دوماهنامه طبّ جنوب
پژوهشکده زیست-پزشکی خلیج فارس
دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی بوشهر
سال بیست و سوم، شماره ۲، صفحه ۹۸ - ۸۷ (خرداد و تیر ۱۳۹۹)

Iran South Med J 2020; 23(2): 87-98

تیپ‌بندی ملکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های* جدا شده از بیماران ایرانی با استفاده از توالی‌های تکراری چند شکل غنی از GC

بهرام گلستانی ایمانی (PhD)[1*]، خلیل انصارین (MD, FCCP)[2]، لیلا صاحبی (PhD)[2]،
مریم سیدی (PhD)[2**]

[1] گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران
[2] مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه، دانشگاه علوم‌پزشکی تبریز، تبریز، ایران

(دریافت مقاله: ۹۸/۵/۱۲- پذیرش مقاله: ۹۸/۹/۱۹)

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

چکیده

زمینه: توبرکلوزیس (TB) با بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید در سال و به عنوان یکی از ۱۰ عامل مرگ ومیر مطرح در دنیا، همچنان یکی از مهم ترین مشکلات بهداشت جهانی است. همچنین سل مقاوم به درمان چند دارویی (MDR)، خطر جدی برای سلامت عمومی است. درک الگوی اپیدمیولوژیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTB)، که موجب برآورد انتقال اخیر و عود عفونت TB می‌باشد، با روش‌های تیپ‌بندی ملکولی امکان‌پذیر می‌باشد. این مطالعه با هدف مسیریابی و تعیین نوع انتقال عفونت *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* همراه با عوامل دموگرافیکی با روش PGRS_RFLP انجام شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۹۰ نمونه جمع‌آوری شده از بیماران مبتلا به سل ریوی از استان‌های شمال غرب و غرب ایران، با تشخیص فراوانی توالی‌های غنی از GC تیپ‌بندی گردید و عوامل دموگرافیکی مرتبط با انواع انتقال بیماری بررسی شد.

یافته‌ها: تمام جدایه‌های تحت مطالعه به۴۴ خوشه تقسیم شدند، که ۲۸ تیپ آن (۳۳/۳ درصد) منحصر به فرد بوده و ۱۶ تیپ در خوشه‌های چند عضوی قرار گرفتند. و بزرگ‌ترین خوشه، خوشه ۸ عضوی (۹/۵۲ درصد)، مربوط به استان‌های غرب ایران بود.

نتیجه‌گیری: تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دراین منطقه بسیار بالاست. میزان انتقال اخیر بر اساس خوشه‌بندی دور از انتظار بود (متوسط جهانی ۴۰-۳۰ درصد). انتقال اخیر بیماری در منطقه غرب ایران در مقایسه با منطقه شمال غرب بسیار پویاتر بود. خوشه‌بندی بر اساس PGRS_RFLP، همبستگی بالای اطلاعات ملکولی و کلاسیک را نشان می‌دهد. همچنین وجود رابطه معنی‌دار بین سابقه واکسیناسیون و خوشه بندی لزوم انجام مطالعات گسترده را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، PGRS-RFLP، تیپ‌بندی ملکولی، اپیدمیولوژی

** تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه

Email: seyyedim@tbzmed.ac.ir
***ORCID: 0000-0002-9134-2422**
**** ORCID: 0000-0001-9848-4274**

مقدمه

سل یکی از بیماری‌های عفونی تنفسی است که عواملی مانند عفونت HIV، بیماری‌های مزمن کلیه، بیماری‌های هماتولوژیک، سرکوب سیستم ایمنی، الکل، بی‌خانمانی و بدتر شدن وضعیت زندگی و بهداشتی موجب افزایش ابتلا به این بیماری می‌شود (۱). یک سوم جمعیت جهان توسط *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MTB) آلوده می شود، اما تنها در ۵ تا ۱۰ درصد این افراد بیماری سل بروز می‌کند. عفونت سل به ویژه در کشورهای در حال توسعه که دارای محدودیت‌های بهداشتی هستند، شایع است (۲).

طبق گزارش سازمان جهانی WHO در سال ۲۰۱۸، توبرکلوزیس (TB) یکی از ۱۰ علت اصلی مرگ ومیر در سراسر جهان است و در سال ۲۰۱۷، ده میلیون نفر مبتلا به بیماری سل شدند، ۱/۶ میلیون نفر از این بیماری جان خود را از دست دادند، حدود ۱ میلیون کودک مبتلا به سل شدند و ۲۳۰ هزار کودک بر اثر این بیماری کشته شدند. همچنین سل مقاوم به درمان چند دارویی (MDR)، تهدیدی برای امنیت بهداشتی همچنان بحران سلامت عمومی است (۳). علیرغم معرفی و استفاده از آنتی‌بیوتیک‌ها علیه MTB از دهه‌های پیش، بیماری سل هنوز هم به عنوان یک بیماری بسیار جدی در جوامع بشری مطرح می‌باشد (۴).

کشورهای توسعه یافته از سیاست‌های پیشگیری کننده مانند تست TST (tuberculin skin test) و IGRA interferon gamma release assay برخوردارند ولی در ایران نیز مثل کشورهای در حال توسعه به دلیل هزینه های بالا و سمیت‌های مرتبط با آن، امکان مقاومت در برابر داروهای ضد سل و خطر ابتلای دوباره به عفونت پس از درمان پیشگیرانه، به صورت گسترده اعمال نمی شود. علیرغم در دسترس بودن یک واکسن مؤثر و یک درمان مؤثر اما طولانی، این بیماری باعث ایجاد بیش از یک میلیون مرگ در هر سال می‌شود (۲).

