مجله دنیای میکروب‌ها
سال یازدهم شماره چهارم (پیاپی ۳۷) زمستان ۱۳۹۷
صفحات ۳۳۱-۳۲۰

Original Article

تنوع ژنوتیپی سویه های مقاوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جداشده از بیماران مسلول مرکز آذربایجان شرقی با روش MIRU-VNTR

علی آفاقی قراملکی[۱]، سیدرضا مؤدب[*۲]، مجتبی داربویی[۳]، خلیل انصارین[۴]، شهرام حنیفیان[۵]

[۱] دکتری، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، [۲] دانشیار، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم آزمایشگاهی، [۳] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شیراز، دانشکده علوم، گروه میکروبیولوژی، [۴] استاد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات سل و بیماری های ریوی، [۵] استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تبریز، دانشکده علوم غذایی و تکنولوژی.

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سل به دلیل گسترش مقاومت، به یکی از جدی ترین بیماری ها تبدیل شده است. مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی سل با تعیین تنوع ژنتیکی سویه های مورد گردش در جوامع به منظور برنامه های کنترلی این بیماری اهمیت دارد. این مطالعه با هدف بررسی اپیدمیولوژی مولکولی سل مقاوم به دارو در بین بیماران دو کشور ایران و جمهوری آذربایجان انجام گرفت.

مواد و روش ها: جدایه های حاصل از بیماران مسلول شهر تبریز و کشور جمهوری آذربایجان به مدت یک سال مورد بررسی قرار گرفتند. تمامی جدایه ها با روش های بیوشیمیایی به عنوان مجموعه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داده شدند و با روش نسبی برای داروهای ایزونیازید، ریفامپسین، استرپتومایسین و اتامبوتول تعیین حساسیت شدند. پس از استخراج DNA، لوکوس های MIRU تکثیر شدند و تعداد تکرارهایشان در مقایسه با سویه استاندارد H37Rv تعیین گردید. تعیین ژنوتیپ بر اساس الگوی تعداد تکرارهای مجموعه لوکوس های ۱۵ گانه مورد مطالعه، با استفاده از سایت مرجع MIRU-VNTRplus انجام گرفت.

یافته ها: از مجموع ۱۱۹ جدایه مورد بررسی، مقاومت حداقل به یک دارو و مقاومت چند دارویی (MDR) به ترتیب در ۲۷/۷۳ و ٦/۷۲ درصد موارد شناسایی شد. همچنین خانواده های ژنوتیپی شناخته شده شامل Uganda I، Uganda II، LAM، TUR، Delhi/ CAS، Bovis، Beijing، NEW-1 و Cameron بودند.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که میزان و الگوی مقاومت دارویی و نیز خانواده های ژنوتیپی در بین مردم تبریز و کشور آذربایجان تفاوت دارند، اما این شاخص ها برای جمهوری آذربایجان نسبت به تبریز متنوع تربودند.

واژگان کلیدی: MIRU-VNTR، بیماری سل، مقاومت چندگانه، تعیین ژنوتیپ، خانواده های ژنوتیپی.

دریافت مقاله: مرداد ماه ۹۷ پذیرش برای چاپ: شهریور ماه ۹۷

مقدمه

اطلاعات در رابطه با موارد سل و مقاومت دارویی در طول سال ها افزایش یافته است. به طوری که این اطلاعات از ۳۵ کشور و ۲۰ درصد کل جمعیت قبل از ۱۹۹۹ به ۱٤٤ کشور و ۹۵ درصد جمعیت افزایش یافته است (۱).

بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی (WHO)، ایران در سال ۲۰۱٦ با حدود ۱۲ هزار بیمار مسلول و میزان بروز ۱٤ مورد در ۱۰۰ هزار نفر از نظر بار بیماری، در وضعیت قابل قبولی قرار دارد. اما اکثریت کشورهای همسایه ایران از نظر بیماری سل در وضعیت نامطلوبی قرار دارند (۲ و ۳).

میزان بیماری سل و مقاومت دارویی در کشور آذربایجان نیز به عنوان همسایه شمال غربی ایران و در مجاورت استان آذربایجان شرقی بسیار بالا می باشد (٤).

*) آدرس برای مکاتبه: دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پیراپزشکی، خیابان دانشگاه.
تلفن: ۰٤۱-۳۳۳۷۱۹۷۱ پست الکترونیک: moaddabseyyedreza@gmail.com

مطالعات نشان داده اند که انتقال بیماری و مقاومت دارویی سل از کشورهای با فراوانی بیشتر به کشور ایران وجود دارد (۵ و ٦).

به دلیل رفت و آمد زیاد بین کشور آذربایجان و مرکز استان آذربایجان شرقی به عنوان توریسم درمانی، این احتمال وجود دارد که بتواند چهره بیماری سل در این منطقه را نیز تحت تاثیر قرار دهد. بنابراین نتایج مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل و بررسی نحوه شیوع بیماری در منطقه و بین مردمان این استان و کشور آذربایجان می تواند در برنامه های کنترلی این بیماری سودمند باشد.

توسعه روش های انگشت نگاری DNA برای تعیین تیپ جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (*M. tuberculosis*) در دهه های گذشته موجب افزایش تعداد مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی سل شده است. تکنیک های مولکولی به محققان اجازه می دهد تا سیر بیماری در بین افراد مختلف را مشخص نمایند و یا اینکه آیا انتقال بیماری ممکن است از فرد بیمار به فردی دیگر رخ داده باشد. علاوه بر این، کاربرد روش های مولکولی می تواند میزان وابستگی ژنتیکی جدایه های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را تعیین نماید. بر این اساس، ژنوتیپ های مختلف این باکتری می توانند از یکدیگر تفکیک گردند. فراوانی برخی از این ژنوتیپ ها از قبیل بیجینگ در آسیا به دلیل شیوع بالا و مقاومت آن از اهمیت ویژه ای برخوردار است. بنابراین انگشت نگاری DNA سویه های رایج در یک منطقه، می تواند به عنوان یک ابزار دقیق در بررسی انتشار و گردش عامل بیماریزا، مورد استفاده قرار گیرد (۹-۷). اگرچه تا به امروز روش های مختلف انگشت نگاری DNA مانند اسپولیگوتایپینگ و Restriction Fragment Length Polymorphis RFLP IS_{6110} درتعیین تیپ سویه های مختلف *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ارائه شده اند. اما تنها تعداد معدودی از این روش ها در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل قابلیت کاربردی دارند. تکنیک مورد استفاده، باید از قدرت افتراقی بالایی برخوردار باشد تا قدرت تفکیک سویه های با قرابت ژنتیکی نزدیک به هم را داشته و بتواند ارتباط ژنتیکی سویه های منتشره در جامعه و یا یک منطقه را تشخیص دهد.

