Archive of SID

دو فصلنامه طبّ جنوب
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال پنجم، شماره ۲، صفحه ۱۱۱-۱۰۳ (اسفند ۱۳۸۱)

اپیدمیولوژی ملکولی سل با استفاده از تکنیک RAPD-PCR دراستان فارس

محمد علی حقیقی*[۱]، دکترمحمد حسین معتضدیان[۲] ، فرحانه آل یاسین [۳]، دکتر رضا قانع شیرازی[۴]

[۱] کارشناس ارشد میکروب شناسی، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر
[۲] استادیار گروه انگل شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۳] کارشناس ارشد میکروب شناسی ، دانشکده پزشکی ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز
[۴] فوق تخصص بیماری های عفونی ، مرکز تحقیقات سل استان فارس

چکیده :
انگشت نگاری ملکولی ژنومی با استفاده از تکنیک RAPD- PCR می تواند سویه های مایکوباکتریوم توبر کولوزیس را شناسایی نماید. بررسی پلی مورفیسم ژنومی این باکتری می تواند در ردگیری شیوه انتقال آن سودمند باشد. جهت شناسایی گوناگونی ژنومی سویه های میکوباکتریوم توبرکولوزیس استان فارس، تعداد ٤٥ نمونهٔ جدا شده از بیماران (۱۷ نفر ایرانی ، ۲۸ نفر افغانی) مراجعه کننده به بخش تحقیقات ریوی مرکز بهداشت استان فارس با استفاده از تکنیک RAPD توسط سه پرایمر انتخاب شده مختلف ، به طور مجزا مورد مطالعه ژنومیک قرار گرفتند. تمام ٤٥ نمونه از لحاظ آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی متعلق به گونه مایکوباکتریوم توبر کولوزیس بوده و از لحاظ گوناگونی ژنومی در پنج گروه مختلف (A-E) جای گرفتند. در گروه A شش سویه و چهار سویه دو به دو، صد در صد ازلحاظ ژنومیک مشابه یکدیگر بودند ؛ در گروههای E,D,C نیز به ترتیب دو ، چهار و هشت سویه دو به دو ، صد در صد شباهت ژنومی داشتند. در یک فرا گرد تحلیلی به نظر می رسد که به دلیل پلی مورفیسم محدود در سوش های مایکوباکتریوم تیپر کولوزیس استان فارس ، شیوه انتقال بیماری سل در این استان اکنون بیشتر از طریق سرایت می باشد تا فعال شدن کانون های نهفته داخلی .

واژگان کلیدی: سل، گوناگونی ژنومی، پلی مورفیسم DNA ، انگشت نگاری ملکولی DNA ، RAPD-PCR

* آدرس : بوشهر ، خیابان معلم ، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر – مدیریت پژوهشی ، محمدعلی حقیقی، صندوق پستی : ۳۶۳۱

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

بیماری سل در طول دهه های گذشته همواره یکی از معضل های بهداشتی جهان بوده است. در سال ۱۹۸۲ کارشناسان خوش بینانه به این دل بسته بودند تا بیماری در سطح جهان مهار گردد (۱)، ولی با اپیدمی شدن بیماری ایدز و با سهل انگاری در برنامه های کنترل سل، هم اکنون شاهد موارد فراوانی از این بیماری در جهان هستیم (۲) . در سال ۱۹۹۳ از سوی سازمان بهداشت جهانی، سل به عنوان یک فوریت جهانی اعلام شد. سالانه در حدود ۸ میلیون نفر به این بیماری مبتلا شده و ۳ میلیون نفر در اثر ابتلای به این بیماری از بین می روند و شیوع آن در بین کودکان و بزرگسالان رو به افزایش است (٤-۳).

آینده سل در کشور ما به دلیل افزایش مهاجرت ها، بروز جنگ و مشکلات اقتصادی در کشورهای آلوده همسایه، از اپیدمی نوین بیماری سل که از دو دهه اخیر آغاز شده جدا نمی باشد و مشکل سل هم اکنون در استان های شرقی و جنوبی ایران بیشتر از سایر نقاط کشور می باشد(۵).

سل بیماری کاملاً مسری است که بیشتر دستگاه تنفسی تحتانی را تحت تأثیر قرار می دهد و از طریق هوا از شخصی به شخص دیگر انتقال می یابد. عامل اصلی این بیماری مایکوباکتریوم توبر کولوزیس ، عضوی از خانواده مایکوباکتریوم ها می باشد و انسان تنها مخزن این باکتری محسوب می شود.

در مطالعات اکولوژی و اپیدمیولوژی که تشخیص گونه و سویه های یک باکتری حائز اهمیت است، طبقه بندی و تشخیص گونه های مختلف باکتری ها به طور معمول بر اساس خصوصیات مرفولوژیکی ، احتیاجات غذایی ، مقاومت دارویی ، مقایسه های ایزوآنزیمی و فاژتایپینگ انجام می شود. در مورد بیماری خطرناکی همچون سل ، مطالعات اپیدمیولوژی ، تشخیص موارد جدید و پیگیری راه انتقال نقش بسیار مهمی را در برنامه ریزی های اصولی جهت مهار این بیماری ایفا می کند.

