فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال ششم، شماره ۲۱، بهار ۱۳۹۶، صفحه ۵۲- ۴۷
تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۵/۱۷ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۰۹

جداسازی، تعیین هویت وتهیهٔ الگوی ژنومی باکتری‌های عضوکمپلکس *مایکوباکتریوم‌توبرکولوزیس* از گاو های توبرکولین مثبت استان قم با روش RFLP PGRS

سینا نیمروز: دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی دانشگاه آزاد اسلامی واحد ساوه، ساوه، ایران، nimrooz1988@gmail.com
نادر مصوری *: استادیار میکروبیولوژی مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، کرج، ایران، n.mosavari@rvsri.ac.ir
تقی زهرائی صالحی: استاد میکروبیولوژی دانشگاه تهران، گروه زیست‌شناسی، تهران، ایران، tsalehi@ut.ac.ir

چکیده

مقدمه: *مایکوباکتریوم‌بویس* عامل اصلی ایجاد سل در گاوها است. در مطالعهٔ حاضر یافته‌های مربوط به جداسازی، تعیین هویت وتهیهٔ الگوی ژنومی باکتری‌های عضوکمپلکس *مایکوباکتریوم‌توبرکولوزیس* (MTbC) از گاوهای توبرکولین مثبت استان قم با روش RFLP با استفاده از پروب PGRS بررسی شده است.

مواد و روش‌ها: از دی ۱۳۹۱ تا بهمن ۱۳۹۲ غدد لنفاوی اصلی سر و تنه لاشهٔ ۳۰ رأس گاو توبرکولین مثبت استان قم بر روی محیط لونشتاین ـ جانسون گلیسرینه و پیروات‌دار کشت و ۸ تا ۱۲ هفته در $37\ ^{\circ}C$ نگهداری شدند. بر تمام لوله‌های کشت دارای رشد باکتریایی اسید فست، PCR-IS6110 اجرا شد و جدایه‌های عضو MTbC به‌روش RFLP-PGRS ژنوتایپ شدند.

نتایج: در ۲۱ نمونه در آزمایش PCR-IS*6110* وجود MTbC تأیید شد و در RFLP-PGRS در مجموع سه تیپ ژنتیکی شناسایی شد.

بحث و نتیجه‌گیری: آلودگی گله‌های گاو در استان قم به MTbC اهمیت خطر احتمالی انتقال بیماری به میزبان‌های انسانی را نشان می‌دهد. شناسایی سه تیپ ژنتیکی در میان ۲۱ جدایهٔ استان قم ضمن نشان‌دادن فعالیت سویه‌های مختلف MTbC در منطقه، وجود تنوع ژنتیکی این باکتری‌ها را در استان قم نشان می‌دهد که تعیین میزان گستردگی آن نیازمند به انجام پژوهش‌های تکمیلی خواهد بود. با درنظرگرفتن تنوع ژنتیکی حاضر در جمعیت MTbC در استان قم، به نظر می‌رسد برنامهٔ در حال اجرای تست و کشتار در این استان نیازمند بازنگری و تقویت مبانی راهبردی در اجرا باشد.

واژه‌های کلیدی: *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* کمپلکس، سل گاوی، برنامهٔ تست و کشتار، انگشت‌نگاری ژنومی، RFLP- PGRS

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم های بیماری‌زای دام – موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی(تات)، کرج، ایران

Copyright©2017, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

www.SID.ir

مقدمه

سل گاوی ناشی از *مایکوباکتریوم‌بویس* از قدیمی‌ترین و مهم‌ترین بیماری های شناخته‌شدهٔ مشترک بین انسان و دام است که قدمت آن را به‌اندازهٔ حیات بشریت می‌دانند (۱). این بیماری از تمام جهان به‌جز قطب جنوب گزارش شده است. در بسیاری از کشورهای جهان هرساله مبالغ هنگفتی بودجه صرف اجرای برنامه‌های ریشه‌کنی سل گاوی در دام‌ها می‌شود.

