

## بررسی نقش انتقال اخیر عفونت و عود مجدد عفونت نهفته ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مسلول به روش IS6110-RFLP و DR-RFLP

بهنام رفیعی<sup>۱</sup>، دکتر علی اصغر فرازی<sup>۲</sup>، داود صادقی<sup>۳</sup>، سپیده غنی<sup>۱</sup>، محمد محمد طاهری<sup>۴</sup>، احمد سخراوی<sup>۴</sup>،  
دکتر روحاله کشاورز<sup>۵</sup>، دکتر کیوان تدین<sup>۶</sup>، دکتر نادر مصوری<sup>۶</sup>

### مقاله پژوهشی

### چکیده

**مقدمه:** مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به عنوان یک پاتوژن موفق انسانی عامل مرگ حدود ۳ میلیون نفر در هر سال می‌باشد و نزدیک به یک سوم جمعیت جهان عفونت نهفته به این باکتری دارند. این مطالعه به منظور بررسی نقش انتقال اخیر و فعال شدن مجدد عفونت نهفته به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در استان مرکزی با استفاده از روش‌های IS6110-RFLP (IS6110-Restriction fragment length polymorphism) و DR-RFLP و نیز مقایسه‌ی قدرت تفکیک جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با این دو روش انجام گرفت.

**روش‌ها:** در این مطالعه طی یک سال در مجموع ۵۷ نمونه‌ی خلط اسمیر مثبت از بیماران مبتلا به سل ریوی از مراکز بهداشتی-درمانی استان مرکزی جمع‌آوری گردید و طبق روش‌های استاندارد کشت داده شد. سپس استخراج DNA ژنومیک با روش ایزو آمیل الکل-کلروفورم صورت پذیرفت. جهت بررسی‌های ژنتیکی سویه‌ها از روش RFLP با استفاده از آنزیم محدودکننده‌ی PvuII استفاده شد و دو رگه‌سازی با پروب‌های IS6110 و DR انجام پذیرفت.

**یافته‌ها:** طی این مطالعه، تنوع ژنتیکی وسیعی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشاهده شد. با استفاده از پروب IS6110، ۴۸ ژنوتیپ مشاهده گردید که ۴۱ نوع منحصر به فرد بود و با پروب DR، ۴۵ ژنوتیپ دیده شد که ۳۷ نوع آن منحصر به فرد بود.

**نتیجه‌گیری:** تنوع ژنتیکی وسیع سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه، نشان‌دهنده‌ی نقش اصلی فعال شدن مجدد عفونت نهفته نسبت به انتقال اخیر عفونت می‌باشد. همچنین یافته‌های تجربی ما نشان داد قدرت تفکیک سویه‌ها با روش IS6110-RFLP بیشتر از روش DR-RFLP می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** انتقال اخیر، عود مجدد عفونت، قدرت تفکیک، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، RFLP

**ارجاع:** رفیعی بهنام، فرازی علی اصغر، صادقی داود، غنی سپیده، محمد طاهری محمد، سخراوی احمد، کشاورز روحاله، تدین کیوان، مصوری نادر. بررسی نقش انتقال اخیر عفونت و عود مجدد عفونت نهفته ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مسلول به روش

IS6110-RFLP و DR-RFLP. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۱؛ ۳۰ (۲۱۹): ۲۳۲۳-۲۳۱۰

- ۱- کارشناس ارشد، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، قم، ایران
  - ۲- استادیار، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
  - ۳- کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران
  - ۴- کارشناس ارشد، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالتین، مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
  - ۵- دامپزشک، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالتین، مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
  - ۶- استادیار، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالتین، مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران
- نویسنده‌ی مسؤول: دکتر نادر مصوری  
Email: nmosavari@yahoo.com

## مقدمه

نسل بشر از زمان های بسیار دور تحت تأثیر بیماری سل بوده است؛ به طوری که مطالعات ژنتیک مولکولی به تازگی نشان داده است که طی میلیون ها سال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس متعارف ترین عامل بیماری سل انسانی در دنیا بوده است (۱).

با توجه به این که بروز بیماری سل به عوامل مختلفی مانند میزان شیوع سل در منطقه، مدت عفونت در بیماران و میزان تماس افراد با بیماران مسلول بستگی دارد، ولی با این حال تخمین زده می شود که یک سوم از جمعیت جهان عفونت نهفته به این باکتری دارند و بیماری سل در اثر فعال شدن مجدد این عفونت های نهفته به وجود می آید (۲-۴).

شناسایی و ردیابی بیماری سل در کشور ما محدود به برخی روش های معمول مانند آزمایش های میکروبی بر روی نمونه های خلط و کشت باکتری و انجام تست های بیوشیمیایی، ثبت اطلاعات عمومی بیماران و در نهایت تست ELISA و ایمنوفلورسانس می باشد (۵-۸). محدودیت های موجود در روش های معمول آزمایشگاهی برای تفکیک کردن سویه های مربوط به عفونت اخیر و سویه های مربوط به فعال شدن مجدد عفونت، سبب به وجود آمدن دانش اپیدمیولوژی مولکولی شده است (۹). سازمان جهانی بهداشت تخمین می زند که یک سوم جمعیت دنیا مبتلا به عفونت نهفته ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند و در ۵-۱۰ درصد افراد آلوده بیماری به صورت سل فعال پیشرفت می کند (۱۰). روش انگشت نگاری DNA یا آنالیز ژنوم به روش RFLP (Restriction fragment length polymorphism) یک روش استاندارد و رایج برای تقسیم بندی

سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از لحاظ اپیدمیولوژی مولکولی می باشد (۱۱). مطالعات نشان داده است که طی انگشت نگاری DNA به روش RFLP سویه های دارای الگوی ژنومی مشابه به عنوان خوشه (Cluster) در نظر گرفته می شوند و به طور معمول مربوط به انتقال اخیر فرد به فرد می باشد و سویه هایی که الگوی ژنومی منحصر به فرد و اختصاصی نشان می دهند، نشان دهنده ی کسب عفونت در گذشته ی دور و فعال شدن مجدد عفونت هستند. این در حالی است که بررسی های مولکولی در طول دهه ی گذشته در ایالات متحده حاکی از کاهش موارد سل از طریق انتقال اخیر فرد به فرد و افزایش میزان موارد فعال شدن مجدد عفونت های نهفته ی همراه بوده است (۱۲).

