Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکربیولوژی دامپزشکی/ دوره سیزدهم، شماره اول، ۱۳۹۶، پیاپی ۳۴: ۱۱۹-۱۰۹

جداسازی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کمپلکس از جوندگان دامداری‌های آلوده در استان خوزستان

رحمن لونی [۱]، نادر مصوری [۲*]، کیوان تدین [۳]، روح‌الله کشاورز [۴]، شمس‌الدین قائم‌مقامی [۵]، شجاعت دشتی پور [۶]، محمدمحمدطاهری [۶]

۱- کارشناس بخش تضمین کیفیت - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

۲- رئیس آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماری‌زای دام - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

۳- رئیس بخش واکسن‌های باکتریایی هوازی دام - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

۴- رئیس تشخیص بخش تحقیق و تهیه توبرکولین، مالئین و یونین - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

۵- رئیس مرکز رشد فن آوری - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

۶- کارشناس آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماری‌زای دام - موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج - ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش ۹۵/۱۱/۱۵

چکیده

گونه‌های مختلف کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل ایجادکننده بیماری سل در انسان و دام می‌باشند. با توجه به زئونوز بودن این پاتوژن ها و وجود گله‌های متعدد گاو در جوار شهرها همواره جهت کنترل و پیشگیری از بروز اپیدمی سل در انسان و دام و همچنین انجام بهتر و دقیق‌تر برنامه کنترل و مبارزه با این بیماری، می‌بایست مراقبت‌های فعالانه انجام پذیرد. لذا هدف از این تحقیق جداسازی عامل بیماری از گاوهای توبرکولین مثبت و حیواناتی که در گله وجود دارند مانند جوندگان دامداری‌ها می‌باشد تا مشخص گردد که چه سویه‌ها و گونه‌هایی در کشور در حال گردش می‌باشند. برای رسیدن به این اهداف، می‌بایست عامل پاتوژن مجزا و تعیین هویت گردد. در جریان انجام این تحقیق با همکاری سازمان دامپزشکی استان خوزستان و با استفاده از تست توبرکولین، از تعداد ۴۰ کانون آلوده به سل گاوی ۱۶ نمونه موش از دامداری‌های آلوده به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شکار شد. تمامی نمونه‌ها مورد کشت باکتریایی در محیط‌های اختصاصی قرار گرفتند و پس ازانکوباسیون (حداقل ۸ هفته)، ۲ جدایه به دست آمد. به کمک PCR با استفاده از 16sRNA جنس مایکوباکتریایی جدایه‌ها تائید و سپس با استفاده از قطعه الحاقی IS6110، تعلق جدایه‌ها به اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشخص گردید.

کلیدواژه‌ها: موش، کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR، خوزستان

**نویسنده مسئول: نادر مصوری*

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)- کرج – ایران. تلفن: ۰۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸ و ۰۲۶۳۴۵۰۲۸۹۵

پست الکترونیک: N.MOSAVARI@rvsri.ac.ir

مقدمه

گونه‌های مایکوباکتریا که در انسان و حیوانات ایجاد بیماری می‌کنند و به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تعلق دارند شامل: *مایکوباکتریوم بویس*، *مایکوباکتریوم بویس BCG*، *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم آفریکانوم*، *مایکوباکتریوم کانتی*، *مایکوباکتریوم میکروتی*، *مایکوباکتریوم کاپری*، *مایکوباکتریوم‌پنی پدی*، *مایکوباکتریوم مونژی* و *مایکوباکتریوم اوریجیس* می‌باشند (۲۰). ارگانیسم‌های متعلق به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* کند رشد بوده و کلنی‌های آن‌ها فاقد پیگمان است (۱۴).

ازلحاظ ژنتیکی و توالی ژنومی سویه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* همسانی بسیار نزدیکی باهم داشته و در سطح نوکلئوتید ۹۹/۹٪ شبیه هستند و تفاوت آن‌ها بیشتر در پلی مورفیسم توالی‌های بزرگ ژنی LSP (Large sequence polymorphism) می‌باشد(۱۲). اعضای این کمپلکس بر اساس تفاوت‌های موجود میان آن‌هاازنظر پاتوژنیسیتی، جغرافیای متفاوت، مقاومت و حساسیت به آنتی‌بیوتیک‌ها نیز متمایز می‌شوند.در سال ۲۰۰۷ گونه *مایکوباکتریوم مونژی* به این جنس اضافه گردیده است (۱۱).

