

## جداسازی و تعیین هویت مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از جوندگان دامداری‌های آلوده به مایکوباکتریوم

### • خاطره علیزاده

دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

### • نادر مصوری (نویسنده مسئول)

آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکنش و سرم سازی رازی،

سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

### • راضیه نظری

دانشکده علوم پایه، واحد قم، دانشگاه آزاد اسلامی، قم، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶-۰۲-۰۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶-۰۵-۲۵

Email: nmosavari@gmail.com



### چکیده

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عامل بیماری سل می‌باشد که باعث عوارض و مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. از این رو ابزار انگشت‌نگاری DNA برای بهبود تشخیص سل توسعه یافته‌اند و از تکنیک‌های تایپینگ مولکولی برای تشخیص و پیگیری گسترش آن استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه جداسازی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از جوندگان دامداری‌های آلوده و تعیین هویت آن‌ها می‌باشد. در مجموع ۱۰۰ نمونه از جوندگان در دامداری‌های آلوده جمع‌آوری شد. در ادامه حضور مایکوباکتریوم به وسیله رشد نمونه‌ها در محیط لویین اشتاین-جانسون مورد بررسی قرار گرفت. همه جدایه‌ها شده توسط روش RFLP و هیبریداسیون DNA شناسایی شدند. هویت جدایه‌ها توسط PCR و آزمون‌های IS۶۱۱۰، 16S rRNA و RD تایپینگ تعیین گردید. تمایز بیشتر با هضم *PvuII* و هیبریداسیون DNA با استفاده از پروب نوالی‌های تکراری چند شکلی غنی از سیتوزین/گوانین (PGRS) انجام شد. ۵ نمونه حضور مایکوباکتریوم را نشان دادند. نتایج پروب PGRS نشان داد که دو جدایه متعلق به یک کلاستر هستند، در حالی که جدایه‌های باقی مانده در دسته‌های مختلف طبقه‌بندی شدند. تجزیه و تحلیل الگوی ژنتیکی به دست آمده و مقایسه این الگوهای با الگوی ژنتیکی سایر دامداری‌های آلوده و تشابه و تفاوت‌های آن‌ها با هم، تایید انتقال مایکوباکتریوم از جوندگان آلوده به گاوها را در دامداری تایید می‌کند. با بررسی نتایج بدست آمده، انتقال مایکوباکتریوم از جوندگان آلوده به گاوها را باید خطری برای گسترش سویه‌های مایکوباکتریوم در بین حیوانات دانست.

کلمات کلیدی: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، پلی مورفیسم طولی قطعات محدود شونده، DNA هیبریداسیون

● Veterinary Researches & Biological Products No 118 pp: 74-86

**Isolation and Identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from rodents of infected cattle husbandry**

By: Alizadeh, Kh, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran. Mosavari. N., (Corresponding Author) Bovine Tuberculosis Reference Laboratory, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran. and Nazari. R., Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.

Email: nmosavari@gmail.com

**Received: 2017-04-26 Accepted: 2017-08-16**

*Mycobacterium tuberculosis*, the agent of tuberculosis, causes morbidity and mortality, particularly in developing countries. Therefore, DNA-fingerprinting tools have been developed to improve tuberculosis case detection and control. Molecular typing techniques allow to detect and follow *M. tuberculosis* complex. The aim of this work was to isolate and identify *M. tuberculosis* from rodents in cattle farms contaminated. A total of 100 samples were collected from the rodents in the contaminated farms and analyzed for the presence of Mycobacterium by growing the samples on Lowenstein-Jensen medium. Identity of its were determined by PCR and 16SrRNA, IS6110 and RD typing test. Further differentiation was performed with *PvuII* digestion and DNA hybridization using the polymorphic guanine/cytosine-rich repetitive sequences (PGRS) probe. As much as five samples showed the presence of Mycobacterium. The PGRS probe results classified two of the isolates as belonging to one cluster, whereas the remaining isolates were classified as belonging to different clusters. An analysis of the obtained genetic pattern and a comparison of these patterns with the genetic pattern of other infected farms allowed us to record the similarities and difference. The results indicated the transmission of Mycobacterium from infected rodents to the cows located in the same farm. These results highlight the possible danger of transmission of Mycobacterium among animals.

□ **Key words:** *Mycobacterium tuberculosis*, Restriction fragment length polymorphism, DNA hybridization

### مقدمه

برای پی بردن به خط سیر ارگانیزم و سویه‌ها استفاده نمود (۳). از آنجایی که مایکوباکتریوم‌های پاتوژن دوره انکوباسیون طولانی دارند، تشخیص آزمایشگاهی آن‌ها با مشکلاتی مواجه است به نحوی که تعیین هویت و حساسیت دارویی بین باکتری‌ها، مستلزم گذشت مدت زمان ۲ تا ۴ ماه می‌باشد. لذا به کارگیری روش‌های نوین جهت تشخیص سریع و دقیق این بیماری و گونه‌های مختلف آن بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌ها را می‌توان به وسیله تعیین هویت مولکولی و در ادامه بررسی سویه‌ها را با تعداد زیادی از روش‌های انگشت‌نگاری DNA تشخیص داد. امروزه تکنیک‌های جدید مولکولی مانند انگشت‌نگاری DNA یا آنالیز به روش پلی مورفیسم طولی قطعات محدودشونده (RFLP)، برای شناسایی دقیق و متمایز نمودن جدایه‌های مایکوباکتریوم به کار می‌رود. به کمک این تکنیک‌ها می‌توان با سرعت بسیار و در عین حال حساسیت و ویژگی بالا به تشخیص مورد نظر دست یافت (۴).

از روش‌های مهم بیولوژی مولکولی در آزمایشگاه‌های مایکوباکتر-یولوژی می‌توان به روش‌های شناسایی و تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها

بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که قدمت آن را به اندازه حیات بشریت می‌دانند ولی علی‌رغم وجود روش‌های مختلف درمانی همه ساله مرگ و میر بسیاری را در پی دارد و هنوز هم یکی از معضلات بهداشتی جامعه جهانی می‌باشد (۱). عامل بیماری سل، باسیل‌هایی از جنس مایکوباکتریوم بوده که باکتری‌هایی هوازی، داخل سلولی و اسید فست می‌باشند. کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل تعدادی از معروف‌ترین اعضای جنس مایکوباکتریوم‌ها می‌باشند که سبب بروز سل در انسان و حیوانات می‌گردند. از لحاظ ژنتیکی و توالی ژنومی سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس همسانی بسیار نزدیکی با هم داشته که در سطح نوکلئوتید ۹۹/۹ درصد شبیه بهم هستند و تفاوت آن‌ها بیشتر در پلی مورفیسم توالی‌های بزرگ ژنی می‌باشد (۲).

باسیل سل همزمان با انسان در طول هزاران سال و شاید هم میلیون‌ها سال تکامل یافته است. در طی این تکامل، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نواحی کدکننده و غیر کدکننده بیشماری را در ژنوم خود از دست داده است که این تغییرات می‌تواند برای شناسایی بین سویه‌های مختلف باکتری استفاده شود. بنابراین از تفاوت‌های ژنتیکی آن‌ها می‌توان

منظور الگوی ژنومی (شناسنامه مولکولی) این جدایه‌های تهیه شود و سویه‌های غالب آن تعیین گردد.

