Journal of Veterinary Microbiology

نشریه میکروبیولوژی دامپزشکی/ دوره نهم، شماره دوم، ۱۳۹۲، پیاپی ۲۷: ۹۰-۸۱

بررسی تنوع ژنتیکی تحت تیپ‌های *مایکوباکتریوم بوویس* در ایران توسط روش اسپولیگوتایپینگ و PCR-RFLP

پویان خالقیان[۱و۲و۳]، کیوان تدین[۲*]، پریسا فرنیا[۱]، نادر مصوری[۲]، محدثه مظفری[۱]، زهرا درخشانی نژاد[۱]، روح الله کشاورز [۲]، شجاعت دشتی پور[۲]، محمد رضا مسجدی[۱]، علی اکبر ولایتی[۱]، رایناک قادری[۲]، سامد برومندفر[٤]

۱. مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید بهشتی، تهران، ایران

۲. موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران

۳. دانشکده دامپزشکی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد گرمسار، گرمسار، ایران

۴. دفتر بهداشت و مدیریت بیماری‌های دامی، سازمان دامپزشکی کل کشور، تهران، ایران

تاریخ دریافت: ١٤ بهمن ١٣٩١ تاریخ پذیرش: ١٧ تیر ١٣٩٢

چکیده

در جریان انجام این تحقیق که بمدت ۱۸ ماه از ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۱ صورت پذیرفت، در مجموع تعداد ۸ جدایه انسانی مایکوباکتریوم بوویس که از میان ۱۳۲۰ بیمار مشکوک به سل اخذ شده بودند همراه با ۶۸ جدایه گاوی این مایکوباکتریوم مورد مطالعه قرار گرفتند. ساختار ژن pncA تمام جدایه‌ها با هدف بررسی وضعیت مقاومت آنها نسبت به پیرازینامید با استفاده از روش PCR-RFLP مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این همه جدایه‌ها بمنظور درک بهتر ارتباطات اپیدمیولوژیک میان آنها اسپولیگوتایپینگ گردیدند. آلودگی تنها ۰/۶ درصد از بیماران تحت مطالعه به مایکوباکتریوم بوویس در مقایسه با گزارشات مشابه از ایران، میزان پایین تری از فراوانی این باکتری را در میان بیماران نشان می‌دهد. ضمن آنکه تمام جدایه‌ها نسبت به پیرازینامید مقاوم بودند. با مراجعه به بانک اطلاعات بین المللی اسپولیگوتایپینگ (SPOLDB04) و مقایسه اسپولیگوتایپ‌های شناسایی شده در این تحقیق، دو تیپ ژنتیکی به نام های ST595 و ST694 در میان جدایه‌های انسانی و ۱۲ تیپ ژنتیکی در میان جدایه‌های گاوی شناسایی گردیدند. تیپ ST595 تنها ژنوتایپ مشترک میان جدایه‌های انسانی و گاوی تحت مطالعه در این تحقیق شناخته شد. یافته‌های این پژوهش به مسئولین بهداشتی کشور خاطر نشان می‌نمایند که مایکوباکتریوم بوویس همچنان سلامت شهروندان ایرانی را در معرض تهدید قرار می‌دهد.

کلمات کلیدی: *اسپولیگوتایپینگ، مایکوباکتریوم بوویس، مولکولار اپیدمیولوژی، PCR-RFLP*

* *نویسنده مسئول: کیوان تدین*

آدرس: موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، کرج، ایران. تلفن: ۲۸۹۲-۳۴۵۰-۰۲۶