روش IS6110-RFLP به عنوان یک روش استاندارد در اپیدمیولوژی مولکولی سل شناخته شده است. این روش مبتنی بر وجود توالی (Sequence) الحاقی IS6110 است که به طور اختصاصی در طول ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به تعداد متنوع و در جایگاه های مختلف وجود دارد. تعداد کپی IS6110 در هر سویه ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بین صفر تا ۲۵ عدد متغیر است. این روش به دلیل افتراق زیاد و تکرارپذیری بالا دارای اهمیت خاصی است (۱۳-۱۴).

همچنین روش دیگر RFLP نیز به کمک قطعات DR (Direct repeat-Restriction length fragment polymorphism یا DR-RFLP) می باشد. توالی های DR شامل تعدادی توالی ۳۶ جفت بازی و بدون فاصله های تکراری هستند و گونه ها و سویه های مایکوباکتریوم بر اساس حضور یا عدم حضور این توالی ها و نیز محل قرارگیری و تعداد این توالی ها

دارای تنوع و گوناگونی هستند (۱۵).

هدف از این مطالعه، بررسی نقش انتقال اخیر عفونت به صورت فرد به فرد و عود مجدد عفونت نهفته به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بیماران مسلول استان مرکزی با استفاده از دو روش IS6110-RFLP و DR-RFLP و همچنین مقایسه‌ی قدرت تفکیک سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با دو روش مذکور بود.

## روش‌ها

### جداسازی و شناسایی نمونه

در این تحقیق طی یک دوره‌ی یک ساله تعداد ۵۷ نمونه‌ی خلط از بیماران مراجعه کننده به مراکز بهداشت استان مرکزی جمع‌آوری شد و اسمیر مثبت بودن این نمونه‌ها با رنگ‌آمیزی زیل نلسون ثابت گردید. سپس آلودگی‌زدایی نمونه‌ها به روش N-استیل-L-سیستین انجام و جهت تکثیر و بررسی سرعت رشد در محیط کشت انتخابی Lowenstein Jensen حاوی گلیسرین کشت داده شد و به مدت ۸-۶ هفته در دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از رشد باکتری‌ها جهت شناسایی سویه‌ها از تست‌های نیاسین، کاتالاز و احیای نترات استفاده گردید (۱۷-۱۶).

### استخراج DNA و تعیین هویت مولکولی جدایه‌ها

طبق روش استاندارد ون سولینگن، DNA ژنومیک و بدون هیچ گونه شکستگی با استفاده از لیزوزیم، (Sodium dodecyl sulfate) SDS، ایزوآمیل‌الکل-کلروفرم و پروتئیناز K از کلنی‌های قابل مشاهده استخراج گردید (۱۸). کیفیت و کمیت DNAهای استخراج‌شده با استفاده از روش الکتروفورز کوتاه مدت و اسپکتروفتومتری با دستگاه

نانودراپ مورد بررسی قرار گرفت (۱۹).

با توجه به این که به DNA ژنومیک فاقد شکستگی نیاز داشتیم، نمونه‌های DNA دارای شکستگی (بررسی با الکتروفورز کوتاه مدت) و نیز دارای غلظت پایین (بررسی با دستگاه نانودراپ) از مسیر تحقیق کنار گذاشته شد. تعلق جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از طریق واکنش PCR (Polymerase chain reaction) بر اساس قطعه‌ی IS6110 طبق پرایمر پیش‌رونده‌ی: 5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC3' و پرایمر معکوس 5'GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA3' انجام پذیرفت (۲۰).

مخلوط واکنش PCR در هر میکروتیوب شامل موارد زیر بود:

۰/۰۵ میلی مول مخلوط dNTPs، ۲/۵ میکرولیتر بافر PCR (۰/۱ میلی مول KCl، ۰/۲ میلی مول Tris HCL با pH = ۸/۸، ۰/۱ میلی مول (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>، ۱/۵ میلی مول MgCl<sub>2</sub>، ۱۰ پیکومول پرایمر پیش‌رونده، ۱۰ پیکومول پرایمر معکوس، ۱ واحد از آنزیم Taq DNA polymerase و ۱۰۰ نانوگرم DNA برای مخلوط نهایی ۲۵ میکرولیتر استفاده شد. در این تحقیق برای شاهد منفی، از تمام مواد میکروتیوب شاهد مثبت که فاقد DNA الگو بود (به جای DNA، آب مقطر اضافه شد) استفاده شد. تمامی مواد مورد استفاده در واکنش PCR ساخت شرکت سیناژن-ایران بود.

برنامه‌ی PCR هم به ترتیب ۱ سیکل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۳ دقیقه (Initial denaturation)، ۲۵ سیکل ۹۴ درجه‌ی سانتی‌گراد (Denaturation) به مدت ۱ دقیقه، ۲۵ سیکل ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (Annealing) به مدت ۱ دقیقه و همچنین ۲۵ سیکل

شدن در فواصل زمانی مشخصی به ترتیب تحت تیمار با محلول دیپورینه کننده (۵ دقیقه به منظور دیپورینه شدن نسبی ژل آگارز)، محلول واسرشت کننده (۲ بار تیمار هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، به منظور واسرشت شدن و ایجاد DNA تک رشته‌ای به منظور اتصال صحیح پروب در مرحله‌ی دو رگه‌سازی) و محلول خنثی کننده (۲ بار تیمار و هر بار به مدت ۱۵ دقیقه، به منظور خنثی نمودن محلول‌های قبلی) قرار گرفت.

پس از آن به وسیله‌ی تکنیک Southern blotting و به کارگیری روش انتقال موئینه‌ای، قطعات DNA برش‌یافته‌ی موجود در ژل، به یک غشای نایلونی با شارژ مثبت منتقل شد؛ به طوری که صفحه‌ی نگهدارنده‌ی ژل در داخل سینی ساترن بلاتینگ محتوی بافر Saline- sodium citrate ۲۰x قرار گرفت. دو قطعه کاغذ واتمن به طور جداگانه با بافر SSC، ۲۰ برابر آغشته شد و به عنوان فیلتر بر روی صفحه‌ی نگهدارنده قرار گرفت؛ آن گاه، ژل عمل آوری شده بر روی آن قرار گرفت و سپس غشای نایلونی با شارژ مثبت (شرکت Roche-آلمان) روی ژل قرار داده شد. در نهایت کاغذهای جاذب به صورت منظم روی غشا قرار گرفتند (به طول ۱۵ سانتی‌متر) و سپس جهت برقراری تعادل و فشار مناسب یک وزنه‌ی یک کیلوگرمی روی ستون ساترن بلاتینگ قرار گرفت. در این مطالعه ساترن بلاتینگ به مدت ۱۵ ساعت انجام پذیرفت. بعد از اتمام ساترن بلاتینگ قطعات DNA منتقل شده بر روی غشای دارای شارژ مثبت با استفاده از اعمال حرارت ۱۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه توسط دستگاه فور بر روی غشا تثبیت شد. پری هیبریداسیون و

۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد (Extension) به مدت ۱ دقیقه و برای تکثیر نهایی ۱ سیکل ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد برای ۴ دقیقه (Final extension) دنبال شد. در نهایت محصول PCR در ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز گردید و عکس‌های به دست آمده مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت.