VNTR (Variable Numbers of Tandem Repeats) توالی های متغیر ۱۰۰-۱۰ جفت بازی پشت سر هم در ژنوم باکتری ها هستند. از جمله تکنیک های مبتنی بر این سیستم که بر روی ژنوم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* صورت می گیرد، روش MIRU-VNTR (Mycobacterial Interspersed Repetitive Unit) است، که در سال ۲۰۰۱ ابداع گردیده است (۱۰).

امروزه بر حسب تعداد و نوع لوکوس های مورد استفاده در تعیین تیپ *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، روش هایی از آن مورد استفاده قرار می گیرند. به عنوان نمونه ۱۵ لوکوس مشخص از ٤۱ لوکوس شناخته شده، انتخاب گردیده و سیستم MIRU-VNTR ۱۵ لوکوسی را تشکیل می دهد. در مطالعه حاضر نیز به منظور بررسی اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل از این روش استفاده شده است. پلی مورفیسم حاصل از جدایه های به دست آمده از بیماران آلوده به سویه های غیرمرتبط، الگوهای متفاوت از هم ایجاد می نمایند. اما جدایه های حاصل از بیماران مرتبط به صورت الگوی یکسان و در یک دسته قرار می گیرند. اطلاعات حاصل از جدایه های به دست آمده، در بانک اطلاعاتی مربوطه تجزیه و تحلیل گردیده و در مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی بیماری سل مورد استفاده قرار می گیرند (۱٤-۱۲).

هدف از این مطالعه، بررسی اپیدمیولوژی بیماری سل به منظور مشخص کردن خانواده های ژنوتیپی سویه های مقاوم باسیل سل در دو موقعیت جغرافیایی ایران (تبریز) و کشور آذربایجان بود. شایان یادآوری است که این دو جمعیت با وجود داشتن ارتباطات جمعیتی زیاد، اما از نظر میزان بیماری سل متفاوت می باشند.

مواد و روش ها

الف) جداسازی باکتری و شناسایی فنوتیپی: این مطالعه مقطعی- تحلیلی بر روی ۱۱۹ جدایه باکتریایی جمع آوری شده از بیماران مسلول مراجعه کننده به مرکز تحقیقات سل و بیماری

ریوی تبریز در سال ۱۳۹۳ انجام پذیرفت. در جداسازی و شناسایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، از خاصیت غیرفتوکروموژن بودن این باکتری به همراه آزمون های تولید نیاسین، احیای نیترات و آزمون مثبت کاتالاز به همراه مطالعات میکروسکوپی اسید فاست استفاده شد (۱۵ و ۱٦). در تمامی آزمون های مولکولی و غیرمولکولی از سویه استاندارد H37Rv به عنوان کنترل استفاده گردید.

ب) تعیین حساسیت دارویی: برای این منظور ابتدا محیط کشت لوونشتاین جانسون (مرک، آلمان) حاوی آنتی بیوتیک های ایزونیازید (۰/۲ µg/ml)، استرپتومایسین (۱۰ µg/ml)، اتامبوتول (۲ µg/ml) و ریفامپین (٤۰ µg/ml) (سیگما، فرانسه) و بدون آنتی بیوتیک (شاهد) تهیه گردید. هرکدام از محیط ها با ۲۰۰ میکرولیتر از رقت های 10^{-2}، 10^{-4} و 10^{-5} سوسپانسیون باکتری تلقیح شدند و مطابق با روش نسبی تعیین حساسیت شدند (۱۵ و ۱٦).

ج) استخراج DNA و PCR: به منظور استخراج DNA از روش CTAB مطابق با دستورالعمل سامرویل (Somerville) و همکاران استفاده شد (۱۷). برای این منظور، کلنی باکتری رشد یافته در محیط لوونشتاین جانسون در محلول تریس پخش شد. پس از غیرفعال شدن توسط حرارت، با آنزیم های لیزوزیم و پروتئیناز K (سیگما، فرانسه)، سدیم دودسیل سولفات (SDS)، نمک طعام، CTAB، کلروفرم، ایزوآمیل الکل، پروپانل و اتانل (مرک، آلمان) DNA استخراج گردید.

لوکوس های مشتمل بر روش MIRU-VNTR ۱۵ لوکوسی، شامل Mtub04، Mtub21، Mtub30، Mtub39، Qub4156، و Qub26، Qub11b، ETRC، ETRA، MIRU31، MIRU40 و MIRU26، MIRU16، MIRU10 و MIRU4 به صورت جداگانه با ۰/٤ میلی مول از پرایمرهای اختصاصی (شرکت تکاپوزیست) و ۱۲/۵ میکرولیتر از مستر میکس PCR حاوی تریس–HCl (pH8.5)، $(NH_4)_2SO_4$ ، $MgCl_2$ (غلظت متغیر بر اساس لوکوس ها)، ۰/۲ ٪ توین ۲۰، ۰/٤ میلی مولار هرکدام از dNTP ها، ۰/۲ واحد بر میکرولیتر آنزیم Taq DNA پلی مراز و ۲ نانوگرم از DNA استخراج شده با حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر انجام گرفت.

