

تنوع ژنتیکی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش پالسد فیلد ژل الکتروفورزیس در ایران

محمد پوییده¹، اسماعیل جبارزاده²، مرتضی معصومی³، رضا رنجبر⁴، زینب احمدی³، مهناز سیفی²

1. فوق لیسانس میکروبیولوژی، دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم
2. دکترای علوم آزمایشگاهی، استاد بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران
3. لیسانس میکروبیولوژی، بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ایران
4. متخصص باکتری شناسی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران
5. فوق لیسانس سلولی مولکولی، مرکز تحقیقات بیولوژی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله تهران
6. PhD باکتری شناسی، استادیار انستیتو پاستور ایران

* نشانی برای مکاتبه: تهران، خیابان پاستور، انستیتو پاستور ایران، گروه باکتری شناسی، تلفن و نمابر: 66968853 mahsaifi@yahoo.com
دریافت مقاله: بهمن نود و یک پذیرش برای چاپ: فروردین نود و دو

چکیده

سابقه و هدف: سل به دلیل انتقال فرد به فرد، میزان مرگ و میر بخصوص در کشورهای در حال توسعه یک مشکل بهداشتی در سطح دنیا است. بر طبق نظر سازمان بهداشت جهانی بروز سویه های چند مقاومتی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک مسأله اورژانس بوده و هم راهی سل با ایدز نیز بر اهمیت این مسئله افزوده است. استفاده از روش های ژنوتایپینگ مولکولی در تشخیص وجود انتقال یا عفونت مجدد در یک جمعیت نقش مهمی دارند. در طی یک مطالعه یک ساله تعیین ژنوتایپ 100 ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بیماران مراجعه کننده به انستیتو پاستور ایران با استفاده از روش PFGE انجام شد.

روش کار: پس از تعیین هویت ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و انجام تست حساسیت آنتی بیوتیکی با روش های استاندارد، مخلوط *incert agarose* و لیزوزیم با سوسپانسیون باکتری ها جهت تهیه پلاک های مخصوص PFGE مورد استفاده قرار گرفت. پلاک ها بعد از طی مراحل لیز، شستشو با استفاده از آنزیم محدود اثر *XbaI* هضم شدند. در نهایت محصولات هضم آنزیمی درون پلاک ها بر روی ژل آگارز 1% با روش PFGE الکتروفورز شده سپس از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید مورد آنالیز توسط نرم افزار *GelcomparII* قرار گرفتند.

یافته ها: دندروگرام تنوع ژنتیکی این 100 سویه در مقایسه با مارکر وزن مولکولی بدست آمد و دو تایپ شایع بدست آمد. پالسوتایپ A با 71 سویه که یکی از سویه های MDR را دربر می گرفت و پالسوتایپ B با 29 سویه که 3 مورد MDR را شامل میشد. نتیجه گیری: آگاهی نسبت به هرگونه شیوع و انتشار کلونال ژنوتایپ های خاص از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که دربرگیرنده سویه های مقاوم نیز می باشند در کنترل سل بسیار حائز اهمیت است. تحقیقات ما حاکی از وجود 3 ایزوله MDR در داخل پالسوتایپ کم شیوع B بود که می تواند زنگ خطری برای دقیق تر عمل نمودن و کنترل این کلون به لحاظ برنامه های مراقبت سل مقاوم در کشور باشد. احتمالاً مشاهده تنوع ژنتیکی کم در این مطالعه به دلیل حفاظت جایگاه های برش بر روی ژنوم ایزوله های مورد بررسی با آنزیم *XbaI* است. برای اطمینان بیشتر در مورد ارتباط ژنتیکی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده هم زمان از دیگر آنزیم های محدود اثر و هم چنین روش های مختلف مولکولار اپیدمیولوژی پیشنهاد میگردد.