پست الکترونیک: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شامل گونه‌هایی می‌گردد که قادر به ایجاد سل در انسان و حیوانات می‌باشند. این گونه‌ها عبارتند از: *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، *مایکوباکتریوم بوویس*، *مایکوباکتریوم افریکانوم*، *مایکوباکتریوم کاپره ای*، *مایکوباکتریوم میکروتی*، *مایکوباکتریوم کانتی*، *مایکوباکتریوم پینی پدی*، *مایکوباکتریوم مانگی* (۱) و *مایکوباکتریوم آریگیس* (۲۱). با وجود تشابه ژنتیکی بسیار زیاد میان این گونه‌ها، تفاوت‌هایی از لحاظ اپیدمیولوژی و میزبان اصلی در میان آنها مشاهده گردیده است (۲۲ و ۲۵). *مایکوباکتریوم بوویس* گسترده ترین تنوع میزبانی را در میان تمام اعضای کمپلکس به خود اختصاص داده است بطوری که این گونه علاوه بر گاو می‌تواند در انسان، حیوانات خانگی و وحشی نیز سبب بیماری گردد. این بیماری که در گاو به نام سل گاوی شناخته می‌شود، از مهمترین بیماری‌های مشترک میان انسان و دام محسوب می‌گردد و در بسیاری از کشورهای جهان باعث بروز خسارت‌های کلان اقتصادی می‌گردد (۲۲ و ۲۵). بر همین اساس تشخیص سریع آلودگی میزبان‌های انسانی و حیوانات به *مایکوباکتریوم بوویس* از اهمیت اپیدمیولوژیکی ویژه برخوردار می‌باشد. اخیرا Nieman تحت تیپ‌هایی از *مایکوباکتریوم بوویس* را گزارش نموده است که حساس به پیرازینامید می‌باشند. بدین ترتیب از نظر کلینیکی و درمان دارویی مبتلایان، شناسایی تحت تیپ‌های *مایکوباکتریوم بوویس* و اینکه آیا مقاوم یا حساس به پیرازینامید هستند، از اهمیت برخوردار می‌باشد. *مایکوباکتریوم بوویس* تحت تیپ *کاپره* و *مایکوباکتریوم بوویس* تحت تیپ *بوویس*، دو تحت تیپ *مایکوباکتریوم بوویس* را تشکیل می‌دهند. مخزن طبیعی *مایکوباکتریوم کاپره* حساس به پیرازینامید معمولا گوسفند، بز و میزبان معمول تحت تیپ *بوویس* گاو می‌باشد ضمن آنکه این تحت تیپ نسبت به پیرازینامید مقاوم می‌باشد (۱۳). افتراق بین *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم بوویس* بصورت سنتی بر اساس روش‌های بیوشیمیایی و خصوصیات رشد این باکتری‌ها صورت می‌پذیرد. *مایکوباکتریوم بوویس* رشد dysgonic دارد و احیاء و جذب نیاسین را انجام نمی‌دهد (۱۶). در سال‌های اخیر روش‌های مولکولی متنوعی برای تمایز میان دو گونه ابداع گردیده اند. از جمله این روش‌ها استفاده از وجود تنوع نوکلئوتیدی (Single Nucleotide Polymorphism= SNP) در ژن pncA می‌باشد (۴ و ۶). این ژن مشتمل بر ۵۶۱ نوکلئوتید می‌باشد و فعالیت آن سبب تولید آنزیم PZAase با ۱۸۶ اسید آمینه می‌گردد که تولید آن سبب مقاومت باکتری نسبت به پیرازینامید می‌گردد. در ژن pncA *مایکوباکتریوم بوویس* تغییر در نوکلئوتید ۱۶۹ (که باعث تبدیل اسید آمینه آسپارتیک به هیستیدین می‌گردد) سبب بروز مقاومت باکتری به پیرازینامید می‌شود.

این پروژه با هدف شناسایی و بررسی فراوانی *مایکوباکتریوم بوویس* در میان نمونه‌های ارجاعی به آزمایشگاه رفرانس سل انسانی کشور مستقر در بیمارستان مسیح دانشوری در طول دوره زمانی سال‌های ۱۳۸۹ تا ۱۳۹۱ و مقایسه تنوع ژنتیکی این جدایه‌ها در مقایسه با جدایه‌های گاوی این پاتوژن که در آزمایشگاه رفرانس سل گاوی موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی نگهداری می‌گردند، به روش اسپولیگوتایپینگ صورت پذیرفته است. مطالعه فراوانی میزان حساسیت جدایه‌های انسانی *مایکوباکتریوم*

Archive of SID

www.SID.ir

بوویس به پیرازینامید از دیگر اهداف این مطالعه بوده است.

مواد و روش کار

در این تحقیق تعداد ۸ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس* که از میان ۱۳۲۰ نمونه بالینی جمع آوری شده از بیماران مشکوک به سل مراجعه کننده به مرکز تحقیقات مایکوباکتریولوژی سل و بیماری‌های ریوی بیمارستان مسیح دانشوری در بازه زمانی سالهای ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۱ جدا شده بودند همراه با ۶۸ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس* جمع آوری شده از عقده‌های لنفاوی گاوهای توبرکولین مثبت در موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی در محیط لونشتاین جانسون تجدید کشت و در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۸ هفته در انکوباتور نگهداری شدند.

آزمون‌های بیوشیمیایی

آزمون‌های بیوشیمیایی احیاء نیترات و جذب نیاسین و همچنین توانایی رشد باکتری در حضور TCH (Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) بر روی همه جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* تحت بررسی در این تحقیق بر اساس روش‌های استاندارد اجرا گردید.