به منظور تکثیر لوکوس ها از پرایمرهای اختصاصی موجود در جدول ۱ استفاده گردید. واکنش PCR در دستگاه ترمال سایکلر (Peqlab Primus 96، آلمان) با شرایط دمایی شامل ۷ دقیقه واسرشت شدن اولیه در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس، در ادامه ۳۵ سیکل شامل واسرشت شدن در دمای ۹٤ درجه سلیسیوس به مدت ٤۵ ثانیه، اتصال پرایمر به مدت ٤۵ ثانیه در دمای ۵۹/۵ تا ٦۷ درجه سلیسیوس (بسته به لوکوس)، گسترش به مدت ۵۰ ثانیه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس و گسترش نهایی به مدت ۷ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سلیسیوس انجام گرفت. جدول ۱ توالی پرایمرها، طول قطعات تکثیری و تعداد لوکوس ها در سویه استاندارد $H_{37}Rv$ را نشان می دهد (۱۸). محصولات PCR بر روی ژل آگاروز ۱/۵ درصد الکتروفورز و تصویر برداری شدند (۱۹).

د) شناسایی خانواده های ژنوتیپی: تعداد تکرارهای هر یک از ۱۵ لوکوس به کار رفته در این روش، با توجه به نتایج الکتروفورز محصولات PCR برای تک تک نمونه های مورد آزمایش محاسبه گردید. نتایج این تکرارها و نتایج تعیین حساسیت دارویی در سایت مرجع MIRU-VNTRplus.org وارد گردید. تجزیه و تحلیل این اطلاعات در مقایسه با بانک اطلاعاتی سایت یاد شده صورت پذیرفت و با قابلیت های همان سایت، نمودارهای رابطه تکاملی سویه های به دست آمده، به صورت شجره های درختی NJ رسم گردید (۲۰ و ۲۱).

ه) تجزیه و تحلیل آماری: متغیرهای موجود در مطالعه حاضر از قبیل مقاومت دارویی در بین گروه های مختلف سن، جنس و ملیت به کمک نسخه نوزدهم نرم افزار SPSS و نیز آزمون آماری مربع کای با مرز معنی داری ۱ درصد مورد بررسی قرار گرفتند. مگر در مواردی که مقدار مورد انتظار از ۵ کمتر بوده باشد که در این حالت از آزمون فیشر استفاده شد. در تجزیه و تحلیل تعیین تیپ جدایه های حاصل، تعیین خانواده های

جدول ۱. توالی پرایمرها و ویژگی های لوکوس ها در سویه استاندارد $H_{37}Rv$ *مایکوباکتریوم* توبرکلوزیس (۱۸)

توالی پرایمر (′3 - ′5)	اندازه محصول PCR (bp)	اندازه لوکوس (تعداد تکرار)	نام مستعار	لوکوس
F:GCGCGAGAGCCCGAACTGC R:GCGCAGCAGAAACGCCAGC	٦٣٩	(٢)٧٧	MIRU 4 ETRD	٥٨٠
F:GTTCTTGACCAACTGCAGTCGTCC R:GCCACCTTGGTGATCAGCTACCT	٣٨٢	(٣)٥٣	MIRU 10	٩٦٠
F:TCGGTGATCGGGTCCAGTCCAAGTA R:CCCGTCGTGCAGCCCTGGTAC	٣٢٩	(٢)٥٣	MIRU 16	١٦٤٤
F:TAGGTCTACCGTCGAAATCTGTGAC R:CATAGGCGACCAGGCGAATAG	٤٠٨	(٣)٥١	MIRU 26	٢٩٩٦
F:GTGCCGACGTGGTCTTGAT R:ACTGATTGGCTTCATACGGCTTTA	٦٤٣	(٣)٥٣	MIRU31 ETRE	٣١٩٢
F:GGGTTGCTGGATGACAACGTGT R:GGGTGATCTCGGCGAAATCAGATA	٦٧١	(١)٥٤	MIRU 40	٨٠٢
F:CGTAAGGGGGATGCGGGAAATAGG R:CGAAGTGAATGGTGGCAT	٢٠٦	(٥)٦٩	QUB-11b	٢١٦٣
F:AACGCTCAGCTGTCGGAT R:CGGCCGTGCCGGCCAGGTCCTTCCCGAT	٤١٢	(٥)١١١	QUB-26	٤٠٥٢
F:TGACCACGGATTGCTCTAGT R:GCCGGCGTCCATGTT	٤٢٠	(٢)٥٩	QUB-4156	٤١٥٦
F:AAATCGGTCCCATCACCTTCTTAT R:CGAAGCCTGGGGTGCCCGCGATTT	٣٦٣	(٣)٧٥	ETR A	٢١٦٥
F:CGAGAGTGGCAGTGGCGGTTATCT R:AATGACTTGAACGCGCAAATTGTGA	٣٩٩	(٤)٥٨	ETR C	٥٧٧
F:CTTGGCCGGCATCAAGCGCATTATT R:GGCAGCAGAGCCCGGGATTCTTC	٦٥١	(٢)٥١	Mtub04	٤٢٤
F:AGATCCCAGTTGTCGTCGTC R:CAACATCGCCTGGTTCTGTA	٥٦٢	(٢)٥٧	Mtub21	١٩٥٥
F:CTTGAAGCCCCGGTCTCATCTGT R:ACTTGAACCCCCACGCCCATTAGTA	٧٠٨	(٢)٥٣	Mtub30	٢٤٠١
F:CGGTGGAGGCGATGAACGTCTTC R:TAGAGCGGCACGGGGGAAAGCTTAG	٦٨١	(٥)٥٨	Mtub39	٣٦٩٠

ژنوتیپی جدایه ها و خوشه بندی نیز از قابلیت های سایت یاد شده استفاده گردید.

یافته ها

الف) جداسازی باکتری و اطلاعات بیماران: باکتری های به دست آمده از نمونه های بالینی، به ترتیب با شماره و کدهای tbz (نمونه های آذربایجان شرقی که حدود ۹۰٪ متعلق به بیماران تبریز بودند) و azr (نمونه های کشور آذربایجان)، کدبندی شدند. در مجموع ۱۱۹ نمونه باکتری از ۱۲۵ بیمار مراجعه کننده به مرکز سل و بیماری های ریوی تبریز در طول یکسال به دست آمد. بنابراین حدود ۵ درصد از بیماران مراجعه کننده، بنابه دلایل مختلف از قبیل، آلودگی نمونه، عدم رشد و غیره از مطالعه حذف گردید. ۹۱ مورد (۷٦ درصد) از مجموع نمونه های به دست آمده از بیماران تبریز و ۲۸ مورد دیگر (۲٤ درصد) نیز در ارتباط با کشور آذربایجان بود.