واژگان کلیدی: مایکوباکتریوم، توبرکلوزیس، پالسد فیلد ژل الکتروفورزیس، ژنوتایپ

مقدمه

به رغم تدابیر پزشکی صورت گرفته در رابطه با بیماری سل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همچنان یکی از مهم ترین پاتوژن های انسانی و از عوامل عمده مرگ و میر در دنیا باقی مانده است. از طرف دیگر گسترش جهانی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به یک یا چند دارو در اغلب کشورها به عنوان یک هشدار در برنامه های کنترل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به حساب می آید. در سال های اخیر افزایش میزان مهاجرت ها، پیدایش سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک، افزایش هم زمانی عفونت توبرکلوزیس و HIV به ویژه در کشورهای در حال توسعه باعث شده تا تشخیص دقیق و به موقع این باکتری و هم چنین ردیابی مسیر اپیدمی ها و پروسه انتقال، از اهمیت زیادی برخوردار باشد (1،2). به همین دلیل روش های تایپینگ مولکولی مختلفی از جمله Pulsed Field Gel Electrophoresis method (PFGE) برای مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی بیماری سل بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. تایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در کنترل اپیدمیولوژیک سل ضروری است. روش های فنوتایپینگ منجر به جداسازی گونه های مایکوباکتریایی میشوند ولی در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی کارایی ندارند. فاژتایپینگ مایکوباکتریوم ها نیز تا به حال منجر به معرفی گروه های محدودی شده است. تکنیک های مولکولی متعددی که اساس آنها بر مطالعات ژنوم باکتری استوار است در بررسی کلونالیتهی سویه های مایکوباکتریایی کاربرد وسیعی دارند. در تکنیک PFGE، که کل ژنوم باکتری جهت هضم آنزیمی و بررسی شباهت های کلونال مورد استفاده قرار می گیرد، اطلاعات مفیدی را در خصوص کنترل شیوع این بیماری در اختیار ما قرار می دهد (3).

در سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ژنوتایپینگ با استفاده از PFGE برخی موارد نسبت به روش IS6110-RFLP genotyping دارای برتری می باشد، زیرا روش IS6110-RFLP وابسته به تعداد توالی IS6110 در ژنوم ایزوله ها است و بر روی نمونه هایی که کمتر از 6 توالی IS6110 در ژنوم دارند غیر موثر است اما PFGE این محدودیت را نداشته و با بکارگیری ژنوم کامل ارگانیزم به جای تمرکز بر روی عناصر تکراری کوتاه و استفاده از پروب های رادیواکتیوی از قدرت تفکیک بالایی برای افتراق بین گونه ای برخوردار است. در روش PFGE کل ژنوم باکتری توسط آنزیم های محدود الاثر خاصی برش خورده و با مطالعه الگوی به دست آمده از قطعات حاصل از برش آنزیمی و به دست آوردن الگوی تنوع ژنتیکی سویه ها می توان ابزاری قدرت مند و استاندارد در زمینه مطالعه اپیدمیولوژی مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشت و اطلاعات حاصل از آنالیز این روش در زمینه تحلیل ویژگی سویه های در حال چرخش در جامعه، نشان دادن قرابت سویه های شایع در یک منطقه، شناسایی منبع آلودگی و طراحی روش های کنترل عامل بیماری را کارایی بالایی دارد (4،5).

آنزیم های محدود الاثر مختلفی از جمله XbaI, AseI, DraI, SpeI جهت برش ژنوم باکتری در روش PFGE برای باکتری سل بکار گرفته شده اند. آنزیم XbaI بطور میانگین کمتر از 10 جایگاه در هر 10⁶ bp را شناسایی کرده و DNA را به قطعات کوچک تر با اندازه ای حدود 40-50 kb برش می زند که بوسیله الکتروفورز معمولی در ژل آگارز قادر به حرکت و جداسازی نبوده درحالی که با PFGE به دلیل تغییرات متنوب میدان الکتریکی به راحتی از یکدیگر جدا می شوند. ژنوتایپینگ با استفاده از PFGE در مقایسه با دیگر روش های تایپینگ مولکولی از قدرت تفکیک بالایی برای افتراق بین گونه ای برخوردار است (6). بر همین اساس مطالعه فعلی با هدف تعیین تنوع ژنتیکی سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از افراد مراجعه کننده به بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور تهران در سال 1389-90 انجام شد.

روش کار

اطلاعات پرونده 100 بیمار کشت مثبت مراجعه کننده به انستیتو پاستور تهران در سال 90-1389 بررسی و اطلاعات مورد نظر در رابطه با جنسیت، سن، ملیت، سابقه ابتلا به بیماری، تماس نزدیک با فرد آلوده و یا مشکوک به سل، سابقه پزشکی فرد از لحاظ وجود نقص سیستم ایمنی (ایدز) جمع آوری شد.

نمونه های ارسالی به آزمایشگاه جهت بررسی میکروسکوپی با رنگ آمیزی زیل نلسون، رنگ آمیزی و از لحاظ وجود باکتری اسید فست بررسی شد. سپس تمام نمونه ها پس از آلودگی زدایی با محلول N-استیل L-سیستئین هیدروکسید سدیم؛ در محیط کشت لوین اشتاین جانسون آگار کشت داده و نتایج رشد میکروارگانیسم تا 2 ماه انکوباسیون در دمای 37°C مطالعه شد (7).

کلیه کشت های مثبت مشکوک به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش های استاندارد (7) از لحاظ تست های نیاسین، فعالیت کاتالازی (22°C و 68°C)، احیاء نیترات، حساسیت به TCH و تولید پیگمان آزمایش شد.

