دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال هفدهم، شماره ۴، صفحه ۶۱۱ – ۶۰۲ (مهر و آبان ۱۳۹۳)

ISMJ 2014;17(4): 602-611

# تایپینگ ملکولی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از بیماران در استان مرکزی

سجاد یعقوبی [۱]، نادر مصوری [۱*]، سهیلا مرادی بیدهندی [۲]، علی‌اصغر فرازی [۳]، محمد محمدطاهری [۱]، زهرا رجبی [۴]، خلیل عزیزیان [۱]، یوسف امینی [۱]، آزاد جامعی [۵]

[۱] گروه میکروبیولوژی، بخش تولید توبرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
[۲] گروه میکروبیولوژی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج
[۳] گروه عفونی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک
[۴] گروه پاتوبیولوژی،دانشکده بهداشت، مرکز تحقیقات میکروبیولوژی مواد غذایی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران
[۵] گروه اندودانتیکس،دانشکده دندانپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران

(دریافت مقاله: ۹۱/۷/۴- پذیرش مقاله: ۹۱/۸/۱۰)

## چکیده

**زمینه: RFLP-IS6110** یک روش کامل و استاندارد برای ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد. هدف از این مطالعه بررسی تعیین تنوع ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان مرکزی و همچنین شناسایی نحوه‌ی انتقال بیماری در این منطقه بوده است.

**مواد و روش‌ها:** نتایج یافته‌های آزمایش **RFLP** بر روی ۴۲ نمونه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جمع‌آوری شده از استان اراک آنالیزشد. **DNA** جمع‌آوری شده از ایزوله‌ها مورد هضم آنزیمی توسط **Pvu II** قرار گرفته و در نهایت هیبریدیزاسیون با استفاده از پروب **IS6110** انجام شد.

**یافته‌ها:** براساس تعداد کپی **IS6110**، ایزوله‌ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند ۱- فاقد کپی‌های **IS6110** ۲- تعداد کپی‌های اندک (۲-۱) ۳-دارای تعداد کپی‌های متوسط (۵-۳) ۴- دارای تعداد کپی‌های بالا (۱۷-۶). در این مطالعه بررسی تعداد کپی بیشتر از ۱۷ در هر یک از ایزوله‌های بررسی شده دیده نشد.۷۲ درصد از ایزوله‌ها دارای کپی‌های بالا **IS6110**، ۱۰ درصد از ایزوله‌ها دارای تعداد کپی‌های متوسط **IS6110**، ۱۰ درصد از ایزوله‌ها دارای تعداد کپی اندک **IS6110**و ۵ درصد از ایزوله‌ها فاقد کپی‌های **IS6110** بودند.

**نتیجه‌گیری:** روش انگشت نگاری ژنومی**RFLP-IS6110** ، به فهم بهتر ما از ارتباطات اپیدمیولوژیکی در موارد توبرکلوزیس کمک شایانی می‌نماید. با این تکنیک می‌توان فعال شدن مجدد عفونت در استان را تخمین زد. در مطالعه‌ی حاضر کنونی قرار گرفتن سویه‌ها در خوشه‌های جداگانه، نشان دهنده فعال شدن مجدد عفونت نهفته توبرکلوزیس در این منطقه است.

**واژگان کلیدی:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تایپینگ ملکولی،**DR**، **IS6110**، **RFLP**

*کرج، گروه میکروبیولوژی، بخش تولید توبرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج
**E-mail: n.mosavari@rvsri.ir**

## مقدمه

بیماری سل، از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان است. با این همه به‌نظر می‌رسد که بیماری سل تا سال ۲۰۲۰ هنوز هم جزء یکی از ده بیماری همه‌گیر باقی خواهد ماند. موضوع مهم در مورد بیماری سل، چگونگی کنترل و پیشگیری آن است (۱، ۳ و ۴).

امروزه افزایش قابل توجهی در موارد توبرکلوزیس به ویژه با افزایش موارد افراد مبتلا به ایدز در سراسر دنیا دیده می‌شود (۳، ۵ و ۱۰). با وجود معرفی آنتی‌بیوتیک‌های ضد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، بیماری سل هنوز به‌عنوان یک عامل تهدید کننده‌ی سلامتی مطرح بوده و تا به امروز، جزء یکی از بیماری‌های خطرناک منجر به مرگ محسوب می شود (۶ و ۷).

در سال‌های اخیر شیوع توبرکلوزیس در سراسر جهان افزایش یافته است (۸ و ۹). همچنین در ایران موارد توبرکلوزیس، به‌دلیل مهاجرت از کشورهای دارای شیوع بالای سل (افغانستان)، افزایش چشمگیری را نشان داده و نسبت سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم در ایران، شدیداً تحت تأثیر موج افزایش مهاجرت است. امروزه پژوهشگران در تلاش برای پیدا کردن ابزاری برای کنترل شیوع این بیماری پاندمیک هستند، یکی از ابزارهای بسیار قدرتمند برای کنترل این بیماری، تکنیک‌های مولکولی اپیدمیولوژی است که برای تیپ‌بندی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده می‌شود (۲ و ۳۴).

ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با بهره از روش‌های مولکولی، برای روشن کردن انتقال پایدار توبرکلوزیس در میان جمعیت‌های گوناگون بسیار مفید است. تکنیک RFLP، به ویژه زمانی که از توالی‌های الحاقی IS6110 به‌عنوان پروب استفاده شود، باعث تمایز سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌گردد. این تکنیک به محققان اجازه مقایسه نتایج در آزمایشگاه‌های مختلف را داده، که به سبب آن، به شناسایی سویه‌های خاص با ویژگی‌های منحصر به فرد مانند قدرت عفونت‌زایی، ویرولانس و مقاومت دارویی بالا کمک شایانی می‌نماید (۱۴-۱۲). عموماً روش RFLP -IS6110، برای آنالیز اپیدمیولوژی مولکولی توبرکلوزیس استفاده می‌شود. با استفاده از این قطعات تکراری در اپیدمیولوژی مولکولی می‌توان به پلی‌مورفیسم موجود در سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس پی برد (۱۵-۱۱).

IS6110 یکی از پرکاربردترین قطعات تکراری است که برای تیپ‌بندی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، در روش ملکولی RFLP استفاده می‌شود. این قطعه به خانواده‌ی انتروباکتریال IS3 تعلق دارد (۱۵). از برتری‌های این روش نسبت به سایر روش‌های اپیدمیولوژی مولکولی، قدرت تمایز کنندگی بسیار بالای RFLP IS 6110 است (۱۵). در این مطالعه اولین آنالیز RFLP با استفاده از پروب IS6110 انجام شده است. این بررسی با هدف تعیین هویت ژنومی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استان مرکزی به روش RFLP به‌کمک آنزیم Pvu II و Alu I با استفاده از هیبریدیزاسیون مارکرهای IS 6110 و DR بر روی نمونه‌های جدا شده از استان مرکزی انجام گرفت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه توصیفی آنالیز آماری بر روی گروه‌ها از طریق chi- square، برای مقایسه میانگین در نمونه‌های مربوط به ۴۲ بیمار مسلول و چند مورد بیمار مشکوک به

سل ریوی، در سال ۱۳۹۰-۱۳۸۹ انجام گردید. نمونه‌ها در محیط ترانسپورت انتقالی، تریپتو سوی براث و گلیسیرین به آزمایشگاه ارسال گردید. از آنجا که بیشتر نمونه‌های بالینی دارای مایکوباکتریوم‌ها، باکتری‌های دیگر نیز دارند، این میکروارگانیسم‌ها بایدپیش از کشت حذف شوند، تا از آلودگی محیط کشت جلوگیری شود. برای این منظور هضم و آلودگی‌زدایی به‌روش پتروف (هم حجم نمونه به آن سود ۴ درصد) افزوده شد. نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس نمونه به‌مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ سانتریفیوژ شد. محلول رویی دورریخته شد. به‌منظور خنثی نمودن، چند قطره اسید به ته‌نشین می‌افزاییم تا تغییر رنگ مشاهده گردد. رسوب را به ۳ محیط (برای نمونه‌های خارج ریوی) و یا محیط لوین اشتاین جانسون (برای نمونه‌های خلط) تلقیح می‌کنیم (۷).

اطلاعات فردی بیماران مانند سن، جنس و تابعیت آنان با مراجعه به پرونده پزشکی مربوطه استخراج گردید. این نمونه‌ها به مؤسسه سرم‌سازی و واکسن‌سازی ارسال گردید. تولید محیط‌های کشت در مؤسسه سرم‌سازی و واکسن‌سازی رازی، بخش توبرکولین انجام گرفت. کشت‌ها همگی بر روی محیط اختصاصی لوین اشتاین جانسون گلیسیرین‌دار و پیرووات دار انجام شد و سطح لوله‌های حاوی کشت باکتری‌ها در فواصل ۲۴-۷۲ ساعت پس از انکوباسیون، از نظر آلودگی احتمالی با سایر باکتری‌ها بررسی و سپس هفته‌ای یکبار تا شش هفته کنترل گردید. در حدود شش تا هشت هفته پس از انکوباسیون کلنی‌ها به‌اندازه کافی رشد کرده بودند. سپس کلنی‌های باکتری در درون یک میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE انتقال داده شد.

سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ دقیقه جهت غیرفعال شدن سلول‌های باکتری در دمای $^{\circ}C$ ۸۰ قرار داده شد.

برای استخراج DNA از پروتکل ون‌سولینگن (van Solingen) و همکاران که WHO آن را برای استخراج DNA مایکوباکتری‌ها توصیه نموده استفاده شد (۱۳).