به طور کلاسیک در تشخیص سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبر کولوزیس در تحقیقات اپیدمیولوژیک بیماری سل از تکنیک فاژتایپینگ استفاده می شود(٦). اما اخیراً در تشخیص گونه و سویه های مختلف میکروبی از تکنیک های متکی بر ملکول DNA استفاده شده است . این روش ها به لحاظ اینکه متکی بر ژنوم ارگانیزم بوده و ارتباط ژنومی بین گونه های مختلف را شناسایی می نمایند از اهمیت زیادی بر خوردارند و به همین دلیل اخیراً در تحقیقات اپیدمیولوژی سل، روش انگشت نگاری ژنومی DNA که با استفاده از پلی مورفیسم ژنومی ارتباط بین سویه ها و گونه های مختلف را به دقت زیاد مشخص می نماید کاربرد وسیعی پیدا کرده است.(۹-٦).

انگشت نگاری ژنومی که تا چندی قبل با استفاده از RFLP و آنزیم های اندونوکلئاز انجام می گرفت، با ابداع تکنیک PCR و تحول در بیولوژی ملکولی، تغییر پیدا کرد. هم اکنون تکنیک RAPD-PCR با استفاده از پرایمرهای یونیورسال ، ابزار بسیار مناسبی جهت انگشت ملکولی DNA بوده و پلی مورفیسم ملکول DNA را به خوبی مشخص می کند(۱۰). بنابراین در این مطالعه ما به کمک این تکنیک در صدد آن هستیم که اپیدمیولوژی ملکولی سل در استان فارس را جستجو نموده و مشخص کنیم که موارد سل این استان از طریق انتقال شخص به شخص صورت گرفته است یا از طریق فعال سازی کانون های نهفته در این اشخاص.

مواد و روش ها

هفت گونه مایکوباکتریوم استاندارد از مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی واقع در بیمارستان مسیح دانشوری تهران تهیه گردید : این مایکوباکتریوم ها شامل مایکوباکتریوم آفریکانوم (MYC ۱٤۰۰-۳۰۰۱۲) ، آویوم تایپ 1 (MYC۲۲۱)، مایکوباکتریوم بوویس (ATCC ۱۹۲۱۰) ، مایکوباکتریوم گاستری (ATCC ۲۵۲۲۰) ، مایکوباکتریوم ترا (۲٤۰۳ MYC) ، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (RV ۳۷) و مایکوباکتریوم اولسرانس(ATCC۱۹۴۲۲) بودند.

تعداد٤۵ نمونه از مایکو باکتریوم توبرکولوزیس مورد مطالعه در این تحقیق از بیماران مراجعه کننده به آزمایشگاه بخش تحقیقات سل و بیماری های ریوی مرکز استان فارس در فاصله سال های ۷۷ – ۱۳۷۵ تهیه شد. اکثر نمونه های

www.SID.ir

Archive of SID

ادرار – شستشوی معده ، بیوپسی از بافت های مختلف، مورد بررسی قرار گرفتند. در بین نمونه های ارسالی تنها نمونه هایی که از آبسه شدن آدنیت به علت تزریق واکسن به کودکان ارسال شده بود مورد بررسی قرار نگرفت. نمونه های مورد مطالعه در این تحقیق، افراد افغانی و ایرانی می باشند نمونه های افراد ایرانی اکثراً محدود به استان فارس بوده و تعداد محدودی نیز مربوط به استان بوشهر بوده اند.

الف- کشت و جداسازی DNA

تمامی مایکوباکتریوم های جدا شده از بیماران و استاندارد بر روی محیط کشت لوونشتین و دوبوس برات تغییر یافته کشت داده شد. با انجام آزمایش های کنترل کیفی و رنگ آمیزی اسید فاست پس از اطمینان از خالص بودن کشت ، ابتدا دولوپ کامل از مایکوباکتری ها در بافر TE (10mM Tris-Cl-1mM EDTA) جمع آوری و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام بخار آب ۷۰ درجه سانتیگراد غیر فعال و جهت استخراج DNA با روش آنزیمی M4 مطابق زیر مورد استفاده قرار گرفت(۱۱).

به سوسپانسیون شسته شده و غیر فعال گشته باکتری به میزان ۲ میلی گرم در میلی لیتر آنزیم لیزوزیم افزوده و سپس به مدت ۲/۵ ساعت در حمام بخار آب ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. در مرحله بعد آنزیم پروتئیناز K به مقدار ۰/۳ میلی گرم در میلی لیتر، سدیم دودسیل سولفات (SDS) به مقدار ۰/۰۳ گرم در هر میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی (۳٪) اضافه ودر حمام بخار آب ٥٦ درجه سانتیگراد به مدت ۲/۵ ساعت قرار داده شد. پالایش DNA از مواد لیز شده سلول مایکوباکتریوم ها با تکنیک فنل /کلروفرم /ایزوآمیل انجام گرفت (۱۲). در این روش به حجم مساوی از مواد لیز شده در مرحله قبل، مخلوط فنل / کلروفرم/ایزوآمیل به نسبت ۲۴:۱: ۲۵ اضافه و با روش استاندارد با استفاده از الکل مطلق و قرار دادن در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد به مدت یک شب DNA رسوب داده شد. سپس به کمک سانتریفیوژ با شتاب ۱۲۰۰۰g رسوب DNA جدا و پس از شستشو با الکل ۷۰ درجه به منظور جداسازی از باقیمانده محلول SDS،DNA رسوب یافته در بافر T.E مجدداً حل و تا هنگام استفاده بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. غلظت DNA بایستی در تمام واکنش ها یکسان باشد و به همین دلیل با استفاده از روش اسپکتوفوتومتری و جذب نوری ۲٦۰ نانومتر غلظت DNA دورشته ای براساس فرمول $C=\frac{A260}{0.02}$ با دقت میکروگرم در میلی لیتر محاسبه گردید.