حساسیت آنتی بیوتیکی سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس نیز بر طبق استاندارد های CDC به روش تناسبی نسبت به آنتی بیوتیک های ریفامپین (40µg/ml)، ایزونیاژید (0.2µg/ml)، استرپتومایسین (4µg/ml)، اتامبوتول (2µg/ml)، کانامایسین (20µg/ml) و اتیوناماید (20µg/ml) سنجیده شد (7).

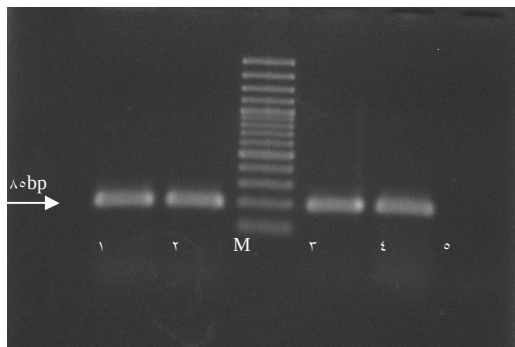
DNA کروموزومی کلیه سویه ها با استفاده از کیت Roche استخراج گردید. به طور خلاصه برای تخریب دیواره سلولی مایکوباکتریوم از بایندینگ بافر استفاده کرده و برای هضم پروتئین ها پروتئیناز K افزوده شد. سپس با استفاده از ایزوپروپانول خلالت DNA را کم کرده تا از خلل و فرج فیلتر عبور ننماید. فیلتر حاوی سیلیکاژل بوده که با بار مثبت خود DNA دارای بار منفی را جذب می کند. در مرحله ی بعد به کمک removal inhibitor بقیه ترکیبات سلولی و پروتئین ها را حذف کرده، پس از دوبار شستشو با washing buffer، الوشن بافر اضافه گردید که سبب آزادسازی DNA کروموزومی می شود. نتیجه استخراج DNA با الکتروفورز در آگارز 0/8% رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید با نور UV رویت شد. از آن جایی که باید تعیین هویت سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه به صورت قطعی انجام می شد در مرحله بعد از واکنش PCR جهت تایید نهایی جنس و گونه استفاده شد. برای این کار واکنش PCR با پرایمر اختصاصی (8) جهت تایید قطعی سویه های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس با مقادیر زیر و حجم نهایی 25µl انجام شد.

Primer-F 5' (ATGCGGGCGTTGATCATCGTC) 3'
Primer-R 5' (CGGTGTGCCGAGAAGCGC) 3'

PCR Buffer= 2.5 µl, MgCl₂= 1.5 mM, dNTP= 200 µM, primer1= 30 pmol, primer 2= 30 pmol, Taq= 2 Unit, DNA = 5 µl

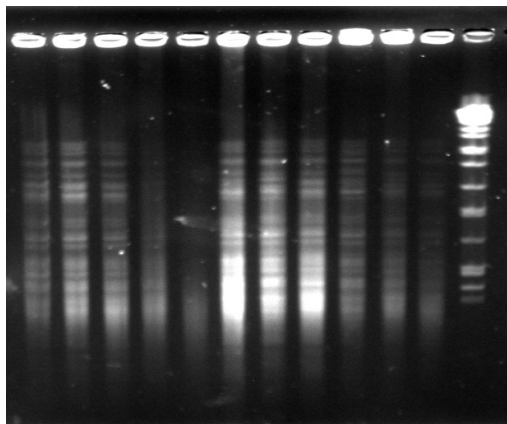
پروتکل PCR با الگوی مرحله اولیه 95 درجه به مدت 12 دقیقه 1 سیکل، 94 درجه 1 دقیقه 64، درجه 1 دقیقه 72، درجه 1 دقیقه 35 سیکل و 72 درجه 1 سیکل انتهایی به مدت 5 دقیقه انجام شد (8). پس از انجام PCR وجود قطعه تکثیر شده به وزن 185bp با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز 1/5% درولتاژ 80 ولت به مدت یک ساعت و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید ارزیابی شد.

درصد) بیش ترین میزان مقاومت های آنتی بیوتیکی را در بین سویه ها داشتند و بیش از یک چهارم سویه ها (29%) به هیچ کدام از گروه های آنتی بیوتیکی مقاوم نبودند. پس از استخراج DNA سویه ها و انجام آزمون PCR، قطعه مورد نظر با وزن مولکولی 189bp مشاهده شد. نتایج حاصل نشان داد که تمامی سویه های مورد مطالعه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند (تصویر 1).



