

## بررسی نقش سن در انتقال فرد به فرد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در منطقه شمال غرب ایران با استفاده از روش IS6110-RFLP

محمد اصغر زاده<sup>۱\*</sup>، عباس علی بخشی<sup>۲</sup>، جواد رنجبری<sup>۳</sup>، غلامرضا حنیفی<sup>۴</sup>، ایرج خلیلی<sup>۵</sup>، ناصر رزم آرای<sup>۶</sup>، حسین صمدی کفیل<sup>۶</sup>

- ۱- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۳- دانشجوی کارشناسی ارشد، مرکز تحقیقات هماتولوژی و انکولوژی تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
- ۴- کارشناس ارشد، مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه شمال غرب کشور (پیام مرند)، مرند، آذربایجان شرقی، ایران
- ۵- دکتری دامپزشکی، مرکز تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، شعبه شمال غرب کشور (پیام مرند)، مرند، آذربایجان شرقی، ایران
- ۶- دانشجوی دکتری، گروه باکتری‌شناسی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ پذیرش: ۸۸/۰۲/۰۹

تاریخ دریافت: ۸۷/۱۱/۱۶

### چکیده

**هدف:** مطالعه حاضر به بررسی نقش سن در انتقال فرد به فرد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایزوله‌های جدا شده از منطقه شمال غرب ایران (استان‌های آذربایجان شرقی و غربی) می‌پردازد.  
**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه برای بررسی ایزوله‌های منطقه شمال غرب ایران از روش RFLP روی قطعه IS6110 استفاده شد. در مجموع ۱۶۵ ایزوله مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با این روش مطالعه شد.  
**نتایج:** در مجموع ۳۰/۵۲ درصد از نمونه‌هایی که دارای ۵ یا بیشتر کپی IS6110 هستند در دسته‌های انتقال فرد به فرد قرار گرفتند که ۱۶ دسته را تشکیل دادند. دسته‌ها بین ۲ تا ۱۰ عضو داشتند. ۶۹/۴۸ درصد ایزوله‌ها نیز دارای الگوی RFLP منحصر به فرد بودند. جنس مذکر بیشتر از مؤنث در دسته‌های انتقال قرار گرفتند که البته از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ). در مطالعه حاضر مشاهده شد که افراد با سن ۵۶ و بالاتر بیشترین گروه مشتمل بر دسته‌ها را شامل می‌شدند (۵۹/۶ درصد) که به صورت معنی‌داری بیشتر از افراد جوان بود ( $P < 0/05$ ).  
**نتیجه‌گیری:** در مطالعه حاضر مشاهده شد که در سن بالا انتقال فرد به فرد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از فاکتورهای اصلی ابتلا به بیماری در مقایسه با فعال شدن مجدد بیماری پیشین است، همچنین در مطالعه حاضر بیکاری و فقر و سطح پایین فرهنگی از عوامل خطرزای دخیل در انتقال فرد به فرد باکتری بودند.

کلیدواژگان: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، سن، انتقال، IS6110، RFLP

### ۱- مقدمه

می‌شود که تا سال ۲۰۲۰ این باکتری ۱ میلیارد نفر از جمعیت جهان را آلوده نماید که از این تعداد ۱۵۰ میلیون نفر دچار بیماری سل شده و ۳۶ میلیون نفر را خواهد کشت و سل به‌عنوان اصلی‌ترین عامل عفونی مرگ و میر بزرگسالان در

مایکوباکتریوم (*Mycobacterium*) یکی از بیماری‌زاترین باکتری‌ها است که در سراسر جهان گسترش یافته است به‌نحوی که سالانه ۸ میلیون مورد جدید و ۲-۳ میلیون مرگ و میر بر اثر این باکتری در سطح جهان گزارش می‌شود [۱، ۲]. تخمین زده

\*نشانی مکاتبه: تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، دانشکده پزشکی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، صندوق پستی: ۵۱۶۶۶-۱۴۷۶۶  
Email: asgharzadchmo@yahoo.com