ب- روش های تشخیصی باکتری های مجهول

در این تحقیق گونه های مجهول با آزمایش های استاندارد بیوشیمیایی و RAPD-PCR مورد شناسایی قرار گرفته ودر پایان برای اطمینان از نتایج RAPD-PCR ، نتایج به دست آمده با نتایج آزمایش های بیوشیمیایی مقایسه شدند. در مرحله بعد سویه های مختلف مایکوباکتریوم توبرکولوزیس با محاسبه ضرایب شباهت ژنومی با یکدیگر مقایسه و تقسیم بندی شدند.

در این بررسی برای هر مایکوباکتریوم مجهول، حداقل ۱۰ آزمایش بیوشیمیایی (نیاسین . احیای نیترات و تلوریت ، هیدرولیز توئین ۸۰ ، پیرازینامید ، اوره آز ، رشد بر روی مک کان کی بدون کریستال ویوله ، حساسیت به T.C.H و مقاومت به نمک طعام ۵٪ ، رنگ زایی و سرعت رشد) انجام شده است، و نتایج به دست آمده با جداول بیوشیمیایی استاندارد جهت تعیین جنس و گونه مایکوباکتریوم مجهول مقایسه شده است(۱۳).

ج- آزمایش RAPD-PCR

در ابتدا با انجام آمایش PCR در حجم ۲۵ میکرولیتر ، مقادیر ۵۰ نانو گرم DNA ، ۱/۵میکرولیتر پرایمر ، ۱/۵ یونیت آنزیم Taq-DNA پلی مراز ۰/۲۵ میلی مول از مخلوط dNTP و ۲۵ میلی مول MgCL2، ۵۰ میلی مول بافرTris -KCL با PH= ۸/٤ و ۵۰ میکرولیتر روغن معدنی استریل، کلیه گونه های کند رشد بدون رنگدانه با استفاده از ۱۵ پرایمر به طور مجزا با برنامه ریزی ماشین PCR (ساخت Progene انگلستان) مورد ارزیابی قرار گرفت. در انجام آزمایش های PCR از روش چند برنامه ای در برنامه ریزی ماشین PCR استفاده شد. این روش دارای سه برنامه به هم پیوسته می باشد که در برنامه اول مخلوط PCR تهیه شده مطابق قبل به مدت ۵ دقیقه در دمای ۹٤ درجه سانتیگراد ، ۱ دقیقه در دمای ۳۵ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد و در برنامه دوم ٤۰ مرتبه هر بار ۱ دقیقه در

www.SID.ir

Archive of SID

دمای ۹۴ درجه سانتیگراد ، ۱ دقیقه ۳۵ درجه سانتیگراد و ۲ دقیقه در ۷۲ درجه سانتیگراد و در ادامه برنامه سوم به مدت ۵ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد نگهداری شد ودر پایان واکنش نمونه ها از دستگاه خارج و در دمای ٤ درجه سانتیگراد تا زمان الکتروفورز نگهداری شد.

از بین پرایمرهای آزمایش شده، پرایمرهای جدول شماره (۱) به عنوان پرایمرهایی که پلی مورفیسم را بین گونه های کند رشد بدون رنگدانه به خوبی نشان داده و قادر به تشخیص و افتراق هر یک از گونه های استاندارد می باشند جهت بررسی فاصله ژنومی و قرابت بین این گونه ها انتخاب شدند.

جدول شماره ۱ : خصوصیات انواع پرایمرهای انتخاب شده در شناسایی پلی مورفیسم مایکوباکتریوم های کند رشد بدون رنگدانه

پرایمر	توالی نوکلئوتیدها (5'-3')	درصدGC
۳۰۱	CGGTGGCGAA	۷۰
۳۰۴	AGTCCTCGCC	۷۰
۳۰۸	AGCGGCTAGG	۷۰
۳۵۴	CTAGAGGCCG	۷۰
۳۷۷	GACGGAAGAG	۶۰
۳۹۹	TTGCTGGGCG	۷۰

از آنجایی که کلنی مایکوباکتریوم های بدون رنگدانه تفاوت های مرفولوژیکی قابل تمیزی با یکدیگر ندارند و می توانند با یکدیگر اشتباه شوند. بنابراین مایکوباکتریوم های استاندارد بدون رنگدانه و کند رشد در یک گروه جهت تشخیص و تمیز آنها از یکدیگر قرار داده شدند. در خانواده مایکوباکتریوم ها، گونه های بدون رنگدانه در کمپلکس های توبرکولوزیس، آویوم و ترا قرار دارند. به لحاظ اهمیت کمپلکس توبرکولوزیس، تمامی اعضای استاندارد این کمپلکس جهت مطالعه انتخاب شده اند. از مایکوباکتریوم، آویوم فراوانترین گونه های بیماری زا در انسان یعنی مایکوباکتریوم آویوم و مایکوباکتریوم گاستری انتخاب شدند و از کمپلکس ترا تنها یک گونه به عنوان نماینده این کمپلکس انتخاب شده است.در مرحله بعد- از پرایمرهای ۳۰۱-۳۰٤ -۳۰۸ برای تشخیص هر یک از گونه های مجهول بدون رنگدانه به طور مجزا در کنار مایکوباکتریوم های استاندارد، آزمایش RAPD-PCR انجام و از مقایسه ضریب شباهت ژنومی نمونه مجهول با هریک از مایکوباکتریوم های استاندارد گونه، مایکوباکتریوم مجهول شناسایی شد. جهت بررسی ضریب شباهت ژنومی ٤۵ سویه مایکوباکتریوم مجهول جدا شده از بیماران (۱۷ ایرانی ، ۲۸ افغانی) از پرایمرهای ۳۰۱ و ۳۰۸ استفاده شد. در هر آزمایش PCR از یک واکنش بدون DNA به عنوان کنترل منفی و از یک مارکر ملکولی در هنگام الکتروفورز استفاده گردید.