### RFLP و دو رگه‌سازی DNA

به منظور انجام RFLP، هضم آنزیمی در داخل یک میکروتیوب استریل ۲ میکرولیتر DNA (با غلظت ۱۵۰۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر)، به همراه ۱ میکرولیتر آنزیم محدود کننده‌ی PvuII (Roche-آلمان) اضافه گردید. سپس ۲ میکرولیتر بافر آنزیم x ۱۰ اضافه و در نهایت ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل اضافه شد تا حجم نهایی به ۲۰ میکرولیتر برسد. سپس میکروتیوب‌های حاوی مواد فوق به مدت ۱۸ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آن به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم، میکروتیوب حاوی DNA هضم شده به مدت ۱۵ دقیقه در ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد. در مرحله‌ی بعد جهت جداسازی قطعات حاصل از برش آنزیمی، محصولات هضم آنزیمی به مدت ۲۴ ساعت در ژل آگار ۱ درصد در ولتاژ ۳۰ ولت الکتروفورز گردید. همچنین از DNA سائز مارکر شماره‌ی ۲ نشان‌دار با دیگوکسیژنین (Digoxigenin) محصول شرکت Roche-آلمان، برای تعیین اندازه‌ی باندها در کنار سایر نمونه‌ها استفاده شد.

پس ژل آگارز محتوی قطعات برش‌خورده‌ی DNA توسط دستگاه ژل داگ (شرکت BioRad-آمریکا) مورد بررسی و عکس‌برداری قرار گرفت (شکل ۲). ژل آگارز مذکور جهت عمل‌آوری و آماده

چشمی، توسط نرم‌افزار تخصصی Gel-Pro Analyzer (Media cybernetics. Millan, Italy) بر اساس تعداد و اندازه‌ی باند بررسی و مقایسه گردید.

### یافته‌ها

در این تحقیق تعداد ۵۷ سویه‌ی مایکوباکتریوم از بیماران مسلول استان مرکزی بر روی محیط اختصاصی Lowenstein Jensen حاوی گلیسرین رشد کردند که از این بیماران ۳۰ نفر زن و ۲۷ نفر مرد بودند. دامنه‌ی سنی بیماران از ۲۰ تا ۸۹ سال متغیر بود و میانگین سنی بیماران ۶۰ سال محاسبه گردید که حاکی از بالا بودن میانگین سنی بیماران بود.

در روش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی قطعه‌ی IS6110 و مشاهده‌ی یک باند الکتروفورزی به اندازه‌ی ۲۴۵ جفت بازی، نشان داده شد که همه‌ی ۵۷ جدایه از کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند و با سویه‌های استاندارد H37RV و C نیز مقایسه شدند (شکل ۱).

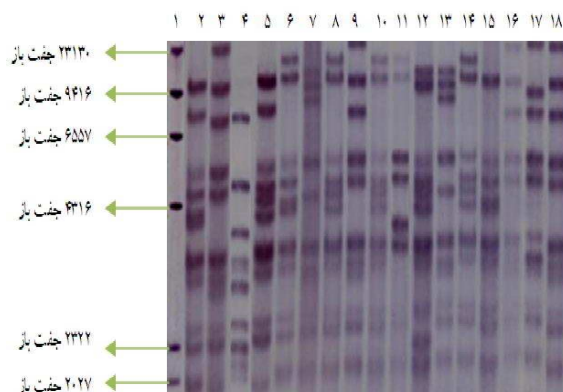
الگوهای به دست آمده با مقایسه‌ی چشمی باندهای با وزن مولکولی (۲۳۱۳۰ تا ۲۰۲۷ جفت باز) و با استفاده از نرم‌افزار تخصصی Gel-Pro Analyzer (آنالیز بر اساس تعداد و اندازه‌ی باندها) مورد بررسی دقیق قرار گرفت. از ۵۷ سویه، پس از RFLP با آنزیم Pvu II (شکل ۲) و دو رگه‌سازی با پروب IS6110 و آشکارسازی (شکل ۳)، تعداد ۴۸ ژنوتیپ شناسایی گردید. ۷۷/۱ درصد از ۵۷ سویه‌های جداشده واجد تعداد کپی زیاد، ۲۱ درصد واجد تعداد کپی متوسط، ۱/۷۵ درصد سویه‌ها واجد تعداد کپی کم از قطعه‌ی IS6110 بودند.

هیبریداسیون، با استفاده از پروب‌های لیبل شده با دیگوکسیژنین صورت پذیرفت. بدین منظور، ابتدا غشا در آن هیبریداسیون در مجاورت محلول پری هیبریداسیون ( فاقد پروب) به مدت ۲-۴ ساعت در دمای ۵۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از آن، غشا به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت محلول هیبریداسیون آغشته به پروب نشان‌دار (پروب‌های DR IS6110 که هر کدام جداگانه و طی آزمایش‌های جدا از هم استفاده شدند) در دمای ۶۵ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفت (۱۸).

### آشکارسازی

برای آشکارسازی قطعات DNA دو رگه‌شده با پروب، ابتدا غشای نایلونی به مدت ۱ دقیقه تحت شستشو با بافر شستشو (Washing buffer) قرار گرفت. سپس غشا به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار با بافر بلوکه کننده (Blocking buffer) به منظور از بین بردن مکان‌های غیر اختصاصی که پروب به آن‌ها اتصال یافته بود، انجام پذیرفت. در مرحله‌ی بعد غشا به مدت ۳۰ دقیقه تحت تیمار با آنتی بادی ضد دیگوکسیژنین کنژوگه‌شده با آلکالین فسفاتاز قرار گرفت. پس از آن ۱۵ دقیقه شستشو با بافر شستشو و ۲ دقیقه تیمار با بافر شناسایی (Detection buffer) انجام پذیرفت. در نهایت جهت آشکارسازی از سوبستراهای NBT (Nitro blue tetrazolium salt in dimethyl formamide) و BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl phosohate) به مدت ۲ ساعت استفاده گردید. کلیه‌ی مواد مورد استفاده در مرحله‌ی آشکارسازی ساخت شرکت Roche-آلمان بود.