تصویر 1. PCR اختصاصی جنس و گونه، اندازه باند 189bp، M مارکر وزن مولکولی 100bp، ردیف 5 نمونه کنترل منفی

سویه های مورد مطالعه با استفاده از آنزیم XbaI و سیستم CHEF DRIII بررسی شدند. نتایج به صورت ژل های جداگانه حاصل شد (تصویر 2). الگوهای هضمی کلیه سویه ها با استفاده از نرم افزار CompareII و مقایسه با مارکر Salmonella Choleraesuis Serotype Branderup H9812 ژنتیکی به دست آمده از آنالیزهای کامپیوتری وجود ژنوتایپ در جمعیت مورد مطالعه را نشان داد (تصویر 3). دندروگرام رسم شده برای این باکتری ها تنها 2 Common type را نشان داده و هیچ Single Type در این جمعیت مشاهده نشد. بیش ترین تعداد مربوط به Common type A بود که به عنوان شایع ترین تایپ 71 سویه را شامل می شد. پس از آن Common type B با 29 سویه شایع ترین تایپ مورد مطالعه بودند.



تصویر 2. تصویر باند های حاصل از Pulsed field gel electrophoresis به همراه Salmonella Branderup به عنوان مارکر وزن مولکولی

برای پالسد فیلد ژل الکتروفورز (Pulsed Field gel electrophoresis) صد سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس که اختصاصی جنس و گونه آنها مثبت و تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در آنها قطعی بود از روی محیط کشت کلنی برداری و در 200µl آب مقطر در 80°C به مدت یک ساعت غیر فعال شد. سپس رسوب حاصله در rpm 4000 به مدت 15 دقیقه بدست آمده و دو بار با 1/5 ml بافر TEX1 (1M) 1/5 ml بافر CSB (100mM EDTA 0/5M و 100mM Tris-Hcl 1M) شسته و رسوب در 1/5 ml بافر CSB (100mM EDTA 0/5M و 100mM Tris-Hcl 1M) شسته و رسوب در 200µl سس 200 سوسپانسیون تهیه شده با 1/5% incert agarose 10 mg/ml لیزوزیم و مخلوط و جهت تهیه دو عدد پلاک در قالب مخصوص ریخته شده و پس از بستن پلاک ها هر دو عدد پلاک به مدت 24 ساعت با 1/5 ml بافر لیز (حاوی 150 µl لیزوزیم 100mg/ml و 1.5 بافر TE و 5µl ARNase) در دمای 37°C درجه انکوبه و لیز باکتری در آنها صورت گرفت. پلاک ها بعد از 2 مرحله شست و شو با بافر TEX1، به منظور حذف پروتئین ها با بافر ESP (حاوی 0/5M EDTA و 5% لیسارکوزیل 10% و پروتئیناز K 1mg/ml) به مدت 48 ساعت در دمای 55°C انکوبه گردیده در نهایت بعد از 5 مرحله شستشو با بافر 1X TE، برای هضم آنزیمی آماده شدند.

برای هضم آنزیمی در مرحله اول پلاک ها ی آماده شده 2 بار با آب دیونیزه شسته و به منظور آماده شدن جهت هضم آنزیمی به مدت یک ساعت با 100µl بافر آنزیم در دمای اتاق انکوبه شدند. در مرحله بعدی برای هضم DNA نصف هر پلاک آگارز با 100µl بافر آنزیم و 6µl از آنزیم برش دهنده XbaI به مدت 24 ساعت در دمای 37°C انکوبه شدند.

در مرحله انجام PFGE برنامه کلی دستگاه CHEF-DR III جهت حرکت باندهای هضم شده به صورت زمان تعویض میدان 0/5 تا 10 ثانیه به مدت 16 ساعت و 10 تا 17 ثانیه به مدت 4 ساعت مجموعاً 20 ساعت الکتروفورز می باشد. به علاوه فاکتورهای دیگر در دستگاه شامل دمای 14°C، ولتاژ 6 v/cm² و زاویه میدان 120 درجه بود (910). بعد از اتمام الکتروفورز، ژل آگارز از دستگاه خارج شده و بعد از رنگ آمیزی با اتیدیوم برای دیدن دستگاه Transilluminator بررسی شد. بررسی و مقایسه الگوهای PFGE با استفاده از نرم افزار GelcomparII انجام شد.

یافته ها

در بین 100 بیمار مورد مطالعه که کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشتند؛ 46 نفر زن و 54 نفر مرد و دامنه سنی بیماران نیز 1 تا 86 سال بود. 99 درصد بیماران مراجعه کننده ایرانی بوده و تنها یک نفر مهاجر افغانی در جمعیت مورد مطالعه وجود داشت. تمام یک صد نفر شهرنشین بودند و هیچ مراجعه کننده روستایی در جمعیت وجود نداشت. 74% از مراجعه کنندگان ایرانی ساکن شهر تهران بودند. در 42% موارد اسمیر مستقیم مثبت و 58% بقیه اسمیر منفی بود.