نسبت فراوانی نمونه های تبریز به کشور آذربایجان چهار به یک بود. پراکندگی سن بیماران مورد مطالعه نشان داد که حداقل سن این بیماران ۱۵سال وحداکثر ۸٦ سال با متوسط ۵۹ سال است. آزمون های تشخیصی فنوتیپ باکتری های به دست آمده نشان داد که از مجموع ۱۱۹ باکتری، ۱۱۵ مورد در ارتباط با گونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (MT) بوده و تنها ٤ گونه غیر توبرکلوزی (NMT) تشخیص داده شد.

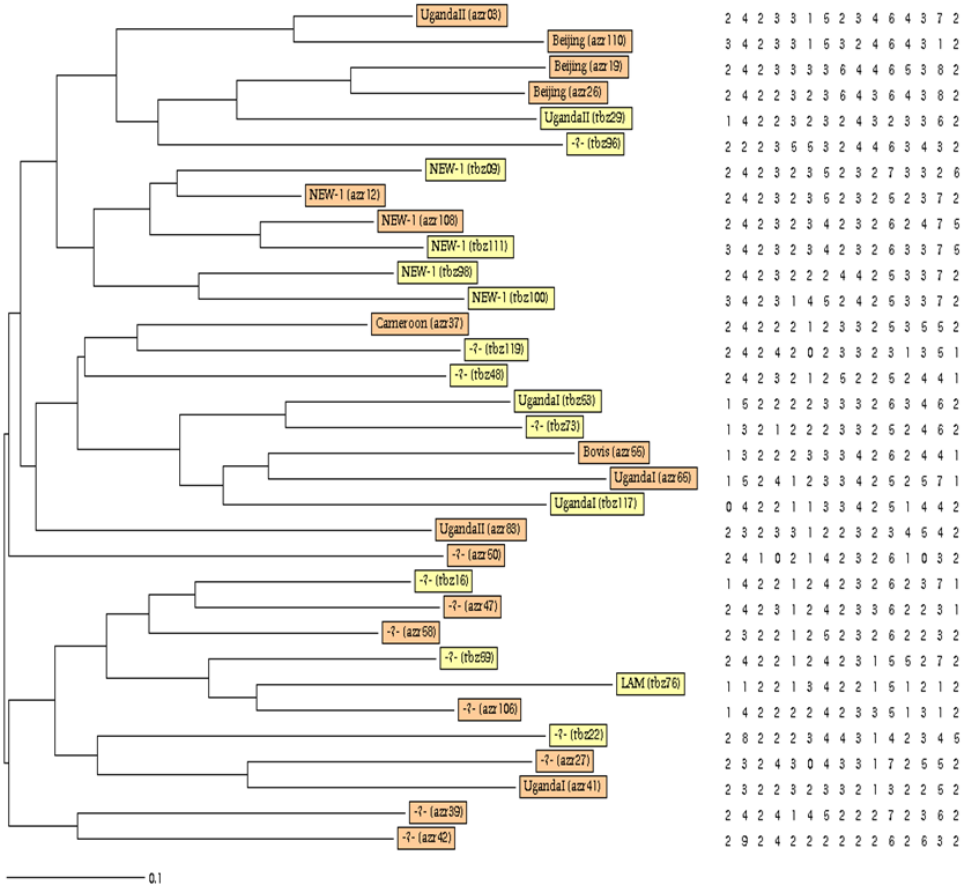
ب) تعیین حساسیت باکتری: نتایج تعیین حساسیت آنتی بیوتیکی نمونه های به دست آمده برای ایزونیازید، اتامبوتول، ریفامپین و استرپتومایسین مشخص نمود که ۸٦ نمونه (۷۲ درصد) نسبت به حداقل یکی از داروهای یاد شده حساس می باشند. اما ۳۳ نمونه (۲۷/۸ درصد) دیگر نیز نسبت به حداقل یکی از این داروها مقاوم بودند (p=0).

ج) تعیین خانواده های ژنوتیپی: شناسایی خانواده های ژنوتیپی نمونه ها در مقایسه با سویه های مرجع شناخته شده در بانک اطلاعاتی یاد شده صورت پذیرفت. نتایج تشخیصی ژنوتیپ ها نشان داد که ٤٧ نمونه (٣٩/٥ درصد) از ١١٩ نمونه جدا شده، قابل تشخیص نبودند و به عنوان ژنوتیپ های ناشناخته درنظر گرفته شدند. بدین ترتیب تعداد ٧٢ مورد(٦٠/٥ درصد) از نمونه های مورد مطالعه توسط روش MIRU-VNTR ١٥ لوکوسی در خانواده های ژنوتیپی متعددی تشخیص داده شدند. ژنوتیپ های Cameron، UgandaI، UgandaII، LAM، TUR، Dehli/CAS، Bovis، Beijing، NEW-1 و $H_{37}Rv$ خانواده ژنوتیپی بودند که در میان نمونه های مورد مطالعه یافت شدند. نتایج مربوط به تعیین ژنوتیپ باکتری های حاصل در جدول ٢ و شکل ٢ و نیز نتایج تعیین حساسیت خانواده های ژنوتیپی در جدول ٣ نشان داده شده اند.

TUR، Delhi و $H_{37}Rv$ در بین نمونه های مقاوم و نیز نمونه های جمهوری آذربایجان وجود نداشتند. اما تمامی این ژنوتیپ ها در بین نمونه های تبریز وجود داشت. بیشترین میزان ژنوتیپ های به دست آمده برای تمامی نمونه ها و نمونه های مقاوم در ارتباط با ژنوتیپ NEW-1 (٢٦/١ درصد) بود. ٧ مورد از ژنوتیپ Bijing که به عنوان بیماریزای قوی مطرح است نیز مشاهده گردید.