آنالیز تصاویر حاصل از دو رگه‌سازی پروب با قطعات برش خورده DNA، علاوه بر مشاهده و آنالیز



شکل ۳. نتایج دو رگه‌سازی DNA ژنومیک سویه‌های

مایکوباکتریوم توپرکلوزیس با استفاده از پروب IS6110

ستون ۱: سایز مارکر شماره ۲ شرکت Roche

(Cat No. 11218590910)، ستون ۲: سویه استاندارد

C (ATTC 35808)، ستون ۳: نمونه‌ی شماره ۱،

ستون ۴: نمونه‌ی شماره ۲، ستون ۵: نمونه‌ی شماره ۵،

ستون ۶: نمونه‌ی شماره ۲۴، ستون ۷: نمونه‌ی شماره ۶،

ستون ۸: نمونه‌ی شماره ۴۵، ستون ۹: نمونه‌ی شماره ۲۵،

ستون ۱۰: نمونه‌ی شماره ۵۴، ستون ۱۱: نمونه‌ی شماره ۹،

ستون ۱۲: نمونه‌ی شماره ۳۰، ستون ۱۳: نمونه‌ی شماره ۳۱،

ستون ۱۴: نمونه‌ی شماره ۵۶، ستون ۱۵: نمونه‌ی شماره ۳۲،

ستون ۱۶: نمونه‌ی شماره ۴۱، ستون ۱۷: نمونه‌ی شماره ۴۲،

ستون ۱۸: نمونه‌ی شماره ۲۶

تعداد ژنوتیپ‌های منحصر به فرد در این روش ۴۱

مورد (۸۵/۴ درصد) بود و الگوی ژنومی مشابه ۷

ژنوتیپ بودند. این ۵۷ سویه به طور جداگانه، تحت

RFLP با آنزیم Pvu II و دو رگه‌سازی با پروب DR و

آشکارسازی قرار گرفتند (شکل ۴) و تعداد ۴۵ ژنوتیپ

شناسایی گردید. تعداد ژنوتیپ‌های منحصر به فرد در

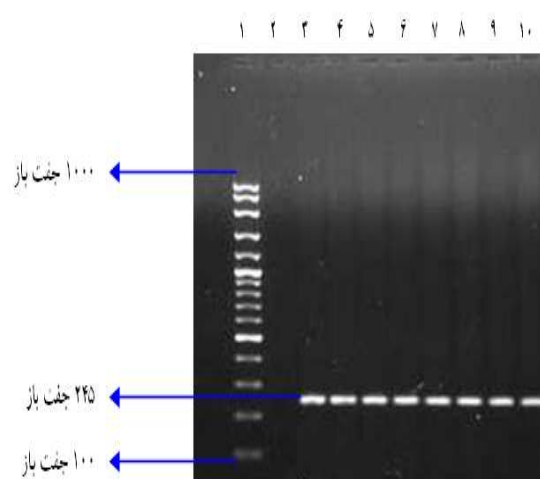
این روش ۳۷ مورد (۸۲/۲ درصد) تعیین شد.

ژنوتیپ‌های دارای الگوی ژنومی مشابه ۸ ژنوتیپ

بودند. طبق این یافته‌های آزمایشگاهی، روش

IS6110-RFLP دارای قدرت تفکیک بیشتری نسبت

به روش DR-RFLP بود.



شکل ۱. تعیین هویت مولکولی بر اساس قطعه‌ی IS6110 با وزن

مولکولی ۲۴۵ جفت باز

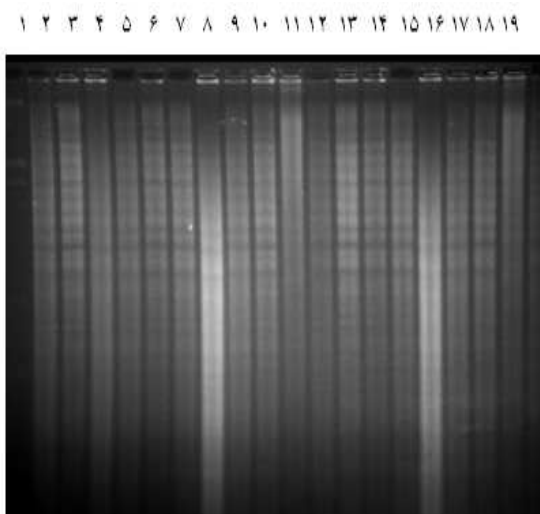
ستون ۱: مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون ۲: شاهد منفی، ستون ۳:

سویه استاندارد مایکوباکتریوم توپرکلوزیس (C (ATTC 35808)،

ستون ۴: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توپرکلوزیس

H37RV (ATTC 25618)، ستون‌های ۵ تا ۱۰: جدایه‌های

مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از مسلولین اسمیر مثبت استان مرکزی



شکل ۲. RFLP سویه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس

(هضم DNA کامل و بدون شکستگی با استفاده از آنزیم PvuII)

ستون ۱: سایز مارکر شماره ۲ شرکت Roche

(Cat No. 11218590910)، ستون ۲: سویه استاندارد

مایکوباکتریوم توپرکلوزیس (C (ATTC 35808)، ستون‌های ۳

تا ۱۹ سویه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس جداشده از بیماران

مسلول اسمیر مثبت استان مرکزی

میزان همبستگی بین روش‌های IS6110-RFLP و DR-RFLP برابر ۰/۵۶ بود و این همبستگی معنی‌دار بود ( $P = ۰/۰۲۹$ ).

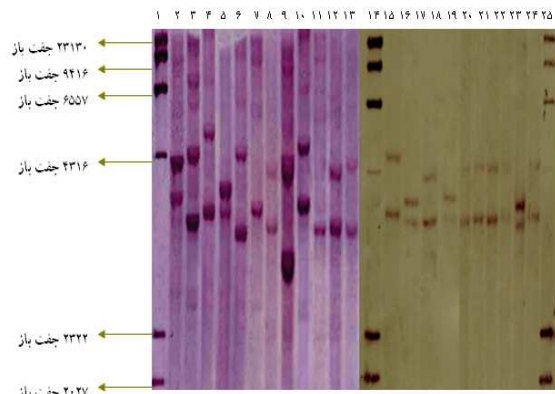
به طور قراردادی الگوهای ژنتیکی به دست آمده با نام‌های HPIS و HPD (H اول که از ابتدای کلمه Human و P که از ابتدای نام آنزیم Pvu II و همچنین IS و D که از ابتدای نام پروب‌های DR و IS6110 برگرفته شده‌اند) نامگذاری گردیدند (جدول ۱).