سویه های جدا شده از کلیه بیماران از لحاظ تستهای بیوشیمیایی همچون نیاسین، فعالیت کاتالازی (22 و 68 درجه)، احیاء نیترات مثبت بوده و همگی به TCH مقاوم بودند.

فراوانی سویه های مقاوم به ایزونازید 13%، اتیوناماید 61%، استرپتومایسین 37%، ریفامپین 23%، آمبوتول 26% و کانامایسین 21% بود. 71 ایزوله حداقل به یک دارو مقاومت داشته و الگوی مقاومت به تمام داروها در 2% موارد مشاهده گردید. 29% ایزوله های مورد مطالعه نسبت به تمام داروها حساس بوده و 4 مورد سویه MDR مشاهده شد.

میزان مقاومت به یک آنتی بیوتیک در گروه های مختلف آنتی بیوتایی بیشترین درصد (20 درصد) و به دنبال آن مقاومت به دو آنتی بیوتیک (18

شهرستان	نمونه	سن	اسمیر	آنتی بیوگرام
تهران	خط	62	neg	S
تهران	خط	40	neg	S
تهران	خط	24	neg	A1
تهران	بیوپسی	35	neg	S
تهران	ترشح زیر بغل	47	neg	D3
تهران	بیوپسی	27	neg	D3
تهران	خط	73	++	A1
تهران	خط	74	+++	A3
تهران	مایع مفصل	72	neg	C4
تهران	خط	90	neg	C4
تهران	گره نظیر کردن	83	neg	B2
شهر ری	خط	53	+	B6
تهران	خط	47	+	D2
تهران	خط	17	neg	D4
رابطه کریم	خط	68	neg	D4
تهران	خط	32	++	A1
تهران	شیره معده	45	neg	A1
شهر ری	خط	21	neg	S
تهران	خط	59	++	A1
تهران	خط	26	neg	S
شهریار	خط	22	++	A1
کر ج	خط	54	neg	A1
تهران	خط	76	neg	D5
کر ج	شیره معده	65	+	D5
تهران	خط	50	++	D2
تهران	خط	38	+	C7
تهران	خط	39	neg	B2
تهران	نرمال سالین	57	---	S
تهران	بیوپسی	62	neg	D5
تهران	بیوپسی	51	neg	S
تهران	خط	26	neg	S
اسلامشهر	خط	85	++	S
تهران	خط	11	neg	S
تهران	خط	65	neg	A3
تهران	خط	69	neg	S
رابطه کریم	خط	45	++	S
تهران	خط	69	neg	A1
تهران	مایع مفصل	90	neg	D5
زابل	شیره معده	65	+	D5
تهران	خط	51	+	S
تهران	خط	60	+++	B2
تهران	خط	46	neg	B6
تهران	خط	80	neg	D2
تهران	خط	63	neg	A3
رابطه کریم	خط	28	+	S
تهران	خط	27	neg	S
تهران	خط	26	neg	S
تهران	خط	23	neg	A1
تهران	خط	69	neg	A1
تهران	خط	63	neg	A3
تهران	خط	37	+++	S
اسلامشهر	شیره معده	5 months	+++	C5
تهران	خط	61	+	B3
تهران	خط	74	++	D2
تهران	خط	32	+++	C2
شهریار	خط	34	+++	E2
اسلامشهر	خط	84	++	C2
اسلامشهر	بیوپسی	53	++	B4
اسلامشهر	بیوپسی	82	++	B3
تهران	بیوپسی	27	neg	C3
مازندران	خط	38	++	S
تهران	خط	65	neg	D1
تهران	خط	39	+++	C1
تهران	خط	38	neg	B6
تهران	خط	66	neg	D2
تهران	خط	66	neg	D4
تهران	خط	40	neg	F1
رشت	خط	62	neg	A1
تهران	خط	27	neg	A1
تهران	خط	45	neg	S
شهریار	خط	26	neg	S
رامسر	خط	53	neg	S
تهران	خط	59	++	A1
اسلامشهر	خط	79	++	D1
تهران	بیوپسی	51	neg	S
تهران	خط	22	++	A1
تهران	خط	68	neg	C1
تهران	بیوپسی	85	neg	B2
تهران	خط	69	neg	A1
شهرکرد	خط	80	neg	B6
تهران	خط	50	neg	C6
تهران	لایه معده	60	neg	B5
تهران	خط	51	+	S
اسلامشهر	خط	45	neg	D6
تهران	خط	36	neg	A2
تهران	خط	45	++	C8
تهران	شیره معده	68	neg	S
تهران	خط	38	++	S
تهران	خط	80	+++	B1
تهران	خط	53	++	E1
تهران	خط	40	neg	F1
تهران	خط	33	neg	S
تهران	خط	58	neg	A1
اسلامشهر	خط	41	+	B1
تهران	خط	23	+	B2
تهران	خط	67	neg	S
تهران	خط	60	neg	D3
تهران	خط	29	neg	B3
اسلامشهر	خط		neg	S

