی ژنتیکی با آنزیم <i>AluI</i>
1	اراک	HPP1	HAP1
2	اراک	HPP2	HAP2
3	اراک	HPP3	HAP3
4	اراک	HPP4	HAP4
5	اراک	HPP5	HAP4
6	اراک	HPP6	HAP5
7	اراک	HPP7	HAP6
8	اراک*	HPP8	HAP7
9	اراک	HPP9	HAP8
10	اراک	HPP9	HAP9
11	اراک	HPP10	HAP10
12	اراک	HPP11	HAP11
13	اراک	HPP12	HAP12
14	اراک	HPP13	HAP13
15	اراک	HPP14	HAP14
16	اراک	HPP15	HAP15
17	اراک*	HPP15	HAP15
18	اراک	HPP16	HAP16
19	اراک	HPP17	HAP17
20	اراک	HPP18	HAP18
21	اراک	HPP19	HAP19
22	اراک	HPP20	HAP20
23	اراک*	HPP21	HAP21
24	اراک	HPP22	HAP22
25	اراک	HPP23	HAP22
26	اراک	HPP24	HAP23
27	اراک	HPP25	HAP24
28	اراک	HPP26	HAP25
29	اراک	HPP26	HAP25

بیماران و میزان تماس افراد با بیماران مسلول بستگی دارد (12)، (13). این در حالی است که در مطالعات دیگر در ایران نیز چنین تنوع ژنتیکی گسترده‌ای در سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشاهده شده است که چنین استنباط می‌گردد که اکثر افراد با منشأ متفاوت به بیماری سل مبتلا شده‌اند، بنابراین به نظر می‌رسد فعال شدن مجدد عفونت نقش بیشتری را در گسترش بیماری سل داشته است (14، 15).

در مطالعه مشابهی که در شهر تهران انجام گرفت از 292 سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، 232 سویه، الگوی منحصر به فرد نشان دادند که بیان‌گر فعال شدن مجدد عفونت بود و 60 سویه الگوی مشابه نشان دادند که نشان دهنده انتقال و گردش فعال این سویه‌ها بوده است و در همین راستا در مطالعه دیگری که در آذربایجان غربی و شرقی صورت گرفته است، از 154 سویه جدا شده از بیماران مسلول 69/48 درصد دارای الگوی RFLP منحصر به فرد بودند. بنابر این مشاهده می‌شود که فعال شدن مجدد عفونت نقش بیشتری در اپیدمیولوژی بیماری سل در این مناطق داشته است (16، 17). هم‌چنین در مطالعه دیگری که در شهر هوستون ایالت تگزاس با استفاده از روش RFLP در طی 9 سال انجام پذیرفت، مشخص شد که 54 درصد موارد سل، ناشی از انتقال و عفونت جدید بوده است که این یافته‌ها با یافته‌های تحقیق حاضر در استان مرکزی و تحقیقات دیگر در ایران هم‌خوانی ندارد (18). این در حالی است که تخمین زده می‌شود حدود 90 درصد موارد سل در کشورهای توسعه یافته بر اثر فعال شدن مجدد بیماری در سنین بالا باشد و انتقال نقش کمتری در ایجاد عفونت دارد (19).

جالب این‌که در زمینه سل گاوی چهره اپیدمیولوژیکی متفاوتی از ژنتیک جمعیتی مایکوباکتریوم بویس در ایران گزارش شده است که تنوع ژنتیکی بسیار محدودی را نشان می‌دهد (20). از طرف دیگر با در نظر گرفتن میانگین سنی 60 سال بیماران در این مطالعه و هم‌چنین تنوع گسترده ژنتیکی سویه‌ها، شواهدی دال بر گردش فعال سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در

منطقه تحت مطالعه نشان نمی‌دهد که این مطلب خود مؤید نقش مؤثرتر فعال شدن مجدد عفونت‌های قدیمی در بروز بیماری سل در استان مرکزی می‌باشد. هم‌چنین این مسئله می‌تواند ناشی از ضعف سیستم ایمنی به خاطر کهولت سن و دیگر بیماری‌های همراه دوران سالمندی باشد. هم‌چنین در این مطالعه 53 درصد مبتلایان زن بودند که البته با گزارش‌های دیگری نیز از ایران در این مورد مشابه است که می‌تواند با جنبه‌های هورمونی و شیوه زندگی مرتبط باشد (21).