استخراج ماده ژنتیکی باکتری

به منظور استخراج ژنوم باکتری، تمام جدایه‌ها بر روی محیط کشت لونشتاین- جانسون گلسیرینه و پیرووات دار تجدید کشت شدند. هشت هفته پس از انکوباسیون لوله‌های کشت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، ۲-۳ پرگنه باکتری از هر جدایه به کمک آنس برداشت و به یک میکروفیوژ تیوب محتوی ۲۵۰ میکرولیتر بافر لیز کننده مایکوباکتریوم (سیناژن، ایران) انتقال داده شد. میکروفیوژ تیوب به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری محتوی آب با دمای ۹۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا باکتری غیر فعال گردد. پس از سانتریفیوژ بمدت ۱۰ دقیقه در g ۷۸۰۰ ، مایع فوقانی موجود در میکروفیوژ تیوب حاوی ماده ژنتیکی باکتری به یک میکروفیوژ جدید انتقال و از آن در انجام آزمون‌های PCR استفاده گردید.

آزمون PCR-RFLP بر روی ژن *pcnA*

این آزمون در دو مرحله صورت پذیرفت. در مرحله نخست ژن *pcnA* به روش PCR و با استفاده از پرایمرهای pncA-f با توالی نوکلئوتیدی 5'-GGC GTC ATG GAC CCT ATA TC-3' و همچنین پرایمر pncA-r با توالی نوکلئوتیدی 5'-CAA CAG TTC ATC CCG GTT C- 3' تکثیر گردید (۹). واکنش‌های PCR بگونه ای تنظیم گردیدند که حجم هر واکنش در نهایت معادل ۵۰ میکرولیتر تثبیت گردید. اجزا و پروتکل دمایی این آزمون در جدول ۱ ذکر گردیده است. برای مشاهده محصول مورد انتظار PCR که عبارت از یک قطعه ژنتیکی به طول ۶۷۰ bp بود از الکتروفورز ژل آگارز ۱/۵ ٪ استفاده گردید. در مرحله دوم این آزمون مقدار ۱ واحد از آنزیم محدود کننده *Bst*EII با استناد به روش پیشنهادی شرکت سازنده (Roche, Manheim, Germany) به ۵ میکرولیتر از محصول PCR اضافه و هضم آنزیمی به مدت یک ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انجام گرفت. به منظور تفکیک و تعیین اندازه فرآورده‌های حاصل از هضم آنزیمی، مقدار ۵ میکرولیتر از محصول هضم شده هر جدایه بر روی ژل پلی آکریل آمید ٪۸ رانده شد . در این آزمون مشاهده سه قطعه به طول bp ۱۳۶، bp ۴۲۳ و bp ۱۰۳ نشان دهنده هویت جدایه بعنوان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و مشاهده دو قطعه به اندازه bp۵۲۶ و bp ۱۴۶ موید هویت جدایه بعنوان

Archive of SID

www.SID.ir

مایکوباکتریوم بوویس خواهد بود. بعنوان کنترل مثبت از سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* H37Rv که حساس به پیرازینامید می‌باشد و *مایکوباکتریوم بوویس* BCG که مقاوم به پیرازینامید می‌باشد و همچنین به عنوان کنترل منفی از آب مقطر استفاده گردید.

آزمون اسپولیگوتایپینگ

از روش متعارف Kamerbeek (۸) و کیت تجارتی (Isogen Bioscience, Netherlands) شامل بلاتر، غشا و پرایمرهای DRa و DRb استفاده گردید. اجزاء واکنش و پروتکل دمایی آزمون PCR مورد استفاده در جدول ۱ ذکر گردیده است. هیبریدیزاسیون ممبران با استفاده از Hybridization oven و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد صورت پذیرفت و وجود یا فقدان spacerها با استفاده از شناساگر ECL و با کمک فیلم حساس رادیوگرافی صورت پذیرفت (۴، ۸، ۹، ۱۴، ۱۵ و ۲۴). مجددا بعنوان کنترل مثبت از سویه‌های *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* H37Rv و *مایکوباکتریوم بوویس* BCG و نیز آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده گردید.

شناسایی اسپولیگوتایپ‌های *مایکوباکتریوم بوویس*

نتایج به دست آمده از جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* با منشاء گاو با استفاده از وب سایت بین المللی بانک اختصاصی اسپولیگوتایپ‌های *مایکوباکتریوم بوویس* www.m.bovis.org مورد بررسی قرار گرفت و کد شناسایی مشخصه هر سویه دریافت گردید و در مورد جدایه‌های انسانی این باکتری نیز از بانک اطلاعات اسپولیگوتایپ SPOLDB4 قابل دسترسی از طریق وب سایت www.pasteur-guadeloupe.fr استفاده گردید و کد اختصاصی سویه‌ها مشخص گردیدند.

نتایج

همه *جدایه‌های مایکوباکتریوم بوویس*‌های تحت بررسی در این تحقیق با منشا دامی(۶۸ جدایه) و انسانی (۸ جدایه) در آزمون احیاء نیترات و نیز جذب نیاسین منفی و در حضور (Thiophene-2-carboxylic acid hydrazide) TCH ناتوان از رشد بودند. این ویژگی‌ها با خصوصیات بیوشیمیایی مورد انتظار از *مایکوباکتریوم بوویس* سازگار می‌باشد.