انگشت‌نگاری DNA ابزاری دقیق در مطالعه اپیدمیولوژی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است [۱۴].  
با توجه به اهمیت سن در انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در مطالعه حاضر نقش سن بیماران در انتقال مستقیم و فرد به فرد این باکتری در منطقه شمال غرب ایران (استان‌های آذربایجان شرقی و غربی) بررسی شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

تمامی ایزوله‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد مطالعه بین فروردین سال ۱۳۸۳ تا فروردین سال ۱۳۸۴ به مراکز تحقیقات سل و بیماری‌های ریوی استان‌های آذربایجان شرقی و آذربایجان غربی مراجعه کرده بودند، جمع‌آوری شد. در نهایت الگوی RFLP مایکوباکتریوم در ۱۶۵ بیمار مشخص شد. شناسایی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از آزمون‌های استاندارد بیوشیمیایی شامل قابلیت تولید نیاسین (Niacin)، فعالیت کاتالاز، مصرف نیترات، تولید رنگدانه (Pigment) و میزان رشد صورت گرفت.

برای استخراج DNA باکتری‌های جدا شده از روش استاندارد که توسط دکتر ون‌سولنجن (van Soolingen) توصیف شده است، استفاده شد [۱۵]. برای تهیه پروب (Probe) IS6110 به اندازه ۲۴۵ جفت‌باز از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (Polymerase Chain Reaction: PCR) استفاده شد. برای این کار از دو الیگونوکلوئوتیدهای (5'-CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC-3') و (5'-GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA-3') INS-2 (Tib-Molbiol, Germany) استفاده شد. برای سنتز پروب از DNA خالص شده مایکوباکتریوم بویس (*M. bovis*) (باسیل (BCG) به وسیله PCR استفاده شد [۱۲]. پروب تولید شده خالص‌سازی شد و با مواد غیرراديوکتیو دیگوکسی‌ژنین (Digoxigenin) نشان‌دار شد.

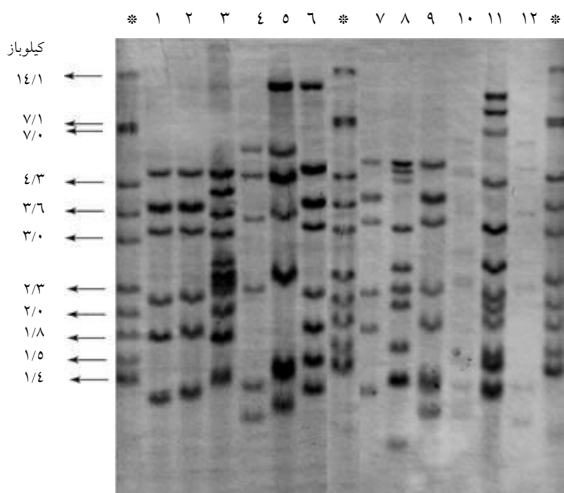
انگشت‌نگاری DNA آن‌گونه که توسط ون‌انبدن (van Embden) و همکاران توصیف شده بود، صورت گرفت

کشورهای در حال توسعه خواهد بود. [۳]. در حال حاضر نیز سل به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مشکلات بهداشتی جهان شناخته می‌شود و بالغ بر ۹۵ درصد گزارش‌ها مربوط به کشورهای توسعه نیافته یا در حال توسعه است که دلیل آن را در ارتباط با شیوع ویروس سندرم نقص سیستم ایمنی (Acquired Immune Deficiency Syndrome: AIDS) می‌دانند. در این کشورها اغلب این افراد در میانه زندگی‌شان می‌میرند [۴، ۵] در حالی‌که در کشورهای توسعه یافته حداقل ۲۰ درصد از عفونت سل در سنین ۶۵ سال و بالاتر روی می‌دهد [۴]؛ بنابراین واضح است که این بیماری نیز همچون سایر بیماری‌ها با سن بیماران ارتباط مستقیمی دارد.

