



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

بهرام گلستانی ایمانی^{۱*}، خلیل انصارین^۲ (MD, FCCP)، لیلا صاحبی^۲ (PhD)،

مریم سیدی^{۲**} (PhD)

^۱ گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، ارومیه، ایران

^۲ مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

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

چکیده

زمینه: توبرکلوزیس (TB) با بیش از ۱۰ میلیون مورد جدید در سال و به عنوان یکی از ۱۰ عامل مرگ و میر مطرح در دنیا، همچنان یکی از مهم‌ترین 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 به ۴۴ 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 در این 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

مقدمه

سل یکی از بیماری‌های عفونی تنفسی است که عواملی مانند عفونت HIV، بیماری‌های مزمن کلیه، بیماری‌های هماتولوژیک، سرکوب سیستم ایمنی، الکلی، 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 می‌شود، 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 و میر 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 و interferon gamma release assay برخوردارند ولی در ایران نیز مثل کشورهای در حال توسعه به دلیل هزینه‌های 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 نمی‌شود. 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 میکروپزشناسی 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، روش‌های ژنوتیپ مولکولی می‌توانند منشأ تکاملی را روشن کنند، شیوع بیماری و آلودگی‌های 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).

در حال حاضر طیف گسترده‌ای از روش‌های مولکولی برای شناسایی ژنوتیپ‌های MTB مورد استفاده قرار می‌گیرند، 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 MTB مورد 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 ژنوتایپینگ بر اساس ثبات نسبی در طول زمان و تعداد کمی متغیر و مکان در ژن‌ها دارای بهترین اعتبار است (۱۳). با این 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 کمی IS6110 برابر یا کمتر از ۵ استفاده می‌شود (۱۵).

این تکنیک تیپ‌بندی polymorphic guanine-RFLP - cytosine rich sequence (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 مولکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس‌های جدا شده از بیماران با استفاده از توالی‌های 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 سال‌های ۹۲-۹۱ بودند). ملاحظات اخلاقی در جمع‌آوری اطلاعات رعایت گردید و رضایت‌نامه آگاهانه از کلیه افراد شرکت‌کننده در طرح و یا اولیای آنان بر اساس پروتکل اخلاقی دانشگاه علوم پزشکی تبریز اخذ گردید. پس از آلودگی‌زدایی به روش N استیل L سیستم جهت تکثیر و بررسی رشد در محیط‌های شیب‌دار لونشتین جاسون حاوی گلیسرین 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 کاتالازی 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

جمع‌آوری شده از مطالعه خارج شدند)، به عنوان مایکوباکتریوم توپرکلوزیس 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 ۲-۳ 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 گرمگذاری 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/ایزوامیل 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 سانتی‌گراد به مدت ۳-۴ 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.

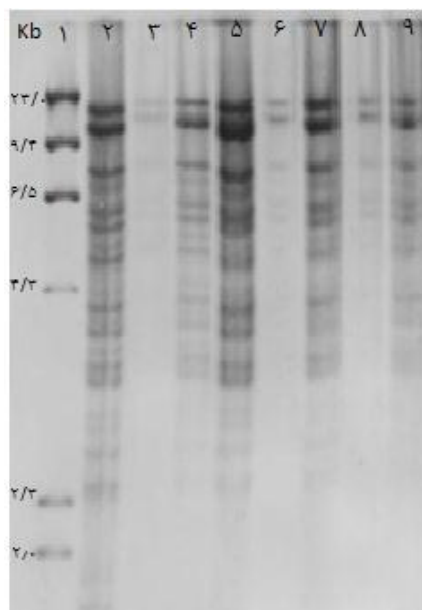
PGRS_RFLP

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 X10 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 سانتی‌گراد 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 (Roche) NBT/BCLP استفاده شد و باندهای شناسایی شده توسط پروب قابل رؤت گردید (۱۹).

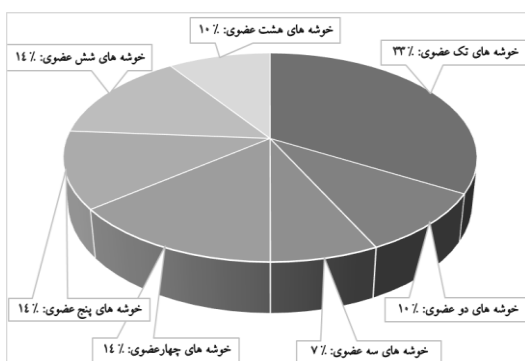
تجزیه و تحلیل داده‌ها

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 X² و آزمون دقیق فیشر در SPSS ویرایش ۱۸ استفاده شد.