سل یکی از دلایل عمده بیماری و مرگ‌ومیر در جهان است. این بیماری تأثیر زیادی روی طیف وسیعی از گونه حیوانات خصوصاً احشام درکشورهای توسعه‌یافته و درحال‌توسعه دارد. *مایکوباکتریوم بویس* بیشترین طیف میزبانی را دارا بوده و یکی از زئونوزهای مهم در سراسر دنیا محسوب و به‌عنوان یکی از شاخص‌های بهداشتی در جوامع قلمداد می‌گردد. گونه‌های مشترک بین انسان و حیوان ممکن است بیش از ۷/۲٪ تا ۱۵٪ به ترتیب درکشورهای صنعتی و درحال‌توسعه موجب سل انسانی گردند (۱۶).

در بیشتر کشورها سل گاوی یکی از نگرانی‌های اصلی بهداشت عمومی بوده و همان‌طور که ذکر گردید، *مایکوباکتریوم بویس* با بالاترین طیف میزبانی، از گونه‌های مختلفی از حیوانات اهلی و وحشی علاوه بر خانواده بویده جداشده است. شیوع جهانی سل انسانی به‌وسیله عامل *مایکوباکتریوم بویس*در حدود ۳/۱٪می‌باشد. در حدود ۲/۱٪ سل ریوی و ۹/۴٪ سل خارج ریوی مربوط به این عامل است (۷). ریشه‌کنی *مایکوباکتریوم بویس* به دلیل داشتن میزبان‌های متعدد مشکل بوده و به همین علت برخی از حیوانات وحشی، مخزن بیماری می‌باشند. گونه موش ول (Vole) یکی از مخزن‌های عامل سل گزارش شده است (۴). در مطالعه‌ای که در سال ۱۳۹۳ انجام پذیرفت، مشخص گردید که وجود موش در دامداری‌ها، به صورت چشم گیری باعث افزایش خطرآلودگی به سل گاوی گردیده است (۳).

در مطالعه حاضر شناسایی مایکوباکتریوم از جوندگان استان خوزستان، توسط روش کشت باکتری و تعیین تعلق جدایه‌هابه جنس مایکوباکتریوم با PCR16sRNA و به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* توسط PCRIS6110 انجام پذیرفت.

مواد و روش کار

الف) جمع‌آوری نمونه‌ها

در جریان انجام این تحقیق با همکاری سازمان دامپزشکی استان خوزستان و با استفاده از تست توبرکولین، از تعداد ۴۰ کانون آلوده به سل گاوی، ۱۶ نمونه موش از دامداری‌های آلوده به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شکار شد و پس از انجام مرگ راحت با استفاده از اتر، در دمای ۲۰- درجه

سانتی‌گراد فریز و نگهداری شد. تمامی نمونه‌ها با رعایت اصول بهداشتی و با استفاده از ظروف غیرقابل نشت، به آزمایشگاه رفرانس سل دامی بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین موسسه رازی منتقل گردید.

ب) کشت و جداسازی باکتری:

پس از خارج کردن نمونه‌هااز حالت انجماد به ترتیب نسبت به کشت و جداسازی باکتری به روش زیر اقدام گردید (۱):

۱- سلایه کردن: در شرایط استریل از اندام‌های داخلی موش‌ها (ترجیحاً کبد و ریه) اقدام به نمونه‌برداری (حدود ۵ گرم از هر نمونه) و سپس هریک از نمونه‌ها داخل هاون چینی استریل پس از اضافه کردن شن استریل به‌خوبی سلایه گردید.

۲- آلودگی‌زدایی و هموژنیزاسیون: برای آلودگی‌زدایی و هموژن نمودن نمونه‌ها از محلول سود نرمال ۴٪به میزان دوسوم حجم نمونه به مدت ۱۵ تا ۲۰ دقیقه استفاده شد.

۳- تغلیظ و کشت: تحت شرایط استریل و به‌آرامی توسط پیپت پاستور مایع رویی هاون برداشته شد و به لوله فالکون انتقال یافت و به هم‌حجم محتوی هر لوله، بافرفسفاته با pH=6.8 اضافه گردید. سپس لوله‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۰۰۰ دور سانتریفوژ شد و در ادامه مایع رویی دور ریخته و چند قطره بافرفسفاته با pH=6.8 به لوله‌هااضافه و با استفاده از اسیدکلریدریک نرمالو دسی نرمال استریل و نوار pH متر رسوب حاصل در ۷ تا ۷/۲ تنظیم و سپس به میزان ۰/۱ میلی‌لیتر در هر یک از دو محیط لوانشتاین جانسون گلیسرینه و پیروات دار کشت داده شد (۲۰).