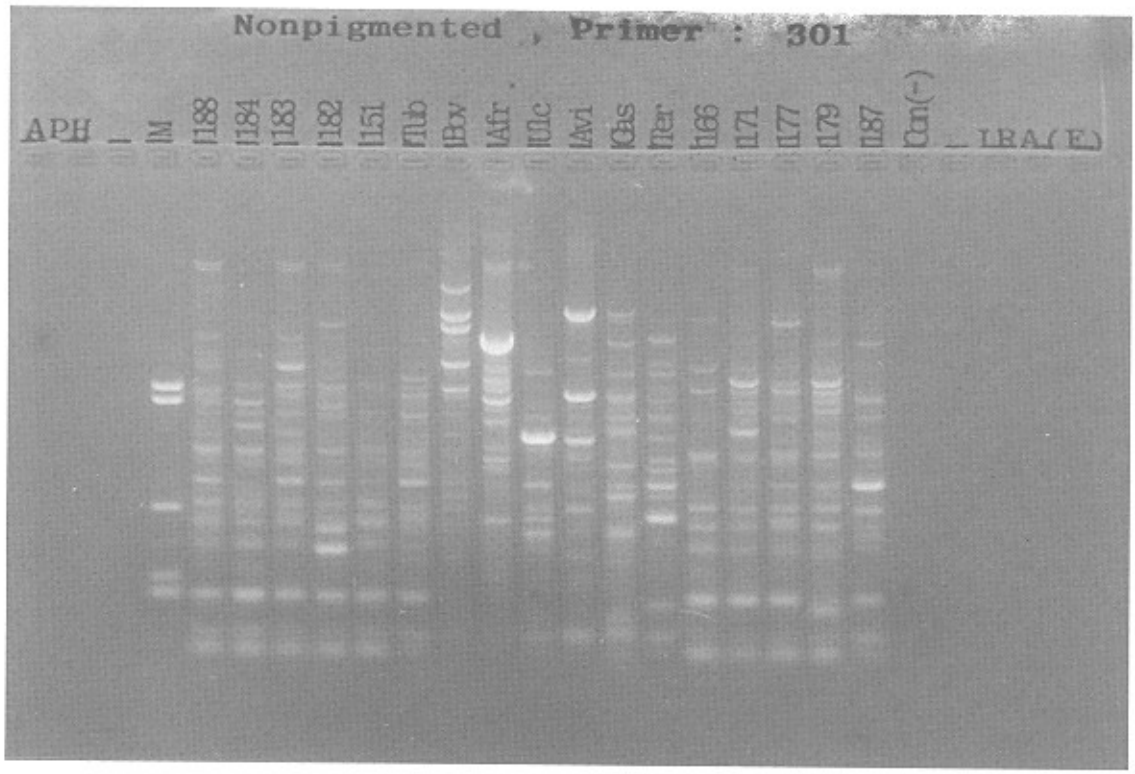
پس از انجام آزمایش های PCR ، نتایج آزمایش به وسیله رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۵ در صد در زیر اشعه u.v، مشاهده و نتایج مربوط به هر پرایمر بلافاصله به وسیله دوربین عکاسی ثبت گردید و با استفاده از فرمول Jaccards ضریب شباهت ژنومی و ترسیم ماتریس شباهت و قرابت ژنومی بین گونه های مجهول و سوش های استاندارد به صورت فنوگرام رسم گردید(۱۲ و ۱٤).

نتایج

تمام ٤۵ نمونهٔ جدا شده از بیماران در این مطالعه ، بر اساس آزمایش های بیوشیمیایی استاندارد، متعلق به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بودند. ضریب تشابه پلی مورفیسم ژنومی این نمونه ها توسط پرایمرهای تشخیصی ۳۰۱،۳۰٤ و ۳۰۸ با گونه های استانداردمایکو باکتریوم توبرکولوزیس همسان بود.