### بحث

در مطالعه‌ی حاضر تعداد ۵۷ سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بیماران سل ریوی با میانگین سنی ۶۰ سال، جداسازی، کشت و تعیین هویت گردید. با استفاده از روش IS6110-RFLP تعداد ۴۸ ژنوتیپ شناسایی گردید که ۴۱ ژنوتیپ آن دارای الگوی منحصر به فرد بود (۸۵/۴ درصد) و ۷ خوشه شامل ۱۶ سویه (۱۴/۶ درصد) مشاهده شد. با استفاده از روش DR-RFLP تعداد ۴۵ ژنوتیپ شناسایی گردید که ۳۷ ژنوتیپ (۸۲/۲ درصد) آن دارای الگوی منحصر به فرد بود و ۸ خوشه شامل ۲۰ سویه (۱۷/۸ درصد) دیده شد.

در این تحقیق آزمایشگاهی، روش IS6110-RFLP دارای قدرت تفکیک (Discriminatory power) بیشتری نسبت به روش DR-RFLP بود. از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری بین دو روش دیده نشد که بی‌شک با تعداد کم نمونه‌ها ارتباط داشته است. از طرفی، بین دو روش همبستگی معنی‌دار دیده شد.

تکنیک‌های مولکولی به کار رفته در این مطالعه همگی مطابق با توصیه‌ی سازمان جهانی بهداشت



شکل ۴. نتایج دو رگه‌سازی DNA ژنومیک سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از پروب DR ستون ۱: سایز مارکر شماره‌ی ۲ شرکت Roche

(Cat No. 11218590910)، ستون ۲: سویه‌ی استاندارد

C (ATTC 35808)، ستون ۳: نمونه‌ی شماره‌ی ۱،

ستون ۴: نمونه‌ی شماره‌ی ۲، ستون ۵: نمونه‌ی شماره‌ی ۳،

ستون ۶: نمونه‌ی شماره‌ی ۴، ستون ۷: نمونه‌ی شماره‌ی ۵،

ستون ۸: نمونه‌ی شماره‌ی ۶، ستون ۹: نمونه‌ی شماره‌ی ۷،

ستون ۱۰: نمونه‌ی شماره‌ی ۸، ستون ۱۱: نمونه‌ی شماره‌ی ۲۲،

ستون ۱۲: نمونه‌ی شماره‌ی ۹، ستون ۱۳: نمونه‌ی شماره‌ی ۱۰،

ستون ۱۴: سایز مارکر شماره‌ی ۲ شرکت رش آلمان،

ستون ۱۵: نمونه‌ی شماره‌ی ۴۵، ستون ۱۶: نمونه‌ی شماره‌ی ۳۹،

ستون ۱۷: نمونه‌ی شماره‌ی ۳۰، ستون ۱۸: نمونه‌ی شماره‌ی ۳۱،

ستون ۱۹: نمونه‌ی شماره‌ی ۳۲، ستون ۲۰: نمونه‌ی شماره‌ی ۲۴،

ستون ۲۱: نمونه‌ی شماره‌ی ۲۵، ستون ۲۲: نمونه‌ی شماره‌ی ۲۸،

ستون ۲۳: نمونه‌ی شماره‌ی ۵۱، ستون ۲۴: نمونه‌ی شماره‌ی ۲۴،

ستون ۲۵: سایز مارکر شماره‌ی ۲

جهت تحلیل آماری داده‌ها از روش Bionomial test

استفاده گردید. تناسب‌های مشاهده شده در گروه ژنوتیپ‌های منحصر به فرد با استفاده از روش IS6110-RFLP و DR-RFLP به ترتیب برابر ۰/۵۸ و ۰/۴۷ بود و در هیچ کدام از دو گروه تفاوت آماری معنی‌داری بین گروه ژنوتیپ‌های منحصر به فرد و کل ژنوتیپ‌ها وجود نداشت ( $P = ۰/۶۴$  در مورد روش IS6110-RFLP و  $P = ۱$  در مورد روش DR-RFLP).

از طرفی، با استفاده از آزمون همبستگی Pearson

آنالیز ارتباطات اپیدمیولوژیک سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد (۲۱).

انتخاب شده بودند؛ به طوری که RFLP بر اساس قطعه‌ی IS6110 مهم‌ترین ابزار در مطالعه‌ی تنوع و

جدول ۱. اطلاعات اپیدمیولوژیک بیماران مسلول استان مرکزی و الگوهای ژنتیکی به دست آمده با استفاده از DR-RFLP و IS6110-RFLP

شماره‌ی بیمار	سن	جنس	منطقه‌ی جغرافیایی	DR	IS6110
۱	۴۸	مرد	اراک	HPD1	HPIS1
۲	۷۰	مرد	اراک	HPD2	HPIS2
۳	۶۶	زن	اراک	HPD3	HPIS3
۴	۷۵	زن	اراک	HPD4	HPIS4
۵	۷۰	زن	اراک	HPD5	HPIS5
۶	۷۰	مرد	اراک	HPD6	HPIS6
۷	۵۵	زن	اراک	HPD7	HPIS7
۸	۲۰	زن	اراک	HPD8	HPIS8
۹	۸۰	زن	اراک	HPD9	HPIS9
۱۰	۶۰	مرد	اراک	HPD9	HPIS10
۱۱	۴۲	زن	اراک	HPD10	HPIS10
۱۲	۷۱	زن	اراک	HPD11	HPIS11
۱۳	۷۷	زن	اراک	HPD12	HPIS12
۱۴	۷۰	مرد	اراک	HPD13	HPIS13
۱۵	۸۰	مرد	اراک	HPD14	HPIS14
۱۶	۷۳	زن	اراک	HPD15	HPIS15
۱۷	۲۸	مرد	اراک	HPD15	HPIS15
۱۸	۲۳	زن	اراک	HPD16	HPIS16
۱۹	۷۳	مرد	اراک	HPD17	HPIS17
۲۰	۷۵	مرد	اراک	HPD18	HPIS18
۲۱	۴۵	مرد	اراک	HPD19	HPIS19
۲۲	۸۵	زن	اراک	HPD20	HPIS20
۲۳	۸۰	زن	اراک	HPD21	HPIS21
۲۴	۷۴	زن	اراک	HPD22	HPIS22
۲۵	۸۵	مرد	اراک	HPD22	HPIS23
۲۶	۴۸	زن	اراک	HPD23	HPIS23
۲۷	۸۰	زن	اراک	HPD24	HPIS24
۲۸	۸۲	زن	اراک	HPD22	HPIS25
۲۹	۸۰	مرد	اراک	HPD25	HPIS26
۳۰	۷۰	مرد	اراک	HPD26	HPIS27
۳۱	۸۵	زن	اراک	HPD27	HPIS28
۳۲	۸۸	زن	اراک	HPD28	HPIS29
۳۳	۸۷	مرد	اراک	HPD29	HPIS30