در آزمون PCR-RFLP، تمام ۷۶ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس* تحت آزمون صرف نظر از منشاء آنها مقاوم به پیرازینامید شناخته شده و بدین ترتیب بعنوان تحت گونه *مایکوباکتریوم بوویس* شناخته شدند (تصویر ۱ و ۲).

در آزمون اسپولیگوتایپینگ از میان ۸ جدایه انسانی *مایکوباکتریوم بوویس* ۶ جدایه الگوی ST595 را از خود نشان دادند این الگو که در میان جدایه‌های دامی تحت آزمون مشاهده نگردید. ۲ جدایه دیگر انسانی دارای اسپولیگوتایپ ST694 بودند که بصورت مشترک در میان جدایه‌های گاوی تحت بررسی نیز مشاهده شد (جدول ۲). علاوه بر این در میان ۶۸ جدایه گاوی تحت مطالعه در مجموع ۱۲ اسپولیگوتایپ مشاهده گردید که ۶ مورد آن ها پیش از این گزارش نگردیده‌اند.

بحث و نتیجه‌گیری

میزان فراوانی سل گاوی در گله‌های گاو ایران در طول نیم قرن گذشته در نتیجه اجرای برنامه کنترل سل گاوی معروف به "تست و کشتار" که بر پایه توبرکولیناسیون گاوها و شناسایی و کشتار گاوهای توبرکولین مثبت می‌باشد، رو به کاهش گذاشته است. بر همین اساس با استناد بر آمارهای اعلام شده توسط سازمان دامپزشکی کشور، این میزان که در سال ۱۳۵۱ متجاوز از ۵٪ گاوهای تست شده گزارش گردیده است

Archive of SID

www.SID.ir

در سال ۱۳۹۰ به کمتر از ۰/۲ درصد کاهش یافته است (سازمان دامپزشکی کشور، اطلاعات منتشر نشده). میزان فراوانی *مایکوباکتریوم بوویس* در جمعیت انسانی به عنوان یک مؤلفه مهم در نشان دادن وضعیت بهداشتی کشورها بکار می‌رود. Kantor با مطالعه فراوانی این باکتری در میان مسلولین ۱۰ کشور آمریکای جنوبی در بین سال‌های ۱۹۷۰ تا ۲۰۰۷ نشان داد این میزان بین ۰/۴۳٪ تا ۱٪ متغیر بود (۳). در اروپا و در هلند این میزان معادل ۱/۴٪ (۱۱) و در انگلستان حدود ۰/۵٪ گزارش گردیده است (۲). در ایران این میزان در مطالعه اله یار که در سال ۱۳۹۱ صورت پذیرفت معادل ۳/۱ ٪ تعیین گردید (۱۷). در مطالعه دیگری که در طی سال های ۱۳۸۹ الی ۱۳۹۱ بر روی مسلولین استان مرکزی صورت پذیرفت ۲ مورد از ۹۳ جدایه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* بعنوان *مایکوباکتریوم بوویس* شناسایی گردیدند که معرف آلودگی تقریبا ۲٪ بیماران به این مایکوباکتریوم می‌باشد (۷). در تحقیق حاضر این مقدار معادل ۰/۶٪ تعیین گردید که بدین ترتیب در مقایسه با گزارشات مشابه قبلی میزان پایین تری از آلودگی بیماران را به این پاتوژن در ایران نشان می‌دهد. انتقال *مایکوباکتریوم بوویس* از انسان به انسان به ندرت اتفاق می‌افتد. با این حال مواردی از این نوع انتقال در ایران و خارج از کشور گزارش گردیده است. در سال ۲۰۰۷ ولایتی انتقال *مایکوباکتریوم بوویس* از یک کودک ۵ ساله به خواهر ۱ ساله وی از طریق تنفسی را گزارش نمود (۲۳). در خارج از ایران، در سال ۲۰۰۹ Sunder انتقال *مایکوباکتریوم بوویس* از یک مرد ۵۰ ساله شاغل در کشتارگاه به دختر ۲۰ ساله اش را با کمک روش‌های اسپولیگوتایپینگ و MIRU-VNTR اثبات نمود (۱۸). با این وجود در اکثر موارد آلودگی انسان به *مایکوباکتریوم بوویس* در ایران همچون سایر نقاط جهان تماس با میزبان‌های غیر انسانی آلوده و یا مصرف مواد و فرآورده‌های دامی آلوده به *مایکوباکتریوم بوویس* به عنوان راه آلودگی بیماران شناخته شده است.