با معرفی دانش مولکولار اپیدمیولوژی و بهره‌گیری از تکنیک‌های ژنوتایپینگ جدایه‌های *مایکوباکتریوم‌بویس* امکان ارزیابی دقیق‌تر برنامه‌های کنترل بیماری، شناسایی ارتباط فیلوژنتیکی میان سویه‌ها، ارتباط میان میزبان‌های مختلف و نقش حیوانات ناقل و همچنین ردیابی منشأ آلودگی فراهم شده است (۱، ۲ و ۳). ایران با داشتن حدود ۸/۵ میلیون رأس گاو و اجرای بیش از ۱/۲ میلیون نوبت تست سل در هر سال، همچنان به‌عنوان بزرگ‌ترین کشور اجراکنندهٔ برنامهٔ تست و کشتار علیه سل گاوی در منطقهٔ خاورمیانه شناخته می‌شود (۱). با وجود اینکه فراوانی موارد گزارش سل گاوی در سطح گله‌ها و همچنین تعداد دام‌های مبتلا در هر گله، کاهش درخورتوجهی داشته است، براساس گزارش های سالیانهٔ سازمان دامپزشکی کشور و درنتیجهٔ اجرای این برنامه، سل گاوی تقریباً در هیچ یک از مناطق جغرافیایی دامپروری مهم ایران ناپدید نشده است؛ علاوه بر این، مشاهدهٔ موارد سل سرتاسری در لاشه‌های گاو ذبح‌شده در برخی از واحدهای کشتارگاه کشور همچنان بر کافی‌نبودن اقدامات در حال انجام در کنترل بیماری اشاره دارد. نقل و انتقالات و خرید و فروش دام‌ها به‌صورت غیرمجاز بین واحدهای گاوداری، مراتع، بازارهای دام و کشتارگاه از جملهٔ اصلی‌ترین راه‌های انتقال بیماری و شکست برنامهٔ کنترل سل در تمام جهان شناخته شده‌اند (۲-۴).

در این پژوهش با استفاده از تکنیک *RFLP-PGRS* تنوع ژنتیکی موجود در جمعیت جدایه‌های *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* کمپلکس جمع‌آوری‌شده از گاوهای توبرکولین مثبت استان قم بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

جمع‌آوری نمونه: در مطالعهٔ حاضر تعداد ۳۰ جدایه جمع‌آوری شده از غدد لنفاوی و نمونه‌های پاتولوژیک لاشهٔ گاوان توبرکولین مثبت کشتارشده در استان قم بررسی شد. این دام‌ها به‌دنبال اجرای عملیات توبرکولیناسیون در ۴ واحد گاوداری در شهرستان قم به‌عنوان دام راکتور(توبرکولین مثبت) شناسایی شدند و در بازهٔ زمانی دی ۱۳۹۱ تا بهمن ۱۳۹۲ به دو واحد کشتارگاه در سطح استان اعزام و ذبح گردیدند. عقده‌های سر (رتروفارنژیال)، لنفاوی تنه (مدیاستینال، برونشیال، مزانتریک) و نمونه‌های پاتولوژیک نظیر ضایعات احتمالی در ریه و کبد و طحال (در صورت مشاهده) در کشتارگاه جمع‌آوری شدند و پس از بسته‌بندی در ظرف نمونه‌برداری مناسب و ثبت مشخصات با رعایت زنجیرهٔ سرد به مؤسسه رازی کرج انتقال داده شدند.