MDR

MDR

MDR
MDR
HIV

تصویر 3. دندروگرام تنوع ژنتیکی سوبه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

بحث

سل یک بیماری عفونی مزمن است که توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می شود. تا قبل از پیدایش تحقیقات اپیدمیولوژی مولکولی تعیین منبع عفونت بسیار دشوار بود زیرا این باکتری از طریق استنشاق ذرات حاصل از ترشحات تنفسی خارج شده از فرد آلوده و ورود به میزبان مستعد منتقل شده و می تواند به صورت نهفته به عنوان یک عفونت بدون نشانه برای سال ها باقی بماند (12). یک مسئله مهم دیگر در انتقال سل نقش مهاجرت های بین شهری است. یک امکان گسترش و پخش باکتری جمعیت زیادی است که از محل کار در حومه شهر به محل سکونت اولیه برگشته در حالی که آلوده به سل شده و ناقل عفونت می باشند. تحقیقات نشان داد در حدود 90% بیماران مورد مطالعه بین تهران و شهرهای مجاور آن مانند اسلام شهر، شهریار، کرج، رباط کریم و شهرری در گردش هستند لذا اقدامات کنترلی موثرتر به منظور جلوگیری از شیوع بیشتر بایستی بیشتر از گذشته مورد توجه قرار گیرد. نتایج این پژوهش نشان داد یک مهاجر افغانی اسمیر مثبت به لحاظ توبرکلوزیس در جمعیت مورد مطالعه حضور داشته است. با توجه به اینکه کارگران افغانی معمولاً برای شغل به مناطق مختلف کشور مهاجرت می کنند و کمتر در صد درمان هستند می توانند در اشاعه بیماری نقش داشته باشند که نسبت به کنترل بیماری در آنها لازم است اقدامات موثر به عمل آید.

از کل مبتلایان 79% آنان به سل ریوی و 21% به یکی از انواع سل خارج ریوی مبتلا بودند. موارد فوق بیان گر این نکته است که انواع سل در ایران و به ویژه در شهر تهران که 74% نمونه ها را شامل می شد تابع وضعیت کلی این بیماری در سایر مناطق است. در مطالعه عسگرزاده و هم کارانش در سال 2006 از 105 بیمار مورد مطالعه 71 بیمار به استرپتومایسین، اتامپوتول، ایزونیاژید و ریفامپسین حساس بوده و میزان مقاومت به استرپتومایسین 15/2%، مقاومت به ایزونیاژید 9/5%، مقاومت به ریفامپسین 5/7% و یک سویه به اتامپوتول مقاوم بود (13). افزایش درصد سویه های مقاوم و MDR در مطالعه اخیر ما نسبت به مطالعه عسگرزاده به طور واضح افزایش سویه های مقاوم به دارو را نشان می دهد که نیاز به کاربرد تکنولوژی های جدید برای تشخیص سریع سویه های دارای مقاومت دارویی و پیشنهاد راه نمایی جهت توقف مسیر انتقال کاملاً حس می شود.

کاربرد روش های اپیدمیولوژی مولکولی برای نشان دادن شیوع توبرکلوزیس مقاوم به دارو مهم بوده و بکارگرفتن هم زمان از تکنیک های مولکولی و نتایج کشت حساسیت آنتی بیوتیکی یک روش سریع و دقیق برای جدا کردن سویه های مقاوم به دارو می باشد. امروزه در مبحث اپیدمیولوژی بیماری های عفونی مشخص نمودن شباهت های فنوتیپی و ژنوتیپی سویه های مورد مطالعه به منظور درک بهتر در زمینه شیوع یک بیماری در منطقه ای خاص با منشا یک یا چند گونه باکتریایی، راه سرایت و انتقال عوامل عفونی و انتخاب راه صحیح درمان یک نیاز ضروری است (14). مشخصات فنوتیپی ممکن است در مقطعی از زمان و تحت شرایط خاص محیطی دچار تغییرات شوند. به همین دلیل امروزه مطالعه اپیدمیولوژی باکتری ها بر اساس اطلاعات حاصل از DNA ژنومی توصیه می شود که به مراتب دارای ثبات و دقت بالاتری است.