### مواد و روش‌ها

#### جمع‌آوری نمونه‌ها

تعداد ۱۰۰ عدد نمونه موش از سطح دامداری‌های آلوده شهرستان بوئین زهرا جمع‌آوری گردید و به آزمایشگاه مرجع توپرکلوزیس موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج جهت انجام آزمایشات برای جداسازی مایکوباکتریوم منتقل شد.

#### کشت نمونه‌ها و برداشت کلنی

بعد از انجام مراحل چون صلیبه نمودن، آلودگی‌زدایی و هموژنیزاسیون، سانتریفوژ و خنثی نمودن pH نمونه‌های مورد مطالعه، نمونه‌ها در محیط اختصاصی لوین اشتاین جانسون گلیرین‌دار و پیرووات‌دار در جهت رشد کلنی مایکوباکتریوم، کشت داده شدند. با مشاهده کلنی (ها) پس از حدود ۸ هفته انکوباسیون، برداشت کلنی به منظور انجام تست‌های میکروسکوپی و ملکولی صورت گرفت.

#### استخراج DNA

در مرحله استخراج DNA، با استفاده از یک آنس استریل تحت شرایط ایمن در زیر هود از سطح محیط کشت حداقل به میزان یک لوپ آنس کامل از کلنی‌های باکتری برداشته شد و به آرامی در درون یک میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر ۱x TE منتقل گردید. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ دقیقه جهت غیرفعال شدن سلول‌های باکتری در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. در ادامه، سوسپانسیون حاصل به مدت ۵ دقیقه در ۵۰۰۰ سانتریفوژ گردید و از فیلتر ۰/۲ μm گذرانده شد. مایع صاف شده محتوی ماده ژنتیکی جهت استفاده در آزمون PCR است

در سطح جنس و گونه (۵) هویت در سویه و بعد از آن، که به اصطلاح ژنوتایپینگ و یا انگشت‌نگاری ژنتیکی اشاره کرد (۶). روش IS۶۱۱۰-PCR وجود شاخص ژنتیکی IS6110 را در ژنوم مایکوباکتریوم‌ها به عنوان مشخصه عضویت آن‌ها در کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بررسی می‌نماید (۷).

منطقه ژنتیکی 16S rRNA یکی از بخش‌های شناخته شده از ژنوم باکتری‌ها است که در تشخیص هویت آن‌ها و تعیین توالی نوکلئوتیدهای قسمت‌های خاصی از این لوکوس ژنتیکی در تعیین جنس و گونه باکتری‌ها به کار می‌رود (۸).

با بررسی‌های انجام گرفته، مشخص شد که در ژنوم مایکوباکتریوم‌ها مناطقی به نام منطقه حذف شده (RD) وجود دارد که وجود یا فقدان این مناطق ژنتیکی از نظر تکاملی معنا دار و به صورت هدفمند انجام می‌پذیرد و براساس آن می‌توان سیر تکاملی پیدایش گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس را از یک نمونه اجدادی بیان کرد. با انجام PCR و با بکارگیری لوکوس RD۱، RD۴، RD۹، RD۱۲ و RD۱ امکان تشخیص افتراقی میان اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس به صورت قطعی فراهم می‌گردد (۹).

در داخل ژنوم مایکوباکتریوم‌ها، ترکیب گوانین و سیتوزین (G+C) به صورت قطعات تکرار شونده، در بیش از ۸۰ درصد آن موجود می‌باشد. این قطعات چند شکلی غنی از سیتوزین/گوانین (PGRS) در بیشتر آنها به صورت پراکنده در سراسر ژنوم وجود دارد. با استفاده از تکنیک DNA هیبریداسیون و PGRS-RFLP برای مایکوباکتریوم بویس، درجه خوبی از افتراق و تمایز گونه‌ای و نژادی با موفقیت به دست می‌آید (۱۰).

در این مطالعه برای تمایز و تعیین هویت ملکولی جدایه‌های مایکوباکتریوم از موش‌های به دام افتاده در دامداری‌های آلوده به مایکوباکتریوم شهرستان بوئین زهرا در استان قم از پروب PGRS و با بهره‌مندی از تکنیک DNA هیبریداسیون و RFLP استفاده گردید. تا بدین

جدول ۱- اجزاء واکنش‌های PCR مورد استفاده در این تحقیق.

PCR Reaction	PCR Master MIX (μl)	Primer Forward (Δpm/μl)	Primer Revers (Δpm/μl)	Primer (int) (Δpm/μl)	DNA Template (μl)	PCR Water (μl)	Total Volume (μl)
16SrRNA	۸	۱	۱	-	۲	۴	۱۶
IS6110	۸	۱	۱	-	۲	۴	۱۶
RD ۱	۸	۱	۱	۱	۲	۳	۱۶
RD ۴	۸	۱	۱	۱	۲	۳	۱۶
RD ۹	۸	۱	۱	۱	۲	۳	۱۶
RD ۱۲	۸	۱	۱	۱	۲	۳	۱۶

است. در نهایت پس انجام PCR، جهت بررسی، محصول به دست آمده PCR الکتروفورز گردید.

دما، زمان و چرخه ترموسایکلر در آزمون PCR به منظور تأیید جنس جدایه‌های میکوباکتریوم با لوکوس‌های IS6110، 16SrRNA و RD و تایپینگ طبق جدول ۳ صورت گرفت (۹).

### هضم آنزیمی و جدا سازی قطعات DNA

جدایه‌های میکوباکتریوم توبرکلوزیس، با آنزیم *H Pvu II* هضم شد و سپس مراحل الکتروفورز، انتقال به غشاء (ساترن بلاتینگ)، هیبریداسیون با پروب PGRS و آشکارسازی بر روی آنها انجام گرفت. از نمونه‌های DNA به مقدار ۲ میکروگرم توسط دستگاه نانودراپ DNA، تعیین کمیت شد و حدود ۲ میکروگرم از DNA ژنومی میکوباکتریوم بویس

(۱۱) و DNA ژنومی به طور کامل و بدون کوچکترین شکستگی استخراج شد و برای RFLP مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی اولیه DNA استحصال شده، الکتروفورز در ژل آگارز ۱ درصد انجام گرفت و در مرحله بعد به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ میزان و خلوص DNA به طور دقیق مشخص گردید.

### تعیین هویت مولکولی جدایه‌ها

در این مطالعه برای اجرای آزمون PCR از لوکوس های، 16SrRNA و *IS6110* و RD تایپینگ (RD1، RD2، RD9، RD4) استفاده گردید (۹). برای انجام PCR از مخلوط تجارتي آماده مصرف به نام Ampliquon® استفاده شد و حجم نهایی هر واکنش معادل ۱۶ میکرولیتر تنظیم گردید (جدول ۱). توالی پرایمرهای مورد استفاده نیز در جدول ۲ آورده شده

جدول ۲- توالی پرایمرهای مورد استفاده در این تحقیق

پرایمر	۵'→۳' توالی	منبع
16SrRNA	F: ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTC R: TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA	۱۹
<i>IS6110</i> (INS ۱-)	F: CGTGAGGGCATCGAGGTGGC R: GCGTAGGCGTCGGTGACAAA	۲۰
RD۱	F: AAGCGGTTGCCCGGACCGACC Int: CTGGCTATATTCTGGGCCCGG R: GAGGCGATCTGGCGGTTTGGGG	۲۱ و ۱۴
RD۴	F: CAAGTTGCCGTTTCGAGCC Int: TGTACTATGCTGACCCATGCG R: AAAGGAGCACCATCGTCCAC	۲۱ و ۱۴
RD۹ (F)	F: GGGAGCCCAGCATTACCTC Int: CAATGTTTGTGCGCTGC R: GCTACCCTCGACCAAGTGTT	۲۱ و ۱۴
RD۱۲ (F)	F: GGGAGCCCAGCATTACCTC Int: GTGTTGCGGGAATTACTCGG R: AGCAGGAGCGGTTGGATATTC	۲۱ و ۱۴

مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه فور بر روی غشاء تثبیت گردید. غشاء آماده شده برای مرحله قبل از هیبریداسیون (پری هیبریداسیون) در یک پلاستیک خشک در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۲).