۴- تمامی محیط‌های کشت به مدت ۸ هفته در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری و هر هفته مشاهده شد.

۵- از جدایه‌ها در شرایط استریل گسترش تهیه و سپس اقدام به رنگ‌آمیزی با روش *زیل نلسون* گردید. اسلایدها پس از خشک شدن با میکروسکوپ نوری بررسی گردید (۱۸).

ج) جداسازی DNA

از جدایه‌ها با استفاده از روش *TB lysise* اقدام به جداسازی DNA شد. در این روش پس از برداشت یک یا دو لوپ کامل از پرگنه‌های جدایه‌ها، در لوله اپندورف درب دار (رینگ دار) حاوی ۲۵۰ – ۳۰۰ میکرولیتر از محلول Lysis solution(TB Lysis) شرکت سینا ژن، اضافه گردید. بعد از بستن درب لوله دربن ماری ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. این کار به دلیل کشتن باکتری و متلاشی کردن پیکر باکتری برای آزادسازی DNA، انجام پذیرفت. سپس نمونه از بن ماری خارج و ورتکس گردید، در ادامه در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰-۱۵ دقیقه سانتریفوژ و به وسیله سمپلر از مایع رویی به‌عنوان منبع DNA برداشته و در میکروتیوب ریخته و در فریزر ۱۸- برای PCR نگهداری شد (۱).

د) آزمون PCR قطعه 16SrRN

به‌منظور تائید تعلق جدایه‌ها به جنس *مایکوباکتریوم* از روش PCR با استفاده از قطعه 16SrRNA استفاده گردید.

در این آزمون از دو پرایمر Forward و Reverse(با توالی ذکر شده در جدول ۱) با غلظت ۵ پیکومول، هر کدام به میزان ۰/۴ میکرولیتر، Master mix با غلظت 2x، به میزان ۶ میکرولیتر، آب دیونیزه ۲/۸ میکرولیتر، Dimetsulfoxide(DMSO) به مقدار ۰/۴ میکرولیتر و میزان ۲ میکرولیتراز هر نمونه DNA استخراج شده باغلظت ۳۰۰-۲۵۰ نانوگرم، برای هر

نمونه PCR استفاده شد. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر در این آزمون به شرح زیر تنظیم گردید:
۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشت شدن اولیه)،۲۵سیکل حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (واسرشته شدن)،۶۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (اتصال پرایمرها)، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱ دقیقه (سنتز)، و یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۴ دقیقه انجام گرفت (۱۰).

ه) آزمون PCR قطعه IS6110

به‌منظور تائید نمونه‌ها در گروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*از روش PCR با استفاده از قطعه الحاقی IS6110 استفاده گردید. در این آزمون از دو پرایمر (INS-1 و INS-2) با توالی ذکر شده در جدول ۱ با غلظت ۵ پیکومول، هر کدام به میزان ۱ میکرولیتر، Master mix باغلظت 2x، به میزان ۸ میکرولیتر، آب دیونیزه ۴ میکرولیتر، و میزان ۲ میکرولیتراز هر نمونه DNA استخراج شده با غلظت ۳۰۰-۲۵۰ نانوگرم، برای هر نمونه PCR استفاده گردید. برنامه دمایی دستگاه ترموسایکلر در این آزمون به شرح زیر تنظیم شد:
۹۵ درجه سانتیگراد به مدت ۳ دقیقه (واسرشت شدن اولیه)،۳۵ سیکل حرارتی شامل ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (واسرشته شدن)،۶۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۳ ثانیه (اتصال)، ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه (سنتز)، و یک بسط نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت (۱۹).
پس از انجام PCR، الکتروفورز نمونه‌ها روی ژل 1٪ با محلول TBE 1x(TrisBurate EDTA) و در بافر TBE با ولتاژ ۹۰ میلی ولت به مدت یک ساعت انجام گردید. بعد از الکتروفورز ژل؛ توسط دستگاه ژل داک عکس‌برداری صورت پذیرفت. ردیف پرایمرهای مورداستفاده در این مطالعه در جدول (۱) نشان داده‌شده است.