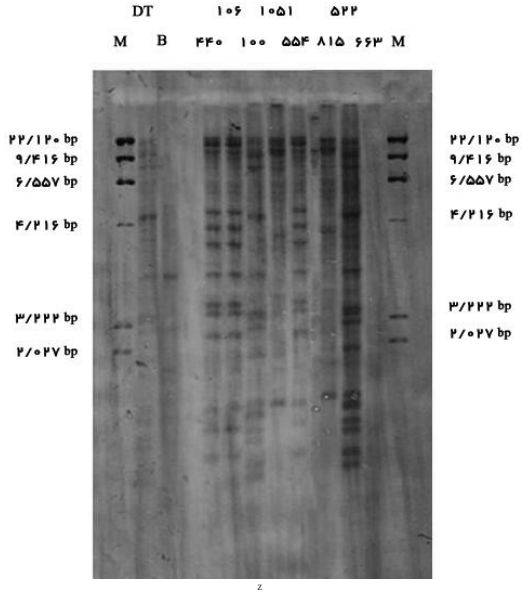
با انجام آزمایش PCR در نمونه‌ها تعلق داشتن همه آن‌ها به گروه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تأئید گردید. در این بررسی جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، با آنزیم Alu I، PVU II (شرکت Roche آلمان) مورد هضم قرار گرفت. مارکر استاندارد در این بررسی، مارکر شماره ۳ شرکت رش آلمان (DNA فاژلامبدا هضم شده توسط اندونوکلئاز EcoR1) استفاده شد و سپس همه مراحل الکتروفورز، انتقال به غشاء (ساترن بلاتینگ)، هیبریداسیون با پروب‌های IS6110 و DR (به‌طور جداگانه) و آشکارسازی بر روی آن‌ها انجام گرفت. در این تکنیک انتقال الکتروفورتیکی قطعات جدا شده DNA (با شارژ منفی به خاطر داشتن باندهای فسفات) به یک غشاء نایلونی با شارژ مثبت، برای استفاده در عملیات هیبریداسیون با استفاده از پروب‌های لیبل شده با دیگوکسیژنین صورت گرفت که پیرو آن در مراحل بعدی آشکارسازی و شناسایی پروب‌های هیبرید شده با استفاده از آنتی‌بادی دیگوکسیژنین کونژوگه با آنزیم آلکالن فسفاتاز و سوبسترای NBT و BCIP (شرکت سینا ژن- تهران، ایران) انجام گرفت. در پایان آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار Gelcampair انجام شد.

## یافته‌ها

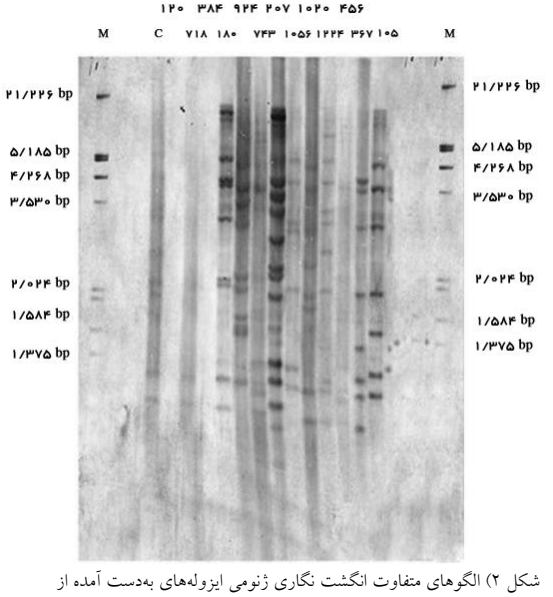
در مرحله جداسازی اولیه میکروب، در مورد ۴۱ جدایه رشد باکتریائی بر روی محیط کشت گلیسیرینه در مقایسه با محیط حاوی پیرووات قوی‌تر بود، که ویژگی شناخته شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

می‌باشد. تنها یک ایزوله در محیط کشت پیرووات‌دار رشد قوی‌تری در مقایسه با محیط کشت گلیسیرین‌دار از خود نشان داد، که هویت این جدایه را مایکوباکتریوم بوویس نشان داد. در مورد ۴۱ جدایه الکتروفورز محصولات به‌دست آمده از هضم قطعه ۵۴۸ جفت باز از ژن oxyR با آنزیم Alu I منجر به تولید ۴ باند هضمی به اندازه‌های ۲۳۶، ۲۲۷، ۵۵ و ۳۰ زوج باز گردید، که بدین‌ترتیب هویت آن‌ها را به‌عنوان مایکوباکتریوم توبرکولوزیس تأئید نمود. تعیین هویت الگوی ژنومی به‌وسیله روش RFLP -IS6110 باندهایی به تعداد صفر تا ۱۷ را نشان داد (شکل ۲-۱). بنابراین تعداد کپی ایزوله‌ها به چهار گروه اصلی تقسیم شدند: ۱- فاقد کپی‌های IS6110 ۲- تعداد کپی‌های اندک (۲-۱) ۳- دارای تعداد کپی‌های متوسط (۵-۳) ۴- دارای تعدادهای بالا (۱۷-۶).