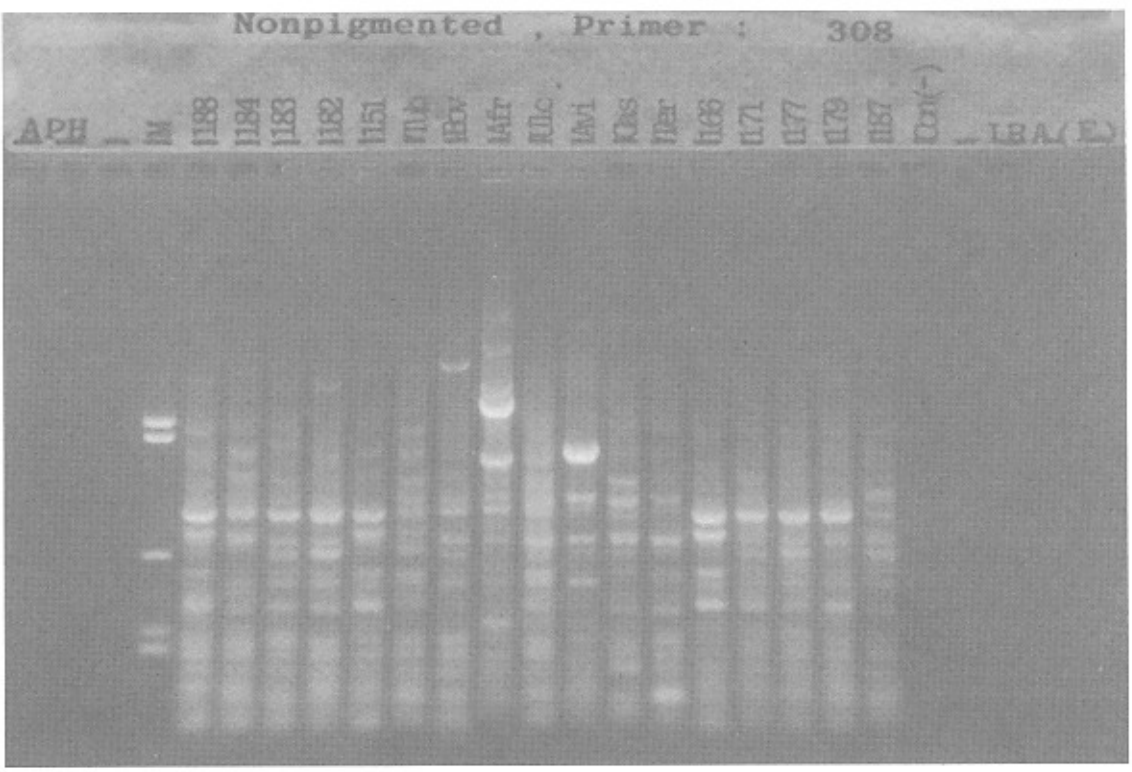
www.SID.ir

Archive of SID



عکس شماره (۱) پلی مورفیسم مایکوباکتریوم های کندرشد بدون رنگدانه با استفاده از پرایمر ۳۰۱ با تکنیکRAPD-PCR

APH : مشخص کننده ملیّت افغانی شماره بیمارانی است که در سمت چپ در عکس قرار دارند. IRA(F) : مشخص کننده ملیت ایرانی و فارسی بیمارانی است که در سمت راست در عکس قرار دارند.M : مارکر وزن ملکولی DNA. CON(-) : کنترل منفی Tub : مایکوباکتریوم توبرکولوزیس استاندارد Afr : مایکوباکتریوم افریکانم استاندارد Gas : مایکوباکتریوم گاسثری استاندارد Bor: مایکروباکتریوم بویس استاندارد Ulc مایکوباکتریوم اولسرانس استاندارد Ter: مایکوباکتریوم ترای استاندارد Avi : مایکروباکتریوم آویوم استاندارد .

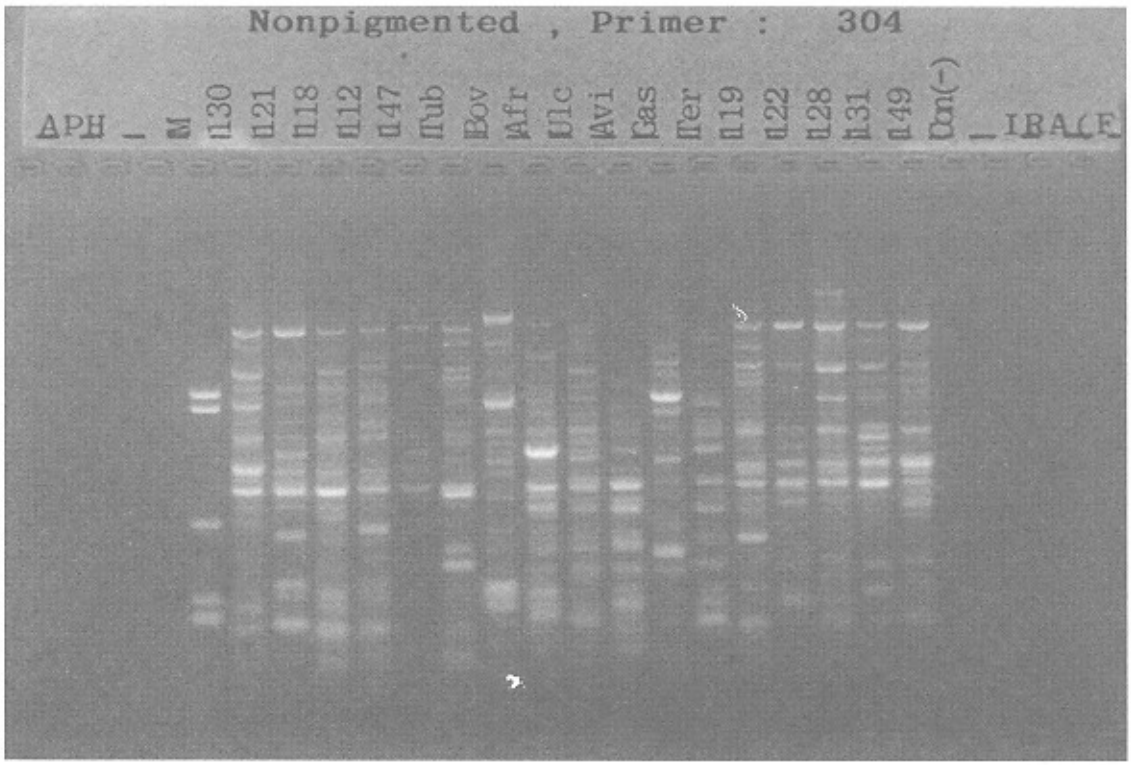


عکس شماره (۲) پلی مورفیسم مایکوباکتریوم های کندرشد بدون رنگدانه با استفاده از پرایمر ۳۰۸با تکنیکRAPD-PCR