همسایگی ایران با کشورهای عراق و جمهوری آذربایجان از سمت غرب و شمال غرب ایران که از نظر شیوع سل و مقاومت دارویی جزو کشورهای با بار بالا محسوب می‌گردند و سهولت نسبی در رفت و آمدهای بین مرزی، ردیابی منبع عفونت و پویایی انتقال بیماری ضرورت توجه بیش از پیش ما را به بیماری سل متذکر می‌شود. به این ترتیب بدیهی است که نیاز به ردیابی عفونت در ایران بخصوص در استان‌های مرزی شمال غرب و غرب بسیار قابل توجه می‌باشد (۵).

آگاهی از اپیدمیولوژی جمعیت‌های میکروبی در میکروب‌شناسی پزشکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. افزایش سویه‌های باکتریایی بیماری‌زا، افزایش روش‌های جدید انتقال ارگانیسم‌ها به میزبان مورد نظر و توسعه مقاومت آن‌ها به آنتی‌بیوتیک‌ها عامل مهمی جهت شناسایی، پایش منشأ و نحوه انتشار سویه‌های یک گونه بوده است (۶). یکی از مهم‌ترین و جدیدترین امکانات جهت شناسایی منبع عفونت و ردیابی بیماری تیپ‌بندی باکتری می‌باشد. انتقال MTB را می‌توان با استفاده از تکنیک‌های انگشت‌نگاری مولکولی استاندارد، برای مقایسه سویه‌های بین آزمایشگاه‌ها، مناطق و کشورها مورد مطالعه قرار داد. همچنین، روش های ژنوتیپ مولکولی می‌توانند منشأ تکاملی را روشن کنند، شیوع بیماری وآلودگی‌های آزمایشگاهی احتمالی را شناسایی کنند، میزان انتقال اخیر را برآورد کنند (۷). و در نهایت در اقدامات مناسب جهت کنترل و درمان بیماری، تیپ‌بندی می‌تواند در شناسایی سویه‌های بیجینگ و سویه‌های مقاوم در برابر چند دارو کمک کند (۸ و ۹).

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

در حال حاضر طیف گسترده‌ای از روش‌های مولکولی برای شناسایی ژنوتیپ‌های MTB مورد استفاده قرار می گیرند، با این حال، با توجه به شرایط ویژه آزمایشگاهی و ویژگی‌های خاص منطقه جغرافیایی، قابلیت این تکنیک‌ها برای تیم‌های تحقیقاتی متفاوت است (۱۰).

در میان این تکنیک‌ها، روش استاندارد IS6110 Restriction Fragment Length Polymorphism (IS6110-RFLP) به عنوان قابل اعتمادترین روش تیپ‌بندی اپیدمیولوژیک در تعیین زیرگونه‌های MTB (۱۱) و اغلب در ایران برای ژنوتایپینگ MTBمورد استفاده قرار گرفته است (۱۲). این تکنیک بر اساس حضور ترانسپون‌های IS6110 است که به طور خاص در ژنوم MTB در سایت‌های مختلف وجود دارد. به عنوان روش ژنوتیپینگ بر اساس ثبات نسبی در طول زمان و تعداد کپی متغیر و مکان در ژن‌ها دارای بهترین اعتبار است (۱۳). بااین حال، این روش دارای محدودیت‌هایی است از جمله، نیاز به مقادیر زیادی از ژنوم باکتری با کیفیت بالا، نرم‌افزارهای کامپیوتری پیچیده و گران قیمت برای تجزیه و تحلیل نتایج و نیاز به پرسنل متخصص و تجهیزات ویژه. اما محدودیت عمده این روش قدرت تفکیک کم آن برای ایزوله‌های با تعداد کمتر از ۵ ویرایش IS6110 می‌باشد (۱۴).

محتوای GC یک پارامتر مهم برای طبقه‌بندی باکتری و یک شاخص مناسب برای بسیاری از خصوصیات فیزیکی ژنوم باکتری می‌باشد. درصد محتوای GC در انواع *مایکوباکتریوم* متفاوت است و این تفاوت بر اساس اندازه ژنوم هر باکتری طبیعی به نظر می‌رسد (۷). به همین دلیل روش تایپینگ ثانویه با استفاده از توالی غنی GC برای افزایش قدرت شناسایی در مورد ایزوله‌هایی با تعداد کپی IS6110 برابر یا کمتر از ۵ استفاده می‌شود (۱۵).

این تکنیک تیپ‌بندی polymorphic guanine-cytosine rich sequence -RFLP (PGRS) دارای قدرت خوشه‌بندی بیشتر نسبت به روش RFLP-IS6110 برای ایزوله‌های با تعداد کمتر از ۵ ویرایش IS6110 می‌باشد (۱۶). عناصر PGRS نسبت به عناصر IS6110 پایدارتر هستند (۱۷). به همین دلیل یک روش تیپ‌بندی بسیار مناسب در کنار روش تیپ‌بندی استاندارد MTB می‌باشد.

هدف از این تحقیق تیپ‌بندی ملکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های* جدا شده از بیماران با استفاده از توالی های تکراری چند شکلی غنی از GC در پنج استان مرزی شمال غرب و غرب ایران و بررسی عوامل دموگرافیکی و بالینی مرتبط با انواع انتقال بیماری می‌باشد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌گیری و کشت باکتری‌ها

در این مطالعه تعداد ۹۰ نمونه خلط از بیماران سل ریوی اسمیر مثبت از مراکز بهداشت و درمان استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، کردستان و کرمانشاه جمع‌آوری شد (نمونه‌ها مربوط به بیماران سال های ۹۲-۹۱ بودند). ملاحظات اخلاقی در جمع‌آوری اطلاعات رعایت گردید و رضایت‌نامهٔ آگاهانه از کلیهٔ افراد شرکت کننده در طرح و یا اولیای آنان بر اساس پروتکل اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز اخذ گردید. پس از آلودگی‌زدایی به روش N استیل L سیستئین جهت تکثیر و بررسی رشد در محیط‌های شیب‌دار لونشتین جانسون حاوی گلیسیرین کشت داده شد. کلنی‌ها از نظر تولید رنگدانه و سرعت رشد مورد بررسی قرار گرفت. جهت افتراق گونه‌ها آزمون‌های بیوشیمیایی شامل تولید نیاسین و فعالیت کاتالایزی در دو دمای ۲۲ و ۶۸ درجه انجام گرفت و در نهایت پس از بررسی کلنی‌های مشکوک، ۸۴ نمونه (۲ نمونه به علت آلودگی، ۳ نمونه به علت عدم رشد و ۱ نمونه به علت رشد نان توبرکلوزیس (NTM) از ۹۰ نمونه

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

جمع‌آوری شده از مطالعه خارج شدند)، به عنوان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تأیید شدند.