در این بررسی تعداد کپی بیشتر از ۱۷ در هر یک از ایزوله‌های بررسی شده دیده نشد. ۷۲ درصد از ایزوله‌ها دارای تعداد کپی‌های بالا IS6110، ۵ درصد از ایزوله‌ها فاقد کپی‌های IS6110 بودند. الگوی RFLP ایزوله‌های جدا شده از بیماران دارای تفاوت قابل ملاحظه‌ای از یکدیگر بودند. نسبت خوشه‌بندی ایزوله‌های مایکوباکتریوم بسیار پایین بود و به ندرت ایزوله‌ها در یک خوشه قرار می‌گرفتند. در مواردی که تمایز بین ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با تعداد یک کپی تنها با BCG غیرممکن باشد، می‌توان از یک پروب جایگزین مانند DR برای تمایز استفاده نمود. با به‌کارگیری روش RFLP-DR تعداد ۲۶ نوع ژنوتیپ مشخص گردید. برخلاف بیماران ایرانی هیچکدام از جدایه‌های بیماران افغانی از تشابه ژنتیکی برخوردار نبودند. تعداد ۴ جدایه بیماران ایرانی دارای الگوی DR یکسانی بودند.




شکل ۱) ستون (M): سایز مارکر شکاره ۳ شرکت رش آلمان، نمونه DT سوش رفرانس مؤسسه رازی، نمونه‌های ۴۴۰،۳۰۶،۵۵۴ دارای الگوی مشابهه مربوط به بیماران ایرانی که در ۳ جدایه دارای شباهت هستند.




شکل ۲) الگوهای متفاوت انگشت نگاری ژنومی ایزوله‌های به‌دست آمده از بیماران، بیماران دارای الگوی بسیار متفاوت ژنومی بوده، که حاکی از فعال شدن مجدد عفونت سل در منطقه است. M: مارکر شماره ۳ شرکت رش آلمان. سوش C: سویه رفرانس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی

## بحث

امروزه یکی از بزرگ‌ترین مسائل بهداشتی جهان، سل به شمار می رود، حدس زده می شود که از هر سه نفر جمعیت جهان ،یک نفر به باسیل سل آلوده بوده و در

هر ثانیه یک نفر به تعداد آن‌ها افزوده می‌شود. بنابراین بررسی الگوی اپیدمیولوژیک شیوع بیماری سل در مناطق گوناگون جهان ضروری به نظر می‌رسد (۲۸ و ۲۹).از آنجایی که ردیابی عفونت در کشور ما با روش‌های معمول صورت می‌گیرد، این روش‌ها از ارزش محدودی برخوردار می باشد و شناسایی سیر آلودگی از این راه میسر نیست و به روشی برای مشخص کردن عفونت اخیر از فعال شدن دوباره عفونت نیاز است (۳۳-۳۰). این بررسی گزارشی بر پایه تفاوت عمده در نسبت ایزوله‌های بدون کپی و یا دارای کپی اندک در بین ایزوله‌های جدا شده از اراک را نشان نمی‌دهد.

به هر حال به‌طور میانگین، ۸۵ درصد از ایزوله‌ها دارای تعداد کپی‌های بالا یا متوسط بودند، در حالی که تعداد ایزوله‌های فاقد کپی بسیار اندک بود. علاوه‌بر این، هیچ‌یک از ایزوله‌های مورد بررسی تعداد کپی بیش از ۱۷را نشان ندادند. گزارش شده است که تنوع در تعداد الگوی IS6110 می‌تواند وابسته به منطقه‌ی جغرافیایی منشاء ایزوله باشد (۱۶). مثلاً الگوی RFLP–IS6110 توبرکلوزیس در تانزانیا و دانمارک دارای یافته‌های چشمگیری بوده است (۱۷ و ۱۸).

در حدود ۷۵ درصد سویه‌ها در تانزانیا دارای ۱۰-۶ کپی بودند. در دانمارک ۵۰ درصد سویه‌های مورد بررسی دارای تعداد ۱۵-۱۱ کپی بودند (۱۷ و ۱۸). که این یافته‌ها در واقع نشان دهنده تفاوت تعداد کپی‌ها، که وابسته به منطقه جغرافیایی و منشاء ایزوله‌ی آن‌ها می‌باشد. بررسی کنونی سطح چشمگیری از پلی‌مورفیسم را بر پایه IS6110، در ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نشان می‌داد، که در واقع می‌تواند دال بر این حقیقت باشد که، روش RFLP–IS6110 می‌تواند برای کنترل اپیدمیولوژیکی توبرکلوزیس در اراک مورد استفاده قرار گیرد. الگوی IS6110 در بین ایزوله‌ها دارای پراکندگی یکسان در یک محدوده بین ۱۷-۰ کپی بود. به گونه قابل توجهی ایزوله‌های فاقد کپی IS6110، بین ۵ درصد از ایزوله‌ها را نشان می‌دادند. اگر چه به نمونه‌های تصادفی و مناسب بیشتری برای بررسی‌ها بر روی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اراک نیاز می‌باشد. پژوهش کنونی، توان کاربردی بودن این تکنیک در تعیین الگوی ژنومی اکثریت ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس اراک را نشان می‌دهد. با در نظر گرفتن میانگین سنی بالاتر از ۶۲ سال بیماران تحت بررسی در این پژوهش و همچنین تنوع گسترده ژنتیکی علیرغم تعداد نسبتاً محدود جدایه‌های این تحقیق شواهدی دال بر گردش فعال سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در منطقه تحت مطالعه چه در اتباع ایرانی و چه در بین اتباع افاغنه نشان نمی‌دهد، که البته این مطلب هم خود دوباره تأئید کننده نقش مؤثرتر فعال شدن مجدد عفونت‌های قدیمی در بروز بیماری در مقایسه با انتقال عفونت بین بیماران منطقی‌تر به‌نظر می‌رسد که در این صورت یافته‌های پژوهشگران دیگر در ایران را تأیید خواهد کرد.