بحث

بروز اپیدمی ایدز و تأثیر آن در بروز بیماری سل از یک طرف



شکل ٢. رابطه تکاملی ٣٣ سویه مقاوم به داروی جداسازی شده با استفاده از الگوریتم شجره درختی NJ بر اساس روش MIRU-VNTR ١٥ لوکوسی. در این شکل tbz: تبریز، azr: کشور جمهوری آذربایجان، علامت سؤال: ژنوتیپ های ناشناخته، اعداد سمت راست: الگوی ١٥ تایی تعداد تکرارهای لوکوس ها می باشد.

جدول ۲. فراوانی خانواده های ژنوتیپی حاصل از روش MIRU-VNTR

فامیل های ژنوتیپی	(تعداد) درصد نمونه ها			
	کل (n=۱۱۹)	مقاوم (n=۳۳)	جمهوری آذربایجان (n=۲۸)	تبریز (n=۹۱)
Beijing	٦(٧)	٩(٣)	١١(٣)	٤(٤)
Bovis	٤(٥)	٣(١)	٧(٢)	٣(٣)
Uganda-I	١٠(١٢)	١٢(٤)	١١(٣)	١٠(٩)
Uganda-II	٨(٩)	٩(٣)	٧(٢)	٨(٧)
New-1	٢٦(٣١)	١٨(٦)	١٤(٤)	٣٠(٢٧)
Cameron	٣(٣)	٣(١)	٧(٢)	١(١)
TUR	٢(٢)	–	–	٢(٢)
LAM	١(١)	٣(١)	–	١(١)
Delhi/CAS	١(١)	–	–	١(١)
H37Rv	١(١)	–	–	١(١)
Unknown	٤٠(٤٧)	٤٢(١٤)	٤٣(١٢)	٣٨(٣٥)

و پیدایش و شیوع سویه های مقاوم چند دارویی موجب شده که مشکلات بیماری سل همچنان پابرجا باقی بمانند. یکی از اولویت های لازم برای برنامه ریزی و کنترل بیماری سل، مطالعات اپیدمیولوژیکی است.

مطالعات اپیدمیولوژی پایه، می توانند اطلاعات آماری حاصل از اقدامات پایه و کلاسیک آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی را تجزیه و تحلیل نمایند. درحالی که در تولید اطلاعات مربوط به گردش و انتشار سویه های عامل این بیماری و نقش عوامل مداخله گر در شیوع بیماری، مطالعات اپیدمیولوژی مولکولی ضرورت داشته و انگشت نگاری مولکولی برای این گونه مطالعات سودمند هستند (۲۲).

در مطالعه حاضر تعداد ۱۱۹ نمونه باکتری از مسلولین شهر تبریز و کشور جمهوری آذربایجان در طول یکسال جداسازی گردید. ۹۱ مورد (۷٦/٤٧ درصد) از نمونه ها مربوط به بیماران شهر تبریز و ۲۸ مورد (۲۳/۵۳ درصد) مربوط به کشور جمهوری آذربایجان بودند. آزمون های تکمیلی کشت، آنتی بیوگرام، تشخیص فنوتاتپی و ژنوتایپی بر روی تمامی نمونه ها صورت پذیرفت.

مطالعه حاضر در مورد تمامی نمونه های مورد بررسی نشان داد که میزان مقاومت دارویی در مقابل حداقل یک دارو از داروهای خط اول درمانی (ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و استرپتومایسین) ۲۷/۷۳ درصد (۳۳ نمونه) است. بخش عمده ای از مقاومت های دارویی در ارتباط با نمونه های کشور جمهوری آذربایجان بود. همچنین بین مقاومت دارویی کشور آذربایجان با شهر تبریزاختلاف آماری معنی داری وجود داشت. به طوری که ٦٤/٢٩ درصد از نمونه های کشور

جدول ۳. نتایج تعیین حساسیت ژنوتیپ های جدا شده از بیماران

سویه های جدا شده	کل (n=۱۱۹)	تعداد (درصد) نمونه ها		
		حساس	مقاوم	MDR
Beijing	٧	(٥٧)٤	(٤٣)٣	–
Bovis	٥	(٨٠)٤	(٢٠)١	–
Uganda-I	١٢	(٦٧)٨	(٣٣)٤	٢
Uganda-II	٩	(٦٧)٦	(٣٣)٣	–
New-1	٣١	(٨١)٢٥	(١٩)٦	٣
Cameron	٣	(٦٧)٢	(٣٣)١	١
TUR	٢	(١٠٠)٢	–	–
LAM	١	–	(١٠٠)١	–
Dehli/CAS	١	(١٠٠)١	–	–
H37Rv	١	(١٠٠)١	–	–
Unknown	٤٧	(٧٠)٣٣	(٣٠)١٤	٢

آذربایجان، مقاومت دارویی نشان دادند. اما این میزان برای نمونه های شهر تبریز تنها ۱۶/۴۸ درصد بود (p=000). هر چند حجم نمونه های شهر تبرز نسبت به جمهوری آذربایجان بیشتر بود. میزان مقاومت دارویی برای کل بیماران برای آنتی بیوتیک های ریفامپین، ایزونیازید، اتامبوتول و استرپتومایسین با گزارش های سایر محققین نیز هم خوانی دارد (۲۳ و ۲۴). اما در سایر پژوهش های انجام شده در کشور ما، میزان مقاومت نسبت به داروهای ضد سل در مقایسه با کشورهای همسایه ایران(که فراوانی سل بیشتری دارند)، نسبت به منطقه مورد مطالعه یه صورت معنی داری بیشتر است (۲۵-۲۷).

بیشترین شیوع مقاومت دارویی در ارتباط با آنتی بیوتیک استرپتومایسین (۱۳/۱۹ درصد) بود. این امر می تواند به دلیل کاربرد گسترده این آنتی بیوتیک در مقابل انواعی از عفونت ها در گذشته باشد. شیوع مقاومت دارویی بیشتر نسبت به این آنتی بیوتیک، درتصمیم گیری مبنی بر محدود نمودن کاربرد آن در رژیم درمانی سویه های حساس و MDR مؤثر می باشد (۲۸ و ۲۹).