استخراج DNA

جهت استخراج DNA ژنومیک از باکتری‌ها از استاندارد ون سولینگن (۱۸) استفاده شد. بدین منظور از ایزوله‌های بالینی رشد کرده بر روی محیط Lowenstein-Jensen حداقل ۳-۲ کلونی در بافر TE سوسپانسیون تهیه شد، در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه غیرفعال شد، پس از شستشو با بافر TE، با لیزوزیم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرماگذاری شدند. سپس پروتئیناز K اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از اضافه کردن CTAB/NaCl+NaCl 5M و کلروفرم/ ایزوآمیل الکل، برای جدا کردن ۳ فاز، ایزوپروپانول به هر نمونه اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در یخچال منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در نهایت پس از حذف مواد اضافی با استفاده از اتانول ۷۰ درصد و اضافه کردن ۳۰-۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر، نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۳ ساعت انکوبه شدند. در این روش DNA ژنومیک به طور کامل و بدون کوچک‌ترین شکستگی استخراج و جهت RFLP آماده گردید. لازم به ذکر است جهت بررسی کیفیت و کمیت DNA استخراج شده نیز از الکتروفورز کوتاه مدت و نانودراپ استفاده گردید.

PGRS_RFLP

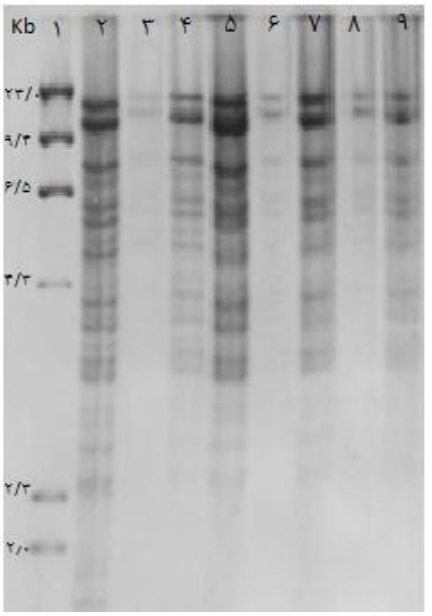
به منظور هضم آنزیمی، آنزیم محدود کننده ALU1 به مقدار ۱ میکرولیتر و ۴ میکرولیتر از DNA ژنومیک استخراج شده باکتری به همراه ۲ میکرولیتر بافر X۱۰ آنزیم و آب مقطر به مدت یک شب در دمای ۳۷ درجه انکوبه گردید. جهت ساترن بلاتینگ از روش کپلری و بر روی غشاء نایلونی با شارژ مثبت (Roche) استفاده شد و پس از Crosslinking غشاء ساترن شده توسط اشعه UV هیبریداسیون و شناسایی صورت گرفت بدین ترتیب که، غشاء حاصل از مرحله ساترن بلاتینگ با استفاده از محلول پری‌هیبریداسیون (Roche) در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون هیبریداسیون قرار گرفت. سپس برای انجام هیبریداسیون با افزودن پروب اختصاصی PGRS (تکنولوژی دانمارک) نشاندار شده با دیگوکسیژنین (Roche)، به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد در دستگاه باقی ماند. در مرحله بعد شستشوی لازم جهت از بین بردن اتصال‌های غیراختصاصی پروب، برای غشاء صورت گرفت و آنتی‌بادی ضد دیگوکسیژنین (Roche) کنژوکه شده با آلکالین فسفاتاز (Merck به غشاء نایلونی اضافه شد و در نهایت جهت آشکارسازی از سوبستراهای NBT/BCLP(Roche استفاده شد و باندهای شناسایی شده توسط پروب قابل رؤئت گردید (۱۹).

تجزیه و تحلیل داده‌ها

آنالیز تصاویر حاصله از هیبریداسیون پروب با قطعات برش خورده DNA، که نمونه باندهای تشکیل شده در آزمون RFLP بر مبنای مارکر PGRS در شکل ۱ آورده شده است (شکل ۱)، علاوه بر مشاهده چشمی، از طریق برنامه تحلیلی G Box (ژل داکت Syngene SYDR41451،G:box, ساخت کشور انگلستان) و با استفاده از نرم‌افزار اورجینال ژل داکت فوق هم مورد ارزیابی قرار گرفت. جهت بررسی ارتباط عوامل دموگرافیک و بالینی با نوع سویه‌ها از آزمون‌های X۲ و آزمون دقیق فیشر در SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]



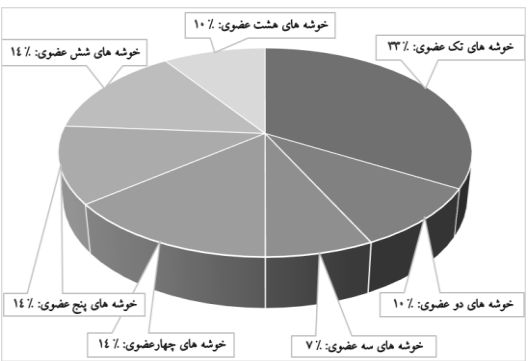
شکل ۱) آزمون RFLP بر مبنای مارکرهای غنی از GC