تکنیک‌های مولکولی به کار رفته در این تحقیق همگی طبق توصیه سازمان بهداشت جهانی انتخاب گردیده و برای پلی مورفیسم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بالاترین تمایز را ایجاد می‌نماید (22). به طوری که ریچاردسون و همکاران 220 نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را به صورت سریالی کشت مجدد دادند و با استفاده از آنالیز RFLP تنها یک مورد (0/5 درصد) در ناحیه PGRS و 9 مورد (4 درصد) در ناحیه IS6110 تغییرات در اثر موتاسیون رخ داده بود، بنا بر این نشان داده شد محدوده PGRS دارای پایداری بسیار زیادی می‌باشد (23).

در مطالعه‌ای که در سال 2009 توسط فلوروز و همکاران صورت پذیرفت، بیشترین میزان تمایز دهندگی به پروب PGRS اختصاص داده شد (24). نیمه عمر الگوی هیبریداسیون (مدت زمان عدم تغییر الگوی هیبریداسیون) برای RFLP در مطالعات مختلف متفاوت بیان شده است به طور مثال 4 سال، 8/74 سال و نیز 33 سال که در صورت فعال شدن مجدد عفونت می‌باشد (25-27). به نظر می‌رسد این تفاوت‌ها وابسته به نوع سویه، مکان زندگی سویه، میان کنش با محیط و میزبان و خصوصیات بیولوژیکی مختص سویه باشد (28).

نتیجه گیری

در این مطالعه تنوع ژنتیکی گسترده‌ای از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های جدا شده از بیماران سل ربوی استان مرکزی به دست آمد، به طوری که مشخص شد

4. Collins CH, Grange JM, Yates D. Tuberculosis bacteriology: organization and practice: Butterworth-Heinemann; 1997.
5. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature. 1998 Jun;393(6685):537-44.
6. Ross BC, Raios K, Jackson K, Dwyer B. Molecular cloning of a highly repeated DNA element from Mycobacterium tuberculosis and its use as an epidemiological tool. J Clin Microbiol. 1992 Apr;30(4):942-6.
7. Whipple DL, Clarke PR, Jarnagin JL, Payeur JB. Restriction fragment length polymorphism analysis of Mycobacterium bovis isolates from captive and free-ranging animals. J Vet Diagn Invest. 1997 Oct;9(4):381-6.
8. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, et al. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008 Jan;46(1):42-9.
9. Soolingen D, Haas PE, Kremer K. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Mycobacteria. 542001. p. 165-203.
10. Shanks OC, Atikovic E, Blackwood AD, Lu J, Noble RT, Domingo JS, et al. Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. Appl Environ Microbiol. 2008 Feb;74(3):745-52.
11. McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. J Clin Microbiol. 1997 Jul; 35(7): 1769-71.
12. Rieder HL. Opportunity for exposure and risk of infection: the fuel for the tuberculosis pandemic. Infection. 1995 Jan-Feb;23(1):1-3.
13. Borgdorff MW, Nagelkerke NJ, van Soolingen D, Broekmans JF. Transmission of tuberculosis between people of different ages in The Netherlands: an analysis using DNA fingerprinting. Int J Tuberc Lung Dis. 1999 Mar;3(3):202-6.
14. Rohani M, Farnia P, Nasab MN, Moniri R, Torfeh M, Amiri MM. Beijing genotype and other predominant Mycobacterium tuberculosis

عامل اصلی سل ریوی در استان مرکزی مایکوباکتریوم توبریکلوژیس است که با توجه به تنوع ژنتیکی زیاد سویه‌ها و بالا بودن میانگین سن بیماران می‌توان نتیجه گرفت فعال شدن مجدد عفونت نقش بیشتری را در گسترش بیماری سل داشته است. بنابراین به عنوان یک نتیجه‌گیری مهم می‌توان گفت برنامه‌های کنترل و پیش‌گیری و ریشه‌کنی بیماری سل در استان مرکزی با موفقیت بسیار زیادی همراه بوده است. با توجه به این که یک مورد تشابه کامل ژنتیکی بین یک جدایه از بیمار افغانی و یک جدایه از بیمار ایرانی مشاهده شد بنابراین با توجه به صنعتی بودن و مهاجر پذیر بودن استان مرکزی احتمال این که اتباع افغانی در گسترش سل خصوصاً ژنوتیپ بیجینگ در این استان نقش داشته باشند وجود دارد ولیکن این موضوع تحقیقات بیشتری را می‌طلبد.