APH : مشخص کننده ملیّت افغانی شماره بیمارانی است که در سمت چپ در عکس قرار دارند. IRA(F) : مشخص کننده ملیت ایرانی و فارسی بیمارانی است که در سمت راست در عکس قرار دارند.M : مارکر وزن ملکولی DNA. CON(-) : کنترل منفی Tub : مایکوباکتریوم توبرکولوزیس استاندارد Afr : مایکوباکتریوم افریکانم استاندارد Gas : مایکوباکتریوم گاسثری استاندارد Bor: مایکوباکتریوم بویس استاندارد Ulc: مایکوباکتریوم اولسرانس استاندارد Ter: مایکوباکتریوم ترای استاندارد Avi : مایکروباکتریوم آویوم استاندارد .

www.SID.ir

Archive of SID



عکس شماره (۳) پلی مورفیسم مایکوباکتریوم های کندرشد بدون رنگدانه با استفاده از پرایمر ۳۰۸با تکنیکRAPD-PCR

APH : مشخص کننده مایت افغانی شماره بیمارانی است که در سمت چپ در عکس قرار دارند IRA(F) : مشخص کننده مایت ایرانی و فارسی بیمارانی است که در سمت راست در عکس قرار دارند M : مارکر وزن ملکولی DNA
(-)CON: کنترل منفی Tub : مایکوباکتریوم توبرکولوزیس استاندارد Afr : مایکوباکتریوم افریکانم استاندارد Gas : مایکوباکتریوم گاسدری استاندارد Bor: مایکروباکتریوم بویس استاندارد Ulc: مایکروباکتریوم اولسرانس استاندارد Ter: مایکروباکتریوم ترای استاندارد Avi : مایکروباکتریوم آویوم استاندارد .

تصاویر ۱ ، ۲ و ۳ نمایانگر پلی مورفیسم مایکوباکتریوم های کندرشد بدون رنگدانه با استفاده از پرایمرهای ۳۰۱ ، ۳۰۸ و۳۰٤ بااستفاده از RAPD-PCR می باشند . چهل و پنج سویه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس که با پرایمرهای ۳۰۱ ، ۳۰٤ و ۳۰۸ بررسی شدند، از لحاظ تنوع ژنومی در پنج گروه متفاوت جای گرفتند(فنوگرام۱). سوش های ۱۷۳ ، ۱۳۰، ۱۱۱ ، ۱۰۹ ، ۱۰۷ و ۱۰٦ از زیر گروه S A، صد در صد یکسان بودند. سوش ۱۱۰ بیمار افغانی با ۱۲۲ ایرانی کاملاً یکسان و شباهت بالاتر از ۹۵ در صدنیز نسبت به سایر گروهها، به زیر گروه S A نشان دادند. همین قرابت نیز برای سوش ۱۰۲ ایرانی و ۱۰۸ افغانی قابل تعمیم بود.

در گروههای D,C و Eنیز به ترتیب دو ، چهار و هشت سویه، دو به دو صد در صد شباهت ژنومی داشتند.

بحث

مقایسه شباهت های ژنومی ٤۵ مایکوباکتریوم توبرکولوزیس مورد مطالعه در این پژوهش نشان داد که براساس گوناگونی ژنومی می توان آنها را در پنج گروه (A-E) تقسیم بندی نمود.