ستون ۱ سایز مارکر، ستون ۲ سویه استاندارد، ستون ۳ نمونه شماره ۵، ستون ۴ نمونه شماره ۱۲، ستون ۵ نمونه شماره ۱۹، ستون ۶ نمونه شماره ۲۹، ستون ۷ نمونه شماره ۴۱، ستون ۸ نمونه شماره ۶۰، ستون ۹ نمونه شماره ۶۳

یافته‌ها

در این تحقیق، ۸۴ بیمار شرکت کننده در مطالعه از نظر اطلاعات دموگرافیکی مورد بررسی و طبقه‌بندی قرار گرفت که در جدول ۱ آورده شده است (جدول ۱).

در بررسی فوق از بین نمونه‌هایی که تحت آنالیز ژنومی قرار گرفتند و دسته‌بندی شدند. ۲۸ ایزوله (۳۳/۳ درصد) در خوشه‌های تک عضوی و۵۶ ایزوله (۶۶/۷ درصد) در خوشه‌های چند عضوی قرار گرفتند. بدین ترتیب ۴۲ تیپ ژنتیکی به دست آمد که ۲۸ تیپ آن منحصر به فرد (۳۳/۳ درصد)، بوده و ۱۶ تیپ به ترتیب در ۴ خوشه ۲ عضوی (۹/۵۱ درصد)، ۲ خوشه ۳ عضوی (۷/۱۴ درصد)،۳ خوشه ۴ عضوی (۱۴/۲۸ درصد)، ۲ خوشه ۵ عضوی (۱۱/۹ درصد)، ۲ خوشه ۶ عضوی (۱۴/۲۸ درصد) و ۱ خوشه ۸ عضوی (۵۲/۹ درصد) قرار داشتند (نمودار ۱).



نمودار ۱) نتایج خوشه‌بندی سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به روش PGRS-RFLP

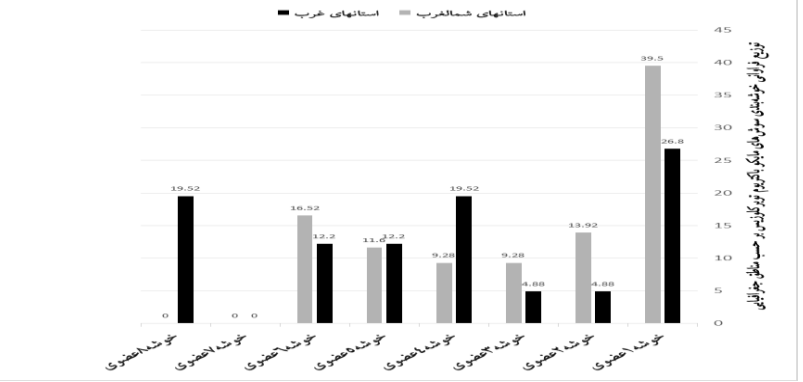
Fig 1) Results of the Clustering *Mycobacterium tuberculosis* by PGRS-RFLP method

در خوشه‌های به‌دست آمده در این تحقیق پرجمعیت ترین خوشه یک خوشه ۸ عضوی بود که یک همبستگی قوی اطلاعات اپیدمیولوژیکی کلاسیک با نتایج ملکولی را نشان داد. به این ترتیب که هر ۸ عضو خوشه مربوط به بیماران استان‌های غرب بودند که ۸۰ درصد مربوط به ایزوله‌های استان کرمانشاه و ۲۰ درصد مربوط به

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

ایزوله‌های استان کردستان بود که توزیع فراوانی خوشه بندی به تفکیک استان‌های تحت مطالعه در نمودار ۲ نشان داده شده است (نمودار ۲).



نمودار ۲) توزیع فراوانی خوشه‌بندی سویه‌های مایکو باکتریوم توبرکلوزیس بر حسب مناطق جغرافیایی به روش PGRS-RFLP

Fig 2) Frequency distribution of *Mycobacterium tuberculosis* strains clustering according to geographical regions by PGRS-RFLP metod

در تحلیل مقایسه استان‌های شمال غرب و غرب بر اساس شانس خوشه‌بندی، استان‌های غرب بیشتر از استان‌های شمال‌غرب تمایل به تشکیل خوشه نشان دادند و در واقع ایجاد خوشه‌های با جمعیت بزرگ‌تر بیشتر ایزوله‌های استان‌های کردستان و کرمانشاه بودند. در مطالعه حاضر یک رابطه قوی بین خوشه‌بندی و گروه درمانی ۱ (بیماران بدون سابقه درمان) وجود داشت که ۷۵/۵ از بیماران بدون سابقه درمان در خوشه های شبیه به هم و ۲۴/۵ از بیماران همین گروه از سوش های منحصر به فرد بودند (P=۰/۰۰۴). همچنین رابطه معنی‌داری بین سابقه واکسیناسیون و تشکیل خوشه به دست آمد (P=۰/۰۴۹). به طوری که ۵۸/۵ درصد افرادی که سابقه واکسیناسیون در آن‌ها وجود نداشت در خوشه‌های چند عضوی قرار گرفتند.

لازم به ذکر است بین متغیرهای جنسیت، مذهب، اعتیاد به مواد مخدر، استعمال دخانیات، سابقه مهاجرت از روستا به شهر، مناطق جغرافیایی، سن، میزان تحصیلات و وضعیت تأهل و گروه‌های منحصر به فرد و خوشه بندی رابطه معناداری وجود نداشت (جدول ۱).