کشت میکروبی بر روی محیط اختصاصی: در آزمایشگاه با استفاده از مواد و وسایل استریل، ابتدا همهٔ نمونه‌های مربوط به هر لاشه به‌صورت مجتمع توسط هاون آزمایشگاهی و ماسه بادی، سلایه و یکنواخت شد و سپس با استفاده از محلول آلودگی‌زدای هم‌حجم نمونه، شامل: مخلوط اناستیل‌السیستئین[1] (۰/۵درصد)، هیدروکسیدسدیم (۳/۵ مولار) و سیترات سدیم (۰/۰۵

www.SID.ir

مولار) به‌مدت ۱۵ دقیقه آلودگی‌زدایی شدند (۵). حدود ۵ میلی‌لیتر از بخش فوقانی مایع موجود در هاون به یک لوله یونیورسال منتقل شد و با استفاده از اسیدکلریدریک خنثی گردید و سپس در ۳۵۰۰rpm به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. از رسوب به‌دست‌آمده برای تلقیح یک لوله کشت لونشتاین-جانسون گلیسیرین دار و یک لوله کشت لونشتاین-جانسون پیروات‌دار استفاده شد. لوله‌های کشت‌شده در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد برای ۱۲ هفته به دور از نور نگهداری شدند.

آزمایش میکروسکوپی: از تمام لوله‌های کشت در پایان دورهٔ انکوباسیون گسترش میکروسکوپی تهیه شد و پس از رنگ‌آمیزی به‌روش اسید فست، رنگ آنها بررسی شد.

ویژگی‌های رشد بر روی محیط کشت اختصاصی، مدت‌زمان لازم برای مشاهدهٔ نخستین پرگنه‌های رشد و برخورداری از خصوصیت اسید فست بودن، به‌عنوان مؤلفه‌های مؤید هویت احتمالی جدایه‌های جمع‌آوری شده به‌عنوان اعضای *مایکوباکتریوم‌توبرکولوزیس* کمپلکس در نظر گرفته شدند(۶).

تعیین هویت : برای اطمینان از هویت جدایه‌ها از نشانگر اختصاصی IS*6110* به‌روش PCR-IS*6110* و بر مبنای روش پیشنهادی ونسولینگن[۲] استفاده شد (۶). در این روش تولید یک قطعه به‌طول ۲۴۵ *bp* در نتیجهٔ آمپلیفیکاسیون ژنوم باکتری تحت‌بررسی نشان‌دهندهٔ هویت آن به‌عنوان جدایهٔ *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* کمپلکس است.

آزمایش *PCR-IS6110*: حجم هر واکنش PCR به‌میزان ۲۵ µl به‌گونه‌ای تنظیم شد که شامل ۱۵ µl محلول آمادهٔ مصرف [۳](مرک آلمان)، ۱ میکرولیتر از هریک از دو پرایمر INS-1 (5'CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC 3') و INS-2 (5'GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA 3')، ۱/۲۵ واحد آنزیم DNA پلیمراز،۲ میکرولیتر نمونه DNA template و تا سقف ۱۰ میکرولیتر از آب مقطر باشد. برنامهٔ حرارتی اجرای PCR شامل یک مرحلهٔ گرمایش مقدماتی (94°C /3 m) و ۳۵ چرخهٔ آمپلی‌فیکاسیون سه‌مرحله‌ای مشتمل بر گرمایش اول (94°C /1 m)، گرمایش دوم (65°C /1 m) و گرمایش سوم (72°C /1 m) بود که در پایان با یک مرحله گرمایش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به‌مدت ۴ دقیقه خاتمه می‌یافت.

آزمایش RFLP-PGRS: استخراج ژنوم باکتری و اجرای RFLP براساس روش ون سولینگن صورت گرفت. به‌طور خلاصه، تودهٔ رشدیافته بر روی ۵-۳ لوله کشت لونشتاین-جانسون متناسب با میزان رشد باکتری، در یک میکروفیوژ مجهز به واشر ضدنشت[۴] جمع‌آوری و توسط بن ماری محتوی آب مقطر در حال جوش غیرفعال شد. سوسپانسیون غیرفعال‌شده باکتری سپس تحت‌تأثیر لیزوزیم[۵] و پروتکیناز K[۶] و CTAB[۷] قرار گرفت. مادهٔ ژنتیکی توسط کلروفورم استخراج شد. درمورد RFLP، ژنوم باکتری تحت‌تأثیر آنزیم PvuII در طول شب و در دمای 8°C 37 هضم شد. قطعات به‌دست‌آمدهٔ حاصل از هضم ژنوم توسط ژل الکتروفورز تفکیک شدند و به سطح یک غشای نایلون دارای شارژ مثبت منتقل و تثبیت شدند. برای هیبریدیزاسیون از پروب نشاندار PGRS (5' CGG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG) با دیگ اکسژنه[۸] استفاده شد که این مرحله در آون مخصوص هیبریدیزاسیون و درون