در این مطالعه ما از روش PFGE برای نشان دادن تنوع ژنتیکی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردیم. الگوی قطعات DNA حاصل از هضم آنزیمی ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نشان داد اکثر جایگاه های برش با XbaI حفاظت شده اند، اگرچه تفاوت سویه ها به وسیله مقایسه الگوهای حاصل از برش با آنزیم های محدودالثر حاصل از XbaI کم است اما معنی دار و مهم بوده و می توان سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از یک دیگر تفکیک نمود (14و15). بطور خلاصه مقایسه الگوهای برش آنزیمی حاصل از PFGE در مایکوباکتریوم ها امروزه به عنوان یک روش عملی و قابل اطمینان برای مقایسه سویه ها و تایپینگ این ارگانیسم به حساب می آید و با بکارگیری ژنوم کامل ارگانیسم به جای فوکوس بر روی عناصر تکراری کوتاه و استفاده از پروب های رادیواکتیوی، می تواند قدرت افتراق بیشتری ایجاد

کند. مطالعه انجام شده بر روی یک صد سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه با روش PFGE با آنزیم XbaI نشان داد که این سویه ها تنوع بالایی نداشتند.

در مطالعه Zhang هم چنین قدرت افتراق بیشتر XbaI و SpeI نسبت به AseI و DraI نشان داده شد (5). در مقابل فیض آبادی گزارش کرد DraI پلی مورفیسم بیش تری در مقایسه با XbaI ایجاد می کند (9). این نظریه در خصوص سویه های مورد مطالعه با آنزیم XbaI می تواند مطرح باشد که پلی مورفیسم محدود مشاهده شده در سویه های مورد بررسی ما شاید به دلیل مناطق حفاظت شده جهت برش با XbaI و عدم وقوع موتاسیون در آن مناطق باشد که منجر به ارائه الگوهای محدودی از پالسوتاایپ های شایع در بین سویه های مورد مطالعه گردید. به نظر می رسد گاه استفاده از روش هایی که در بین ایزوله های خاص قدرت تفکیک کم تری دارند می تواند در نشان دادن یکی بودن منشا برخی سویه ها بسیار موثر باشد. مشخص شده است که PFGE typing زمانی که به عنوان یک روش تایپینگ دوم بعد از IS6110-RFLP بکار گرفته شود می تواند 21-35% اطلاعات جدید ایجاد کند بنابراین بهتر است به صورت هم زمان روش های مولکولی دیگر برای تایپینگ این سویه ها بکار گرفته شود تا افتراق ژنتیکی دقیق تری حاصل شود (10).

بر اساس آنالیز نتایج هر دو تایپ شایع در استان تهران، اسلام شهر و رباط کریم وجود داشتند. بر طبق این آمار می توان نتیجه گیری کرد که سویه های شایع هم در تهران و اسلام شهر و رباط کریم هم بین سه منطقه در حال گردش می باشد. که این نکته از حیث درمانی و کنترل این سویه ها بسیار حائز اهمیت می باشد. 29 سویه در Common Type B قرار داشتند که 3/4 سویه های MDR را شامل می شد. این ژنوتاایپ کم جمعیت تر است ولی به لحاظ در برداشتن سویه های چند مقاومتی بیشتر باید به لحاظ پاتوژنیسیته و هم چنین مقاومت آنتی بیوتیکی بیش تر مورد مطالعه قرار گیرد تا راه های جلوگیری از شیوع آن مد نظر باشد.

در طی این مطالعه تنوع ژنتیکی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از آنزیم XbaI در روش PFGE محدود بود و مقادیر افزایش یافته مقاومت به داروهای ضد توبرکلوزیس مشاهده شد که ارتباطی با هیچ کدام از کلون های تفکیک شده در روش PFGE نداشتند ولی به نوبه خود زنگ خطری برای شیوع سویه های چند مقاومتی سل در سطح کشور می باشد. نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد از آنجایی که استفاده از آنزیم XbaI در افتراق سویه های توبرکلوزیس مورد مطالعه دارای قدرت تفکیک بالایی نبود برای اطمینان بیش تر در مورد ارتباط ژنتیکی بین ایزوله ها لازم است مطالعات دوره ای با پیش فرض های آماری دقیق در خصوص انتخاب جمعیتی درست در سایر نقاط کشور و همچنین تهران با استفاده از دیگر روش های مولکولار اپیدمیولوژی در خصوص سویه های توبرکلوزیس با استفاده از روش های مانند اسپولیگوتاایپینگ، Typing IS6110-RFLP بصورت هم زمان برای بررسی تنوع ژنتیکی و افتراق سویه های توبرکلوزیس و برقراری ارتباط بین سویه های جدا شده از مناطق مختلف باید صورت گیرد (16).