جدول ۱) رابطه آماری بین عوامل دموگرافیک و خوشه‌بندی در بین بیماران اسمیر مثبت ریوی شمال‌غرب و غرب ایران

متغیر	فاکتور	N (درصد)	خوشه‌های شبیه به‌هم	منحصر به‌فرد	X^2	P-value
سن	<۲۰	۸(۹/۵۲)	۶(۷۵/۰)	۲(۲۵/۰)	-	-

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

	۲۰-۴۰	۶(۷/۱)	۵(۸۳/۳)	۱(۱۶/۷)		
	۴۰-۶۰	۳۶(۴۲/۹)	۲۱(۵۸/۳)	۱۵(۴۱/۷)		
	>۶۰	۳۴(۴۰/۴۷)	۲۴(۷۰/۶)	۱۰(۲۹/۴)		
جنسیت	زن	۴۳(۵۱/۲)	۲۹(۶۷/۴)	۱۴(۳۲/۶)	۱/۰	۰/۰۲۴
	مرد	۴۱(۴۸/۸)	۲۷(۶۵/۹)	۱۴(۳۴/۱)		
استان‌ها	شمال‌غرب	۴۳(۵۱/۲)	۲۶(۶۰/۵)	۱۷(۳۹/۵)	۱/۵۲	۰/۲۵
	غرب	۴۱(۴۸/۸)	۳۰(۷۳/۲)	۱۱(۲۶/۸)		
واکسیناسیون	دارد	۱۹(۲۲/۶۱)	۱۶(۸۴/۲)	۳(۱۵/۸)	۴/۰۸	۰/۰۴۹
	ندارد	۵۳(۶۳/۰۹)	۳۱(۵۸/۵)	۲۲(۴۱/۵)		
اعتیاد به مواد مخدر	دارد	۲(۲/۳۸)	۱(۵۰/۰)	۱(۵۰/۰)	۰/۵۸	۰/۴۷
	ندارد	۳۹(۴۵/۲)	۲۹(۷۴/۴)	۱۰(۲۵/۶)		
استعمال دخانیات	دارد	۵۰(۵۹/۵۲)	۳۵(۶۸/۶)	۱۶(۳۱/۴)	۰/۱۶	۰/۷۹
	ندارد	۲۵(۲۹/۷۶)	۱۶(۶۴/۰)	۹(۳۶/۰)		
سابقه مهاجرت	دارد	۹(۱۰/۷)	۷(۷۷/۸)	۲(۲۲/۲)	۰/۷۳	۰/۴۷
	ندارد	۵۷(۶۷/۵۸)	۳۶(۶۳/۲)	۲۱(۳۶/۸)		
وضعیت تأهل	مجرد	۱۱(۱۳/۱)	۹(۸۱/۸)	۲(۱۸/۲)	-	-
	متاهل	۴۲(۵۰)	۲۵(۵۹/۵)	۱۷(۴۰/۵)		
	همسرفوت شده/ جداشده	۱۷(۲۰/۲۳)	۱۳(۷۶/۵)	۴(۲۳/۵)		
گروه درمانی	بیمار جدید	۴۹(۵۸/۳)	۳۷(۷۵/۵)	۱۲(۲۴/۵)	۹	۰/۰۰۴

بحث

امروزه مشخص شده که باسیل *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قادر است عفونت خود را بلافاصله پس از ابتلای شخص گسترش دهد یا سال‌ها پس از ابتلا علائم بیماری را بروز دهد که می‌تواند به واسطه فعالیت مجدد عفونت قبلی یا ابتلای مجدد شخص بروز کند (۲۰). همان‌طور که می‌دانیم بروز بیماری سل به عواملی مانند شیوع سل در منطقه، مدت عفونت در بیماران و میزان تماس افراد با بیماران وابسته است (۲۱).

از طرف دیگر فقدان مارکرهای توانمند برای شناسایی گونه های مختلف *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مانع مطالعات اپیدمیولوژیکی شده است. این در حالی‌ست که ظهور تکنیک‌های ملکولی در اپیدمیولوژی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* یک فرصت مناسب برای استفاده از مارکرهای مؤثر برای ردیابی انتقال بیماری در محیط زیست انسانی و شناسایی ویژگی‌های تکاملی نژادی از گونه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را به وجود آورده است (۱۵) و قدرت تفکیک هر تکنیک به سیرتکاملی و پایداری مارکر مربوط به آن تکنیک بستگی دارد. مثلا در مورد سویه‌های بیجینگ مارکر IS6110 چندان جوابگو نمی‌باشد چون این مارکر فقط تغییرات زنتیکی اخیر را نشان می‌دهد (۲۲). هرچند که استفاده ترکیبی از چندین مارکر برای ژنوتایپینگ MTB نتایج دقیق‌تری ارائه می‌دهد ولی این در مورد سویه هایی با تعداد کپی کمتر از ۵ از کپی‌های IS6110 و سویه های غیربیجینگ امکان‌پذیر می‌باشد. به نظر می‌رسد بهترین متد برای تیپ‌بندی ایزوله‌هایی با تعداد پایین کپی‌هایی از IS6110 و سویه‌های بیجینگ استفاده از مارکر PGRS به علت پایداری المنت‌ها می‌باشد (۲۲).