سازمان جهانی بهداشت (WHO) طبق گزارشی در مورد مقاومت دارویی در ۳۵ کشور جهان، بالاترین میزان مقاومت را در بین داروهای اصلی ضد سل، استرپتومایسین اعلام کرده است (۳۰). بنابراین، مقاومت مرتبط با آنتی بیوتیک استرپتومایسین در مقایسه با مقاومت نسبت به ریفامپین و ایزونیازید به عنوان داروهای اصلی، از اهمیت پائینی برخوردار است. اما الگوی مقاومتی سویه های مقاوم کشور جمهوری آذربایجان نشان می دهند که عمدتاً مرتبط با ریفامپین و ایزونیازید است.

در گزارش شارما (Sharma) و همکاران در هند نیز مقاومت بیشتر در برابر ریفامپین نسبت به دیگر آنتی بیوتیک های خط اول درمانی وجود دارد (۳۱). میزان MDR برای کل نمونه ها ۶/۷ درصد و برای نمونه های تبریز و جمهوری آذربایجان به ترتیب۳/۳ و ۱۷/۹ درصد به دست آمد.

علی خان اوا (Alikhanova) و همکاران این میزان را در جمهوری آذربایجان برای سال های ۲۰۱۳- ۲۰۱۲ به میزان ۱۳ درصد گزارش نمودند (۳۲).

WHO در سال ۲۰۱۶ گزارش کرد که در حالت کلی میزان سویه های MDR برای ایران و جمهوری آذربایجان به ترتیب ۰/۲۵ و ۲۵ در یکصد هزار جمعیت برآورد شده است (۲).

اما نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که اغلب سویه های جدا شده از بیماران شهر تبریز نسبت به تمام داروهای ضد سل رده اول درمانی در مقایسه با کشور جمهوری آذربایجان حساسیت دارند و میزان مقاومت چند دارویی(MDR-TB) نیز کم است. با توجه به نتایج اخیر چنین استنباط می گردد که موفقیت در درمان با به کارگیری داروهای خط اول درمانی سل برای بیماران جمهوری آذربایجان به صورت الگوی زیر قابل ملاحظه است:

اتامبوتول > استرپتومایسین=ایزونیازید > ریفامپین

اما موفقیت این الگو در مورد درمان بیماران شهر تبریز متفاوت بوده و به صورت زیر دیده می شود:

ایزونیازید > ریفامپین > اتامبوتول > استرپتومایسین

بر این اساس نشان داده می شود که داروهای ریفامپین و ایزونیازید موثرترین داروهای خط اول درمانی برای بیماران مسلول شهر تبریز و استرپتومایسین و اتامبوتول در درمان بیماران مسلول کشور جمهوری آذربایجان موثرترین دارو شناخته می شوند.

همچنانکه نتایج نشان می دهند ۴۷ نمونه (۳۹/۵ درصد) از ۱۱۹ نمونه جدا شده، در مقایسه با سویه های مرجع شناخته شده درپایگاه بانک اطلاعاتی MIRU-VNTRplus.org قابل تشخیص نبود و به عنوان ناشناخته در نظر گرفته شدند. بدین ترتیب ۶۰/۵ درصد از نمونه های مورد مطالعه توسط روش MIRU-VNTR ۱۵ لوکوسی در خانواده های ژنوتیپی متعددی تشخیص داده شدند. بر این اساس انواعی از فامیل های ژنوتیپی مانند Cameron، UgandaI، UgandaII، LAM، TUR، Delhi/CAS، Bovis، Beijing، NEW-1 و $H_{37}Rv$ در بین نمونه های مورد بررسی شناخته شد. نتایج نشان می دهد که از تمامی ژنوتیپ های یاد شده برای نمونه های تبریز وجود داشته

است. اما ژنوتیپ های TUR، Dehli و $H_{37}Rv$ در بین نمونه های مقاوم و نیز نمونه های جمهوری آذربایجان مشاهده نمی گردد. بیشترین میزان ژنوتیپ های شناخته شده برای تمامی نمونه ها و نمونه های مقاوم در ارتباط با ژنوتیپ-NEW 1 (۲۱/٦ درصد از کل نمونه ها و ۱۸/۸ درصد از نمونه های مقاوم) و سپس Uganda-I و Uganda-II بوده است. تجزیه و تحلیل نمونه ها نشان داد که ژنوتیپ NEW-1 با وجود دارا بودن اکثریت موارد، کمترین میزان مقاومت را با ۱۹ درصد شامل می شد. اما ۵۰ درصد این مقاومت در رابطه با موارد MDR بود.

عظیمی(Azimi) و همکاران نیز در مطالعه همزمان و با روش مشابه این پژوهش در تهران نشان دادند که بیشترین ژنوتیپ به دست آمده NEW-1 و سپس West Africa و CAS/Delhi هستند (۳۳). اما در مطالعه هائیلی (Haeili) و همکاران ژنوتیپ Ural با ۳٤ درصد بیشترین ژنوتیپی بود که به دست آمد (۳٤).

میزان خانواده ژنوتیپی بیجینگ برای نمونه های شهر تبریز ٤ درصد حاصل شد که با مقدار محاسبه شده در مطالعه مروری سیستماتیک توسط هافنر (Hoffner) و همکاران هم خوانی دارد (۳۵).

همچنین مطالعات نشان داده است که افزایش تعداد لوکوس های روش MIRU-VNTR و همچنین استفاده ترکیبی از روش های مولکولی می تواند به تشخیص بیشتر فامیل های ژنوتیپی و کاهش ژنوتیپ های ناشناخته منجر گردد (۳٦). قدرت افتراقی مجموعه ۱۵ لوکوسی MIRU-VNTR برای این نمونه ها ۰/۹۹۷٦ به دست آمد که تقریباً با نتایج سایر پژوهش ها هم خوانی دارد. اما نسبت به روش های دیگر مانند RFLP و اسپولیگوتایپینگ قویتر می باشد (۳۷).

نتیجه گیری

یافته های پژوهش حاضر نشان داد با وجود اینکه کشور جمهوری آذربایجان از نظر میزان بیماری سل نسبت به استان هم جوار خود در ایران یعنی آذربایجان شرقی در وضعیت نامطلوبی قرار دارد، اما از نظر میزان و الگوی مقاومت دارویی و ژنوتیپ های در گردش نیز متفاوت می باشد. بنابراین لازم است که در مدیریت کنترل سل توجه لازم صورت پذیرد. این مساله به ویژه در زمان کاهش ارزش پول ملی کشور ایران و افزایش توریسم درمانی از کشور آذربایجان اهمیت ویژه ای خواهد داشت.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از همکاران مرکز سل تبریز که در انجام پژوهش همکاری داشتند، کمال امتنان و سپاسگزاری را دارند.

References

1. WHO, Drug-resistant TB surveillance & response, supplement global tuberculosis report 2014. Available at: http://www.who.int/tb/publications/global_report/gtbr14_supplement_web_v3.pdf.
2. WHO, World Health Organization 2017. Global tuberculosis report. Available at: http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/259366/9789241565516-eng.pdf;jsessionid.
3. Tavakoli A. Incidence and prevalence of tuberculosis in Iran and neighboring countries. Zahedan J Res Med Sci. 2017; 19(7): e9238.
4. Hajimiri ES, Masoomi M, Ebrahimzadeh N, Fateh A, Hadizadeh Tasbiti A, Rahimi Jamnani F, Siadat SD. High prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* mixed infection in the capital of moderate tuberculosis incidence country. Microb Pathog. 2016; 93: 213-218.
5. Metanat M, Mood BS, Shahreki S, Dawoudi SH. Prevalence of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis in Zahedan. southeastern Iran. Iran Red Crescent Medical J. 2012; 14(1): 53-55.

6. Asgharzadeh M, Samadi Kafil H, Pour-Ostadi M, Ghorghanlu S. The role of Azeri patients in transmission of tuberculosis to East Azerbaijan, Iran. Analyt Res Clin Med. 2015; 3(2): 94-98.

7. Ju Chin P, Jou TR. A modified automated high-throughput mycobacterial interspersed repetitive unit method for genotyping *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 53: 325-327.

8. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(4): 658-685.

9. Velayati AA, Farnia P, Mozafari M, Malekshahian D, Farahbod AM, Seif S, Mirsaeidi M. Identification and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* isolated from water and soil samples of a Metropolitan City. Chest. 2015; 147(4): 109-114.

10. Supply P, Lesjean S, Savine E, Kremer K, Van Soolingen D, Locht C. Automated high-throughput genotyping for study of global epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* based on mycobacterial interspersed repetitive units. J Clin Microbiol. 2001; 39(10): 3563-3571.

11. Romano MI, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Llana MN, Cataldi A. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of *Mycobacterium avium* complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Vet Microbiol. 2005; 110(3-4): 221-237.

12. Mathema B, Kurepina NE, Bifani PJ, Kreiswirth BN. Molecular epidemiology of tuberculosis: Current insights. Clin Microbiol Rev. 2006; 19(4): 658-685.

13. Won Yun K, Ju Song E, Eun Choi G, Kyung Hwang I, Yup Lee E, Chang CL. Strain typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Korea by mycobacterial interspersed repetitive units-variable number of tandem repeats. Korean J Lab Med. 2009; 29: 314-319.

14. Yana J, Joub, Chien Koc W, Jong Wud J, Lin Yanga M, Mo Chen H. The use of variable-number tandem-repeat mycobacterial interspersed repetitive unit typing to identify laboratory cross-contamination with *Mycobacterium tuberculosis*. Diagn Microbiol Infect Dis. 2005; 52: 21-28.

15. Rafi A, Moaddab SR. Principles of mycobacteriology. Tabriz, Iran. Soutodeh, 2003. [In Persian]

16. Rieder HL, Chonde TM, Myking H, Urbanczik R, Laszlo A, Kim SJ, Deun AV, Trébucq A. The public health service national tuberculosis reference laboratory and the national laboratory network. Paris, France. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease (IUATLD). 1998.

17. Somerville W, Thibert L, Schwartzman K, Behr MA. Extraction of *Mycobacterium tuberculosis* DNA: A question of containment. J Clin Microbiol. 2005; 43(6): 2996-2997.

18. Afaghi-Gharamaleki A, Moaddab S, Darbouy M, Ansarin K, Hanifian S. Determining the risk of intra-community transmission of tuberculosis in the northwest of Iran though 15 loci MIRU-VNTR typing. Eur J Microbiol Immunol. 2017; 7(1): 46-54.

19. Supply P, Allix C, Lesjean S, Cardoso-Oelemann M, Ru¨sch-Gerdes S, Willery E, Savine E, Haas PD, Deutekom HV, Roring S, Bifani P, Kurepina N, Kreiswirth B, Sola C, Rastogi N, Vatin V, Gutierrez MC, Fauville M, Niemann S, Skuce R, Kremer K, Locht C, Soolingen DV. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit–variable-number tandem repeat typing of Mycobacterium tuberculosis. J Clin Microbiol. 2006; 44(12): 4498-4510.

20. Allix-Be´guec C, Harmsen D, Weniger T, Supply P, Niemann S. Evaluation and strategy for use of MIRU-VNTRplus, a multifunctional database for online analysis of genotyping data and

phylogenetic identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. J Clin Microbiol. 2008; 46(8): 2692-2699.

21. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol. 1987; 4: 406-425.

22. Monteserin J, Camacho M, Barrera L, Palomino JC, Ritacco V, Martin A. Genotypes of *Mycobacterium tuberculosis* in patients at risk of drug resistance in Bolivia. Infect Genet Evol. 2013; 17: 195-201.

23. Asgharzadeh M, Nahaei MR, Rafi A. Identification of Ethambotol-resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis* by MAS-PCR and its comparing with proportional method. J Mazandaran Univ Med Sci. 2007; 17(5): 50-56. [In Persian]

24. Roshdi Maleki M, Moaadab SR. Drug susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* strains to primary and secondary drugs in Tabriz. Iranian Med J Microbiol. 2009; 1: 18- 24. [In Persian]

25. Naserpour FT, Naderi M, Mohagheghi Far AH, Oskoui Oweisi H, Sharifi-Moud B. Drug resistance of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients with pulmonary tuberculosis in South Eastern of Iran. J Med Sci. 2006; 6(2): 275-278.