در ده سال اخیر اپیدمیولوژی مولکولی سل در نواحی گوناگون ایران مانند تهران و خراسان مورد بررسی قرار گرفته است (۲۲-۱۹). موارد ذکر شده عموماً تنوع ژنتیکی بالای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس در کشور را نشان می‌دهند. در یک بررسی توسط فرنیا الگوی اپیدمیولوژیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به‌روش انگشت‌نگاری ژنتیکی باIS6110-RFLP در سال ۲۰۰۵ تا ۲۰۰۶ انجام گرفت و تنوع ژنتیکی بالای IS6110 در سویه‌های گوناگون مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشاهده شد که چنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که بیشتر افراد با منشاء متفاوت به بیماری سل مبتلا شده‌اند. در نتیجه فعال شدن دوباره عفونت در

گسترش بیماری سل در تهران دارای اهمیت بوده است (۲۳). همچنین در استان خراسان، توسط روحانی مطالعه‌ای دیگر بر روی ۱۱۳ جدایه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (۵۷ ژنوتیپ) انجام شد نشان دهنده تنوع بالای ژنتیکی در این استان است (۲۴). اگر چه فعال شدن بیماری ناشی از عفونت بیماران در سال‌های پیش از آغاز بیماری آنان به‌عنوان یک عامل مهم توضیح دهنده این یافته اپیدمیولوژیک معرفی گردیده است، اما در واقع دلیل یا دلائل قطعی مؤثر در پیدایش این وضعیت همچنان ناشناخته باقی مانده است (۲۳).

یادآوری این نکته ضروری است که احتمالاً افزایش تعداد جدایه‌های تحت بررسی در پژوهش‌های تکمیلی میزان پلی‌مورفیسم مشاهده شده را حتی از مقادیر کنونی نیز افزون‌تر خواهد نمود. افزون بر این هم‌خوانی میان یافته‌های به‌دست آمده از هر دو روش تایپینگ علیرغم تفاوت در مکانیزم‌های مؤثر در تکامل و تغییرات مارکرهای ژنتیکی DR و IS6110، خود گویای درستی یافته‌های بررسی کنونی در نشان دادن سطح قابل توجه تنوع سویه‌ها در منطقه استان مرکزی می‌باشد. در مطالعه دیگر در همین راستا که با روش VNTR روی همین نمونه‌ها انجام شد، وجود تنوع ژنتیکی گسترده اثبات شد. بنابراین در این بررسی نیز در استان مرکزی به احتمال زیاد مشابه مطالعات در سایر استان‌ها موارد فعال سل در این استان در اثر فعال‌سازی دوباره عفونت می‌باشد و انتقال اخیر نقش بسیار کمتری دارد. دوم اینکه نبود تشابه میان تیپ‌های ژنتیکی م. توبرکولوزیس جدا شده از بیماران ایرانی (۳۴ مورد) و افغانی (۴ مورد) نشان می‌دهد که برخلاف تصور رایج احتمالاً اقلیت‌های غیرایرانی ساکن در کشور نقش گسترده‌ای در انتقال بیماری به شهروندان ایرانی ندارند. این موضوع پیش از این نیز مورد توجه برخی از مؤلفین قرار گرفته است (۲۰).