در این مطالعه که تیپ‌بندی ملکولی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌ها* با استفاده از توالی‌های تکراری چند شکلی غنی از GC از بیماران بومی استان‌های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، کردستان و کرمانشاه صورت گرفت از ۸۴ زیرگونه مربوط به بیماران مختلف ۴۲ تیپ مختلف ژنتیکی به دست آمد.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

بر اساس تحقیقات انجام شده اعتقاد بر این است که تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در سطح دنیا بسیار بالاست. به‌طور مثال رفیعی و همکاران، در مطالعه ای که بر روی ۵۷ نمونه ایزوله شده از بیماران مسلول استان مرکزی ایران به روش RFLP-PGRS انجام دادند، ۴۵ تیپ ژنتیکی مختلف (۱۹)، یعقوبی و همکاران، به روش IS6110-RFLP روی ۶۲ نمونه از استان مرکزی ژنوتایپینگ انجام داده و ۵۰ تیپ ژنتیکی (۱۵)، فرنیا و همکاران (Farnia & et al)، برای بررسی انتقال اخیر عفونت بین بیماران ایرانی و بیماران مهاجر افغانی، مطالعه‌ای بر روی ۲۵۸ بیمار انجام دادند که ژنوتایپینگ به روش IS6110-RFLP بر روی ایزوله های بیماران ایرانی ۶۰ تیپ ژنتیکی (۲۳) و چاوز (Chaves) ۳۵ تیپ مختلف ژنتیکی را در بررسی ۴۷ نمونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به روش RFLP-PGRS به‌دست آورد (۲۴). کاظمیان و همکاران، نیز در سال ۲۰۱۹ بالا بودن تنوع ژنتیکی MTB در ایران را به روش RFLP-PGRS بر روی ۳۳ نمونه MDR جدا شده از بیماران چهار منطقه تهران، مشهد، کرمانشاه و زاهدان نشان دادند (۷).

نتایج مطالعه ما ضمن داشتن همخوانی کامل با مطالعات صورت گرفته بالا بودن تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در منطقه را نیز تأیید می‌نماید.

به‌طور کلی فراوانی نسبی گروه‌های خوشه‌بندی ۶۶/۷ درصد برآورد شد. و در مقایسه با مطالعه دیگری که در استان مرکزی با استفاده از روش PGRS_RFLP انجام شده بود (۴۵ درصد) بیشتر بود (۱۹)، فراوانی خوشه بندی در مطالعه ما بیشتر بود. به طور کلی در کشورهای افریقایی و آسیایی الگوهای PGRS اغلب نسبت به مناطق با بروز پایین‌تر TB کمتر متغییر هستند یعنی فراوانی و در عین حال اندازه خوشه‌ها در مقایسه با ایزوله‌های منحصربه‌فرد بیشتر است و این مطلب در مورد الگوهای IS6110 نیز به همین ترتیب بیان شده است (۲۵).

در این مطالعه نوع منطقه جغرافیایی یک رابطه قوی با خوشه‌بندی و در نتیجه احتمال انتقال جدید داشت. به این ترتیب که اکثریت بیماران استان‌های غرب (کردستان و کرمانشاه) در اثر انتقال اخیر به بیماری مبتلا شده بودند. و در مورد خوشه‌های بزرگ‌تر از ۴ که بخش قابل توجهی از مطالعه ما را شامل می‌شود، می‌تواند یک هشدار جدی در طغیان بیماری در منطقه خاص باشد این طغیان می‌تواند از طرف کشورهای هم مرز با بار بالا متوجه این مناطق شده باشد. بر اساس نتایج مطالعات مختلف در کشورهایی که بروز بیماری کمتر است احتمال خوشه‌بندی نیز کمتر است. مقایسه بروز بیماری سل در مناطق شمال غرب و غرب نیز تأیید کننده این مطلب است که خوشه‌بندی استان‌های غرب بیشتر از شمال غرب کشور باشد.

متغیر دیگری که در این مطالعه بررسی شد جنسیت و سن بیماران بود تحقیقی در فرانسه توسط گوترز و همکاران (Gutierrez & et al)، انجام شد که در آن مطالعه بین جنسیت مرد و خوشه‌بندی رابطه پیدا شده بود (۲۶). ولی در مطالعه حاضر رابطه معنی‌داری بین جنسیت و سن با خوشه‌بندی در ایزوله‌های سل پیدا نشد (P<۰/۰۵) و این طور به نظر می‌رسد که انتقال اخیر بیماری در بین مردان و زنان متفاوت از هم نباشد. در تحلیل مقایسه بیماران در دو گروه درمانی (بیمار جدید و بیمار با سابقه درمان) بر اساس خوشه‌بندی، رابطه قوی و معنی‌داری بین گروه درمانی ۱ (بدون سابقه درمان) و خوشه‌بندی به دست آمد به این ترتیب که ۷۵/۵ درصد از بیماران این گروه در خوشه‌های شبیه به هم قرار داشتند که این مطلب نیز تأییدکننده انتقال اخیر

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

در بین بیماران بدون سابقه درمان می‌باشد که متأسفانه به علت در دسترس نبودن مقاله‌هایی مرتبط با این مطلب به روش RFLP_GRSP مقایسه بین نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر امکان‌پذیر نبود.

در مطالعه حاضر سابقه واکسیناسیون یک ارتباط معنی‌دار با خوشه‌بندی را نشان داد. به‌طوری که افرادی که سابقه واکسیناسیون در آن‌ها وجود نداشت شاخص بالاتری از آلودگی و انتقال بیماری را دارا بودند. بر اساس نتایج چندی از مطالعات، واکسیناسیون می‌تواند از ابتلا کودکان به نوع شدیدتر بیماری پیشگیری کند (۲۷) و همچنین اثر حفاظتی قوی در مقابل سل خارج ریوی نشان دهد (۲۸).

از نظر استعمال دخانیات، هر چند ۶۸/۶ درصد از بیماران سیگاری در خوشه‌های شبیه به هم قرار گرفتند اما در تحلیل آماری هیچ رابطه معنی‌داری بین استعمال دخانیات با خوشه‌بندی به دست نیامد (P=۰/۷۹).