تشکر و قدر دانی

بدین وسیله از زحمات کلیه پرسنل مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج به خصوص بخش تحقیق و تولید توبریکولین و مالین که از هیچ‌گونه کمکی در طول مدت انجام این تحقیق دریغ نمودند، صمیمانه تقدیر و تشکر می‌نمایم.

منابع

1. Razanamparany VR, Ramarokoto HH, Vololonirina EJ, Rasolonalona T, Michault A, Pyndiah N, et al. RFLP clusters of Mycobacterium tuberculosis strains from the Indian Ocean Region: local and South Asian characteristics. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 May;104(3):441-3.
2. Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, Kadivar MR, Van Soolingen D, Ghaderi AA. IS6110-RFLP and spoligotyping of Mycobacterium tuberculosis isolates in Iran. Scand J Infect Dis. 2000;32(6):663-8.
3. Rosales S. Rapid detection of drug resistance and genetic characterization of mycobacterium tuberculosis isolates in Honduras. Stockholm: Karolinska Institute; 2011.

- spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. *Indian J Med Microbiol.* 2009 Oct-Dec; 27(4): 306-10.
15. Asgharzadeh M, Khakpour M, Salehi TZ, Kafil HS. Use of mycobacterial interspersed repetitive unit-variable-number tandem repeat typing to study *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East Azarbaijan province of Iran. *Pak J Biol Sci.* 2007 Nov;10(21):3769-77.
16. Farnia P, Nourouzi J, Kargar M, Nasiri B. Study on epidemiological patterns of mycobacterium tuberculosis by fingerprinting. *Journal of Army University of Medical Sciences of the IR IRAN* 2008;6(21):59-64. [persian]
17. Asgharzadeh M, Alibakhshi A, Ranjbari J, Hanifi GR, Khalili I, Razmaraei N, et al. Study role of age in contact dependent transmission of mycobacterium tuberculosis in northwest of Iran by IS6110-RFLP method. *Modares Journal of Medical Sciences.* 2009;12(1):11-6. [persian]
18. Serpa JA, Teeter LD, Musser JM, Graviss EA. Tuberculosis disparity between US-born blacks and whites, Houston, Texas, USA. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jun;15(6):899-904.
19. Gutiérrez MC, Vincent V, Aubert D, Bizet J, Gaillot O, Lebrun L, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* and risk factors for tuberculosis transmission in Paris, France, and surrounding area. *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2):486-92.
20. Tadayon K, Mosavari N, Sadeghi F, Forbes KJ. *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian cattle, Iran. *Emerg Infect Dis.* 2008 Dec; 14(12):1919-21.
21. Soufian M, Zarinfar N, Mirzaei M, Mousavinezhad S. Epidemiology of tuberculosis in arak, Iran. *Koomesh.* 2009; 10(32): 261-6.
22. Epizooties Oid. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animal. 5th ed. 2004.
23. Richardson M, van der Spuy GD, Sampson SL, Beyers N, van Helden PD, Warren RM. Stability of polymorphic GC-rich repeat sequence-containing regions of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2004 Mar; 42(3): 1302-4.
24. Flores L, Jarlsberg LG, Kim EY, Osmond D, Grinsdale J, Kawamura M, et al. Comparison of restriction fragment length polymorphism with the polymorphic guanine-cytosine-rich sequence and spoligotyping for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with five or fewer copies of IS6110. *J Clin Microbiol.* 2010 Feb;48(2):575-8.
25. Yun KW, Song EJ, Choi GE, Hwang IK, Lee EY, Chang CL. Strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea by mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats. *Korean J Lab Med.* 2009 Aug;29(4):314-9.
26. Warren RM, van der Spuy GD, Richardson M, Beyers N, Booyesen C, Behr MA, et al. Evolution of the IS6110-based restriction fragment length polymorphism pattern during the transmission of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 2002 Apr; 40(4): 1277-82.
27. Lillebaek T, Dirksen A, Baess I, Strunge B, Thomsen V, Andersen AB. Molecular evidence of endogenous reactivation of *Mycobacterium tuberculosis* after 33 years of latent infection. *J Infect Dis.* 2002 Feb;185(3):401-4.
28. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: current insights. *Clin Microbiol Rev.* 2006 Oct;19(4):658-85.