در بررسی مشابه توسط دکتر فرنیا در سال‌های ۲۰۰۴ تا ۲۰۰۵ مشاهده شد که انتقال بیماری از مهاجرین افغانی به بیماران ایرانی غیرمعمول است به گونه ای که از ۶۰ بیمار مهاجر افغانی مورد بررسی تنها ۲ بیمار افغان در گسترش بیماری در افراد تهرانی مورد مطالعه نقش داشتند (۲۰). با در نظر گرفتن میانگین سنی بالاتر از ۶۲ سال بیماران تحت بررسی در این پژوهش و همچنین تنوع گسترده ژنتیکی برخلاف تعداد نسبتاً محدود جدایه‌های این تحقیق شواهدی دال بر گردش فعال سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در منطقه تحت مطالعه چه در اتباع ایرانی و چه در بین اتباع افغان نشان نمی‌دهد، که البته این مطلب هم خود تأئید کننده نقش مؤثرتر فعال شدن دوباره عفونت‌های قدیمی در بروز بیماری در مقایسه با انتقال عفونت بین بیماران منطقی‌تر به‌نظر می‌رسد که در این صورت یافته‌های محققین دیگر در ایران را تأیید خواهد کرد. در پژوهش‌های اپیدمیولوژی مولکولی سل انسانی برای جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مارکرهای مختلف ژنتیکی استفاده می‌شود، که در زیر به خلاصه‌ای از آن‌ها اشاره گردیده است. پولت (Poulet) و همکاران از پنج قطعه مختلف ژنتیکی برای بررسی پلی‌مورفیسم DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند (۲۵). بررسی‌های ون‌امبدن (van Embden) و همکاران با استفاده از دو مارکر IS6110 و IS1081 برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شد که این دو به‌عنوان مارکرهای مطلوب معرفی گردیدند (۲۶). کازین (Cousin) و همکاران از چهار تکنیک مختلف برای تایپینگ سویه‌های سل گاوی استفاده کردند از ۲۷۳ جدایه م.

بویس از کشورهای کانادا و ایرلند، ایران، استرالیا، با روش IS6110-RFLP، ۲۳ ژنوتایپ جدا شد و مشخص گردید این روش حساسیت خوبی برای جدایه‌های با بیش از سه کپی از IS6110 دارد و در روش PGRS-RFLP، ۷۷ ژنوتایپ جدا شد و مشخص گردید که این روش بیشترین حساسیت را برای جدایه‌های دارای فقط یک کپی از IS6110 دارد (۱۹). دلیل انتخاب روش RFLP و هیبریداسیون DNA در مطالعه کنونی این است که این تکنیک نسبت به سایر روش‌های مولکولی قدرت تمایز کنندگی بالایی در سویه‌های مایکوباکتریوم دارد. نمونه‌های زیر، شواهدی بر این انتخاب است (۱۹).

کرمر (Kermer) و همکاران برای مقایسه‌ی روش‌های مختلف اپیدمیولوژی مولکولی، بر روی ۹۰ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ۳۸ کشور مختلف با استفاده از ۵ روش مختلف RFLP و ۷ روش وابسته به PCR برای ارزیابی ویژگی، وجه تمایز، تکرارپذیری روش‌های فوق صورت پذیرفت، نتایج به‌دست آمده برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، RFLP تایپینگ با استفاده از پروب IS6110 بهترین قدرت تمایزکنندگی و بیشترین الگو (۸۴ الگوی مختلف از ۹۰ سویه) و VNTR و متعاقب آن اسپولیگوتایپینگ کمترین وجه تمایز (به‌ترتیب ۵۶ و ۶۱ الگو از ۹۰ سویه) را ارائه می‌دهد و نتیجه گرفته‌اند که برای مایکوباکتریوم توبرکلوزیس RFLP به‌وسیله IS6110 روش انتخابی می‌باشد (۲۷).

در دیگر بررسی‌ها توسط اصغرزاده در سال ۱۳۸۸ و در مطالعه‌ای مشابه توسط فرنیا و همکاران با روش انگشت‌نگاری ژنومی IS6110-RFLP، DR بررسی ۲۹۹ فرد مبتلا انجام گرفت و مشخص گردید که ۲۳۲ سویه (۷۹/۴ درصد) الگوی متفاوت IS6110 دارند و عفونت دوباره فعال شده است و ۶۰ سویه (۲۱/۶ درصد) دارای الگوی مشابه‌اند در نتیجه بیشتر افراد با منشاء متفاوت به بیماری سل مبتلا شده بودند (۳۴-۲۰).

با توجه به اینکه استان مرکزی به‌عنوان استانی مهاجرپذیر به ویژه از کشورهای ضعیف از نظر بهداشتی مانند افغانستان محسوب می‌باشد، بنابراین این نیاز اساسی وجود دارد که منشاء و منبع عفونت بیماری سل در این استان با استفاده از روش‌های تایپینگ مورد ارزیابی دقیق قرار گیرد.

در این مطالعه با توجه به الگوهای گوناگون حاصل از RFLP به‌وسیله پروب‌های IS6110 (۳۶ الگو) و DR (۲۶ الگو) می‌توان نتیجه گرفت، که میزان سویه‌های در گردش در استان مرکزی زیاد و در واقع بیانگر مهاجرپذیر بودن این استان است. در بررسی کنونی نیز با توجه به تنوع بالای سکانس‌های IS ۶۱۱۰ و DR در سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استان مرکزی می‌توان نتیجه‌گیری کرد که، در جمعیت مورد بررسی بیشتر افراد با منشاء متفاوتی به بیماری سل مبتلا شده‌اند.