یافته‌ها

الف) رؤیت باکتری پس ازکشت: پس از گذشت ۸ هفته از کشت نمونه‌ها، روی محیط لونشتاین جانسون پیروات دار، کلنی‌های مشخص نمایان گردید (تصویر ۱) که پس از نمونه برداری و رنگ آمیزی، باسیل‌های قرمز رنگ در زمینه آبی (باسیل‌هایی اسید فست) مشاهده شد (۱۵)(تصویر ۲). بر اساس نتایج حاصل از مطالعه حاضر، با بررسی کشت باکتریایی نمونه‌ها، از تعداد ۱۶ نمونه موش تعداد ۲ جدایه (۱۲/۵٪) به‌عنوان جنس *مایکوباکتریوم* مورد شناسایی قرار گرفت.

ب) آزمون PCR-16SrRNA: به منظورتائید تعلق ۲ جدایه از موش به جنس مایکوباکتریوم، بررسی مولکولی نمونه‌ها با استفاده از توالی اختصاصی 16SrRNA و مشاهده‌ی باند ۵۴۳ زوج باز روی ژل آگاروز انجام گردید (تصویر ۳).

ج) آزمون PCR قطعه IS6110

روی ۲ جدایه از موش، بعداز انجام پروسه تخلیص DNA با انجام تست PCR تعلق داشتن آن‌ها به گروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تائید شد. اعمال این استراتژی در مورد هر دوجدایه منجر به مشاهده یک باند الکتروفورزی مشخص به‌اندازه ۲۴۵ زوج باز بر روی ژل آگاروز گردید (تصویر ۴).

د) بررسی مولکولی: در بررسی مولکولی نمونه‌ها با استفاده از توالی اختصاصی 16SrRNA و IS6110، هر دو جدایه به‌عنوان عضو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تائید مولکولی شد.

نتایج این مطالعه که جداسازی عضوکمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از موش است برای اولین بار در ایران گزارش می‌گردد.

جدول ۱- ردیف پرایمر های مورد استفاده در PCR قطعه 16SrRN

Primer	Sequence	Size
16SrRNA(F)	5'(ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C) 3'	543
16SrRNA(R)	5'(TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A) 3'	
IS6110 (INS-1 (631-650)) (F)	5'(CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC)3'	245
IS6110 (INS-2 (856-875))(R)	5'(GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) 3'	

جدول ۲-اجزاء و مقدار مورداستفاده در PCR *(Locus16SrRNA)*

Master mix	Primer Forward	Primer Reverse	D.W	Template	DMSO	Total
*µl*6	0.4*µl*	0.4*µl*	2.8*µl*	2 *µl*	0.4	12*µl*

جدول ۳-برنامه زمان و دمای انجام PCR (Locus 16SrRNA)

مراحل PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴	۳ دقیقه	یک سیکل
دناتوراسیون	۹۴	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
آنیلینگ	۶۵	۱ دقیقه	
بسط زنجیر	۷۲	۱ دقیقه	
بسط نهایی	۷۲	۴ دقیقه	یک سیکل

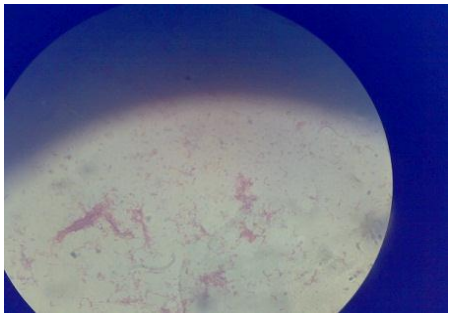
جدول ۴-اجزاء و مقدار مورداستفاده در PCR (Locus IS 6110)

Master mix	Primer INS-1	Primer INS-2	D.W	Template	Total
۸ *µl*	1*µl*	1*µl*	4 *µl*	2 *µl*	16 *µl*

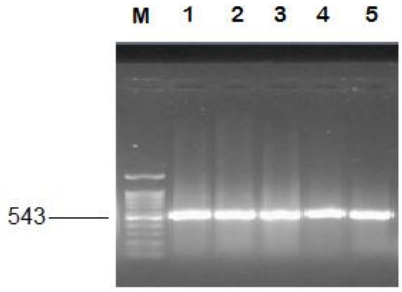
جدول ۵- برنامه زمان و دمای انجام PCR (Locus IS6110)

مراحل PCR	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۵	۳ دقیقه	یک سیکل
دناتوراسیون	۹۴	۳۰ ثانیه	۳۵ سیکل
آنیلینگ	۶۲	۳۳ ثانیه	
بسط زنجیر	۷۲	۳۰ ثانیه	
بسط نهایی	۷۲	۱۰ دقیقه	یک سیکل

تصویر ۱ –پرگنه های جدایه روی محیط لونشتاین جانسون پیروات دار (L JP)