قدردانی و تشکر

این پروسه تحقیقاتی در بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور تهران - ایران و با هم کاری دانشکده علوم پایه دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم - ایران انجام شد. نویسندگان این مقاله سپاس گزار جناب آقای دکتر پورشفیع در گروه باکتری شناسی انستیتو پاستور ایران برای هم اهنگی جهت استفاده از نرم افزار GelcomparII هستند.

REFERENCES

1. Baptista F.D, Oelemann M.C, Araujo Opromolla D.V, Noel Suffys P. Drug resistance and Genotypes of Strains of Mycobacterium tuberculosis Isolated from Human Immunodeficiency Virus-infected and Non-infected Tuberculosis Patients in Bauru, Sao Paulo, Brazil. *Rio de Janeiro* 2002, 1147-1152.
2. Small PM, Shafer RW, Hopewell PC, Singh SP, Murphy MJ, Desmond E, Sierra MF, Schoonik GK: Exogenous reinfection with multidrug-resistant Mycobacterium tuberculosis in patients with advanced HIV infection. *N Engl J Med* 1993, 328:1137-114.
3. Hughes VM, Stevenson K, Sharp JM. Improved preparation of high molecular weight DNA for pulsed-field gel electrophoresis from mycobacteria. *J Microbiol Methods* 44 2001 209-215.
4. Olson E.S, Forbes K.J, Watt B and Pennington T.H. Population genetics of Mycobacterium tuberculosis complex in Scotland analysed by pulsed-field gel electrophoresis. *Epidemiol. Infect.* 1995. 114:153-160.
5. Zhang Y, Mazurek G.H, Cave M.D, Eisenach K.D, Pang Y, Murphy D.T, and Wallace R.J. DNA polymorphisms in strains of Mycobacterium tuberculosis analyzed by pulsed-field gel electrophoresis: a tool for epidemiology. *J. Clin. Microbiol. Jr.* 1992. 30:1551-1556.
6. Birren B, Lai E. Preparation of DNA for pulsed field analysis. *Pulsed Field Gel Electrophoresis: A Practical Guide.* Academic Press, London, 1993. pp. 25-74.
7. Brooks, Carroll , Butel, Morse. 2007, Jawet's Medical Microbiology.
8. Bannalilar A.S, Rishendra V. Detection of Mycobacterium avium & M.tuberculosis from human sputum cultures by PCR-RFLP analysis of hsp65 gene & pncA PCR. *Indian J Med Res.* 123 February 2006 ;165-172.
9. Feizabadi M, Robertson I.D, Edwards D.V. Genetic differentiation of Australian isolates of Mycobacterium tuberculosis by pulsed-field gel electrophoresis. *J. Microbi. Cousins, and D. J.Hampson.* 1997. ol. 46:501-505.
10. Charvin M, Rastogi N. A easy and rapid method for isolation of entire mycobacterial genome for application in pulsed-field gel electrophoresis. *Curr. Microbiol. Vincent Levy- Frebault, V.,* 1991. 22,327-331.
11. Asgharzadeh M, yousefee S, kafil HS, Nahaei MR, Ansarin K, Akhi MT. Comparing transmission of Mycobacterium tuberculosis in East Azarbaijan and west Azarbaijan provinces of iran by using IS6110 RFLP method. *Biotechnol.* (2007b). 6:273-277.
12. Asgharzadeh M, Shahbadian K, Majidi J, Aghazadeh AM, Amini C, Jahantabi AR, and Rafi A. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of Mycobacterium isolates from East Azarbaijan province of Iran. *Mem inst oswaldo cruz.* (2006).101:517-521.
13. Allardet-Servent A, Bouziges N, Carles-Nurit MJ, Bourg G, Gouby A, and Ramuz M. Use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases for DNA analysis in epidemiological investigations of nosocomial bacterial infections. *J. Clin. Microbiol.* 1989.27:2057-2061.
14. Singh P, Salamon H, Lahti C.J, Farid-Moyer M, Small P.M 1999. Use of pulsed field gel electrophoresis for molecular epidemiologic and population genetic studies of Mycobacterium tuberculosis. *J. Clin. Microbiology.* 1999.37, 1927-1931.
15. Silbert SL, Boyken R, and Pfaller MA. improving typeability by pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn. Microbiol. Infect.* 2003. Dis.47: 619- 621.
16. Goyal M, Nsaunders J, Vanemden DA , Young DB, Shaw RJ. Differentiation of Mycobacterium tuberculosis Isolates by Spoligotyping and IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism. *J Clinical Microbiology* Mar.1997,p.647-651