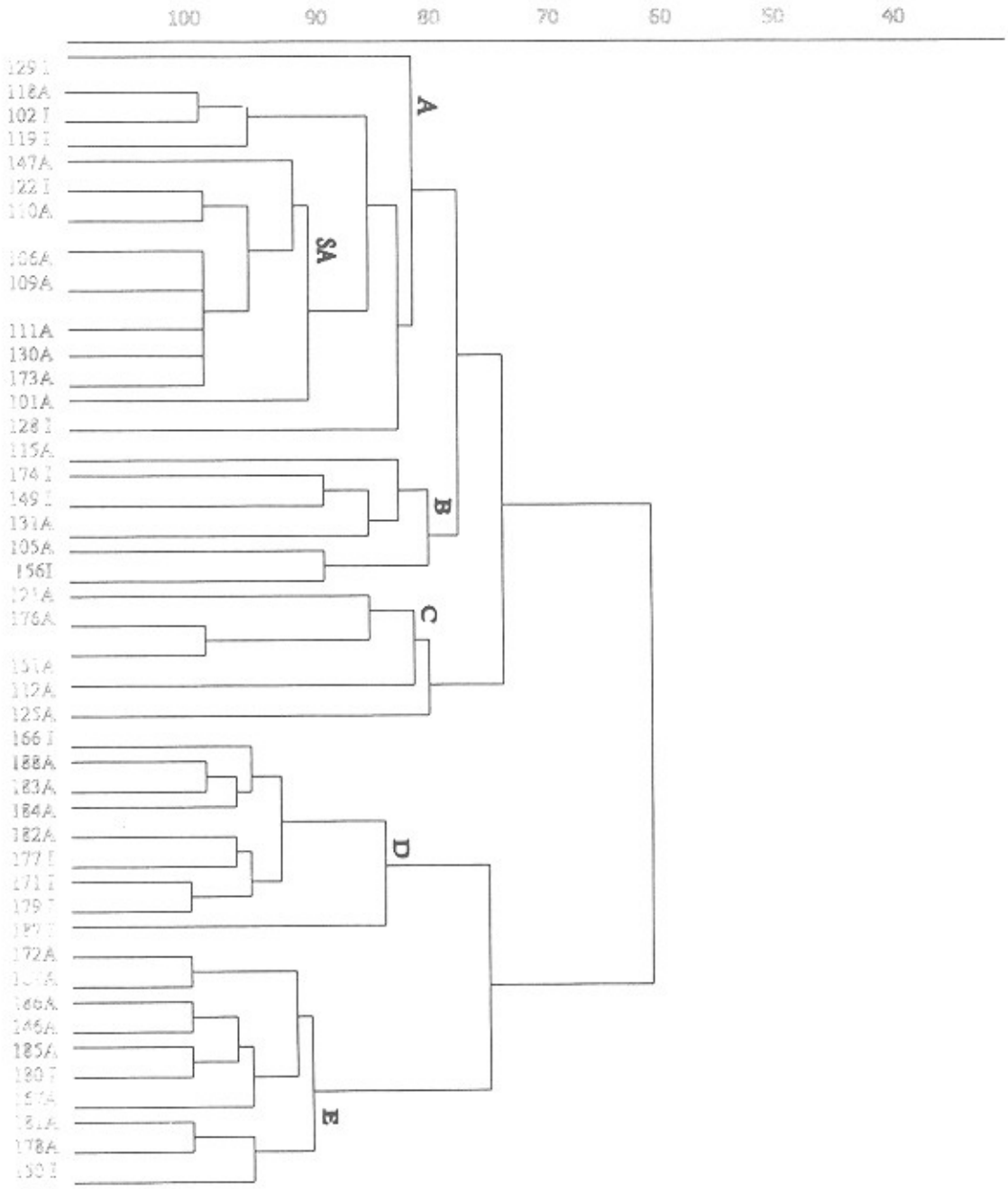
بعضی از سوش های از افراد مختلف، صد در صد با یکدیگر یکسان هستند که نشان دهنده این موضوع است که این افراد توسط یک منبع یکسان آلوده شده و شاید بتوان گفت در اثر تماس بسیار نزدیکی که در جامعه داشته اند بیماری را از یکدیگر گرفته باشند.

اکثر بیماران گروه A افغانی هستند؛ بعضی از سویه های افغانی این گروه مثل ۱۷۳ ، ۱۳۰ ، ۱۱۱ ، ۱۰۹، ۱۰۷ ، ۱۰٦ (زیر گروه S A) ۱۰۰ در صد یکسان هستند. سویه ۱۱۰ افغانی با سویه ۱۲۲ ایرانی کاملاً یکسان است و شباهت بیشتر از ۹۵ در صد را نسبت به سایر گروهها به زیر گروه S A نشان داده اند.

البته همین توضیح نیز در مورد سویه ۱۰۲ ایرانی با ۱۱۸ قابل تعمیم است ، بنابراین شباهت بیشتری که با این گروه

www.SID.ir

Archive of SID



فنوگرام (۱) : رابطه گوناگونی ژنومی مایکروباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده از افراد ایرانی و افغانی
با استفاده از پرایمرهای ۳۰۱ و ۳۰۸ و RAPD-PCR
اعداد محور عمودی به درصد و اعداد محور افقی شماره بیماران می باشند (ایرانی - I و افغانی - A)

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داده به نظر می رسد که این افراد ایرانی با سوش های افغانی آلوده شده باشند و بنا به توضیحات داده شده به نظر می رسد که بیماران ۱۸۰ و ۱۵۰ ایرانی از گروه E با سوش های افغانی این گروه آلوده شده اند. گروه C شامل عده ای از سوش های افغانی است که شباهت بین آنها نسبت به سایرین کمتر است(۸۰٪)؛ در همین گروه به نظر می رسد که بیمار ۱۵۱ و ۱۷٦ از یک منبع مشترک آلوده گردیده اند و با توجه به افغانی بودن ، بیماری را از یکدیگر گرفته باشند.

گروه B شامل بیماران ایرانی است و از آنجایی که سویه جدا شده از بیمار ۱۱۵ شباهت بیشتری را با سویه های این گروه نسبت به سایر گروهها نشان می دهد به نظر می رسد که این بیمار افغانی با سویه ایرانی آلوده شده باشد. با توجه به گروه D که تأثیر سویه های مختلف را روی هر دو جمعیت بهتر نشان می دهد و با توجه به نتایج بدست آمده از سایر گروهها، می توان نتیجه گرفت که هر دو جمعیت ایرانی وافغانی تحت تأثیر یکدیگر هستند و عامل بیماری در بین آنها و از جمعیتی به جمعیت دیگر انتقال می یابد و این نتیجه از آنجایی که هر دو جمعیت در یک موقعیت جغرافیایی زندگی می کنند و از لحاظ اجتماعی نیز تماس زیادی با یکدیگر دارند، منطقی به نظر می رسد.

تعداد زیاد موارد ۱۰۰٪ مشابه در سوش های افغانی وشباهت ژنومی بیش از ۸۰٪ در بین سوش های هر گروه، احتمالاً ناشی از رفتارهای خاص اجتماعی آنها می باشد . بیماری سل بیماری مسری است که در اجتماعات شلوغ از فردی به فرد دیگر انتقال می یابد. افغانی های ایران به دلیل موقعیت خاص اجتماعی و اقتصادی که دارند نسبت به جمعیت ایرانی در اجتماعات متراکم تری قرار دارند، معمولاً به صورت گروهی کار کرده و به دلایل اجتماعی با یکدیگر رفت و آمد بیشتری دارند ، بنابراین شیوع بالای بیماری سل در بین آنها طبیعی به نظر می رسد و همین شیوع بیشتر احتمالاً سبب شباهت ژنومی بیشتر سوش های افغانی مورد مطالعه در این تحقیق شده است.