از آن‌جا که بروز بیماری سل به عواملی همچون میزان شیوع سل در منطقه، طول عفونت در بیماران و شیوع و میزان برخورد افراد با بیماران مسلول بستگی دارد [۶، ۷]؛ بنابراین براساس مطالعات مرسوم اپیدمیولوژیک ثابت شده است که بالغ بر ۹۰ درصد از بیماری‌ها در کشورهای توسعه یافته بر اثر فعال شدن مجدد بیماری در سنین بالا است و انتقال اخیر بخش کمی از عفونت‌ها را تشکیل می‌دهد [۸].

مطالعات اخیر بر نقش سن در انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis*) تأکید داشته‌اند [۹، ۱۰] که می‌تواند انعکاسی از تغییرات در عوامل خطرزای بیماری در طول عمر فرد باشد [۱۰]. مطالعات نشان داده است افرادی که در دسته‌ها (Clusters) قرار نمی‌گیرند نشان‌دهنده کسب عفونت در گذشته دور و فعال شدن مجدد عفونت است؛ این افراد دارای الگوی اختصاصی انگشت‌نگاری DNA (DNA fingerprinting) هستند [۱۱]. بنابراین شناسایی موارد وابسته به سن انتقال سل نقش مهمی در کنترل و کاهش انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مقاوم به درمان و درمان بیماران تا زمان ریشه‌کنی عفونت در فرد دارد [۱۱]. برای شناسایی سل وابسته به سن از روش چندشکلی طول قطعات محدودالتر (Restriction Fragment Length Polymorphism: RFLP) برای شناسایی تعداد قطعات IS6110 موجود در ژنوم استفاده می‌شود [۱۲، ۱۳]، این مطلب ثابت شده است که استفاده از

برای آزمون IS6110-RFLP استفاده شد. از این تعداد ۸۹ (۵۳/۹۴ درصد) از نمونه‌ها مرد و ۷۶ (۶۷/۰۶ درصد) از نمونه‌ها زن بودند. سن بیماران بین ۲/۵ تا ۸۸ سال بود. انگشت‌نگاری به وسیله RFLP باندهایی به تعداد صفر تا ۱۷ را نشان می‌دادند (شکل ۱). میانگین تعداد کپی‌های IS6110 در هر ایزوله ۷/۳ بود. اغلب ایزوله‌ها (۹۳/۳ درصد) حداقل دارای ۵ کپی از IS6110 در ژنوم خود بودند و فقط ۱۱ نمونه (۶/۷ درصد) دارای کمتر از ۵ کپی از IS6110 بودند که در این میان ۱ ایزوله دارای ۴ کپی، ۱ ایزوله دارای ۲ کپی و یک ایزوله فقط دارای یک کپی از IS6110 بود و ۸ ایزوله هیچ کپی از IS6110 را نداشت (شکل ۱).



شکل ۱ الگوهای مختلف انگشت‌نگاری ایزوله‌های به‌دست آمده از بیماران. در این شکل نمونه‌های شماره ۱ و ۲ دارای الگوی مشابه هستند. سویه استاندارد (\*) مورد استفاده سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس Mt14323 است که به‌عنوان نشانگر استفاده شدند.

آنالیز نهایی روی ۱۵۴ ایزوله که دارای ۵ یا بیشتر کپی IS6110 داشتند، صورت گرفت و ۳۰/۵۲ درصد از مجموع ایزوله‌ها در دسته‌ها قرار گرفتند که ۱۶ دسته را تشکیل دادند که در هر دسته بین ۲ تا ۱۰ نمونه قرار می‌گرفت. ۶۹/۴۸ درصد از نمونه‌های مورد مطالعه دارای الگوی انحصاری بودند. در مطالعه حاضر مردان (۵۱/۵ درصد) نسبت به زنان (۴۸/۴ درصد) بیشتر در دسته قرار گرفتند که از نظر آماری معنی‌دار نبود ( $P > 0/05$ ).

[۱۲، ۱۵]. DNA استخراج شده مایکوباکتریوم توسط آنزیم PvuII بریده شدند (Fermentas, Lithuania) و قطعات حاصل توسط الکتروفورز در ژل آگارز ۰/۸ درصد در ۲۰ ولت به مدت ۱۸-۲۰ ساعت جداسازی شدند و سپس قطعات حاصل از ژل به غشای نایلونی دارای شارژ مثبت منتقل شد. دورگه‌سازی (Hybridization) با پروب IS6110 نشان‌دار شده در کیسه دورگه‌سازی انجام گرفت و به روش سیستم کلریمتریک (Colorimetric system) شناسایی شد. مخلوطی از DNA لدر سوپرکویل (Supercoiled DNA ladder) بریده شده توسط PvuII (Sigma, USA) و DNA بریده شده توسط HaeIII از Fermentas, Lithuania  $\phi$ X174 به‌عنوان نشانگر (Marker) داخلی استفاده شد. نشانگر داخلی به تمام چاهک‌ها به همراه DNA مایکوباکتریوم توبرکلوزیس افزوده شد و به‌وسیله پروب‌های طراحی شده DNA نشان‌دار شده و توسط کیت شناساگر شناسایی شدند (Roche, Germany). علاوه بر اندازه نشانگر داخلی، از DNA سویه مرجع Mt14323 هضم شده توسط PvuII به‌عنوان اندازه نشانگر خارجی در هر ساترن بلائینگ (Southern blotting) استفاده شد. الگوی RFLP ایزوله‌ها به‌صورت دیداری مقایسه شدند. دسته به‌عنوان گروهی از دو ایزوله یا بیشتر است که از بیماران متفاوت جداسازی شده‌اند و دارای الگوی RFLP یکسان هستند و تعداد و قطعات با وزن مولکولی مشابه به‌وجود آورده‌اند.

برای مطالعه آماری تمام نمونه‌ها به دو دسته مشتمل در دسته‌ها و غیر مشتمل در دسته‌ها تقسیم‌بندی شدند و نتایج گروه‌های مختلف آماری توسط آزمون Chi-square (یا Fisher exact test) مقایسه شدند. P-value زیر ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی‌دار محسوب می‌شود.

### ۳- نتایج

طی مدت فروردین ۱۳۸۳ تا فروردین ۱۳۸۴ در مجموع ۱۶۵ نمونه کشت مثبت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جداسازی و

در مطالعه حاضر ۲۸ بیمار سن ۳۰ سال و کمتر داشتند، ۱۵ بیمار بین ۳۱-۴۰، ۴۲ بیمار بین ۴۱-۵۵ و ۶۹ بیمار ۵۶ سال یا بیشتر داشتند. بیماران با گروه سنی بالای ۵۶ سال بالاترین همراهی را با دسته‌ها داشتند (۵۹/۶ درصد)، این گروه از بیماران به‌طور معنی‌داری بیشتر از جوانان در دسته‌ها قرار گرفتند ( $P < 0.05$ ). همان‌طور که در جدول ۱ نشان داده شده است ایزوله‌های قرار گرفته در دسته با سن ۳۰ و کمتر فقط ۶/۴ درصد از مجموع ایزوله‌ها را شامل می‌شوند و ایزوله‌های با گروه سنی ۳۱-۴۰ و ۴۱-۵۵ به ترتیب ۱۰/۶ درصد و ۲۳/۴ درصد از مجموع نمونه‌ها را شامل می‌شدند.

جدول ۱ ارتباط بین سن و قرار گرفتن ایزوله‌های جدا شده مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در شمال غرب ایران

P-value	****	***	**	*	
-	۲۸ (۱۸/۲)	۸۹/۳	۲۵ (۲۳/۴)	۳ (۶/۴)	$30 \geq$
-	۱۵ (۹/۷)	۶۶/۷	۱۰ (۹/۳)	۵ (۱۰/۶)	۳۱-۴۰
-	۴۲ (۲۷/۳)	۷۳/۸	۳۱ (۲۹/۰)	۱۱ (۲۳/۴)	۴۱-۵۵
۰/۰۳۱	۶۹ (۴۴/۸)	۵۹/۴	۴۱ (۳۸/۳)	۲۸ (۵۹/۶)	$56 \leq$

\* گروه سنی (سال)

\*\* تعداد بیماران دسته‌بندی شده (درصد)

\*\*\* تعداد بیماران دسته‌بندی نشده (درصد)

\*\*\*\* درصد مجموع بیماران دسته‌بندی نشده در گروه

\*\*\*\* مجموع بیماران (درصد)

بیماران گروه سنی ۳۰ سال و پایین‌تر به‌صورت مشخص و معنی‌داری در دسته‌ها قرار نمی‌گرفتند (جدول ۱) به‌نحوی که از مجموع ۲۸ عضو این گروه سنی ۲۵ بیمار در هیچ دسته‌ای قرار نگرفتند (۸۹/۳ درصد) و در گروه‌های سنی ۳۱-۴۰ و ۴۱-۵۵ و ۵۶ به بالا به ترتیب ۶۶/۷ درصد و ۷۳/۸ درصد و ۵۹/۶ درصد در دسته‌ای قرار نگرفتند.

## ۴- بحث

امروزه مشخص شده است که باسیل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قادر است عفونت خود را بلافاصله پس از ابتلای

شخص گسترش دهد یا سال‌ها پس از ابتلا علایم بیماری را بروز دهد که می‌تواند به‌واسطه فعالیت مجدد عفونت قبلی یا ابتلای مجدد شخص بروز کند. یکی از عوامل دخیل در این ارتباط را سن می‌دانند و در واقع خطر ابتلا افراد در دوره‌های سنی متفاوت متغیر است [۱۰]. در مطالعه حاضر از مجموع ۶۹ بیمار با سن بالای ۵۶ سال، ۲۸ بیمار در دسته قرار گرفتند (۵۹/۶ درصد از بیماران داخل دسته)؛ این یافته عکس نتایج مطالعات قبلی بود که بیماران جوان بیشتر در دسته‌ها قرار می‌گرفتند [۱۶-۱۸]. این یافته نشان می‌دهد در منطقه شمال غرب ایران انتقال بیماری سل جدید غالباً در افراد با سن بالا روی می‌دهد. در حالی‌که در مطالعات صورت گرفته در کشورهای صنعتی برعکس مطالعه حاضر میزان قرار گرفتن افراد مسن در دسته‌ها کمتر از افراد جوان بوده است. در حقیقت در مطالعه حاضر کاهش انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با کاهش میانگین سنی بیماران رابطه مستقیم داشته است. این تفاوت در ارتباط بین گروه سنی و میزان انتقال مستقیم مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بین مطالعه حاضر و سایر نقاط شاید به دلیل تفاوت در عوامل خطرزای ابتلای سل در طول دوره‌های زمانی مختلف حاکم در قرن بیستم و سال‌های اخیر است [۱۹، ۲۰]. در نتیجه در کشورهای پیشرفته در واقع بروز سل در افراد مسن در پی فعالیت مجدد بیماری است که فرد سال‌ها پیش کسب نموده است و به دلیل نیمه‌عمر پایین تغییر الگوی انگشت‌نگاری DNA فقط تعداد کمی از افراد مسن دارای الگوی مشابه هستند [۱۹]. در مطالعه حاضر افراد مسن‌تر ( $\geq 56$  سال) غالباً در دسته‌های انتقال عفونت قرار گرفتند در حالی‌که در مطالعات مشابه در سایر نقاط جهان این میزان بین ۳۰ تا ۴۰ درصد مشاهده شده است و با افزایش سن قرارگیری در دسته‌ها کم شده است [۱۰، ۱۶، ۱۷، ۲۰، ۲۱]. از جمله فرضیات مؤثر بر این تفاوت می‌توان به بیکاری، سطح زندگی پایین، شیوع پایین ویروس AIDS یا حتی موفقیت در کنترل عفونت سل در افراد با سنین پایین‌تر اشاره کرد. در مجموع میزان پایین دسته‌های انتقال سل در این منطقه نشان می‌دهد که عفونت حاضر در