www.SID.ir

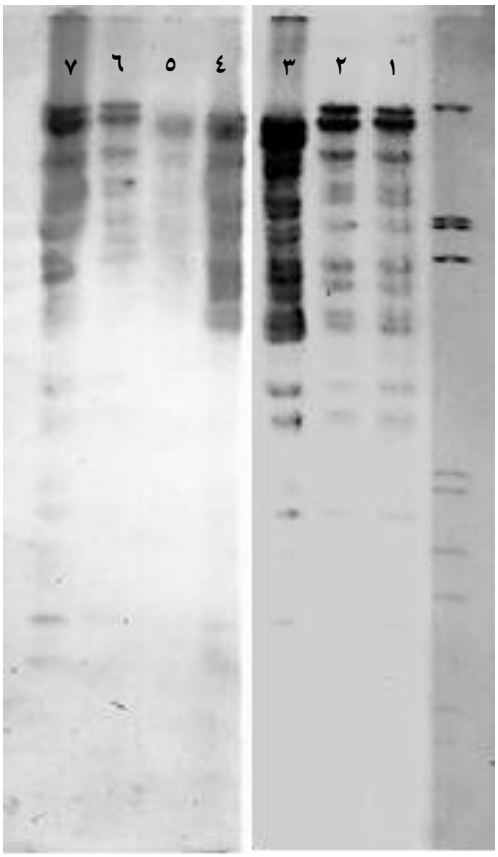
بطری‌های ویژه در دمای ۶۵°C انجام شد. پس از هیبریدیزاسیون غشا در معرض آنزیم الکالین فسفاتاز گونژوگه با دیگ آنتی‌بادی[۹] قرار گرفت و به دنبال آن با افزودن BCIP/NBT به‌عنوان سوبسترای آنزیم، سیگنال‌های نوری حاصل احتمالی ظاهر شدند و تصاویر به‌دست‌آمده توسط یک اسکنر[۱۰] تصویربرداری و ضبط شدند.

نتایج

کشت میکروبی: در کشت میکروبی و بررسی میکروسکوپی رشد مایکوباکتریایی در ۲۱ مورد از ۳۰ نمونه تأیید شد.

نتایج تعیین هویت به‌روش PCR-IS*6110*: همهٔ ۲۱ جدایهٔ جمع‌آوری‌شده در این آزمایش با موفقیت قطعاتی به‌طول *245bp* تولید کردند و بدین ترتیب هویت آنها به‌عنوان جدایه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم‌توبرکلوزیس* تأیید شد.

RFLP: اجرای آزمایش RFLP-PGRS بر ۲۱ جدایه سبب شناسایی ۳ تیپ ژنتیکی شد (تصویر ۱). در بین این ۳ ژنوتیپ دو مورد از نوع خوشه‌ای[۱۱] بودند به‌طوری که درمورد تیپ ۱ تعداد ۱۵ (۷۱/۴۳ درصد) جدایه و درمورد تیپ ۲ تعداد ۵ (۳۳/۸۱ درصد) جدایه تیپ ژنتیکی یکسانی را از خود نشان دادند. تیپ ژنتیکی سوم فقط در یک جدایه مشاهده شد و بر همین اساس، به‌عنوان یک تیپ منحصربه‌فرد[۱۲] شناخته شد. تیپ یک، فراوان‌ترین تیپ مشاهده‌شده در این پژوهش بود؛ در عین حال درمورد سویهٔ فرانسوی *Mycobacterium bovis* BCG 17162P2، سویهٔ واکسینال BCG مورداستفاده در ایران نیز مشاهده شد (شکل ۱).