جدول ۱. اطلاعات اپیدمیولوژیک بیماران مسلول استان مرکزی و الگوهای ژنتیکی به دست آمده با استفاده از

IS6110-RFLP و DR-RFLP (ادامه)

شماره‌ی بیمار	سن	جنس	منطقه‌ی جغرافیایی	DR	IS6110
۳۴	۴۵	مرد	اراک	HPD30	HPIS31
۳۵	۷۰	زن	اراک	HPD31	HPIS32
۳۶	۷۹	زن	اراک	HPD32	HPIS32
۳۷	۸۰	زن	اراک	HPD33	HPIS33
۳۸	۷۳	مرد	اراک	HPD30	HPIS34
۳۹	۷۰	زن	اراک	HPD34	HPIS35
۴۰	۶۰	مرد	اراک	HPD35	HPIS36
۴۱	۳۷	مرد	اراک	HPD36	HPIS37
۴۲	۸۳	زن	اراک	HPD37	HPIS38
۴۳	۸۰	زن	اراک	HPD38	HPIS39
۴۴	۷۸	مرد	شازند	HPD39	HPIS40
۴۵	۸۸	مرد	شازند	HPD40	HPIS22
۴۶	۶۵	زن	شازند	HPD41	HPIS41
۴۷	۸۸	زن	شازند	HPD42	HPIS42
۴۸	۳۵	مرد	شازند	HPD43	HPIS43
۴۹	۴۰	زن	شازند	HPD42	HPIS44
۵۰	۸۱	مرد	کمیجان	HPD30	HPIS45
۵۱	۲۶	زن	کمیجان	HPD22	HPIS46
۵۲	۳۵	مرد	کمیجان	HPD44	HPIS47
۵۳	۸۸	مرد	کمیجان	HPD45	HPIS48
۵۴	۲۴	مرد	خمین	HPD45	HPIS22
۵۵	۳۲	مرد	خمین	HPD30	HPIS31
۵۶	۲۷	مرد	ساوه	HPD44	HPIS22
۵۷	۸۳	زن	ساوه	HPD39	HPIS40

با توجه به بالا بودن میزان ژنوتیپ‌های دارای الگوهای ژنتیکی منحصر به فرد می‌توان به این نتیجه رسید که بیماری سل در استان مرکزی به طور عمده در اثر فعال شدن مجدد عفونت‌های نهفته به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ایجاد می‌گردد و انتقال اخیر عفونت به صورت فرد به فرد نقش بسیار ناچیزی در اپیدمیولوژی سل ریوی در این استان دارد. هر دو روش به کار رفته در این تحقیق مؤید این

موضوع بود و نتایج آن‌ها با یکدیگر هم‌پوشانی داشت. در یک مطالعه در تهران با استفاده از تکنیک RFLP مشخص شد که فعال شدن مجدد عفونت دارای نقش بیشتری در اپیدمیولوژی سل در استان تهران دارد که با تحقیق حاضر هم‌خوانی داشت (۲۲). همچنین در مطالعه‌ی دیگری در ایران که بر روی ژنوتیپ‌های Beijing مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام شد، همه‌ی ژنوتیپ‌ها دارای الگوی

IS6110-RFLP متفاوت بودند (۲۳). در مطالعه‌ی دیگری در منطقه‌ی شمال غرب ایران نقش سن در انتقال فرد به فرد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش IS6110-RFLP مورد بررسی قرار گرفت و مشخص گردید که در این منطقه فعال شدن مجدد عفونت در افراد زیر ۵۶ سال و انتقال اخیر فرد به فرد در افراد بالای ۵۶ سال نقش بیشتری در بروز بیماری سل داشته است (۲۴). این نتایج با نتایج مطالعه‌ی ما انطباق ندارد؛ به طوری که در مطالعه‌ی ما میانگین سنی مبتلایان به سل ۶۰ سال بود و در بیشتر از ۸۰ درصد سویه‌ها فعال شدن مجدد عفونت نقش اصلی را در ایجاد بیماری بر عهده داشت. این در حالی است که مطالعات صورت گرفته در کشورهای صنعتی با نتایج مطالعه‌ی ما انطباق دارد (۲۵-۲۶).

در مطالعه‌ی دیگری که در استان فارس و با استفاده از تکنیک RAPD-PCR صورت گرفت، نتایج حاکی از نقش بیشتر انتقال فرد به فرد عفونت نسبت به فعال شدن مجدد عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در بروز بیماری سل بود. این نتایج با نتایج مطالعه‌ی ما متفاوت بود که البته ممکن است با جمعیت بیشتر و نیز توریستی بودن استان فارس مرتبط باشد (۲۷).

در مطالعه‌ای که در کشورهای منطقه‌ی اقیانوس هند انجام گرفت با استفاده از روش IS6110-RFLP، ۳۳۲ الگو مشاهده گردید که ۲۸۹ الگوی آن منحصر به فرد بودند و ۴۳ الگو به عنوان خوشه‌های ژنتیکی در نظر گرفته شدند. همچنین روش DR-RFLP، ۶۴ الگوی متفاوت را نشان داد که ۴۲ سویه دارای الگوی منحصر به فرد بودند. این شباهت‌های ژنتیکی در بین سویه‌های جدا شده، دال بر انتقال فعال سویه‌ها در بین

کشورهای این منطقه می‌باشد (۲۸).

در مطالعه‌ی دیگری که توسط Chander و همکاران با تکنیک DR-RFLP انجام شد، ۸۰ جدایه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بررسی شدند. بیشتر سویه‌ها الگوهای ۳-۷ بانندی را نشان داد و تنها ۲ سویه، یک باند و یا هیچ بانندی را نشان نداد (۲۹). این در حالی است که در مطالعه‌ی ما اکثر سویه‌ها دارای ۲ کپی از قطعه‌ی DR بودند و تنها دو سویه یک کپی از قطعه‌ی DR داشتند. در مطالعه‌ی دیگری که در هندوستان انجام شد، جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر اساس تعداد کپی‌های قطعه‌ی IS6110 به ۴ دسته‌ی فاقد قطعه‌ی IS6110، تعداد کپی کم (۱-۲ کپی)، تعداد کپی متوسط (۳-۵ کپی) و تعداد کپی زیاد (۶-۱۹ کپی) تقسیم شدند. به علاوه، در این مطالعه تعداد کپی بیشتر از ۱۹ مشاهده نشد (۳۰). این در حالی است که در مطالعه‌ی حاضر ۷۷/۱ درصد از ۵۷ سویه‌ی جدا شده واجد تعداد کپی زیاد، ۲۱ درصد واجد تعداد کپی متوسط، ۱/۷۵ درصد سویه‌ها واجد تعداد کپی کم از قطعه‌ی IS6110 بود. مشاهدات ما در این مطالعه با آن چه که Das و همکاران گزارش کردند مبنی بر این که ۴۰ درصد سویه‌ها فاقد و یا فقط دارای یک کپی از قطعه‌ی IS6110 بودند، هم‌خوانی ندارد (۳۱).