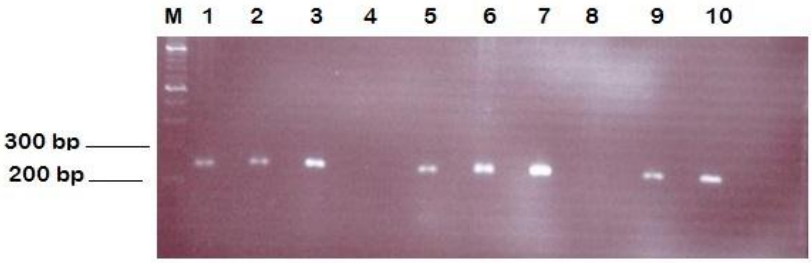
تصویر ۲ –باکتری اسید فست با بزرگنمایی ۱۰۰×



تصویر ۳- الکتروفورز محصول PCR برای سکانس ۵۴۳ جفت بازی 16SrRNA

ستون M: سایز مارکر bp ۱۰۰ شرکت رش آلمان، ستون ۲ و ۱: جدایه های از موش،

ستون ۳ و ۴ تکرار جدایه های موش ستون ۵: سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بویس*به‌عنوان کنترل مثبت.



تصویر ۴- الکتروفوز محصول PCR برای سکانس ۲۴۵ جفت بازی IS6110

ستون M: سایز مارکر bp ۱۰۰ شرکت رش آلمان، ستون‌های ۱،۲ جدایه های از موش،

ستون ۱۰،۳ کنترل مثبت سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بویس*، ستون‌های ۴،۸ کنترل منفی Mycobacteriumavium *D4*،

ستون‌های ۵،۶،۷،۹ تکرار جدایه های موش،

بحث و نتیجه‌گیری

بیماری سل علیرغم تلاش گسترده‌ای که برای ریشه‌کنی ودرمان آن به‌عمل‌آمده است هنوز هم به‌عنوان یک بیماری مهم عفونی در جوامع انسانی مطرح می‌باشد. این بیماری به‌وسیله باکتری‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* ایجاد می‌شود. از بین اعضای کمپلکس، *مایکوباکتریوم بویس*

بیشترین طیف میزبانی را دارا بوده و یکی از زئونوزهای مهم در سراسر دنیا محسوب می‌شود (۸). میزان فراوانی سل گاوی در گله‌های گاو ایران در طول نیم‌قرن گذشته درنتیجه اجرای برنامه کنترلی «تست و کشتار» که بر پایه توبرکولیناسیون گاوها و شناسایی و کشتار گاوهای توبرکولین مثبت است، روند کاهنده‌ای داشته است و از میزان بیش از ۵ درصد در سال ۱۳۵۱ به میزان کمتر از ۰/۲ درصد در سال ۱۳۹۰ رسیده است. میزان فراوانی *مایکوباکتریوم بویس* در جمعیت انسانی به‌عنوان یک مؤلفه مهم در نشان دادن وضعیت بهداشتی کشورها بکار می‌رود (۹). این میزان در سال‌های ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۷ در ده کشور آمریکای لاتین بین ۰/۴۳٪ تا ۱٪ متغیر بوده است (۵). در انگلستان این میزان حدود ۰/۵٪ و در هلند و اروپامعادل ۱/۴٪ گزارش‌شده است (۱۷).

در مطالعه حاضر از تعداد کل ۱۶ نمونه‌ی مورد آزمایش، تعداد ۲ جدایه (۱۲/۵٪) با استفاده از روش‌های کشت و همچنین روش‌های مولکولی جداسازی گردید. با مروری بر مطالعات داخلی، موردی دال بر جداسازی این میکروارگانیسم (عضو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*) از موش یافت نشد.

منطقه ژنتیکی 16SrRNA یکی از بخش‌های شناخته‌شده ژنوم باکتری‌هاست که در تشخیص هویت آن‌ها و تعیین توالی نوکلئوتیدهای قسمت‌های خاصی از این لوکوس ژنتیکی در تعیین جنس و گونه باکتری‌ها بکار می‌رود. این بخش از ژنوم در تمامی اعضای ۸ گانه کمپلکس *مایکوباکتریوم* شامل *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم بویس*، *مایکوباکتریوم آفریکانوم*، *مایکوباکتریوم کنتی*، *مایکوباکتریوم میکروتی*، *مایکوباکتریوم کاپره*، *مایکوباکتریوم بویس BCG* و *مایکوباکتریوم پینی‌پدی* یکسان اما با سایر مایکوباکتریوم ها متفاوت است (۳).

پالمر و همکاران (۲۰۱۳) گزارش‌هایی مبنی بر وجود *مایکوباکتریوم بویس* در حیوانات وحشی از قبیل صاریغ (possum) در نیوزلند، گورکن اروپایی (Badger European) در بریتانیا و ایرلند، بوفالوی آفریقایی (African buffalo) در آفریقای جنوبی، گراز وحشی (Wild Boar) در شبه‌جزیره یبریو آهوی دم‌سفید (white-tailed deer) در میشیگان ارائه نمودند و مشخص گردید که اپوسوم در انتقال بیماری سل گاوی نقش دارد (۱۳).

ارگات و همکاران در سال ۲۰۱۳ در مطالعه‌ای که در کرانه باختری و فلسطین روی ۲۰۸ نمونه بافتی و شیر از گاوو بز انجام دادند، برای اولین بار *مایکوباکتریوم بویس* را بر اساس آزمایش PCR (با استفاده از پرایمر IS6110) و اسپولیگوتایپینگ، شناسایی و تعیین گونه کردند (۷).

در سال ۱۹۹۹ نیز تحقیق دیگری توسط *کاستلو* و همکاران درزمینه مولکولار اپیدمیولوژی عفونت *مایکوباکتریوم بویس* به‌وسیله RFLP با استفاده از پروب‌های IS6110، DR و PGRS و همچنین اسپولیگوتایپینگ در ایرلند صورت پذیرفت. در این تحقیق از ۴۵۲ جدایه موردمطالعه ۲۳۳ مورد از گاو، ۱۷۳ مورد از گورکن، ۳۳ مورد از آهو، ۷ مورد از خوک، ۵ مورد از گوسفند و تنها یک جدایه از بز بود. اکثریت جدایه‌ها در تمام گونه‌ها تنها دارای یک کپی از IS6110 بودند. حدود و توزیع جغرافیایی اکثریت سویه‌های جداشده از گاو، گورکن و آهو مشابه بودند. به همین دلیل انتقال عفونت بین این گونه‌های حیوانی را عاملی در اپیدمیولوژی عفونت

مایکوباکتریوم بویس در ایرلند دانستند. در این مطالعه نیز نقش گورکن در انتقال بیماری مشخص گردیده است (۵). کیپر و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که گونه موش ول (Vole) یکی از مخزن‌های عامل سل می‌باشد (۴).

در مطالعه‌ای که توسط اکبرین و همکارانش در سال ۱۳۹۳ روی عوامل مؤثر بر آلودگی گاوداریهای شیری به سل گاوی انجام گرفت مشخص گردید که وجود موش در دامداری‌ها، به صورت چشم گیری باعث افزایش خطرآلودگی به سل گاوی گردیده است (۳).

در مطالعه حاضر، **برای اولین بار***مایکوباکتریوم* از موش دامداریهای ایران جدا گردید و مشخص شد که این جدایه ها به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تعلق دارند. موضوع مهم اینکه همانطور که در مطالعات بالا اشاره گردید، در بیشتر نقاط نقش میزبان بیماری سل مانند اپوسوم، گورکن و موش ول (Vole) شناسایی شده است ولی تاکنون در ایران نقش میزبانی که بتواند عامل بیماری سل را در گله نگهداری نماید مشخص نشده بود. در این تحقیق نقش موش در حضور عامل سل در گاوداریهای آلوده به اثبات رسید و مشخص گردید که این جدایه ها به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، تعلق دارد لذا اهمیت نقش جوندگان در سل دامی و متعاقباً به سل انسانی به اثبات رسید. نکته دیگر اینکه اثبات مخازن نگهداری باکتری‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در جوندگان، ازنظر بهداشت عمومی و خطر گردش بیماری سل بین جوندگان، انسان و دیگر حیوانات بسیار حائز اهمیت است. در این خصوص تمرکز وزارت بهداشت و آموزش پزشکی به‌منظور مبارزه با مخازن بیماری سل در جوندگان را بیش‌از پیش معطوف می‌دارد. همچنین با اثبات وجود کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در جوندگان، پیشنهاد می‌گردد که سازمان دامپزشکی کشور در برنامه کنترل و ریشه کنی سل دامی، بیش از پیش مبارزه با جوندگان را مد نظر قرار دهد.