بنابراین فعال شدن دوباره عفونت، عامل دارای اهمیت در گسترش بیماری سل در استان مرکزی می‌باشد، چرا که مواجهه با این منابع عفونی زیاد هشدار دهنده است. انتظار می‌رود که تایپینگ سویه‌های مایکوباکتریوم توبر کلوزیس با استفاده از هر سیستم انگشت‌نگاری ژنومی قادر باشد، کمک شایانی در فهم مناسب از مسیر حرکت و انتقال سویه‌های منحصر به فرد در داخل کشور و یا از کشوری به کشور دیگر نماید. همچنین تکنیک انگشت‌نگاری ژنومی با استفاده از پروب IS6110، ابزار بسیار سودمندی در بررسی‌های سویه‌های مقاوم به دارو در زمان شیوع

توبرکلوزیس در بیماران HIV است. با اینکه برنامه‌های آینده‌ی ایران برای پیشگیری از ایدز قابل پیش‌بینی نمی‌باشد، اما ممکن است این پژوهش‌ها برای بررسی چنین پدیده‌هایی، کمک شایانی نماید و تسهیلات مناسبی را برای مدیریت بهتر این موارد فراهم کند. در دیدگاهی دیگر نیز ایزوله‌های دارای تعداد کپی اندک و یا فاقد کپی IS6110 را می‌توان با استفاده از سایر روش‌های جایگزین مانند RFLP-DR، ریبو تایپینگ، اسپولیگوتایپینگ، RAPD و غیره متمایز نمود.

## سپاس و قدردانی

این مطالعه با حمایت مالی مؤسسه سرم‌سازی واکسن‌سازی رازی صورت گرفته است و در اینجا بر خود لازم می‌دانیم، از تلاش و همکاری همه کارمندان آقای دکتر کشاورز، رشادی، دشتی پور، دهقانپور، خانم شکیبا و دیگر همکاران در مرکز تحقیقات سل رازی کرج و مرکز تحقیقات واحد رازی اراک که ما را یاری نموده‌اند، قدردانی نماییم.

## References:

1.Global Tuberculosis Control. WHO Report. (Accessed in May 10, 2013, at http://www.tbrieder.org/publications/books_english/m24392.pdf).
2.Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic. JAMA 1995; 273: 220-6.
3.Daley CL, Small PM, Schecter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. N Engl J Med 1992; 326: 231-5.
4.Maguire H, Dale JW, McHugh TD, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. Thorax 2002; 57: 617-22.
5.Dye C, Scheele S, Dolin P, et al. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence and mortality by country: Consensus Statement. JAMA 1999; 282: 677-86.
6.Otal I, Martin C, Vincent-Levy-Frebault V, Tet al. Restriction fragment length polymorphism analysis using IS6110 as an epidemiological marker in tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 1252-4.
7.van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, et al. Occurrence and stability of insertion sequences in Mycobacterium tuberculosis complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. J Clin Microbiol 1991; 29: 2578-86.
8.Zhang Y, Mazurek GH, Cave MD, et al. DNA polymorphisms in strains of Mycobacterium tuberculosis analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. J Clin Microbiol 1992; 30: 1551-6.
9.Godfrey-Faussett P, Stoker NG. Aspects of tuberculosis in Africa. 3. Genetic 'fingerprinting' for clues to the pathogenesis of tuberculosis. Trans R Soc Trop Med Hyg 1992; 86: 472-5.
10.Daley CL, Small PM, Schecter GF, et al. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-lentgh polymorphisms. N Engl J Med 1992; 326: 231-5.
11.Groenen P, Bunschoten AE, van Soolingen D, et al. Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method. Mol Microbiol 1993; 10: 1057-65.
12.de Boer AS, Borgdorff MW, de Haas PEW, et al. Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of Mycobacterium tuberculosis based on serial patient isolates. J Infect Dis 1999; 180: 1238-44.
13.van Soolingen D, Qian L, de Haas P, et al. Predominance of a single genotype of Mycobacterium tuberculosis in countries of east Asia. J Clin Microbiol 1995; 33: 3234-8.
14.van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. Strain identification of Mycobacterium