در مطالعه‌ی دیگری که در سریلانکا انجام پذیرفت، ۱۲۵ سویه‌ی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد آنالیز IS6110-RFLP قرار گرفت که نتایج این مطالعه با مطالعه‌ی ما مشابه بود و تعداد کپی‌ها و الگوها متفاوت بود و پلی مورفیسم بالایی مشاهده گردید (۳۲). در مورد مایکوباکتریوم بویس نیز بیشتر سویه‌ها دارای یک کپی از قطعه‌ی IS6110 بودند که

یافته‌های ما در تحقیق حاضر هم‌خوانی و انطباق دارد. به هر حال در تحقیق حاضر مشاهده شد که فعال سازی مجدد عفونت ناشی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نقش اصلی را در اپیدمیولوژی بیماری سل در استان مرکزی بر عهده دارد و به نظر می‌رسد که یافته‌های ما در این تحقیق نشان‌دهنده‌ی موفقیت برنامه‌های پیشگیری از سل در استان مرکزی بوده است. همچنین یافته‌های ما نشان داد که روش IS6110-RFLP در تعیین تایپ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای قدرت تفکیک بیشتری نسبت به روش DR-RFLP می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این پژوهش حاصل پایان‌نامه‌ی کارشناسی ارشد به شماره‌ی ۱۵۴۳۰۵۰۷۸۸۲۰۱۳ بود. بدین‌وسیله نویسندگان مراتب تشکر و قدردانی خود را از کلیه‌ی پرسنل بخش تولید و تحقیق و توسعه‌ی توبرکلوزیس و مالئین مؤسسه‌ی واکسن و سرم‌سازی رازی کرج، دانشگاه علوم پزشکی اراک و آزمایشگاه سل مرکز بهداشت استان مرکزی اعلام می‌دارند.

در محدوده‌ی ۱/۹ کیلوبازی الگوی RFLP قرار می‌گیرند. بنابراین روش IS6110-RFLP برای تفکیک سویه‌های مایکوباکتریوم بویس و همچنین سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیسی که واجد ۵ کپی یا کمتر از قطعه‌ی IS6110 باشند مناسب نمی‌باشد (۳۳-۳۴).

در مطالعه‌ی حاضر بیشترین قدرت تفکیک سویه‌ها با استفاده از روش IS6110-RFLP مشاهده گردید.

در مطالعه‌ی جهت مقایسه‌ی روش‌های مختلف مولکولی، اپیدمیولوژی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از ۵ روش مبتنی بر RFLP و ۷ روش مبتنی بر PCR استفاده شد و در نهایت مشخص گردید که روش IS6110-RFLP و بعد از آن روش VNTR (Variable number tandem repeat) دارای بیشترین قدرت تفکیک و روش اسپولیگو تایپینگ دارای کمترین قدرت تمایز می‌باشد (۱۲).

در مطالعه‌ی دیگری در کشور غنا مشخص شد که قدرت تفکیک روش IS6110-RFLP نسبت به سایر روش‌ها بیشتر است (۳۵-۳۶)، که این مطالعات با

### References

- Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical and Developmental Immunology* 2011; 2011: ID 814943.
- Rieder HL. Opportunity for exposure and risk of infection: the fuel for the tuberculosis pandemic. *Infection* 1995; 23(1): 1-3.
- 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; 3(3): 202-6.
- Horsburgh CR, Jr., O'Donnell M, Chamblee S, Moreland JL, Johnson J, Marsh BJ, et al. Revisiting rates of reactivation tuberculosis: a population-based approach. *Am J Respir Crit Care Med* 2010; 182(3): 420-5.
- 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.
- Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW. DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 1993; 31(5): 1143-7.
- Pavlik I, Yayo Ayelle W, Havelkova M,