شکل ۱- در تصویر فوق الگوی ۱ با ۲ و ۶، و الگوی ۳ با ۴ و ۵ شباهت دارند و الگوی ۷ منحصربه‌فرد است.

بحث و نتیجه‌گیری

از سه ژنوتیپ شناسایی‌شده در مطالعهٔ حاضر، فراوان‌ترین آنها تیپ شناخته‌شده‌ای است که به‌جهت اشتراک آن با تیپ ژنتیکی سویهٔ واکسینال BCG به‌نام تیپ شبیه BCG[۱۳] شهرت دارد. مطالعات انجام‌شدهٔ قبلی که مصوری[۱۴] (۷) بر جدایه‌های گاوی *مایکوباکتریوم‌توبرکولوزیس* کمپلکس در ایران نشان داده‌اند در RFLP-PGRS تیپ ژنتیکی شبیه BCG در تمام ایران به‌صورت مشخص فراوان‌تر از تمام تیپ‌های دیگر یافت می‌شود. فراوانی مطلق یک یا تعداد محدودی از سویه‌های *مایکوباکتریوم‌توبرکولوزیس* کمپلکس با توجه به نبودِ طبیعی انتقال ژنتیکی عرضی[۱۵] در میان این پاتوژن‌ها (۸-۹) به‌عنوان تجلی پدیدهٔ تشکیل

www.SID.ir

ساختارهای کلونال[16] شناخته شده است (۱۰). این ساختارها درواقع سویه‌هایی هستند که به‌صورت مشترک از یک سلول باکتریایی که حد مشترک همهٔ آنها محسوب می‌شود اشتقاق و تکامل یافته‌اند. اگرچه مطالعات جدید در حال انجام وجود هیچ‌یک از سه ساختار کلونال شناخته‌شدهٔ *مایکوباکتریوم‌بوویس* حال حاضر در جهان شامل(۱۱)1 European و 1 African و همچنین2 African (تدین، اطلاعات منتشرنشده)[17] فضای جغرافیایی ایران نشان نداده‌اند، غلبهٔ بلامنازع سویه‌های شبیه BCG در ایران و از جمله در استان قم بنا بر احتمال بسیار زیاد از وجود یک و یا تعداد بیشتری ساختارهای کلونال در این کشور حکایت دارد که وجود آنها هنوز به اثبات نرسیده است.

موقعیت جغرافیایی استان قم در مجاورت استان تهران به‌گونه‌ای است که این استان را به یکی از مراکز اصلی نقل و انتقالات دام برای واحدهای گاوداری در کشور تبدیل کرده است. بدین ترتیب مشاهدهٔ تیپ‌های ژنتیکی متفاوت با سه نوع گزارش‌شده در این پژوهش در صورت انجام مطالعات مشابه و مشارکت واحدهای دامپروری بیشتر، خارج از انتظار نخواهد بود. در بین روش‌های مولکولار ژنوتایپینگ[18] *م. بوویس* REA، RFLP[19]، اسپولیگوتایپینگ[20] و در سال‌های اخیرتر MIRU-VNTR[21]عمومیت بیشتری دارند (۱۲). توانایی و قدرت تشخیص افتراقی RFLP-PGRS در شناسایی تیپ‌های ژنتیکی *م. بوویس* حتی بالاتر از توانایی روش *MIRU-VNTR* شناخته شده است (۱۳). به نظر می‌رسد استفاده از روش‌های MIRU-VNTR و اسپولیگوتایپینگ بر نمونه‌های باکتری‌های جداشده در این پژوهش بتواند اطلاعات بهتری را دربارهٔ ساختار ژنتیک جمعیت این پاتوژن‌ها در استان قم فراهم کند.