در این مطالعه با توجه به عنوان مقاله، فقط تا تشخیص عضو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* اشاره گردیده است و مراحل RD typing، PCR-RFLP وRFLP به منظور تعیین گونه و مقایسه الگوی بدست آمده با دیگر سویه‌های عضو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* گاوهای همان گاوداریها و آرشیو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس موجود در موسسه رازی*، در مطالعات بعدی انجام خواهد شد.

منابع

۱- احمدی، م.، تدین، ک.، مصوریف ن.، فرازی، ع. ا.، ارجمندزادگانف م.، کشاورز، ر.، بنی‌هاشمی، ر.، سخاوتی، م.، حامدی، د.، ارم آبادی، م.، جباری اصل، م.، قادری، ر.، حسینی، د.، دشتی پورش (۱۳۹۴). تعیین ساختار ژنتیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به روش MIRU-VNTR. *مجله علمی دانشگاه علومپزشکی گرگان*، بهار ۱۳۹۴ دوره **۱۷** شماره ۱

۲- ارم آبادی، م.، تدین، ک.، مصوری، ن.، کشاورز، ر.، بنی‌هاشمی، ر.، قادری، ر.، سخاوتی، م.، احمدی، م.، ارم آبادی، پ.، خداوردی داریان، ا.، یاحقی، ع. و میرشرف‌الدینی، ه.س. (۱۳۹۲). تعیین هویت اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از روش‌های مولکولی، *مجله علوم آزمایشگاهی*، دوره ۷، شماره ۵، ویژه‌نامه باکتری‌شناسی، ص ۱۵-۹.

۳- اکبرین، ح.، باهنر، ع.، بکایی، س.، مصوری، ن.، رحیمی-فروشان، ع.، شریفی، ح.، ماکنعلی، ع. ص.، رکنی، ن.، مرحمتی‌خامنه، ب.، برومندفر، س. (۱۳۹۳). عوامل موثر بر آلودگی گاوداری‌های شیری تحت پوشش آزمون غربالگری توبرکولین به سل گاوی: مطالعه مورد-شاهدی

در سطح گله. مجله تخصص اپیدمیولوژی ایران،۱۳۹۳، دوره ۱۰، شماره ۳، صفحات ۲۴-۱۵

4- A. Kiper, S.J.Burthe,U.Hetzel, M.AboRokia, S.Telfer, X.Lambin, R.j.Birtles, M.Begon, and M.Bennett. (2013).*Mycobacterium microti Tuberculosis* in Its Maintenance Host,the field Vole (microtusagrestis) (2014).*Veterinary pathology*, **51:** 903-914.

5- Costello E., O'Grady D., Flynn O., O'Brien R., Rogers M., Quigley F., Egan J. & Griffin I. (1999). Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of Mycobacterium bovis infection. *Journal of Clinical Microbiology* **3**: 3217-3222.

6- De Kantor I.N., Ambroggi M., Poggi S., Morcillo N., DaSilvaTelles M.A., Osorio Riberio M., Garzon V. (2008). Human Mycobacteriumbovis infection in ten Latin American countries. *Tuberculosis* **88:** 365-8

7- Eregat S., Nasereddin A., Levin H., Azmi K., Jawabreh A., Greenblatt Ch., Abdeen Z., Kahila G. (2013). First-Time Detection of *Mycobacterium bovis*in Livestock Tissues and Milk in West Bank, Palestinian Territories. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **7:** 2417

8- KavehParvandar-Asadollahi, Nader Mosavari, Mansoor Mayahi (2015) Genotyping of Mycobacterium avium subsp. avium isolates from naturallyinfected lofts of domestic pigeons in Ahvaz by IS901 RFLP. *Iranian Journal.Microbiology* **7**: 260-264

9- Khaleghian p., Tadayon K., Farnia P., Mosavari N., Mozafari M., Derakhshani Nejad Z., Keshavarz R., Dashti Pour Sh., Masjedi M., Velayati A.A., Ghaderi R., Boroumandfar S. Genetic Diversity of Iranian *Mycobacterium bovis* Subtypes Analyzed by PCR-RFLP and Spoligotyping. *Journal of Veterinary Microbiology* **9.**

10- Keshavarz Rouhollah, Mosavari Nader and Maham Masood (2016). Potential Application of Patho-TB test for Rapid Laborary Diagnostic of *Bovine Tuberculosis* in Suspected Lesion.*Journal of Pure and Applied Microbiology* **10:** 1-9

11- Majoor C.J., Magis-Escurra C., Van Ingen J., Boeree M.J., Van Solingen D. (2011). Epidemiology of Mycobacterium bovis disease in humans, The Netherlands*, 1993-2007.Emerging Infectious Disease* **17:** 457-63.