- Svejnochova M, Katalinic-Jankovic V, Zolnir-Dorc M. Mycobacterium bovis in human population in four Central European countries during 1990-1999. *Vet Med - Czech* 2003; 48(4): 90-8.
8. Cruciani M, Mengoli C. An overview of meta-analyses of diagnostic tests in infectious diseases. *Infect Dis Clin North Am* 2009; 23(2): 225-67, Table.
  9. Burgos MV, Pym AS. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Eur Respir J* 2002; 36(Suppl): 54-65.
  10. Ahmad S. New approaches in the diagnosis and treatment of latent tuberculosis infection. *Respir Res* 2010; 11: 169.
  11. Collins CH, Grange JN, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford, UK: Butter Word Heinemann; 1997.
  12. Masala S, Molicotti P, Bua A, Zumbo A, Delogu G, Sechi LA, et al. Molecular characterization of Sardinian Mycobacterium tuberculosis isolates by IS6110 restriction fragment length polymorphism, MIRU-VNTR and rep-PCR. *New Microbiol* 2010; 33(2): 155-62.
  13. Yokoyama E, Kishida K, Ichinohe S. Improved molecular epidemiological analysis of Mycobacterium tuberculosis strains using multi-locus variable number of tandem repeats typing. *Jpn J Infect Dis* 2007; 60(4): 235-6.
  14. Narayanan S. Molecular epidemiology of tuberculosis. *Indian J Med Res* 2004; 120(4): 233-47.
  15. Groenen PM, Bunschoten AE, van Soolingen D, van Embden JD. 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(5): 1057-65.
  16. 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; 46(1): 42-9.
  17. Amirzafari N, Ramezanzadeh R, Farnia P, Ghazi F. The frequency of Beijing genotype of mycobacterium tuberculosis isolated from tuberculosis patients. *Razi j Med Sci* 2006; 13(52): 7-17.
  18. van Soolingen D, de Haas PE, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. *Methods Mol Med* 2001; 54: 165-203.
  19. 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; 74(3): 745-52.
  20. McHugh TD, Newport LE, Gillespie SH. IS6110 homologs are present in multiple copies in mycobacteria other than tuberculosis-causing mycobacteria. *J Clin Microbiol* 1997; 35(7): 1769-71.
  21. Office International Des Epizooties. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. 5<sup>th</sup> ed. Paris, France: OIE; 2004.
  22. Farnia P, Nowroozi J, Kargar M, Naderi B. Study on epidemiological patterns of Mycobacterium tuberculosis by fingerprinting. *J Army Univ Med Sci I R Iran* 2008; 6(1): 59-64. [In Persian].
  23. Kazempour M, Masjedi MR, Velayati AA, Tajeddin E, Farnia P, Kargar M, et al. Identification of mycobacterium tuberculosis beijing genotype using three different molecular methods. *Koomesh* 2009; 11(1): 7-14. [In Persian].
  24. Asgharzadeh M, Alibakhshi A, Ranjbari J, Hanifi GhR, 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 J Med Sci Pathol* 2009; 12(1): 11-6.
  25. van Soolingen D, Borgdorff MW, de Haas PE, Sebek MM, Veen J, Dessens M, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in the Netherlands: a nationwide study from 1993 through 1997. *J Infect Dis* 1999; 180(3): 726-36.
  26. Vynnycky E, Borgdorff MW, van Soolingen D, Fine PE. Annual Mycobacterium tuberculosis infection risk and interpretation of clustering statistics. *Emerg Infect Dis* 2003; 9(2): 176-83.
  27. Haghighi MA, Motazedian MH, Ale Yasin F, Ghane Shirazi R. Molecular epidemiology tuberculosis using RAPD- P RCR in Fars province/ Iran. *Iran South Med J* 2003; 5(2): 103-11.
  28. Razanamparany VR, Ramarokoto HH, Vololonirina EJ, Rasolonavalona 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; 104(3): 441-3.
  29. Chander A, Yadava R, Ghosh S, Rath PC, Yadava PK, Orme I, et al. Strain differentiation among Indian clinical isolates of M. tuberculosis by RFLP analysis. *Molecular Biology Today* 2000; 1(2): 53-5.
  30. Chauhan DS, Sharma VD, Parashar D, Chauhan A, Singh D, Singh HB, et al. Molecular typing of Mycobacterium tuberculosis isolates from different parts of India based on IS6110 element polymorphism using RFLP analysis. *Indian J Med Res* 2007; 125(4): 577-81.
  31. Das S, Paramasivan CN, Lowrie DB, Prabhakar

- R, Narayanan PR. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* from patients with pulmonary tuberculosis in Madras, south India. *Tuber Lung Dis* 1995; 76(6): 550-4.
32. Magana-Arachchi DN, Medagedara D, Thevanesam V. Molecular characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Kandy, Sri Lanka. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 2011; 1(3): 181-6.
33. Berg S, Garcia-Pelayo MC, Muller B, Hailu E, Asiimwe B, Kremer K, et al. African 2, a clonal complex of *Mycobacterium bovis* epidemiologically important in East Africa. *J Bacteriol* 2011; 193(3): 670-8.
34. Gutierrez MC, Ahmed N, Willery E, Narayanan S, Hasnain SE, Chauhan DS, et al. Predominance of ancestral lineages of *Mycobacterium tuberculosis* in India. *Emerg Infect Dis* 2006; 12(9): 1367-74.
35. Kremer K, Arnold C, Cataldi A, Gutierrez MC, Haas WH, Panaiotov S, et al. Discriminatory power and reproducibility of novel DNA typing methods for *Mycobacterium tuberculosis* complex strains. *J Clin Microbiol* 2005; 43(11): 5628-38.
36. Goyal M, Lawn S, Afful B, Acheampong JW, Griffin G, Shaw R. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J Infect* 1999; 38(3): 171-5.

## Effects of Recent Transmission of Infection and Reactivation of Latent Infection with *Mycobacterium Tuberculosis* in Patients with Tuberculosis

Behnam Rafiee MSc<sup>1</sup>, Ali Asghar Farazi MD<sup>2</sup>, Davud Sadeghi MSc<sup>3</sup>, Sepideh Ghani MSc<sup>1</sup>,  
Mohammad Mohammadtaheri MSc<sup>4</sup>, Ahmad Sakhravi MSc<sup>4</sup>, Roholah Keshavarz DVM<sup>5</sup>,  
Keyvan Tadayon PhD<sup>6</sup>, Nader Mosavari PhD<sup>6</sup>

### Original Article

#### Abstract

**Background:** *Mycobacterium tuberculosis* is a successful worldwide human pathogen responsible for killing about three million people every year. It has been estimated that approximately one-third of the world population have latent infections of this pathogen. This study was performed to evaluate the role of recent transmission of infection and reactivation of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* in Markazi Province (Iran).

**Methods:** Overall, 57 sputum specimens from smear-positive patients were collected from health centers in Markazi Province. The samples were then cultured by standard methods. Afterward, genomic DNA was extracted by chloroform-isoamyl alcohol. Genetic studies were conducted by PvuII restriction fragment length polymorphism (RFLP) and DNA hybridization with IS6110 and direct repeat (DR) probes.

**Findings:** We observed a wide range of genetic diversity from *Mycobacterium tuberculosis* strains. Of 48 genotypes identified by IS6110-RFLP method, 41 were unique. On the other hand, 37 of 45 genotypes identified by DR-RFLP were unique.

**Conclusion:** The variety of genetic patterns revealed that reactivation of latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* has a more important role than recent transmission in the studied population. Our practical findings showed higher discriminatory power of IS6110-RFLP compared to DR-RFLP.

**Keywords:** Discriminatory power, *Mycobacterium tuberculosis*, Reactivation, Recent transmission, Restriction fragment length polymorphism

**Citation:** Rafiee B, Farazi AA, Sadeghi D, Ghani S, Mohammadtaheri M, Sakhravi A, Keshavarz R, Tadayon K, Mosavari N. **Effects of Recent Transmission of Infection and Reactivation of Latent Infection with *Mycobacterium Tuberculosis* in Patients with Tuberculosis.** J Isfahan Med Sch 2013; 30(219): 2310-23

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

2- Assistant Professor, Department of Infectious and Tropical Diseases, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

3- Department of Biology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran

4- Department of Tuberculin and Malein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

5- Veterinarian, Department of Tuberculin and Malein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

6- Assistant Professor, Department of Tuberculin and Malein Production and Research, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Karaj, Iran

**Corresponding Author:** Nader Mosavari PhD, Email: nmosavari@yahoo.com