شکل ۱) آزمون RFLP بر مبنای مارکهای 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



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

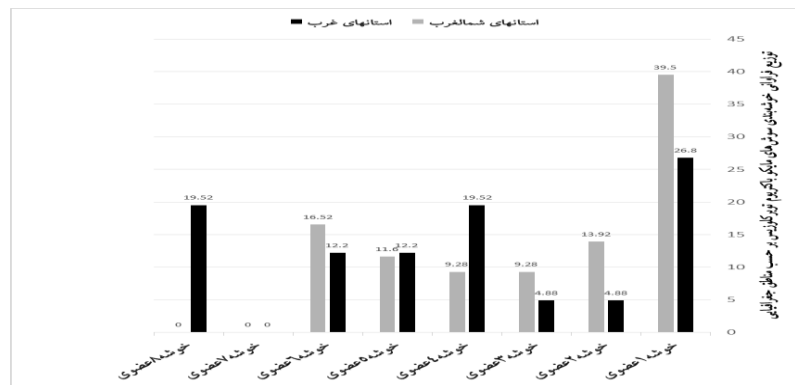
Fig 1) Results of the Clustering *Mycobacterium tuberculosis* by PGRS-RFLP method

در خوشه‌های به دست 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

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 و ۵۶ 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).

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



نمودار ۲) توزیع فراوانی خوشه بندی سویه های مایکوباکتریوم 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

دست آمد ($P=0/049$). به طوری که ۵۸/۵ درصد افرادی که سابقه واکسیناسیون در آنها وجود نداشت در خوشه های 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 گروه های منحصر به فرد و خوشه بندی رابطه معناداری وجود نداشت (جدول ۱).

در تحلیل مقایسه استان های شمال غرب و غرب بر اساس شانس خوشه بندی، استان های غرب بیشتر از استان های شمال غرب تمایل به تشکیل خوشه نشان دادند و در واقع ایجاد خوشه های با جمعیت بزرگ تر بیشتر ایزوله های استان های کردستان و کرمانشاه بودند. در مطالعه حاضر یک رابطه قوی بین خوشه بندی 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 ($P=0/004$). همچنین رابطه معنی داری بین سابقه واکسیناسیون و تشکیل خوشه به

جدول ۱) رابطه آماری بین عوامل دموگرافیک و خوشه بندی در بین بیماران اسامیر مثبت ریوی شمال غرب و غرب ایران						
متغیر	فاکتور	N (درصد)	خوشه های شبیه به هم	منحصر به فرد	X ²	P-value
سن	<۲۰	۸(۹/۵۲)	۶(۷۵/۰)	۲(۲۵/۰)	-	-