References

(1) Tadayon K., Mosavari N., Feizabadi M. An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran. *Iranian Journal of Microbiology*. 2013; 5(1): 1-13.

(2) Wright D.M, Reid N., Montgomery W.I., Allen A.R., Skuce R.A., Kao R.R. Herd-level bovine tuberculosis risk factors: assessing the role of low-level badger population disturbance. *Scientific reports* 2015; 5: 13062.

(3) Vial F., Miguel E., Johnston WT., Mitchell A., Donnelly CA. Bovine Tuberculosis Risk Factors for British Herds Before and After the 2001 Foot-and-Mouth Epidemic: What have we Learned from the TB99 and CCS2005 Studies. *Transboundary and Emerging Diseases.* 2015; 62(5):505-515.

(4) More SJ., Radunz B., Glanville RJ. Lessons learned during the successful eradication of bovine tuberculosis from Australia. *The Veterinary record* 2015; 177(9): 224-232.

(5) Goyal M., Lawn S., Afful B., Acheampong JW., Griffin G., Shaw R. Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *Journal of Infection* 1999; 38(3): 171-175.

(6) McLernon J., Costello E., Flynn O., Madigan G., Ryan F. Evaluation of *mycobacterial* interspersed repetitive-unit-variable-number tandem-repeat analysis and spoligotyping for genotyping of *Mycobacterium bovis* isolates and a comparison with restriction fragment length polymorphism typing. Journal of Clinical Microbiology. 2010; 48(12): 41-45.

(7) Mosavari N., Feizabadi M., Jamshidian M., Shahpouri M., Forbes K., Pajoohi R., et al. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle in Iran. *Veterinary Microbiology* 2011; 151(1-2): 148-152.

www.SID.ir

(8) Behr MA. Evolution of *Mycobacterium* tuberculosis. *Advances in experimental medicine and biology* 2013; 783: 81-91.

(9) Smith NH., Gordon S. de la Rua-Domenech R, Clifton-Hadley R, Hewinson R. Bottlenecks and broomsticks: the molecular evolution of *Mycobacterium*. *Nature reviews Microbiology* 2006, 9(4): 670- 681.

(10) Smith NH., The global distribution and phylogeography of Mycobacterium bovis clonal complexes. Infect Genet Evol Journal 2012; 12(4): 857-865.

(11) Smith NH., Berg S., Dale J., Allen A., Rodriguez S., Romero B., et al. European 1: a globally important clonal complex of Mycobacterium bovis. *Infect Genet Evol Journal* 2011; 11(6): 1340-1351.

(12) Ribeiro-Lima J., Enns E., Thompson B., Craft M., Wells S. From network analysis to risk analysis--An approach to risk-based surveillance for bovine tuberculosis in Minnesota, US. *Preventive Veterinary Medicine* 118(4): 328-340.

(13) Michel AL., Hlokwe T., Coetzee M., Maré L., Connoway L., Rutten V., et al. High Mycobacterium bovis genetic diversity in a low prevalence setting. *Veterinary Microbiology Journal* 2008; 126(1-3): 151-159.

[1]- N-acetyl-L-cysteine
[2]- Vansolinger
[3]- PCR master mix
[4]- O-ring
[5]- lysozyme
[6]- Proteinase K
[7]- Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
[8]- Digoxigenin
[9]- Dig antibody
[10]- (Cannon Laser BaseMF3110, Japan)
[11]- Clustered
[12]- Orphan
[13]- BCG-like
[14]- Mosavari
[15]- Horizontal gene transfer
[16]- Clonal complexes
[17]- Tadayon (no information)
[18]- Restriction Endonuclease
[19]- Restriction Fragment Length Polymorphism
[20]- Analysis Spoligotyping
[21]- Mycobacterial Interspersed Repetitive-unit-Variable-Number Tandem-Repeat (MIRU-VNTR) typing

www.SID.ir