در مطالعه حاضر یکی دیگر از عوامل دموگرافیکی سابقه مهاجرت از روستا به شهر بود که تحت بررسی قرار گرفت. هر چند در گزارشات ارائه شده بین مهاجرت با خوشه‌بندی رابطه یافت شده است (۲۹). اما از انجا که در مطالعه حاضر، بررسی سابقه مهاجرت صرفاً از روستا به شهر بود الزاماً بیماران مورد ارزیابی، بومی مناطق خود بودند لذا امکان مقایسه با مطالعات دیگر فراهم نبود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه، اطلاعاتی در مورد اپیدمیولوژی مولکولی MTB در نواحی غرب و شمال‌غرب ایران را فراهم می کند. افزایش هشدار دهنده در بروز TB، باعث افزایش نگرانی در مورد برنامه‌های کنترل سل در این نواحی می شود. تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در منطقه مورد مطالعه بالا بود. میزان انتقال اخیر بر اساس خوشه بندی دور از انتظار بود (متوسط جهانی ۴۰-۳۰ درصد). انتقال اخیر بیماری در منطقه غرب ایران در مقایسه با منطقه شمال غرب بسیار پویاتر بود. رابطه قوی بین بیماران گروه درمانی ۱ (بدون سابقه درمان) و خوشه‌بندی بر اساس PGRS_RFLP می‌تواند همبستگی بالای اطلاعات ملکولی و کلاسیک را نشان دهد. همچنین وجود رابطه معنی‌دار بین سابقه واکسیناسیون و خوشه‌بندی لزوم انجام مطالعات گسترده را نشان می‌دهد. و در نهایت تشخیص سریع بیماران، بررسی ارتباطات نزدیک با بیماران مبتلا به TB، برای کاهش گسترش بیماری در جامعه در اولویت می‌باشد.

از محدودیت‌های این مطالعه، پیچیده بودن مراحل انجام تکنیک، هزینه بالای آن، زمان‌بر بودن انجام تکنیک و جمع آوری نمونه‌ها از مراکز استان‌های مختلف و مشکلات مربوط به آنالیز باندها به علت تعداد بالای باندهای تشکیل شده می‌توان اشاره کرد. در دسترس نبودن مقاله‌هایی با این روش ملکولی به میزان کافی از سایر محدودیت‌های این مطالعه می‌باشد و همچنین به دلیل وجود بعد مسافت بین استان‌ها و در دسترس نبودن بیماران تعدادی از داده‌ها را از دست دادیم.

سپاس و قدردانی

نویسندگان از کارکنان آزمایشگاه‌های سل و بیماران مسلول استان‌های غرب و شمال غرب کشور تشکر می‌کنند.

حمایت مالی این مطالعه توسط مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه دانشگاه علوم پزشکی تبریز صورت گرفته است.

تضاد منافع

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

References:

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

1.Kruczak K, Augustynowicz-Kopeć E, Kozińska M, et al. Tuberculosis Transmission in the Population of Patients from the Krakow Region (Poland) Based on the Epidemiological and Molecular Methods. Int J Mycobacteriol 2019; 8(1): 60-9.
2.Essone PN, Leboueny M, Siawaya ACM, et al. M. Tuberculosis Infection and Antigen Specific Cytokine Response in Healthcare Workers Frequently Exposed to Tuberculosis. Sci Rep 2019; 9(1): 8201.
3.Tuberculosis WHO. Tuberculosis. (Accessed October 17, 2019, at https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/tuberculosis)
4.Houben RM, Dodd PJ. The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: a Re-estimation Using Mathematical Modelling. PLoS Med 2016; 13(10): e1002152.
5.Sahebi L, Ansarin K, Seyyedi M, et al. Epidemiology and Patterns of Drug Resistance among Tuberculosis Patients in Northwestern Iran. Indian J Med Microbiol 2016; 34(3): 362-8.
6.Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, et al. Multidrug-Resistant, Extensively Drug-resistant and Pandrug-resistant Bacteria: an International Expert Proposal for Interim Standard Definitions for Acquired Resistance. Clin Microbiol Infect 2012; 18(3): 268-81.
7.Kazemian H, Kardan-Yamchi J, Mosavari N, et al. Molecular Characterization of Multidrug and Extensive Drug-resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates from Iran. Infez Med 2019; 27(1): 26-31.
8.Vyazovaya AA, Mokrousov IV, Zhuravlev VY, et al. The Molecular Characteristic of Multidrug-resistant Strains of *Mycobacterium Tuberculosis* Isolated in Northwestern Russia. Mol Genet Microbiol Virol 2016; 31(1): 36-9.
9.Vaziri F, Kohl TA, Ghajavand H, et al. Genetic Diversity of Multi-and Extensively Drug-Resistant *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates in the Capital of Iran, Revealed by Whole-Genome Sequencing. J Clin Microbiol 2019; 57(1): e01477-18.
10.Ei PW, Aung WW, Lee JS, et al. Molecular Strain Typing of *Mycobacterium Tuberculosis*: A Review of Frequently Used Methods. J Korean Med Sci 2016; 31(11): 1673-83.
11.Gonzalo-Asensio J, Pérez I, Aguiló N, et al. New Insights into the Transposition Mechanisms of IS6110 and its Dynamic Distribution between *Mycobacterium Tuberculosis* Complex Lineages. PLoS Genet 2018; 14(4): e1007282.
12.Sahebi L, Ansarin K, Hoffner S, et al. A Molecular Epidemiology of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains in the North West and West of Iran. Ann Med Health Sci Res 2015; 5(5): 334-9.
13.Chae H, Shin SJ. Importance of Differential Identification of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains for Understanding Differences in their Prevalence, Treatment Efficacy, and Vaccine Development. J Microbiol 2018; 56(5): 300-11.
14.Jagielski T, Van Ingen J, Rastogi N, et al. Current Methods in the Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* and other Mycobacteria. Biomed Res Int 2014; 2014: 645802.
15.Yaghoubi S, Mosavari N, Moradi Bidhendi S, et al Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Markazi Province. Iran South Med J. 2014; 17 (4) :602-611. (Persian)
16.Ross BC, Raios K, Jackson K, et al. Molecular Cloning of a Highly Repeated DNA Element from *Mycobacterium Tuberculosis* and Its Use as an Epidemiological Tool. J Clin Microbiol 1992; 30(4): 942-6.
17.Kumar V, Abbas AK, Fausto NMR. Robbins Basic Pathology. 8th ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2007, 516-22.
18.Van Soolingen D, De Haas PE, Kremer K. Restriction Fragment Length Polymorphism Typing of Mycobacteria. Methods Mol Med 2001; 54: 165-203.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