12- Mostowy S., Cousins D., Brinkman J., Aranaz A., Behr M.A. (2002). Genomic deletions suggest a phylogeny for the Mycobacterium tuberculosis complex. *Journal Infectious Disease* **186**: 74-80. Epub 2002/06/29.

13- M.V. Palmer (2013). Mycobacterium bovis: Characteristics of Wildlife Reservoir Hosts Bacterial Diseases of Livestock Research Unit, National Animal Disease gricultural Research Service, USDA, Ames, IA,USA. *Transboundary and Emerging Diseases* **60:** 1–13

14- Niemann S, Richter E., Rüsch-Gerdes S. (2000). Differentiation among Members of the Mycobacterium tuberculosis Complex by Molecular and Biochemical Features: Evidence for Two Pyrazinamide-Susceptible Subtypes of M.bovis. *Journal of clinical microbiology* **38**: 152-7.

15- Office Internation Des Epizooties (2004). Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccine.

16- Pedro Costa, Ana S.Ferreira, And Ana Amaro, Teresa Albuquerque, Ana Botelho, Isabel Couto, Monica V.Cunha, Miguel Viveiros, Joao Inacio (2013). Enhanced Detection of Tuberculous Mycobacteria in Animal Tissue Using a Semi-Nested Probe-Based Real-Time PCR. PLOS *Neglected Tropical Diseases* **8**.

17- Stone M.J., Brown T.J., Drobniewski F.A. (2012). Human *Mycobacterium bovis* infections in London and southeast England.*Journal of Clinical microbiology* **50**: 164-5

18- Textbook of Diagnostic Microbiology (2000). *Mycobacterium tuberculosis* and Other Non tuberculos Mycobacteria **22:** 669-672

19- VanEmbden J. D. A., D. Cave, J.T. Crawford, J.W. Dale, K.D. Eisenach, B. Gicquel, P. Hermans, C. Martin, R. McAdam, T.M. Shinnick and P.M.Small (1993). Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a

standardized methodology. *Journal Clinical. Microbiology* **31**: 406-409.

20- Warren R.M, Gey van pittius N.C., Barnard M., Hesseling A., Engelke E., De Kock M., Gutierrez M.C., Chege G.K, Victor T.C., Hoal E.G., Van Helden P.D. (2006). Differatiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference [Short Communication].*The international Journal of Tuberculosis and Lung Disease* **10:** 818-822.

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 13, Issue 1, 2017

Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria from rodents of infected cattle farms in Khuzestan Province

Loni, R.[1], Mosavari, N.[2*], Tadayon, K.[3], Keshavarz, R.[4], Ghaem Maghami, S.[5], Dashtipour, S.[6], *Mohammad Taheri, M.*[6]

1- Quality Assurance Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
2- Head of Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
3- Head of Aerobic Veterinary bacterial Vaccines Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
4- Head of Diagnosis Laboratory of Tuberculin, Mallein and Jhonin Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
5- Razi Technology Incubator, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran
6- MSc of Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

Received Date: 4 January 2017 *Accepted Date:3 February 2017*

Abstract
The Mycobacteria grouped in the Mycobacterium tuberculosis complex are causes of Tuberculosis in animals and humans. This chronic disease also affects a wide range of other domestic and wildlife animals and may also cause disease in humans. It is very important to control and prevent the epidemic among human and animals because of zoonotic identity of the pathogen and several cattle flocks in suburb of cities, and it must be done better through more active surveillances. During this study, the causative agent of disease must be isolated from rodents found and hunted on the reactor or suspected farms. Finally, it must be distinguished that which isolates (species) are circulated in those areas. This study has been carried out by cooperation of Khuzestan Veterinary Office. By use of T.B test sample Farms have been selected. They consist of 16 mice from the same farms. All samples were referred to laboratory, then cultured in specific Lowenstein-Jensen slant media. After at least 8 weeks incubation (at 37°c) DNA was extracted from 2 isolates of 16 mice to identify the isolates belonging to the Mycobacterium tuberculosis complex, by using PCR detection of insertion sequence 6110 (IS6110) and (16srRNA). According to the test 2 isolates of mice belong to the family of Mycobacterium tuberculosis complex.

Keywords: Mouse, Isolation, Mycobacterium tuberculosis Complex, PCR, Khuzestan

**Corresponding author: Mosavari, N.*
Address: Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran. Tel: 02634552006, Fax: 02634552194
Email: N.MOSAVARI@rvsri.ac.ir