

مولکولار تایپینگ سویه های

مایکو باکتریوم توبرکلوزیس به روش

IS6110-RFLP



ندا علی کوثرزاده ، مهناز سیفی ، اسماعیل جبارزاده ،
احمد رضا بهرمند، الهام صفرپور ، مرتضی معصومی

بخش سل و تحقیقات ریوی انستیتو پاستور ودانشکده
علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قم

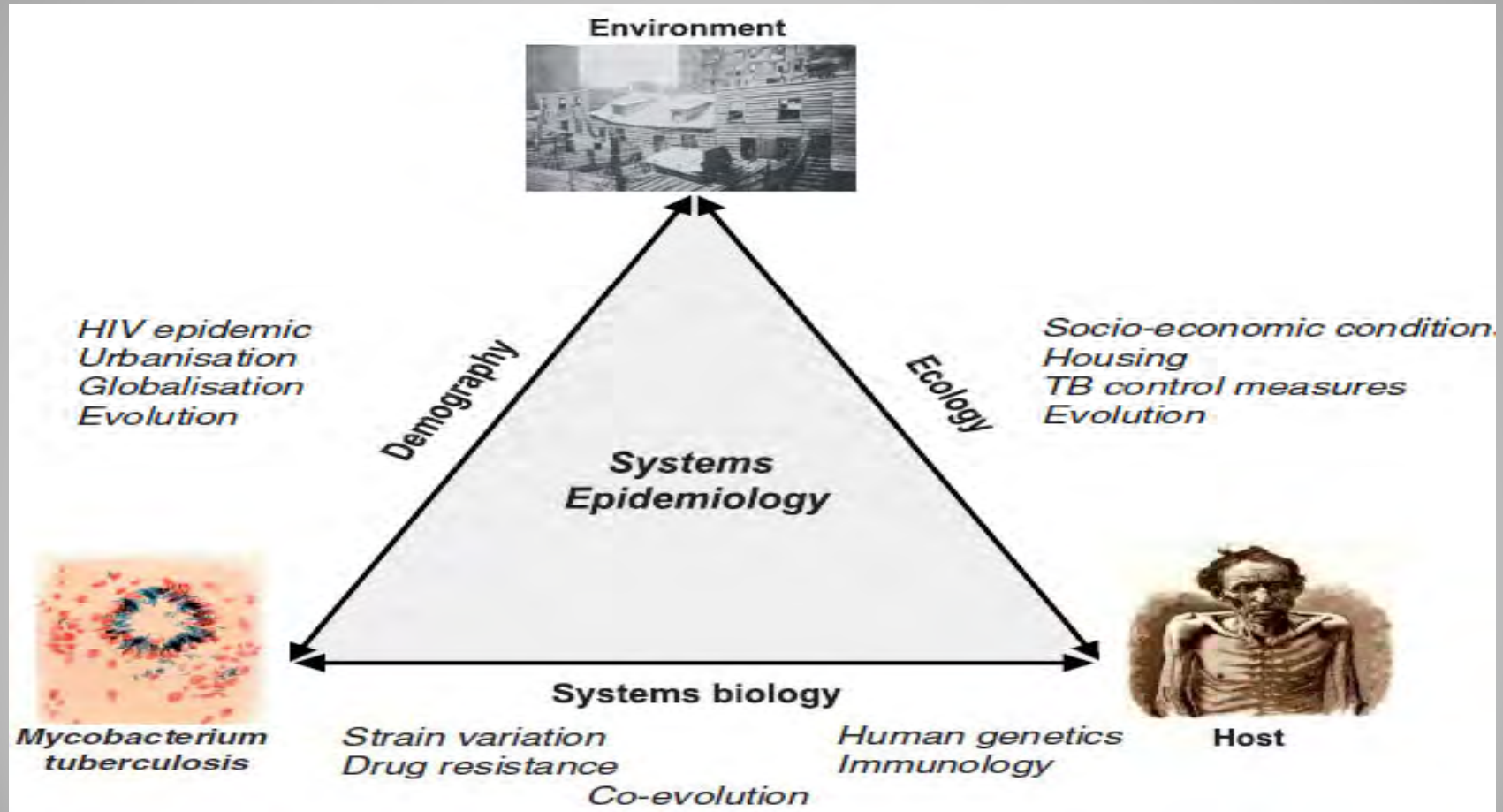
مقدمه

- طبق آمار سال 2004 سازمان بهداشت جهانی به ازای هر 100000 نفر در ایران 29 نفر به بیماری سل آلوده هستند



- مولکولار اپیدمیولوژی بیماری سل در مطالعه انتشار عامل عفونی در مکانهای اپیدمیک، شیوع آنالیز انتقال دینامیک عفونت و تعیین فاکتورهای خطر در جامعه اهمیت دارد.
- در اپیدمیولوژی مولکولی، پراکندگی و انتشار بیماری با استفاده از تکنیکهای مولکولی مورد ارزیابی قرار میگیرد. نتایج به دست آمده از اپیدمیولوژی مولکولی در تعیین برنامه ها و راهبردهای موجود در کنترل و پیشگیری از انتشار بیماری نقش به سزایی دارد.

اپیدمیولوژی بیماری سل

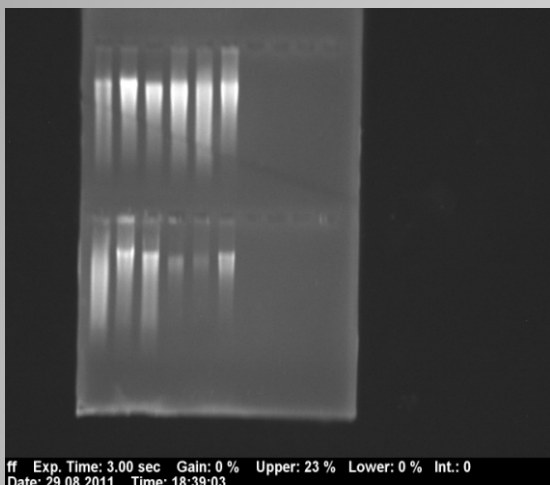


- DNA finger printing مایکوباکتریم توبرکلوزیس یک وسیله قدرتمند برای مطالعات اپیدمیولوژی توبرکلوزیس می باشد که یکی از روشهای مرسوم آن IS6110-RFLP typing یک تکنیک مولکولی و استاندارد مورد قبول برای بررسی های اپیدمیولوژی مولکولی سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.

- اساس ژنتیکی IS6110-RFLP بدین صورت است که این توالی در تعداد کمی های متفاوت و در مناطق مختلف در سویه های گوناگون وجود دارد. استفاده از این تکنیک بررسی زنجیره انتقال سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را مورد بررسی قرار میدهد و همچنین باعث شناسایی سویه های خاص با خصوصیات خاص عفونت زایی بالا و ویرولانسی یا مقاومت دارویی می شود.

مواد و روشها

- ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در عرض یک سال در انستیتو پاستور ایران، انتخاب و مورد بررسی قرار میگیرند؛
- پروتکل کلی کار به صورت خلاصه به این ترتیب می باشد:



(1) تهیه اسمیر و انجام کشت

(2) برداشت کلنی ها

(3) تهیه سوسپانسیون میکروبی و غیر فعال سازی آنها در دمای 80 درجه

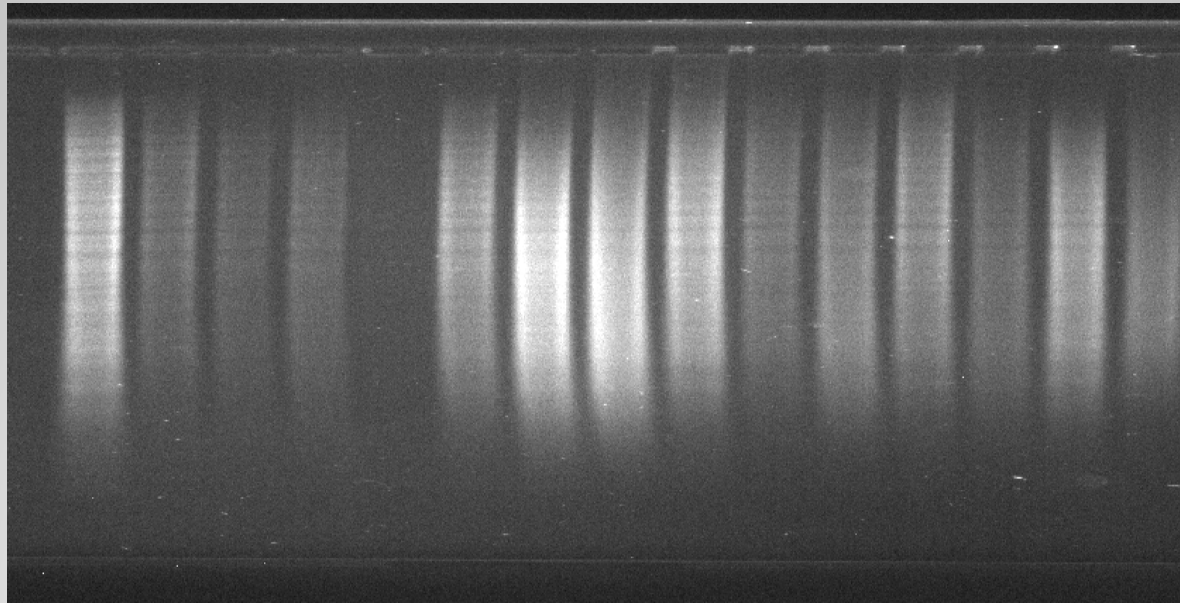
(4) استخراج DNA توسط کیت *Kiagen*

(5) انجام PCR توسط پرایمر اختصاصی جنس و گونه برای اطمینان از شناسایی TB

(6) انجام هضم آنزیمی توسط آنزیم PVUII بر روی DNA استخراج شده در دمای 37 درجه به مدت 24 ساعت

(7) الکتروفورز overnight در آگارز 0.8 %

(8) رنگ آمیزی با اتیدیوم بر مایند



(9) انجام Southern Blotting بر روی کاغذ شارژ مثبت

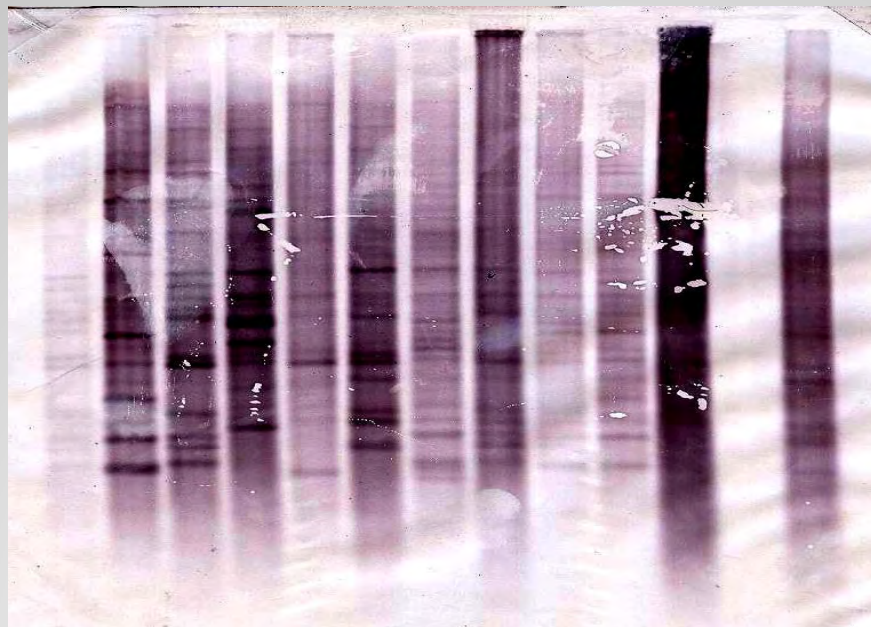
(10) هیبریداسیون و مجاورت کاغذ با پروب اختصاصی IS6110 لیبل شده با دیگوکسی ژنین

(11) شستشو های متوالی با بافر های مختلف

(12) Detection باندها با استفاده از سوبسترای NBT-BCIP

(13) بررسی باندهای ایجادشده با استفاده از نرم افزار

Gel Compare II



نتایج

- پس از بررسی 37 سویه به دست آمده؛ فعلا 4 تایپ شایع در بین ایزوله های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی شده اند که با توجه به تکمیل تر شدن بانک اطلاعاتی این سویه ها در آینده ای نزدیک احتمال شناسایی تایپهای دیگر نیز وجود دارد.

- تاکنون بین الگوی مقاومت آنتی بیوتیکی و مشخصات جمعیت شناسی بیماران مبتلا ارتباط معنی داری به دست نیامده است

بحث:

- به دلیل ثبات سکانس IS6110 در بین سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در طی زمان و به دلیل وجود تعداد کپی های مشخص در جایگاه های مختلف در بین گونه های متفاوت، اثر انگشت این سکانس در تحقیقات مربوط به شیوع بیماری سل و ایجاد تمایز بین عفونت با عامل خارجی و فعال شدت مجدد بیماری فعلی بسیار مفید است.
- مطالعات در زمینه ارتباط الگوهای به دست آمده از روشهای تایپینگ مولکولی و اطلاعات جمعیت شناسی ریسک فاکتور های انتقال سل بسیار مهم و حائز اهمیت است.
- این مطالعه تا زمان بررسی کل نمونه های 2 سال 89-90 ادامه خواهد یافت که نتایج آن در کنگره های بعدی ارائه خواهد شد.

با تشکر از توجه شما