به دلیل تنوع زمانی، ومکانی و امکان وقوع موتاسیون های متنوع در گذر زمان ، بر روی سل در یک جامعه که به دلیل فعال شدن کانون های خفته می باشد، و با پلی مورفیسم بسیار بالایی در مایکوباکتریوم توبرکولوزیس همراه است در حالی که بروز سل به دلیل انتقال و سرایت باکتری سل در یک جامعه، با پلی مورفیسم محدود همراه است. مثلاً در هلند که سل از طریق فعال شدن عفونت خفته در جمعیت پیر جامعه روی می دهد با پلی مورفیسم بالایی از مایکوباکتریوم توبر کولوزیس روبرو هستیم (فرابت ژنومی کم) ولی در سوش های افریقایی که سرایت عفونت، جامعه جوان را در گیر کرده است باپلی مورفیسم محدودی ازباکتری روبرومی شویم(٦).

در تحقیق آقای هارن و همکاران از شهر تایپه تایوان (۱۰) با بررسی ٦٤ سوش از مایکوباکتریوم توبر کولوزیس این سوش ها در ۷۹/۷ در صد در پنج گروه ژنومی قرار داشته و ۲۱/۳ در صد نیز گوناگونی – ژنومی منحصر بفرد داشتند. این پژوهشگران چنین نتیجه گرفتند که شیوع بیماری سل در تایپه عمدتاً از طریق سرایت است نه از طریق فعال شدن کانون های خفته مایکوباکترویوم توبرکولوزیس .

با توجه به اینکه ٤٥ سویه مورد مطالعه ما بر اساس شاخص حداقل ٦٥ در صد تشابه ژنومی در ۵ گروه جای گرفتند می توان چنین نتیجه گرفت که شیوع بیماری سل در منطقه استان فارس بیشتر از شیوع سرایت تبعیت می کند نه از طریق فعال سازی و این یافته حاکی از آن است که سیستم های نظام مراقبت از بیماری در سطح این استان می بایست اقدامات ویژه اپیدمیولوژیک را مد نظر قرار دهند.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از کلیه عزیزانی که در این پژوهش ما را مورد لطف و حمایت علمی خود قرار دادند سپاسگزاری می گردد. از استاد ارجمند جناب آقای دکتر قاضی سعیدی و آزمایشگاه سل بیمارستان مسیح دانشوری که در موفقیت این پژوهش سهم بسزایی داشتند، قدردانی می گردد.

از بخش تحقیقات ریوی مرکز بهداشت استان فارس و پرسنل محترم آزمایشگاه سل بخصوص آقای حسنی و صادقی تشکر می گردد.

www.SID.ir

Archive of SID

REFERENCES:

۱. محمدی م ر ، سل اپیدمی سوم ، مجله بیماری های عفونی و گرمسیری دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ، سال اول (شماره۶) ۱۳۷۶: ۱۱-۵.

2. Yang ZH, Dehaas PEW, Wachmann CH, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in Denmark. J Clin Microbiol 1992;33:2077-81.

3. World Health Organization. New report confirm global spread of drug resistance tuberculosis. Press release WHO/74 1994.

4. Wourld Health Organization. Tuberculosis fact sheet. 1998,104.

۵ – شیرزادی م ر ، فراهانی م ، جوانمرد ع. گزارش وضعیت کنترل بیماری سل درجمهوری اسلامی ایران، وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی، ۱۳۷۶، ص ۵ .

6. Vansoolingen D, Hermans PWM. Epidemiology of tuberculosis by DNA finger printing. Eur Respir J 1995;20:649s-50s.

7. Welsh J, MacClelland D. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Neucleic Acids Res 1990;18:7213-18.

8. Martilla HJ, Soini H, Vyshinevskiy BJ, et al. Rapid detection of rifampin – resistat Mycobacterium tuberculosis by sequencing and line probe assay. Scand J Infect Dis 1998;30:129-32.

9. Rodriguez JG, Meja GA, Portillo PD, et al. Species specific identification of Mycobacterium bovis by PCR 1995;141:2131- 6.

10. Harn HJ, Shen KL, Ho L, et al. Evidence of transmission of Mycobacterium tuberculosis by RAPD-DNA finger-printing in Taipei city. J Clin Pathol 1997;50:505-80.

11. Zany ZQ, Ishaque M. Evalution of methods for isolation of DNA finger slowly and rapidly growing mycobacteria. Inter J Leprosy 1997;65:460-7.

12. Moore DD. Preparation and analysis of DNA. In short protocols in molecular biology 3rd ed. NewYork: John Wiely & Sons Inc, 1995,92-4.

13. Berlin OGW . Mycobac tria. In : Finergold SM, Baron Ey . Diagnostic medical microbiology. 8th ed . Baltimore : Mosby, 199;597-640.

14. Cibuiskis RE, Origins and organization genetic diversity in natural population of Trypanosome brucei . Parasitology 1988; 96:303-22.

۱۵. فاتح شیرازی ر، گزارش وضعیت اپیدمیولوژی و مبارزه با بیماری سل در استان فارس ، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، حوزه معاونت بهداشتی ۱۳۷۸، ص ۲۲.

www.SID.ir