		۱(۱۶/۷)	۵(۸۳/۳)	۶(۷/۱)	۲۰-۴۰	
		۱۵(۴۱/۷)	۲۱(۵۸/۳)	۳۶(۴۲/۹)	۴۰-۶۰	
		۱۰(۲۹/۴)	۲۴(۷۰/۶)	۳۴(۴۰/۴۷)	>۶۰	
۰/۰۲۴	۱/۰	۱۴(۳۲/۶)	۲۹(۶۷/۴)	۴۳(۵۱/۲)	زن	جنسیت
		۱۴(۳۴/۱)	۲۷(۶۵/۹)	۴۱(۴۸/۸)	مرد	
۰/۰۲۵	۱/۵۲	۱۷(۳۹/۵)	۲۶(۶۰/۵)	۴۳(۵۱/۲)	شمال غرب	استان ها
		۱۱(۲۶/۸)	۳۰(۷۳/۲)	۴۱(۴۸/۸)	غرب	
۰/۰۴۹	۴/۰۸	۳(۱۵/۸)	۱۶(۸۴/۲)	۱۹(۲۲/۶۱)	دارد	واکسیناسیون
		۲۲(۴۱/۵)	۳۱(۵۸/۵)	۵۳(۶۳/۰۹)	ندارد	
۰/۰۴۷	۰/۵۸	۱(۵۰/۰)	۱(۵۰/۰)	۲(۲/۳۸)	دارد	اعتیاد به مواد مخدر
		۱۰(۲۵/۶)	۲۹(۷۴/۴)	۳۹(۴۵/۲)	ندارد	
۰/۰۷۹	۰/۱۶	۱۶(۳۱/۴)	۳۵(۶۸/۶)	۵۰(۵۹/۵۲)	دارد	استعمال دخانیات
		۹(۳۶/۰)	۱۶(۶۴/۰)	۲۵(۲۹/۷۶)	ندارد	
۰/۰۴۷	۰/۷۳	۲(۲۲/۲)	۷(۷۷/۸)	۹(۱۰/۷)	دارد	سابقه مهاجرت
		۲۱(۳۶/۸)	۳۶(۶۳/۲)	۵۷(۶۷/۵۸)	ندارد	
-	-	۲(۱۸/۲)	۹(۸۱/۸)	۱۱(۱۳/۱)	مجرد	وضعیت تأهل
		۱۷(۴۰/۵)	۲۵(۵۹/۵)	۴۲(۵۰)	متاهل	
		۴(۲۳/۵)	۱۳(۷۶/۵)	۱۷(۲۰/۲۳)	همسرفوت شده/ جدا شده	
۰/۰۰۴	۹	۱۲(۲۴/۵)	۳۷(۷۵/۵)	۴۹(۵۸/۳)	بیمار جدید	گروه درمانی

بحث

امروزه مشخص شده که باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قادر است عفونت خود را بلافاصله پس از ابتلای شخص گسترش دهد یا سال ها پس از ابتلا علائم بیماری را بروز دهد که می تواند به واسطه فعالیت مجدد عفونت قبلی یا ابتلای مجدد شخص بروز کند (۲۰). همان طور که می دانیم 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 حالی ست که ظهور تکنیک های ملکولی در اپیدمیولوژی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس یک فرصت مناسب برای استفاده از مارکرهای مؤثر برای ردیابی انتقال بیماری در محیط زیست انسانی و شناسایی ویژگی های تکاملی نژادی از گونه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را به وجود آورده است (۱۵)

و قدرت تفکیک هر تکنیک به سیر تکاملی و پایداری مارکر مربوط به آن تکنیک بستگی دارد. مثلاً در مورد سویه های بیجینگ مارکر IS6110 چندان جوابگو نمی باشد چون این مارکر فقط تغییرات ژنتیکی اخیر را نشان می دهد (۲۲). هر چند که استفاده ترکیبی از چندین مارکر برای ژنوتایپینگ MTB نتایج دقیق تری ارائه می دهد ولی این در مورد سویه هایی با تعداد کمی کمتر از ۵ از کپی های IS6110 و سویه های غیربیجینگ امکان پذیر می باشد. به نظر می رسد بهترین متد برای تیپ بندی ایزوله هایی با تعداد پایین کپی هایی از IS6110 و سویه های بیجینگ استفاده از مارکر PGRS به علت پایداری المنت ها می باشد (۲۲).

در این مطالعه که تیپ بندی ملکولی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ها با استفاده از توالی های تکراری چند شکلی غنی از GC از بیماران بومی استان های آذربایجان شرقی، آذربایجان غربی، اردبیل، کردستان و کرمانشاه صورت گرفت از ۸۴ زیرگونه مربوط به بیماران مختلف ۴۲ تیپ مختلف ژنتیکی به دست آمد.

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 هم‌مرز 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 ($P < 0.05$) 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

بر اساس تحقیقات انجام شده اعتقاد بر این است که تنوع ژنتیکی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس 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)، فرنی 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 توپرکلوزیس 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 توپرکلوزیس 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 متغیر هستند یعنی فراوانی و در عین حال اندازه خوشه‌ها در مقایسه با

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 ($P=0/79$).

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 آنجا 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 می‌کند. افزایش هشدار دهنده در بروز TB، باعث افزایش نگرانی در مورد برنامه‌های کنترل سل در این نواحی می‌شود. تنوع ژنتیکی مایکوباکتریوم توبریکلوزیس در منطقه مورد مطالعه بالا بود. میزان انتقال اخیر بر اساس خوشه

بندی دور از انتظار بود (متوسط جهانی ۳۰-۴۰ 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 جمع‌آوری 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 شمال‌غرب 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:

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.

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.

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 reserved

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>