نخستین مطالعات مدرن مولکولی بر روی اپیدمیولوژی سل گاوی در ایران توسط فیض آبادی و به روش RFLP با استفاده از مارکرهای PGRS و DR و IS*6110* صورت پذیرفت که یافته‌های آن در سال ۱۹۹۶ انتشار یافت (۵). درسال ۲۰۰۸ روش‌های تایپینگ VNTR و Spoligotyping توسط تدین بر روی ۱۳۳ جدایه گاوی *مایکوباکتریوم بوویس* از سراسر ایران انجام شد که نشان داد اسپولیگوتایپ معروف به SB0120 یا همان اسپولیگوتایپ مشخصه سویه *مایکوباکتریوم بوویس* BCG فراوان ترین تیپ ژنتیکی در ایران می‌باشد و با در نظر گرفتن وفور سویه‌های حامل ژنوتایپ‌های بسیار نزدیک به این تیپ، جمعیت این پاتوژن در ایران در مقایسه با سایر نقاط جهان از سطح بالایی از یکنواختی ژنتیکی برخوردار می‌باشد (۲۰). در سال ۲۰۱۱ مصوری با بکار گیری روش‌های PGRS-RFLP بر روی ۱۲۳ جدایه گاوی این پاتوژن مجددا بر شباهت ژنتیکی بسیار میان این جدایه‌ها تاکید نموده نشان داد که وفور سویه‌های به اصطلاح " شبه BCG" در ایران از دیدگاه اپیدمیولوژیکی قابل توجه می‌باشد (۱۲).

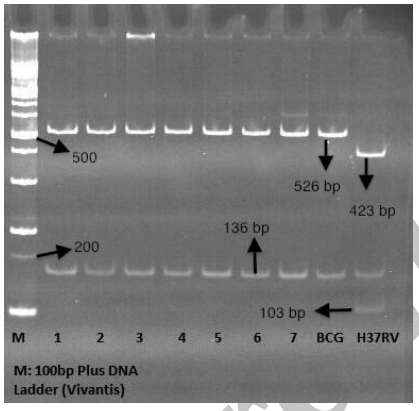
در این مطالعه از ۶۸ جدایه گاوی بررسی شده ۳۱ جدایه دارای اسپولیگوتایپ SB0120بودند (۵/۴۵٪). این مشاهده با مطالعه تدین در همخوانی می باشد. یافته‌های جدیدتر نشان می‌دهند که روش اسپولیگوتایپینگ قادر به تفکیک و افتراق میان تمام اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* می‌باشد. بعنوان مثال تمام جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* فاقد spacerهای شماره ۳، ۹و ۳۹-۴۳

Archive of SID

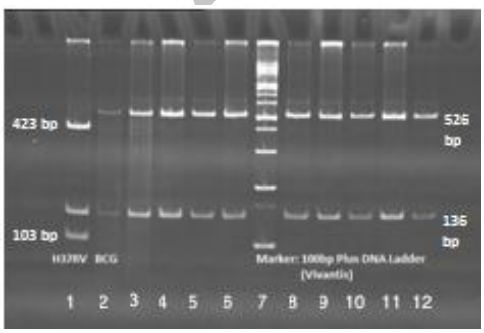
می‌باشند (۱۰). در مطالعه حاضر همه جدایه‌ها ویژگی خاص *اسپولیگوتایپ مشخصه مایکوباکتریوم بوویس* یعنی فقدان spacerهای فوق را از خود نشان دادند. این یافته با خصوصیات گزارش شده حاصل از انجام تست‌های بیوشیمیایی بر روی ۷۶ جدایه تحت بررسی در این تحقیق سازگار بود. جداسازی *مایکوباکتریوم بوویس* از عقده‌های لنفاوی گاو در تحقیق حاضر با مشاهدات پیشین دایر بر فعالیت این *مایکوباکتریوم* به عنوان تنها عضو کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکولوزیس* که در گله‌های گاو ایران مشاهده می گردد (۱۹) همخوانی دارد.

در این پژوهش از دو اسپولیگوتایپ مکشوف در میان جدایه‌های انسانی تیپ ژنتیکی ST694/SB0127 بصورت مشترک در بین جدایه‌های گاوی تحت بررسی نیز مشاهده گردید. بر همین اساس این مشاهده می‌تواند ماهیت مشترک بودن بیماری و انتقال احتمالی پاتوژن از میزبان اولیه (گاو) به انسان را تایید نماید. یادآور می گردد که بصورت مشابه در استان مرکزی فعالیت جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* با ژنوتایپ مشترک بین مسلولین و گاوهای توبرکولینه گزارش گردیده است (۱۸, ۱۹). در ارتباط با اسپولیگوتایپ ST595، با توجه به اینکه این ژنوتایپ پیش از این در میان گله‌های گاو ایران گزارش نگردیده است و به دلیل ویژگی خاص آن دایر بر وجود spacer شماره ۱۶ (جدول ۲) تجزیه و تحلیل اپیدمیولوژیکی این سویه منوط به انجام تحقیقات تکمیلی خواهد بود، هرچند که آلودگی ۶ نفر از بیماران به این سویه نشان دهنده موفقیت آن در ابتلاء بیماران بعنوان یک سویه پاتوژن می‌باشد. علاوه بر این احتمال می‌رود آلودگی این بیماران به یک سویه واحد بیانگر وجود حالت اپیدمیک باشد که در نتیجه بروز آن تمام این بیماران بصورت تقریبا همزمان در نتیجه مواجهه با یک سویه واحد آلوده گردیده اند. دستیابی به تحلیل اپیدمیولوژیک صحیح در این ارتباط متکی بر انجام مطالعات تکمیلی خواهد بود.