19.Rafiee B, Mosavari N, Farazi AA, et al. DNA Fingerprinting of Mycobacterium Tuberculosis Isolates of Pulmonary Tuberculosis Patients in Markazi Province by PGRS-RFLP Method. J Arak Uni Med Sci 2012; 15(6): 35-44. (Persian)
20.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(21): 3769-77.
21.Doroudchi M, Kremer K, Basiri EA, et al. IS6110- RFLP and Spoligotyping of *Mycobacterium Tuberculosis* Isolates in Iran. Scand J Infect Dis 2000; 32(6): 663-8.
22.Richardson M, Van Der Spuy GD, Sampson SL, et al. Stability of Polymorphic GC-Rich Repeat Sequence-Containing Regions of *Mycobacterium Tuberculosis*. J Clin Microbiol 2004; 42(3): 1302-4.
23.Farnia P, Masjedi MR, Varahram M, et al. The Recent-Transmission of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains Among Iranian and Afghan Relapse Cases: A DNA-Fingerprinting Using RFLP and Spoligotyping. BMC Infect Dis 2008; 8: 109.
24.Chaves F, Yang Z, El Hajj H, et al. Usefulness of the Secondary Probe pTBN12 in DNA Fingerprinting of *Mycobacterium Tuberculosis*. J Clin Microbiol 1996; 34(5): 1118-23.
25.Borges M, Cafrune PI, Possuelo LG, et al. Molecular Analysis of *Mycobacterium Tuberculosis* Strains from an Outpatient Clinic in Porto Alegre. J Bras Pneumol 2004; 30(4): 358-64.
26.Gagneux S, DeRiemer K, Van T, et al. Variable Host–pathogen Compatibility in *Mycobacterium Tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(8): 2869-73.
27.Arbeláez MP, Nelson KE, Muñoz A. BCG Vaccine Effectiveness in Preventing Tuberculosis and its Interaction with Human Immunodeficiency Virus Infection. Int J Epidemiol 2000; 29(6): 1085-91.
28.Lei JP, Xiong GL, Hu QF, et al. Immunotherapeutic efficacy of BCG vaccine in pulmonary tuberculosis and its preventive effect on multidrug-resistant tuberculosis. Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine] 2008; 42(2): 86-89.
29.Maliarik MJ, Iannuzzi MC. Host Genetic Factors in Resistance and Susceptibility to Tuberculosis Infection and Disease. Semin Respir Crit Care Med 2003; 24(2): 223-8.

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]

Original Article

Molecular Typing of *Mycobacterium Tuberculosis* Isolated from Iranian Patients Using Highly Abundant Polymorphic GC-Rich-Repetitive Sequence

B. Golestani Eimani (PhD)[1*], Kh. Ansarin (FCCP, MD)[2], L. Sahebi (PhD)[2], M. Seyyedi (PhD)[2**]

[1] Department of Biology, School of Basic Sciences, Islamic Azad University, Urmia, Iran

[2] Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

(Received 3 Aug, 2019 Accepted 10 Dec, 2019)

Abstract

Background: Tuberculosis (TB) with more than 10 million new cases per year and one of the top 10 causes of death worldwide, is still one of the most important global health problems. Also, multi drug-resistant tuberculosis (MDR) is a serious danger to public health. Understanding of the epidemiological pattern of *mycobacterium tuberculosis* (MTB), Estimates of recent transmission and recurrence of infection, it is possible with molecular typing methods. The present study was performed aiming to track and determine the type of *Mycobacterium tuberculosis* infection, as well as its relationship with demographic factors, using PGRS-RFLP.

Materials and Methods: In this study, 90 samples collected from TB patients from the North West provinces of Iran, Molecular typing by Characterization highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence. Investigated Demographic factors associated with the transmission of the disease.

Results: All isolates were grouped into 44 clusters 28types (33.3%) of the subspecies were in unique stains and 66.7% (from 56 patients) had clustered isolates. The largest cluster contained 8 isolates (9.52%) was the West provinces of Iran.

Conclusion: Genetic variation of *Mycobacterium tuberculosis* is high in this region. The rate of recent transmission based on clustering was unexpected (The global average is 30%-40%). The recent transmission was more dynamic in the west than northwest Iran. Clustering based on PGRS-RFLP can demonstrate the high correlation between molecular and classic information. In addition, the significant relationship between vaccination record and clustering highlights the necessity to conduct more extensive studies.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, PGRS–RFLP, Molecular typing, Epidemiology

©Iran South Med J.All right sreserved

Cite this article as: Golestani Eimani B, Ansarin Kh, Sahebi L, Seyyedi M.Molecular Typing of Mycobacterium Tuberculosis Isolated from Iranian Patients Using Highly Abundant Polymorphic GC-Rich-Repetitive Sequence. Iran South Med J 2020; 23(2): 87-98

Copyright © 2020 Golestani Eimani, et al This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

[**] *Address for correspondence:* Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
Email: seyyedim@tbzmed.ac.ir
[*]ORCID: 0000-0002-9134-2422
[**]ORCID: 0000-0001-9848-4274

Website: http://bpums.ac.ir
Journal Address: http://ismj.bpums.ac.ir

[Downloaded from ismj.bpums.ac.ir on 2026-11-01]

[DOI: 10.52547/ismj.23.2.87]