tuberculosis by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. J Clin Microbiol 1993; 31: 406-9.
15.Asgharzadeh M, Kafil HS. Current trends in molecular epidemiology studies of Mycobacterium tuberculosis. Biotechnol Mol Biol Rev 2007; 2: 108-15.
16.Yang Z, de Haas P, van Soolingen D, et al. Restriction fragment length polymorphism Mycobacterium tuberculosis strains isolated from Greenland during 1992: evidence of tuberculosis transmission between Greenland and Denmark. J Clin Microbiol 1994; 32: 3018-25.
17.Sola C, Filliol I, Legrand E, et al. Mycobacterium tuberculosis phylogeny reconstruction based on combined numerical analysis with IS1081, IS6110, VNTR, and DR-based spoligotyping suggests the existence of two new phylogeographical clades. J Mol Evol 2001; 53: 680-9.
18.Chevrel-Dellagi D, Abderrahman A, Haltiti R, et al. Large-scale DNA fingerprinting of Mycobacterium tuberculosis strains as a tool for epidemiological studies of tuberculosis. J Clin Microbiol. 1993; 31: 2446-50.
19.Cousins D, Williams S, Liébana E, et al. Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. J Clin Microbiol 1998; 36: 168-78.
20.Farnia P, Mohammadi F, Masjedi MR, et al. Evaluation of tuberculosis transmission in Tehran: using RFLP and spoloigotyping methods. J Infect 2004; 49: 94-101.
21.Parra A, Fernandez-Llario P, Tato A, et al. Epidemiology of Mycobacterium bovis infections of pigs and wild boars using a molecular approach. Vet Microbiol 2003; 97: 123-33.
22.Asgharzadeh M, Khakpour M, Salehi TZ, et al. 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; 10: 3769-77.
23.Kazempour M, Masjedi M, Velayati A, et al.. Identification of mycobacterium tuberculosis beijing genotype using three different molecular methods. koomesh 2009; 11: 7-14.
24. Rohani M, Farnia P, Nasab MN, et al. Beijing genotype and other predominant Mycobacterium tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. Indian J Med Microbiol 2009; 27: 306-10.
25.Poulet S, Cole ST. Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in Mycobacterium tuberculosis. Arch Microbiol 1995; 163: 87-95.
26.van Soolingen D, Hermans P, de Haas P, et al. Insertion element IS1081-associated restriction fragment length polymorphisms in Mycobacterium tuberculosis complex species: a reliable tool for recognizing Mycobacterium bovis BCG. J Clin Microbiol 1992; 30: 1772-7.
27.Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. J Clin Microbiol 1999; 37: 2607-18.
28.McAdam RA, Quan S, Cuilhot C. Mycobacterial transposons and their applications. In: Harfull GF, Jacobs WR, editors. Molecular Genetics of Mycobacteria. 1st ed. Washington, DC: ASM press; 2000: p. 69-81.
29.Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing. WHO Report. (Accessed in May 10, 2013, at http://www.afro.who.int/index.php?option=com_docman&task=doc_download&gid=483).
30.Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. Eur Respir J Suppl 2002; 36: 54s-65s.
31.Sajduda A, Dziadek J, Kotlowski R, et al. Evaluation of a multiple genetic markers for typing drug-resistance Mycobacterium tuberculosis strains from Poland. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 55: 59-64.
32.SCI (Statistical Center of Iran), 2006. census website.(amar.sci.org.ir/index_e.aspx).
33.Caminero JA, Pena MJ, Campos-Herrero MI, et al. Epidemiological evidence of the spread of a Mycobacterium tuberculosis strain Of the Beijing genotype on gran canaria Island. AM J Respir Crit Care Med 2001; 164: 1165-70.
34.Asgharzadeh M, Shahbabian K, Samadi Kafil H, et al. Use of DNA fingerprinting in identifying the source case of tuberculosis in East Azarbaijan provinces of Iran. J Med Sci 2007; 7: 418-21.

**ISMJ 2014; 17(4): 602-611**

***Original Article***

# Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis strains isolated from patients in Markazi Province

***S. Yaghoubi [1], N. Mosavari [1*], S. Moradi Bidhendi [2], AA. Farazi [3], M. Mohammad Taheri [1], Zahra Rajabi [4], Kh. Azizian [1], Y. Amini [1], A. Jamei [5]***

*[1]Department of Microbiology, Tuberculin Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN*
*[2] Department of Microbiology, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN*
*[3] Department of Tropical, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, IRAN*
*[4]Food Microbiology Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IR IRAN*
*[5]Department of Endodontics,Scool of Dentistry, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, IRAN*

**(Received 25 Sep, 2012 Accepted 31 Oct, 2012)**

***Abstract***

**Background**: RFLP-IS6110 standard technique to genotyping M. tuberculosis.The aims of this study were to identify the genetic diversity of M. tuberculosis population in Markazi province and to recognize the mode of disease transmission in this region.

**Material and Methods:** The RFLP results of 42 isolates of M. tuberculosis deposited in the Mycobacterial Centre from Markazi province were analyzed. DNAs isolated from these isolates were enzyme digested with Pvu II, and hybridized with a PCR amplified DIG-labeled IS6110 probe.

**Results**: The isolates were classified into four groups, based on the copy numbers, as follows: (1) lacking IS6110 element; (2) low copy numbers (1-2); (3) intermediate copy numbers (3-5); and (4) high copy number (6-17). Copy numbers higher than 17 however were not observed in any of the isolates studied, 72 percent of the isolates showed high copy numbers of IS6110, 13 percent intermediate copy numbers, 10 percent low copy numbers, whereas 5 percent isolates lacked IS6110 element.

**Conclusion:** IS6110 DNA fingerprinting assisted us to find epidemiological links between some TB cases, and this technique estimates from reactivation of latent infection transmission of the disease in Markazi province. The low rate of clustering indicates that tuberculosis among studied population is resulted mainly from reactivation of latent infection in this region.

**Keywords**: Mycobacterium tuberculosis, molecular typing, DR, IS6110, RFLP

***Address for correspondence*: Department of Microbiology, Tuberculin Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, IRAN; E-mail: n.mosavari@rvsri.ir