با استناد به مشاهدات این مطالعه، به نظر می‌رسد مسئولین بهداشتی کشور باید همچنان نسبت به خطر انتقال *مایکوباکتریوم بوویس* از گاو به انسان توجه نشان دهند و از برنامه کنترل سل گاوی که توسط سازمان دامپزشکی کشور در راستای مبارزه با این بیماری بصورت ملی انجام می گردد حمایت نمایند همچنین ژنوتایپینگ تمام جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* ایران اعم از انسانی و گاوی با استفاده از روش‌های متعارف مولکولی و بخصوص اسپولیگوتایپینگ می‌تواند در افزایش دانش روز از اپیدمیولوژی سل گاوی در کشور نقش سازنده ایفا نماید.



تصویر ۱ : الگوی مقاومت به پیرازینامید در جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* انسانی پس از هضم با آنزیم BsteII. از چپ به راست: چاهک ۱ : 100 bp plus DNA size marker، چاهک ۲ الی۸: جدایه‌های م. *بوویس* تحت آزمون، چاهک ۹: سویه *M. bovis* BCG، چاهک ۱۰، سویه *M. tuberculosis* H37Rv



تصویر ۲ : الگوی مقاومت به پیرازینامید در جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* گاوی پس از هضم با آنزیم BsteII. از چپ به راست: چاهک ۱، سویه *M. tuberculosis* H37Rv، چاهک ۲: سویه *M. bovis* BCG، چاهک‌های ۳ الی ۶ و ۸ الی ۱۲: جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* گاوی، چاهک ۷ : 100 bp plus DNA size marker

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۱) اجزاء (الف) و پروتکل دمایی (ب) آزمون‌های PCR مورد استفاده در این تحقیق

جدول ۱ قسمت الف

PCR reaction	PCR buffer[1] (µl)	dNTPs[2] (µl)	$MgCl_2$[3] (µl)	Primer forward[4] (µl)	Primer reverse[4] (µl)	Taq polymerase[5] (µl)	DNA template (µl)	PCR water (µl)	Total volume (µl)
pcn A	5	1	0	0.5	0.8	0.2	5	37.5	50
Spoligotyping	5	1	1.5	1	1	0.25	5	24	50

جدول ۱ قسمت ب

PCR reaction	Initial heating	Denaturation	Annealing	Extension	Final extension	№ of complete cycles
pcnA	10 min, 95°C	30 s, 95 °C	40 s, 60 °C	1 min, 72 °C	10 min, 72 °C	40
Spoligotyping	3 min, 96 °C	1 min, 96 °C	1 min, 55 °C	30 sec, 72 °C	5 min, 72 °C	30

[1] : Without $MgCl_2$.
[2] : From 10 mM solution.
[3] : From 25 mM solution.
[4] : From 5 pmol/ µl solution.
[5] : From 5 U/ µl stock

جدول ۲) اسپولیگوتایپ‌های شناخته شده در میان ۶۸ جدایه گاوی و ۸ جدایه انسانی *مایکوباکتریوم بوویس* در مطالعه حاضر. اعداد صفر و یک در ستون Spoligotyping pattern نشانه به ترتیب فقدان و وجود spacer می‌باشد. برای آگاهی از جزئیات به متن مراجعه گردد.

Spoligotyping pattern● (Spacers 1-43)	Spoligotype (ST*/SB** Number)	No of isolates	Frequency (%)	Host
11011111011111101111111111111111111111100000	ST482/SB0120	31	45.5	Cattle
11011111011111101111101111111111111100000	ST1181/SB1167	13	19.1	Cattle
11011111011111101111111111100000111100000	Not reported	12	17.6	Cattle
11011111011111101111101111111111001100000	Not reported	2	2.9	Cattle
11011111011110001111111111111111111100000	ST694/SB0127	2	2.9	Cattle
11011111011111101111111111110001111100000	SB1166	2	2.9	Cattle
00011111011111101111111111111111111100000	ST977/SB0867	1	1.4	Cattle
00011111011111101111111111101111111100000	Not reported	1	1.4	Cattle
11011111011100101111101111111111111100000	Not reported	1	1.4	Cattle
11011111011101011111111111111111111100000	Not reported	1	1.4	Cattle
11010111011100001111001111111100100100000	Not reported	1	1.4	Cattle
11011111011111101111111111111111101100000	SB0934	1	1.4	Cattle
11011111011111111111111111111111111100000	ST595	6	75	Human
11011111011110001111111111111111111100000	ST694/SB0127	2	25	Human