26. Pourakbari B, Mamishi S, Mohammadzadeh M, Mahmoudi S. First-line anti-tubercular drug resistance of Mycobacterium tuberculosis in Iran: A systematic review. Front Microb. 2016; 7: 1-13. doi: 10.3389/fmicb.2016.01139.

27. Metanat M, Sharifi-Mood B, Shahreki S, Dawoudi SH. Prevalence of multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis in patients with pulmonary tuberculosis in Zahedan, Southeastern Iran. Iran Red Crescent Med J. 2012; 14(1): 53-55.

28. Merza MA, Farnia P, Tabarsi P, Khazampour M, Masjedi MR, Velayati AA. Anti-tuberculosis drug resistance and associated risk factors in a tertiary level TB centre in Iran: a retrospective analysis. J Infect Dev Ctries. 2011; 5(7): 511-519.

29. Punpanich Vandepitte W, Rattanasataporn R, Treeratweeraphong V. Drug-resistant tuberculosis among urban Thai children: A 10-year review. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2015; 46(5): 892-900.

30. WHO. 2015. Global tuberculosis report. Availabe at: *www.who.int/iris/ bitstream/10665/191102/1/9789241565059_eng.pdf?ua.*

31. Sharma SK, Sethi S, Mewara A, Meharwal S, Jindal S, Sharma M, Katoch V. Genetic polimorphisms among *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients with pulmonary tuberculosis in Northern India. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012; 43(5): 1161-1168.

32. Alikhanova N, Akhundova I, Seyfaddinova M, Mammadbayov E, Mirtskulava V, Rusch-Gerdes S, Bayramov R, Suleymanova J, Kremer K, Dadu A, Acosta D, Acosta AD, Dara M. First national survey of anti-tuberculosis drug resistance in Azerbaijan and risk factors analysis. Public Health Action. 2014; 4(2): S17–23.

33. Azimi T, Nasiri M J, Zamani S, Hashemi A, Goudarzi H, Imani Fooladi AA, Feizabadi MM, Fallah F. High genetic diversity among *Mycobacterium tuberculosis* strains in Tehran, Iran J Clin Tuberc Other Mycobact Dis. 2018; 11: 1-6.

34. Haeili M, Darban-Sarokhalil D, Fooladi AA, Javadpour S, Hashemi A, Siavoshi F, Feizabadi MM. Spoligotyping and drug resistance patterns of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from five provinces of Iran. Microbiol Open. 2013; 2(6): 988-996.

35. Hoffner S, Sahebi L, Ansarin K, Sabour S, Mohajeri P. *Mycobacterium tuberculosis* of the Beijing genotype in Iran and the WHO Eastern Mediterranean Region: A meta-analysis. Microb Drug Resist. 2017; 24(6): 693-698.

36. Teixeira Dantas NG, Noel Suffys P, Carvalho WS, Magdinier Gomes H, Refregier G, Sola C, Kireopori Gomgnimbou M. Genetic diversity and molecular epidemiology of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Minas Gerais State, Brazil. BMC Infect Dis. 2015; 15: 306-316.

37. Liu Y, Tian M, Wang X, Wei R, Xing Q, Ma T, Jiang X, Li W, Zhang Z, Xue Y, Zhang X, Wang W, Wang T, Hong F, Zhang J, Wang S, Li C. Genotypic diversity analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strains collected from Beijing in 2009, using spoligotyping and VNTR typing. PLoS One. 2014; 9(9): 1067-1087.

Journal of Microbial World
Volume 11, No. 4, January 2019

Original Article

Genotypic diversity of resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from tuberculosis patients in East Azerbaijan center by MIRU-VNTR

Ali Afaghi-Gharamaleki[1], Seyyed Reza Moaddab[2], Mojtaba Darbouy[3], Khalil Ansarin[4], Shahram Hanifian[5]

[1] PhD, Department of Microbiology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[2]Associate Professor, Department of Laboratory Sciences, Paramedical Faculty, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran. [3]Assistant Professor, Department of Microbiology Science and Research Branch, Islamic Azad University, Fars, Iran.
[4] Professor, Tuberculosis and Lung Disease Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
[5]Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Abstract

Background & Objectives: Tuberculosis has become one of the most serious diseases due to the increased prevalence of resistance. To control the disease, tuberculosis molecular epidemiological studies are important in determining the genetic diversity of strains circulating in communities. The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of drug-resistant tuberculosis among patients in Iran and Azerbaijan.

Materials & Methods: The isolates from tuberculosis patients of the Azerbaijan Republic and Tabriz were studied from March 2014 to March 2015. All isolates were identified as *Mycobacterium tuberculosis* complex by biochemical methods and drug susceptibility testing against isoniazid, rifampicin, streptomycin, and ethambutol was performed by proportional method. Following DNA extraction, each MIRU locus was amplified individually to determine their repeat numbers as compared to H37Rv standard strain. Finally, genotyping was performed according to the repeat numbers of subsets of 15 studied loci using the MIRU-VNTRplus reference website.

Results: Totally of 119 obtained isolates, resistance to at least one drug of the first line of anti-TB drugs and multidrug resistance were observed as 27.73 and 6.72 percent, respectively. Cameron, UgandaI, UgandaII, LAM, TUR, Dehli/CAS, Bovis, Beijing, NEW-1 and H37Rv were among genotypic families which were determined.

Conclusion: According to the results of this study, the rate and pattern of drug resistance and genotypic families are different among the people of Tabriz and Azerbaijan, but the indicators were more diverse in Azerbaijan as compared to Tabriz.

Keywords: MIRU-VNTR, Tuberculosis, Multidrug resistance, Genotyping, Genotypic family.

Correspondence to: Seyyed Reza Moaddab

Tel: +98 41 33371971

E-mail: moaddabseyyedreza@gmail.com

Journal of Microbial World 2019, 11(4): 320-331.