#### هیبریداسیون با پروب نشان‌دار

غشاهای حاصل از مرحله ساترن بلاتینگ با استفاده از محلول پری هیبریداسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه آون هیبریداسیون قرار گرفتند، سپس برای انجام هیبریداسیون با افزودن پروب PGRS نشاندار شده با دیگوکسیژنین، غشاء به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در دستگاه باقی ماند، سپس شستشوی لازم جهت از بین بردن اتصال‌های غیراختصاصی پروب برای غشاء صورت گرفت و در ادامه آنتی بادی ضد دیگوکسیژنین کنژوگه شده با آلکالین فسفاتاز به غشاء نایلونی اضافه شد و در نهایت جهت آشکارسازی از سوبستراهای NBT/BCIP استفاده گردید و باندهای شناسایی شده توسط پروب، رؤیت شدند. از تصاویر مرئی روی غشاء توسط دستگاه اسکنر تصویربرداری شد. آنالیز تصاویر حاصله از هیبریداسیون پروب با قطعات برش خورده DNA، علاوه بر مشاهده و آنالیز چشمی توسط نرم افزار تخصصی جهت Pro Analyzer بر اساس تعداد و اندازه باندها مورد آنالیز دقیق جهت تعیین تیپ‌های ژنتیکی قرار گرفت و پلی‌مورفیسم قطعه PGRS در سویه‌های مختلف شناسایی شد.

#### یافته‌ها

در جریان این تحقیق از مجموع ۱۰۰ نمونه موش کشت داده شده، بعد از بررسی‌های ماکروسکوپی و میکروسکوپی فقط ۶ نمونه کشت مثبت حاصل گردید که به عنوان کشت مثبت گزارش شدند. تمام جدایه‌ها در محیط کشت پیرووات‌دار رشد قوی‌تری در مقایسه با محیط کشت گلیسرین‌دار از خود نشان دادند که هویت این جدایه‌ها در آزمایش‌های تکمیلی نشانگر مایکوباکتریوم بویس بود.

با بررسی تخلیص DNA بر روی ۶ جدایه موجود، عدم شکستگی در DNA استحصال از تمامی جدایه‌ها مشاهده شد و یک باند مشخص و واضح، حضور DNA و عدم شکستگی در آن را ثابت کرد (شکل ۱).

با انجام آزمون PCR-16S rRNA بر روی DNA تخلیص شده مشخص شد که تمام جدایه‌ها از جنس مایکوباکتریوم هستند، به طوری که باند ۵۴۳ زوج بازی بر روی ژل آگاروز مشاهده شد (شکل ۲).

آزمون PCR-IS6110 بر روی ۶ جدایه موجود تعلق داشتن همه آن‌ها به گروه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را تأیید کرد به طوری که در مورد تمام جدایه‌ها منجر به مشاهده یک باند الکتروفورزی مشخص به اندازه ۲۴۵ زوج باز بر روی ژل آگاروز گردید (شکل ۳).

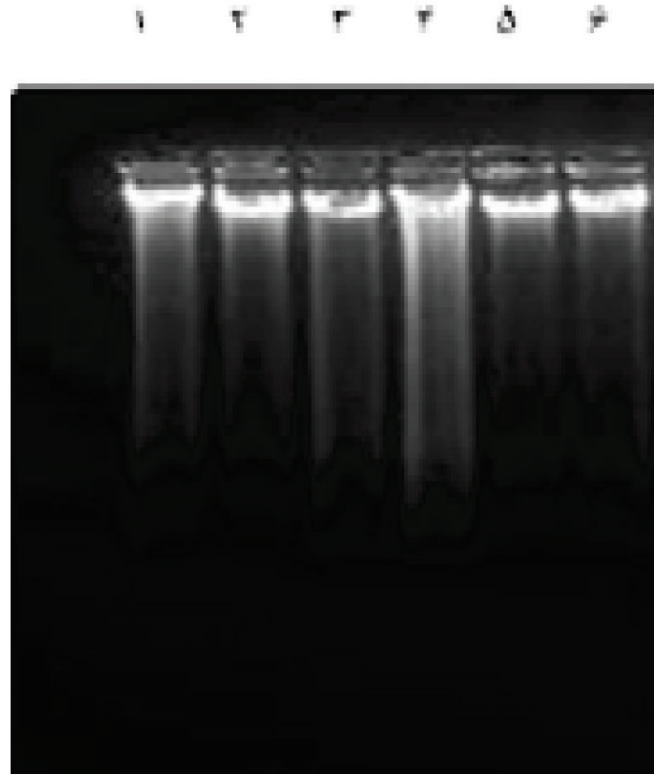
انجام آزمون RD تایپینگ (RD۱) بر روی ۶ جدایه، اندازه ۱۴۶ جفت بازی را در تمامی نمونه‌ها مشخص نمود و موردی غیر از این اندازه (مایکوباکتریوم بویس BCG) مشاهده نشد (شکل ۴).

انجام آزمون RD تایپینگ (RD۴)، حضور این مارکر با اندازه ۱۷۲ جفت باز برای اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بجز مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG (سایز ۲۶۸ جفت بازی)

BCG با استفاده از *II Pvu* در یک میکروتیوب به حجم نهائی ۲۰ میکرولیتر رسانیده و هضم شد. جداسازی قطعات هضم شده DNA با وزن مولکولی در حدود ۰/۵ تا ۲۵ کیلو باز در ژل آگارز توسط الکتروفورز صورت گرفت و بعد از آن قطعات به روی غشاء نایلونی با شارژ مثبت (ساترن بلاتینگ) انتقال یافت.

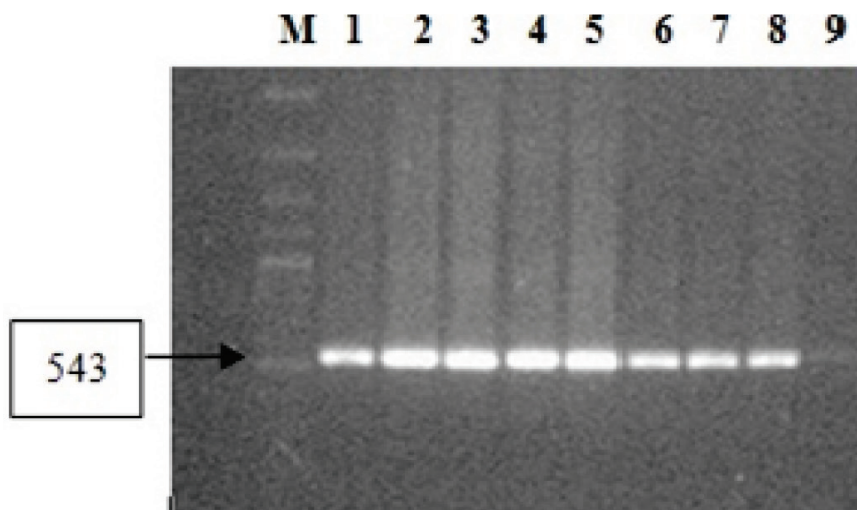
#### ساترن بلاتینگ

جهت ساترن بلاتینگ ژل آگارز حاوی قطعات DNA برش خورده توسط آنزیم محدودکننده، ژل به مدت ۵ دقیقه در معرض اشعه فرابنفش قرار داده شد. سینی محتوی ژل به مدت ۱۰-۵ دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۲۵ مولار قرار گرفت تا عمل دیپورینه شدن صورت پذیرد. ژل دو بار به مدت کوتاه (هر بار حدود ۱۰ ثانیه) با آب مقطر شستشو داده شد. برای واسرشت (داناتوره شدن) DNA دو بار سینی محتوی ژل هر بار به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در ۵۰۰ میلی‌لیتر سود ۰/۴ مولار قرار داده شد و سپس دو بار شستشو صورت پذیرفت. ژل دو مرتبه به مدت ۱۵ دقیقه در محلول خنثی کننده و بعد از آن در بافر SSC ۲x به مدت یک دقیقه قرار گرفت. پس از طی مراحل دیپورینه، دنیچره و نوترالیزه ژل به مدت یک شب از طریق انتقال موئینهای به روش ساترن بلاتینگ به غشای نایلونی با شارژ مثبت انتقال داده شد و در نهایت به

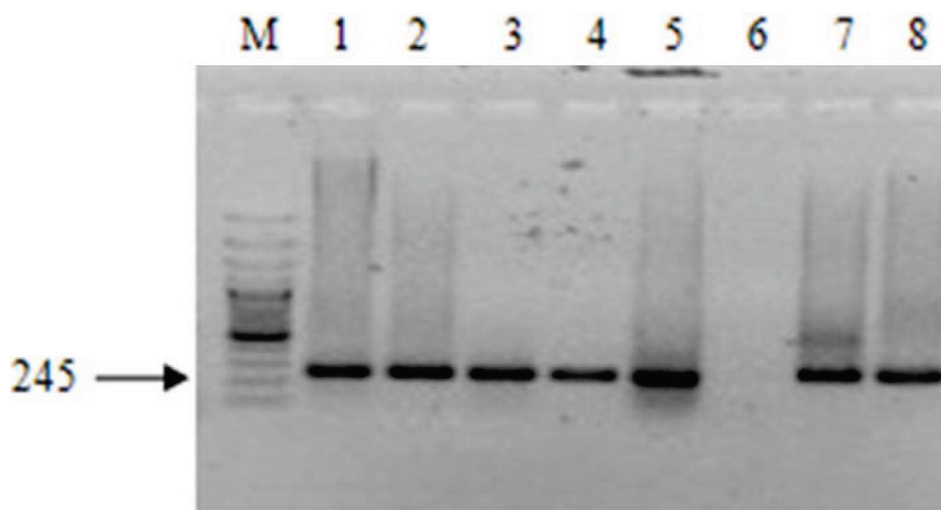


شکل ۱- نتایج تخلیص DNA، نمونه های مثبت

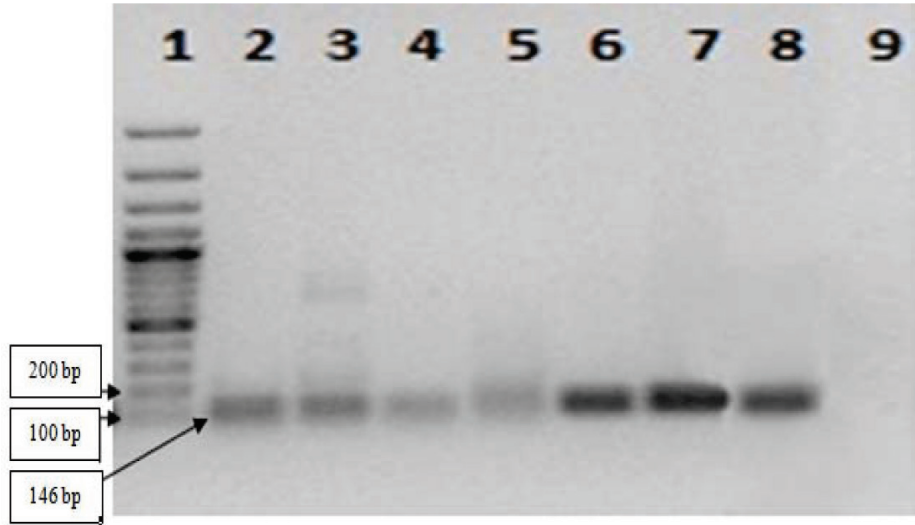




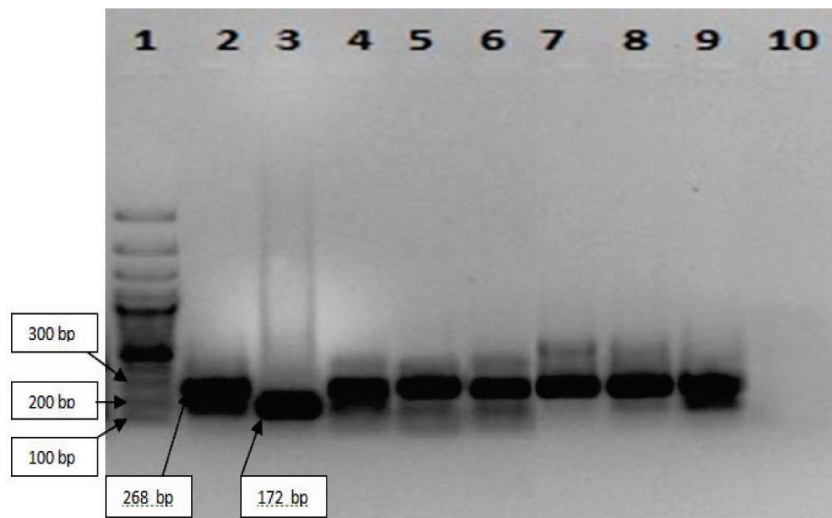
شکل ۲- الکتروفورز محصول PCR برای توالی ۵۴۳ جفت بازی 16S rRNA در ژل آگارز ۱ درصد.  
ستون M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
ستون ۱ تا ۶: جدایه های میکوباکتریوم مورد مطالعه  
ستون ۷ و ۸: سویه استاندارد میکوباکتریوم توپرکلوزیس و میکوباکتریوم بویس (کنترل مثبت)  
ستون ۹: نمونه کنترل منفی.



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR برای توالی ۲۴۵ جفت بازی IS6110 در ژل آگارز ۱ درصد  
ستون M: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
ستون ۱ تا ۵: جدایه های میکوباکتریوم مورد مطالعه  
ستون ۶: نمونه کنترل منفی  
ستون ۷: سویه استاندارد میکوباکتریوم توپرکلوزیس (کنترل مثبت)



شکل ۴- الکتروفورز محصول RD1-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
 ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
 ستون ۲: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توپر کلوزیس (کنترل مثبت)  
 ستون ۳ تا ۸: جدایه های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
 ستون ۹: نمونه کنترل منفی



شکل ۵- الکتروفورز محصول RD4-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
 ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
 ستون ۲ و ۳: سویه استاندارد مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توپر کلوزیس (کنترل مثبت)  
 ستون ۴ تا ۹: جدایه های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
 ستون ۱۰: نمونه کنترل منفی

در Wood mice، ۱/۵ درصدی در حشره خوارها و شیوع ۹ تا ۳۱ درصدی (بر اساس زمان و مکان نمونه برداری) به دست آمد (۱۴).

فیشر و همکارانش، اندام‌های ۳۰ حشره خوار و ۶۲ جوده جمع‌آوری شده از مناطق مسکونی انسان و محل نگهداری دام را مورد بررسی قرار دادند که ۱۰ درصد از حشره خوارها و ۹/۷ درصد از جوندگان حامل مایکوباکتریوم بودند. از حشره خوارها، مایکوباکتریوم آویوم، مایکوباکتریوم چلونه، مایکوباکتریوم واکای و از جوندگان مایکوباکتریوم آویوم، مایکوباکتریوم فورتیتوم، مایکوباکتریوم چلونه و ۳ سویه از گروه سه مایکوباکتریوم‌های کند رشد جداسازی شد (۱۵).

در ایران و در چهار استان کشور، مطالعه‌ای بر روی ۱۵ موش جمع‌آوری از دامداری‌های آلوده به مایکوباکتریوم صورت گرفت. نتایج ۵ موش آلوده به مایکوباکتریوم را نشان داد که شامل سه جدایه مایکوباکتریوم میکروتی و دو جدایه مایکوباکتریوم کانزاسی بود (۱۶). در مطالعه ما نیز از ۱۰ نمونه موش جمع‌آوری شده از سطح دامداری‌های آلوده به مایکوباکتریوم، ۶ نمونه مثبت گردید و تمام جدایه‌ها مایکوباکتریوم بویس گزارش شدند.

در ادامه به دنبال طغیان بیماری سل و اعلام فوریت جهانی از سوی سازمان جهانی بهداشت، بررسی الگوی اپیدمیولوژیک شیوع بیماری سل در مناطق مختلف جهان ضروری به نظر می‌رسد (۱۳). از آنجایی که ردیابی عفونت در کشور ما از طریق لام مستقیم صورت می‌گیرد، ردیابی به وسیله این روش‌ها از ارزش محدودی برخوردار است و شناسایی سیر آلودگی از این طریق میسر نیست و به روشی برای مشخص کردن عفونت اخیر از فعال شدن مجدد عفونت نیاز است (۱۷).

اپیدمیولوژی مولکولی روشی سودمند در مطالعه انتقال توبرکلوزیس می‌باشد که می‌توان با این روش‌ها سویه‌های مایکوباکتریوم شدیداً منتقل شونده را شناسایی نمود. همچنین این روش‌ها، مارکرهای ملکولی اپیدمیولوژیک را برای پیدا کردن موارد توبرکلوزیس و مطالعه شیوه انتقال و فعال شدن مجدد توبرکلوزیس در تحقیقات منطقه‌ای معرفی می‌کنند. از مزیت‌های این روش‌ها می‌توان به قدرت تمایزکنندگی و شناسایی ارتباطات اپیدمیولوژیک اشاره نمود (۱۸).

در این مطالعه از ۶ نمونه مثبت مورد بررسی ۵ تیپ ژنتیکی مربوط به پروب RFLP-PGRS بدست آمد، که دارای ۵ الگوی منحصر به فرد هم بودند. همچنین در مطالعه سلیمان پور، ۲۵ و ۲۶ تیپ ژنتیکی به ترتیب با روش‌های RFLP-PGRS و RFLP-DR بدست آمد (۱۹) و در مطالعه یعقوبی از ۴۲ نمونه استان مرکزی مورد بررسی ۳۸ تیپ ژنتیکی بدست آمد، که ۲۹ مورد از آن‌ها دارای الگوی منحصر به فرد بودند (۲۰).

در سال ۱۳۹۰، با بررسی ۵۷ بیمار مسلول، با استفاده از RFLP، آنزیم *PvuII* و هیبریداسیون با پروب PGRS، ۵۰ تیپ ژنتیکی شناسایی شد، که ۴۴ مورد از آن‌ها دارای الگوی منحصر به فرد بودند. این امر نشان می‌دهد که در استان اراک تنوع بالای ژنتیکی سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد و حاکی از فعال شدن مجدد عفونت قدیمی در این منطقه است (۲۱). در مطالعه فرازی بر روی ۹۵ بیمار مسلول با روش RFLP و به وسیله سه مارکر PGRS، IS6110 و DR، تنوع ژنتیکی به ترتیب شامل ۴۵، ۵۰ و ۴۸ بود (۲۲).

در مطالعه ما با روش RFLP-PGRS، ۲ جدایه در یک گروه ۲ تایی در

را مشخص کرد که تمام ۶ جدایه، سایز ۲۶۸ جفت بازی را نشان دادند و این امر نشان‌دهنده وجود جدایه مایکوباکتریوم بویس یا مایکوباکتریوم بویس BCG می‌باشد (شکل ۵).

در بررسی نمونه‌ها با آزمون RD تایپینگ (RD۹)، مشاهده شد که تمام ۶ جدایه، سایز ۱۰۸ جفت بازی را نشان دادند که مشخص می‌کند این ۶ نمونه یکی از مایکوباکتریوم‌های افریکانوم، بویس، بویس BCG، میکروتی، کاپری و یا پنی‌پدی می‌باشند و با توجه به نتایج قبلی آزمون‌های RD مدعی حضور ۶ جدایه مایکوباکتریوم بویس گردید (شکل ۶).

در بررسی نمونه‌ها با آزمون RD تایپینگ (RD۱۲)، ۶ جدایه، سایز ۳۰۶ جفت بازی را نشان دادند و این لوکوس تست‌های قبلی را مجدداً تایید نمود (شکل ۷).

شکل ۸، DNAهای استخراج شده تحت تاثیر هضم با آنزیم *Pvu II* روی ژل آگاروز ۱ درصد را نشان می‌دهد.

با انجام ساترن بلائینگ و هیبریداسیون با پروب PGRS، تعداد ۵ تیپ ژنتیکی مشخص گردید. تعداد ژنوتیپ‌های خوشه‌های ۱ مورد و تعداد تیپ‌های منحصر به فرد در روش RFLP-PGRS ۵ مورد تعیین گردید (جدول ۴). با مقایسه چشمی باندها و با استفاده از نرم‌افزار ژل پرو، با پروب PGRS تعداد ۵ الگوی متفاوت با نام‌های 01 MPBP الی 05 MPBP حاصل گردید.

#### برآورد درصد انتقال اخیر در نمونه‌های بررسی شده

Percentage of transmission =

$$\frac{\text{No. of clustered strains} - \text{No. of clusters}}{\text{Total number of strains}} \times 100$$

در روش RFLP-PGRS برآورد انتقال اخیر نمونه‌ها شامل: تعداد سویه‌های قرار گرفته در خوشه‌ها ۲، تعداد خوشه‌ها ۱ و تعداد کل سویه‌ها ۶ می‌باشد.

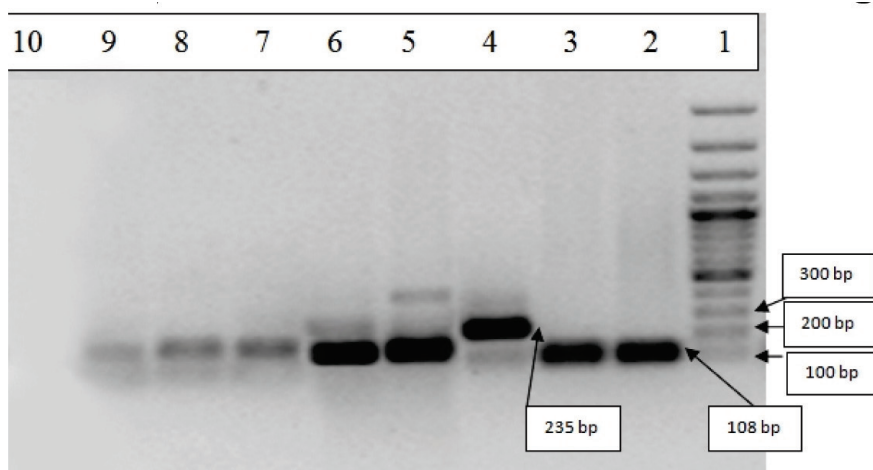
$$\text{Percentage of transmission} = ۱۶,۶۶ = ۶ \div ۱۰۰ \times ۱ - ۲$$

#### بحث

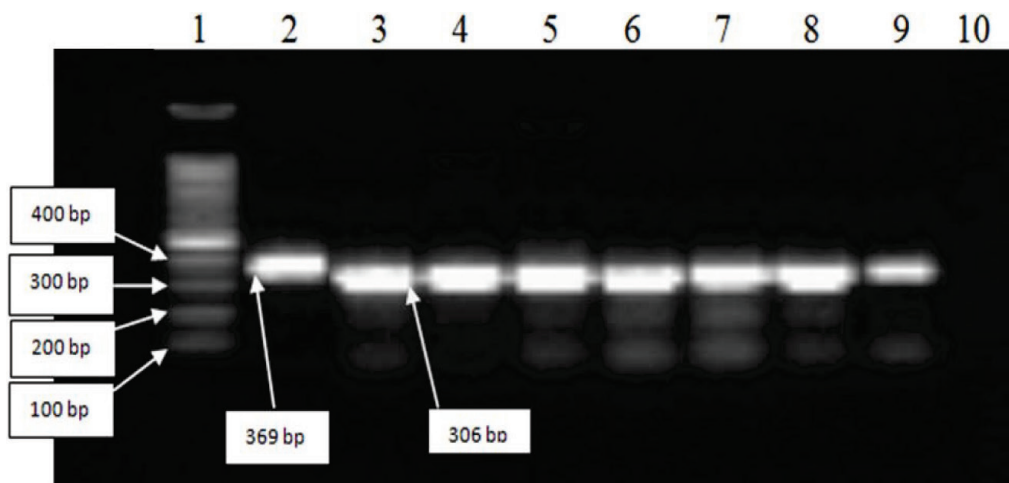
سل بیماری عفونی و بسیار مسری و یکی از مهلک‌ترین بیماری‌ها است، به طوری که در طول تاریخ جان میلیاردها نفر را گرفته است. همانطور که بیان شد سل یک بیماری مشترک می‌باشد و انسان علاوه بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند در اثر آلودگی به مایکوباکتریوم بویس نیز به سل (سل ژئونوز) مبتلا گردد. با توجه به نقش حیوانات بخصوص گاو در انتقال این بیماری به انسان، وجود این نوع سل در جامعه و میزان فراوانی آن از شاخص‌های معرف سطح بهداشت جامعه محسوب می‌گردد (۱۳).

سل مشترک بین حیوانات هم وجود دارد و این نوع هم بخاطر انتقال و عدم ممانعت کامل انتقال از سوی انسان در بین حیوانات یکی از عوامل انتشار عوامل سل می‌باشد به نحوی که اولین بار در سال ۱۹۳۷، ولز توبرکلوزیس را در جوندگان وحشی گزارش کرد، که در این مطالعه، شیوع ۱۱ درصدی مایکوباکتریوم میکروتی در *Bank vole*، شیوع ۲ درصدی



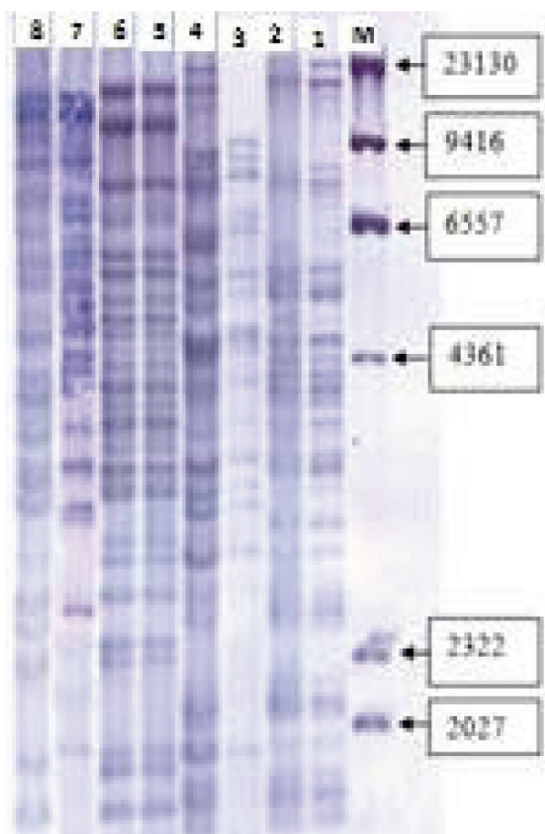
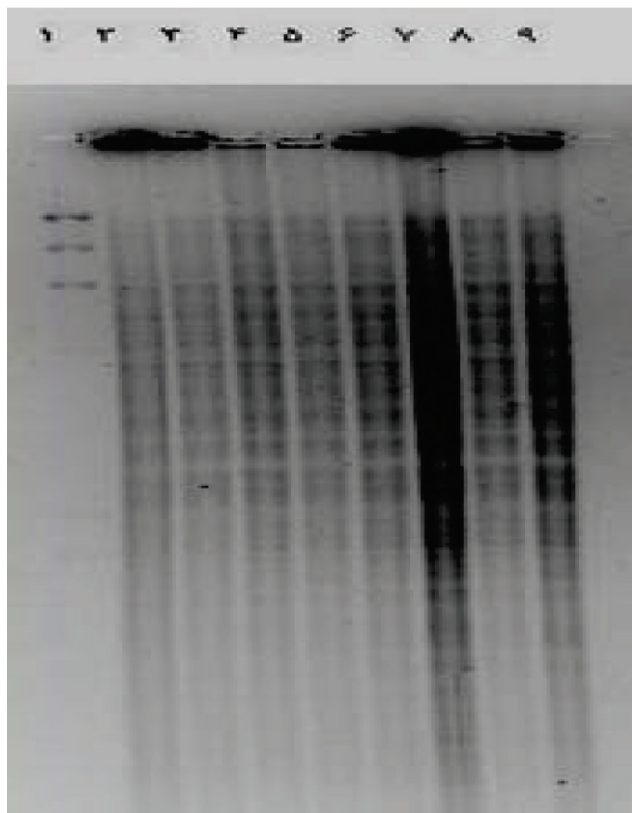


شکل ۶- الکتروفورز محصول RD9-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
 ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
 ستون ۲ و ۴: سویه استاندارد مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توپرکلوزیس (کنترل مثبت)  
 ستون ۳ و ۵ تا ۹: جدایه های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
 ستون ۱۰: نمونه کنترل منفی

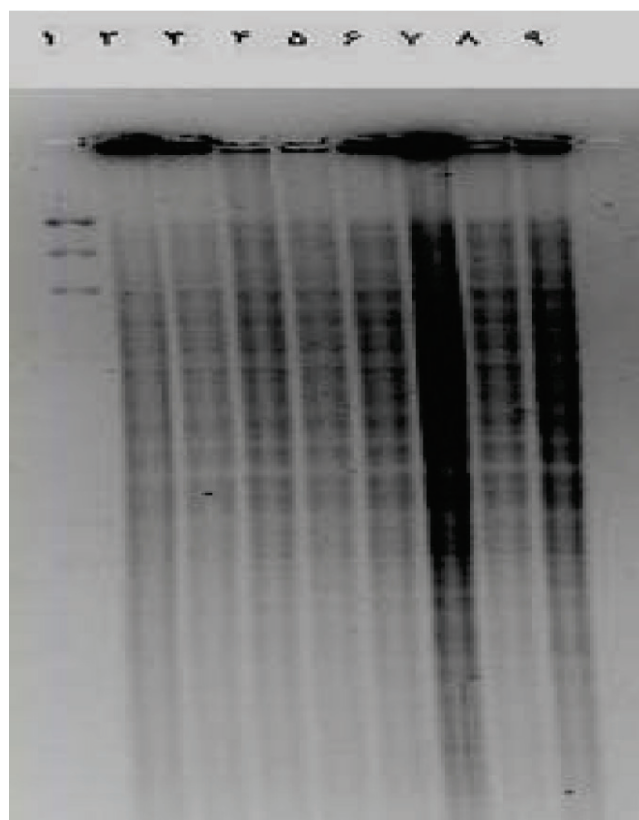


شکل ۷- الکتروفورز محصول RD12-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
 ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
 ستون ۲ و ۴: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توپرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس (کنترل مثبت)  
 ستون ۳ تا ۹: جدایه های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
 ستون ۱۰: نمونه کنترل منفی

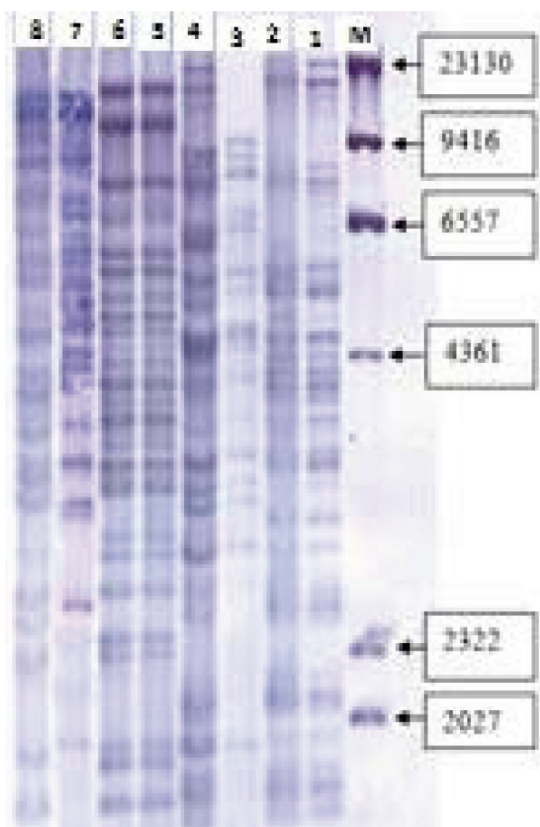
شکل ۶- الکتروفورز محصول RD9-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
ستون ۲ و ۴: سویه استاندارد مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس  
(کنترل مثبت)  
ستون ۳ و ۵ تا ۹: جدایه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
ستون ۱۰: نمونه کنترل منفی



شکل ۷- الکتروفورز محصول RD12-PCR در ژل آگارز ۱ درصد  
ستون ۱: سایز مارکر ۱۰۰ جفت بازی  
ستون ۲ و ۳: سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم  
بویس (کنترل مثبت)  
ستون ۴ تا ۹: جدایه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
ستون ۱۰: نمونه کنترل منفی



شکل ۸- هضم آنزیمی DNA با آنزیم *Pvu II*  
 ستون ۱: سایز مارکر  
 ستون ۲ تا ۷: جدایه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه  
 ستون ۸ و ۹: سویه استاندارد مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم  
 توپر کلوزیس



شکل ۹- ساترن بلائینگ و هیبریدیزاسیون با پروب PGRS در ژل آگاروز ۱  
 درصد  
 ستون M: سایز مارکر  
 ستون ۱ و ۲: سویه استاندارد مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم  
 توپر کلوزیس  
 ستون ۳ تا ۸: جدایه‌های مایکوباکتریوم مورد مطالعه

همسایه و حتی استانی به استان دیگر می‌تواند به شناسایی مسیر انتقال و روند انتقال در بین کشورها و استان‌های همجوار کمک زیادی نماید.

### نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه بیماری سل یک بیماری مشترک است، این مطالعه مشخص می‌کند که بیماری به راحتی قابل انتقال در جامعه حیوانی می‌باشد و انتقال سویه‌های عامل بیماری در حیوانات مانند مایکوباکتریوم بویس به موش کاملاً امکان‌پذیر است و زنگ خطری برای جامعه انسانی و دامی از لحاظ ماندگاری در محیط زیست می‌باشد.

### منابع مورد استفاده

- 1- Daniel, T.M. 2006. The history of tuberculosis. *Respir Med.* 100(11): 1862-1870.
- 2- Thoen, C.O., Steele, J.H., Gilsdorf, M.J. 2006. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. pp. 18-33 & 54-62. Second Edition, Blackwell publishing.
- 3- Easmon, C.F.S. 1984. Topley and Wilson's principles of bacteriology, virology and immunity. *Immunology.* 52(4): 780-790.
- 4- Carson, H.B., Miller, D., Witherow, S. 2012. *Molecular Biology Techniques: A Classroom Laboratory Manual.* pp 200-210. Academic Press, Elsevier, London, UK.
- 5- Stucki, D., Malla, B., Hostettler, S., Huna, T., Feldmann, J., Yeboah-Manu, D., & et al. 2012. Two new rapid snp-typing methods for classifying *Mycobacterium tuberculosis* complex into the main phylogenetic lineages. *PLoS One.* 7(7): 1-8.
- 6- Aleksic, E., Merker, M., Cox, H., Reiher, B., Sekawi, Z., Hears, A.C., & et al. 2013. First molecular epidemiology study of *Mycobacterium tuberculosis* in Kiribati. *PLoS One.* 8(1): 11-19.
- 7- Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H.P., Lauria, S., Mannino, R., Mantegani, P., & et al. 2013. Survey of 150 strains belonging to the *Mycobacterium terrae* complex and description of *Mycobacterium engbaekii* sp. Nov., *Mycobacterium heraklionense* sp. Nov. And *Mycobacterium longobardum* sp. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 63(2): 401-411.
- 8- Mostowy, S., Inwald, J., Gordon, S., Martin, C., Warren, R., Kremer, K. 2005. Revisiting the evolution of *Mycobacterium bovis*. *J Bacteriol.* 187(18): 6386-6395.
- 9- Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., & et al. 2006. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by pcr amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis.* 10(7): 818-822.
- 10- Supply, P., Allix, C., Lesjean, S., Cardoso-Oelemann, M., Rüsche-Gerdes, S., Willery, E., Savine, E. 2006. Proposal for standardization of optimized mycobacterial interspersed repetitive unit

یک کلاستر قرار گرفت که دارای الگوی مشابه بودند. در مطالعه یعقوبی ۷ جدایه در گروه‌های ۲ تا ۳ تایی در یک کلاستر قرار گرفتند و دارای الگوی مشابه بودند (۲۰). در مطالعه مشابه دیگر از ۲۹۲ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تحت مطالعه تنها ۶۰ مورد از آن‌ها در کلاسترها قرار گرفتند و دارای شباهت الگوی ژنومی بودند، در حالی که ۲۳۲ نمونه دارای الگوی منحصر به فرد ژنومی بودند (۲۳). بنابراین می‌توان گفت با توجه به مطالعات در استان‌های کشور و همچنین در بسیاری از مناطق دنیا که نسبت بالای تفاوت الگوی ژنومی بین سویه‌ها مشاهده می‌شود، در سایر استان‌های کشور نیز فعال شدن مجدد عفونت سل نقش بیشتری در اپیدمیولوژی بیماری سل در این مناطق دارد و در این مناطق نیز به علت پایین بودن نسبت قرار گرفتن گروه‌ها در کلاسترها تنها اپیدمی کوچکی از عفونت سل مشاهده می‌شود.

گزارش شده است که تنوع در تعداد و جایگاه الگوی باندها می‌تواند وابسته به منطقه جغرافیایی منشاء جدایه باشد. مثلاً الگوی IS6110-RFLP توبرکلوزیس در تانزانیا و دامبارک دارای نتایج قابل توجهی بوده است. در حدود ۷۵ درصد سویه‌ها در تانزانیا دارای تعداد ۱۰-۶ کپی بودند. در دامبارک ۵۰ درصد سویه‌های مورد بررسی دارای تعداد ۱۵-۱۱ کپی بودند (۲۴) که این نتایج در واقع نشان دهنده تفاوت تعداد کپی‌ها، که وابسته به منطقه جغرافیایی و منشاء جدایه آن‌ها می‌باشد. در مطالعه ما با روش RFLP-PGRS، ۳۳/۳۳ درصد جدایه‌ها در ۱ کلاستر جداگانه و ۶۶/۶۷ درصد جدایه‌ها منحصراً بفرده طبقه‌بندی شدند.

در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های PCR-IS6110 و RFLP-IS6110 انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بین یک شخص با بیماری ریوی و یک حیوان بررسی شده است. در واقع در با استفاده از این روش مشخص شد که به طور مثال سگ عامل انتقال توبرکلوزیس به انسان بوده است و سگ‌های بیمار قابلیت انتقال توبرکلوزیس به انسان را دارند و می‌توانند به عنوان منبع انتقال توبرکلوزیس به انسان مطرح باشند. که باید به این مسئله اذعان نمود، که کنترل سل در حیوانات می‌تواند تا حد بالایی از انتقال آن در بین افراد ممانعت نموده و در کاهش این بیماری موثر باشد (۲۵).

اگرچه روش آنالیز RFLP به عنوان یک روش استاندارد برای ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم‌ها محسوب می‌شود اما تنها استفاده از مارکرها DR، PGRS و IS6110 در RFLP باعث محدود کردن توانایی در مقایسه ژنوتیپ‌های این استان با استان‌های دیگر و یا کشور ایران با سایر مناطق دنیا می‌شود. یادآوری این نکته ضروری است که در یک مطالعه با استفاده از دیگر روش‌ها مانند اسپولیگوتایپینگ می‌توان نشان داد که سویه‌ها بسیار نزدیک به سویه‌های اجدادی می‌باشند، که در واقع پیشنهاد شده است که ممکن است این سویه‌ها دارای مهاجرت به این مناطق باشند، در صورتی که در این تحقیق الگوی دو مورد از نمونه‌ها دارای الگوی ژنومی یکسان بودند که این نتایج گویای انتقال سویه توبرکلوزیس در بین نمونه‌های همان دامداری در این مطالعه است.

همچنین طبقه‌بندی الگوهای ژنتیکی مختلف به خانواده‌هایی با الگوهای مشابه دلالت بر این موضوع دارد که شباهت ژنتیکی ممکن است حتی در بین سویه‌های یک کشور با کشور دیگر وجود داشته باشد که در مطالعه ما نیز بررسی مقایسه‌ای بین الگوهای کشور با کشورهای

variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol.* 44(12): 4498-4510.

11- Van Soolingen, D., de Haas, P.E., Kremer, K. 2001. Restriction fragment length polymorphism typing of Mycobacteria. *Methods Mol Med.* 54: 165-203.

12- Yuen, L.K., Ross, B.C., Jackson, K.M., Dwyer, B. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by southern blot hybridization. *J clin microbiol.* 1615-1618.

13- OIE. 2009. Bovine tuberculosis, OIE Terrestrial Manual.

14- Wells, A.Q. Tuberculosis in wild voles. *Lancet.* 1937; 1221-1229.

15- Fischer, O.L., Matlova, J., Bartl, J., Dvorská, L., Melichárek, I., Pavlík, I. 2000. Findings of mycobacteria in insectivores and small rodents. *Folia Microbiol.* 45:147-152.

16- Moradi, E., Mosavari, N., Tebianian, M., Tadayon, K., Ghaderi, R., Soleymani Babadi, K., & et al. 2015. Pest rodents as the essential elements of *Mycobacterium bovis* controlling programs. *Int J Mycobacteriol.* 137(4).122-129.

17- Kazempour, M., Masjedi, M., Velayati, A., Tajeddin, E., Farnia, P., Kargar, M., & et al. 2009. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* beijing genotype using three different molecular methods. *Koomesh.* 11 (1): 7-11.

18- Asgharzadeh, M., Shahbadian, K., Majidi, J., Aghazadeh, A.M., Amini, C., Jahantabi, A.R., et al. 2006. IS6110 restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from East Azerbaijan Province of Iran. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 101(5): 517-521.

19- Soleimanpour, S., Hamed Asl, D., Tadayon, K., Farazi, A.A., Keshavarz, R., Soleymani, K., & et al. Extensive Genetic Diversity among Clinical Isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Central Province of Iran. Hindawi Publishing Corporation. 1-5.

20- Yaghoubi, S., Mosavari, N., Moradi Bidhendi, S., Farazi, A.A., Taheri, M.M., Rajabi, Z., & et al. 2014. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Markazi Province. *ISMJ.* 17 (4): 602-611.

21- Rafiee, B., Mosavari, N., Farazi, A.A., Nazari, R., Keshavarz, R., Tadayon, K. 2012. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of pulmonary tuberculosis patients in Markazi province by PGRS-RFLP method. *AMUJ.* 15(6): 35-44.

22- Farazi, A., Jabbariasl, M., Tadayon, K., Mosavri, N., Keshavarz, R., Hoseini, S.D. 2014. Comparison of the genetic convergence between Mycobacterium strains by three RFLP-based methods in central province of Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 17(6): 401-405.

23- Asgharzadeh, M., Alibakhshi, A., Ranjbari, J., Hanifi, G.H., Khalili, I., Razmaraei, N., Kafil, H.S. 2009. Study role of age in contact dependent transmission of *Mycobacterium tuberculosis* in northwest of Iran by IS6110-RFLP method. *MJMS.* 12(1): 11-16.

24- Yuen, L., Ross, B.C., Jackson, K.M., Dwyer, B. 1993. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* strains from Vietnamese patients by Southern blot hybridization. *J clin microbiol.* 31(6): 1615-1618.

25- Moravkova, M., Slany, M., Trecka, I., Havelkova, M., Svobodova, J., Skoric, M., & et al. Human-to-human and human-to-dog *Mycobacterium tuberculosis* transmission studied by IS6110 RFLP analysis: a case report. *Veterinarni Medicina.* 56(6): 314-317.