● Spoligotyping pattern: 1= spacer is present, 0= spacer is absent
* ST Number: Based on SPOLDB4 accessible at www.pasteur-guadeloupe.fr
** SB Number: Based on *M. bovis* spoligotyping database accessible at www.m.bovis.org

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله مایل هستند از پرسنل آزمایشگاهی بیمارستان مسیح دانشوری و همچنین بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج و علاوه بر آن کارشناسان دامپزشک و تکنسین فنی سازمان دامپزشکی کل کشور که در انجام این پروژه مساعدت نموده اند تشکر نمایند. هزینه انجام این تحقیق به تساوی توسط بیمارستان مسیح دانشوری و موسسه رازی تامین گردیده است.

منابع

1. Alexander, K.A., Laver, P.N., Michel, A.L., Williams, M., Van Helden, P.D., Warren, R.M., Gey Van Pittius, N.C. (2010). Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, m. Mungi. *Emerging Infectious Disease Journal* **16**: 1296-9.
2. Allahyar Torkman, M. (2011). Single nucleotide polymorphism (snp), in *katg* and *pnca* genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains using PCR-RFLP and PCR specific allele techniques. Islamic Azad University, Science & Research branch, Tehran. pp: 98-110.

Archive of SID
www.SID.ir

3. De Kantor, I.N., Ambroggi, M., Poggi, S., Morcillo, N., Da Silva Telles, M.A., Osório Ribeiro, M., Garzón Torres, M.C., LLerena Polo, C., Ribón, W., García, V. (2008). Human *Mycobacterium bovis* infection in ten latin american countries. *Tuberculosis* **88**, 365-8.
4. De los Monteros, L.E.E., Galán, J.C., Gutiérrez, M., Samper, S., Marín, J.F.G., Martín, C., Domínguez, L., De Rafael, L., Baquero, F., Gómez-Mampaso, E. (1998) Allele-specific PCR method based on *pnca* and *oxyr* sequences for distinguishing *Mycobacterium M.bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: Intraspecific Bovis *pnca* sequence polymorphism. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 239-42.
5. Feizabadi, M., Robertson, I., Cousins, D., Hampson, D. (1996). Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. *Journal of Clinical Microbiology* **34**: 1136-42.
6. Haddad, N., Ostyn, A., Karoui, C., Masselot, M., Thorel, M., Hughes, S., Inwald, J., Hewinson, R., Durand, B. (2001). Spoligotype diversity of *Mycobacterium bovis* strains isolated in France from 1979 to 2000. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 3623-32.
7. Hamedi, D. (2010). Population genetics study of *Mycobacterium tuberculosis* complex in Markazi province based on miru-vntr study. *In Veterinary Aerobic Bacterial Research and Vaccine Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute Karaj*. p: 85.
8. Kamerbeek, J., Schouls, L., Kolk, A., Van Agterveld, M., Van Soolingen, D., Kuijper, S., Bunschoten, A., Molhuizen, H., Shaw, R., Goyal, M. (1997). Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 907-14.
9. Kazempour, M., Masjedi, M., Velayati, A.A., Tajeddin, E., Farnia, P., Kargar, M., Noroozi, J., Ahmadi, M. (2009). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* beijing genotype using three different molecular methods. *Koomesh* **11**: 7-14.
10. Kremer, K., Van Soolingen, D., Frothingham, R., Haas, W.H., Hermans, P.W., Martin, C., Palittapongarnpim, P., Plikaytis, B.B., Riley, L.W., Yakrus, M.A., Musser, J.M., Van Embden, J.D. (1999). Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: Interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *Journal of Clinical Microbiology* **37**: 2607-18.
11. Majoor, C.J., Magis-Escurra, C., Van Ingen, J., Boeree, M.J., Van Soolingen, D. (2011). Epidemiology of *Mycobacterium bovis* disease in humans, the Netherlands, 1993-2007. *Emerging Infectious Disease* **17**: 457-63.
12. Mosavari, N., Feizabadi, M.M., Jamshidian, M., Shahpouri, M.R., Forbes, K.J., Pajoohi, R.A., Keshavarz, R., Taheri, M.M., Tadayon, K. (2011). Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle in Iran. *Veterinary Microbiology* **151**: 148-52.
13. 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.
14. Rohani, M., Farnia, P., Nasab, M.N., Moniri, R., Torfeh, M., Amiri, M. (2009). Beijing genotype and other predominant *Mycobacterium*

Archive of SID

www.SID.ir

tuberculosis spoligotypes observed in Mashhad city, Iran. *Indian Journal of Medical Microbiology* **27**: 306.

15. Sekiguchi, J.I., Nakamura, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kirikae, F., Kobayashi, I., Augustynowicz-Kopeć, E., Zwolska, Z., Morita, K., Suetake, T., Yoshida, H. (2007). Development and evaluation of a line probe assay for rapid identification of *pnca* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 2802-7.
16. Somoskovi, A., Dormandy, J., Parsons, L.M., Kaswa, M., Goh, K.S., Rastogi, N., Salfinger, M. (2007) Sequencing of the *pnca* gene in members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex has important diagnostic applications: Identification of a species-specific pnca mutation in "*Mycobacterium canettii*" and the reliable and rapid predictor of pyrazinamide resistance. *Journal of Clinical Microbiology* **45**: 595-9.
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. Sunder, S., Lanotte, P., Godreuil, S., Martin, C., Boschiroli, M., Besnier, J. (2009). Human-to-human transmission of tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis* in immunocompetent patients. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 1249-51.
19. Tadayon, K., Mosavari, N., Feizabadi, M.M. (2013). An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran, a historically Zebu-dominant farming country. *Iranian Journal of Microbiology* **5**: 1-13.
20. Tadayon, K., Mosavari, N., Sadeghi, F., Forbes, K.J. (2008). *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian cattle, Iran. *Emerging Infectious Disease* **1**4: 1919-21.
21. Van Ingen, J., Brosch, R., Van Soolingen, D. (2013). Characterization of *Mycobacterium orygis*. *Emerging Infectious Disease* **19**: 521-2.
22. Van Soolingen, D., Hoogenboezem, T., De Haas, P.E., Hermans, P.W., Koedam, M.A., Teppema, K.S., Brennan, P.J., Besra, G.S., Portaels, F., Top, J. (1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canetti: Characterization of an exceptional isolate from Africa. *International Journal of Systematic Bacteriology* **47**: 1236-45.
23. Velayati, A.A., Farnia, P., Boloorsaze, M., Sheikholslami, M., Khalilzadeh, S., Hakeeme, S., Masjedi, M. (2007). *Mycobacterium bovis* infection in children in the same family: Transmission through inhalation. *Monaldi Archives for Chest Disease* **67**: 169.
24. Velayati, A.A., Farnia, P., Mirsaeidi, M., Masjedi, M. (2006). The most prevalent *Mycobacterium tuberculosis* superfamilies among Iranian and Afghan tuberculosis cases. *Scandinavian Journal of Infectious Disease* **38**: 463-8.
25. Whitman, W.B., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Ludwig, W., Suzuki, K.I., Parte, A. (2012). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 5, Springer.

Archive of SID

www.SID.ir

Journal of Veterinary Microbiology, Volume 9, Issue 2, 2013

Genetic Diversity of Iranian *Mycobacterium bovis* Subtypes Analyzed by PCR-RFLP and Spoligotyping

Khaleqhian, P.[1,2,3], Tadayon, K.[2*], Farnia, P.[1], Mosavari, N.[2], Mozafari, M.[1], Derakhshani Nejad, Z.[1], Keshavarz, R.[2], Dashti Pour, Sh.[2], Masjedi, M.[1], Velayati, A.A.[1],Ghaderi, R.[2], Boroumanfar, S.[4]

1- Mycobacteriology Research Center, NRITLD, Masih Daneshvari Hospital, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
2- TB Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran
3- Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Iran
4- Office of Health and Animal Diseases Management, Iranian Veterinary Organization, Tehran, Iran

Received Date: 1 February 2013 *Accepted Date: 8 July 2013*

Abstract

Within the course of this 18-month long work spanning 2010 and 2011, a total of eight human Mycobacterium bovis isolates collected from 1,320 tuberculosis-suspected patients, along with 68 bovine isolates were subjected to PCR-RFLP of pncA gene to assess their resistance to Pyrazynamide. All the isolates were subsequently spoligotyped to better understand their potential epidemiological links. As results showed, only 0.6% of the patients were infected with M. bovis, i.e. a considerably smaller rate compared to previous reports from Iran. Besides, all the isolates proved to be resistant to pyrazynamide. Consulting the SPOLDB4 spoligotyping databank, two patterns, namely ST595 and ST694, were detected among human isolates. Moreover, 12 patterns were found among the bovine isolates. ST595 was the single spoligotype shared between human and bovine hosts. For health officials, these observations indicate that in the Iranian environment M. bovis continues to produce a health risk to human.

Keywords: *Spoligotyping, Mycobacterium bovis, Molecular Epidemiology, PCR-RFLP.*

**Corresponding author: Tadayon, K.*
Address: TB Department, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran. Tel: 026-34502892
Email: k.tadayon@rvsri.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir