مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـــی دانشـــگاه علـــوم پزشـــکی زنجـــان
دوره‌ی ۲٤, شماره‌ی ۱۰۷, بهمن و اسفند ۱۳۹۵, صفحات ۷۱ تا ۸۳

جداسازی *مایکوباکتریوم بویس* از مسلولین استان زنجان در سال ۱۳۹۲

مهدی دهقانپور[۱]، دکتر حمید باغچه سرایی[۲]، دکتر نادر مصوری[۳]، دکتر سعیده مظلوم‌زاده[۴]

نویسنده‌ی مسوول: گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان m.dehghanpour1983@yahoo.com

دریافت: ۹۴/۷/۸ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۲

چکیده

زمینه و هدف: *بیماری سل، از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان است که سازمان جهانی بهداشت، آن را به‌عنوان یک اورژانس جهانی اعلام کرده است. با وجود شناخت عامل این بیماری و وجود داروهای موثر برای درمان آن، هنوز این بیماری یک معضل جهانی است. هدف از این مطالعه جدا سازی و تعیین هویت سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با روش PCR-RD Typing در مسلولین استان زنجان و شناسایی موارد سل زئونوز می‌باشد.*

روش بررسی: *در این مطالعه تعداد ۲۷ نمونه کشت مثبت سال ۱۳۹۲ از مرکز بیماری‌های ریوی و سل استان زنجان دریافت شد و روی محیط‌های کشت لوین اشتاین جانسون گلیسیرین‌دار و پیروات دار مجددا تکثیر گردید. DNA جدایه‌ها به روش Van Soolingen استخراج و برای تایید جنس مایکوباکتریوم آزمون PCR-16SrRNA و تعلق به گروه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس PCR-IS6110 و تعیین گونه توسط PCR- RD Typing (RD1, RD4, RD9, RD12) انجام شد.*

یافته‌ها: *از ۲۷ جدایه، تمامی جزء جنس مایکوباکتریوم و متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند که ۲۵ جدایه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۲ جدایه مایکوباکتریوم بویس بودند.*

نتیجه‌گیری: *نتیجه‌ی به دست آمده از این مطالعه نشان می‌دهد که گونه‌های مایکوباکتریوم بویس در مسلولین استان زنجان وجود دارد که دلیلی بر زئونوز بودن بیماری سل و انتقال آن از حیوان به انسان می‌باشد و این زنگ خطری برای گسترش سویه‌های حیوانی در جامعه می‌باشد. برای همین در مواقع کار بر روی نمونه‌های انسانی مشکوک به سل، باید مسئله‌ی جداسازی سویه‌های زئونوز قابل انتقال از حیوان به انسان را مد نظر قرار داد.*

واژگان کلیدی: ***کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، PCR-RD Typing***

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۲- دکترای تخصصی میکروب شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی و ویروس شناسی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۳- دکترای تخصصی میکروب شناسی، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماری‌زای دام، استادیار موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی کرج، کرج
۴- دکترای تخصصی اپیدمیولوژی، دانشیار مرکز تحقیقات عوامل اجتماعی موثر بر سلامت، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

مقدمه

بیماری سل، از شایع‌ترین بیماری‌های عفونی در جهان می‌باشد. با این همه به نظر می‌رسد که بیماری سل تا سال ۲۰۲۰ هنوز هم جزء یکی از ده بیماری همه‌گیر باقی بماند موضوع مهم در مورد بیماری سل، چگونگی کنترل و پیشگیری آن است (۳-۱). با وجود معرفی آنتی‌بیوتیک‌های ضد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، بیماری سل هنوز به‌عنوان یک عامل تهدید کننده‌ی سلامتی مطرح بوده و تا به امروز، جزو یکی از بیماری‌های خطرناک منجر به مرگ محسوب می‌شود. در سال‌های اخیر شیوع توبرکلوزیس در سراسر جهان افزایش یافته است (۳و۲).

عامل بیماری سل، باسیل‌هایی از جنس مایکوباکتریوم بوده که باکتری‌هایی هوازی، داخل سلولی و اسید فاست می‌باشند (٤). مایکوباکتریوم‌ها را بر اساس تفاوت‌های بنیادی در اپیدمیولوژی و بیماری به دو گروه اصلی تقسیم می‌کنند: آن‌هایی که به کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تعلق دارند و آن‌هایی که مایکوباکتریوم‌های غیر توبرکلوزیس نامیده می‌شوند (٥). کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شامل تعدادی از معروف ترین 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 و در سطح نوکلئوتید ۹۹/۹ درصد مشابه هستند و تفاوت آن‌ها بیشتر در پلی‌مورفیسم توالی‌های بزرگ ژنی (Large Sequence Polymorphism) می‌باشد (٦). این تشابه بسیار زیاد باعث می‌شود که تشخیص افتراقی و تفسیر آن‌ها با روش‌های بیوشیمیایی مرسوم آزمایشگاهی مشکل باشد (۷).

اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شامل گونه‌های *مایکوباکتریوم‌های توبرکلوزیس*، میکروتی، آفریکانوم، بویس، بویس ب ث ژ، کانتی، کاپری، پنی پدی و مونژی می‌باشند. *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* عامل اصلی سل انسانی است که اولین بار توسط رابرت کخ در سال ۱۸۸۲ معرفی گردید (۸) و انسان مهم‌ترین مخزن این باکتری می‌باشد. *مایکوباکتریوم بویس* عامل سل گاوی است که می‌تواند سبب بروز بیماری در انسان و سایر گونه‌های پستانداران گردد. سل گاوی در انسان که به سل زئونوتیک معروف می‌باشد عموما از طریق مصرف شیر غیر پاستوریزه و یا گوشت آلوده و نیز از طریق استنشاق ذرات آلوده، به انسان منتقل می‌شود. موارد سل انسانی ناشی از *مایکوباکتریوم بویس* در کشورهای توسعه یافته بسیار محدود می‌باشد (۹). در بسیاری از کشورهای در حال توسعه از جمله آفریقا، سل گاوی به‌عنوان یک تهدید جدی بهداشت عمومی و اقتصادی کشورها می‌باشد (۱۰). بیشتر عفونت‌های *مایکوباکتریوم بویس*، بیماری‌های خارج ریه بوده و کمتر ریوی می‌باشد. سل گاوی در حیات وحش اولین بار در سال ۱۹۲۹ در آفریقای جنوبی گزارش گردید (۱۱). همان‌گونه که بیان شد سل یک بیماری عفونی است که در اثر مجموعه مایکوباکتریوم‌های سلی ایجاد می‌شود و بیماری در اکثریت موارد ناشی از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* حاصل می‌گردد (۱۲).

امروزه محققان در تلاش برای پیدا کردن ابزاری برای کنترل شیوع این بیماری هستند، یکی از ابزارهای بسیار قدرتمند برای کنترل این بیماری، تکنیک‌های مولکولار اپیدمیولوژی است که برای تشخیص، تعیین هویت و تیپ بندی کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* استفاده می‌شود (۱۳). با شناسایی گونه جدایه (جدایه‌های) مورد بررسی می‌توان نسبت به کنترل و تشخیص دیگر سویه‌ها و یا گونه‌های تازه، اقدام سریع‌تر و مناسب‌تری انجام داد. یکی از این تکنیک‌ها، PCR-RD Typing بر پایه نواحی متغیر می‌باشد. بررسی‌های مقایسه‌ای بر روی ژنوم کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بیانگر تعدادی مناطق ژنومی متغیر بین اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشد. در سال ۲۰۰۲ موستووی

با مقایسه‌ی سویه واکسینال *مایکوباکتریوم بویس ب ث ژ* با سویه‌ی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* H37Rv متوجه کوتاه‌تر بودن ژنوم سویه‌ی گاوی و شناسایی ۱۶ منطقه‌ی ژنتیکی گردید که به نام "منطقه‌ی حذف شده" معروف شدند (۱۴). مطالعات بعدی نشان داد که وجود و یا فقدان این مناطق ژنتیکی از نظر تکاملی معنادار و هدفمند صورت گرفته که بر اساس آن می‌توان سیر تکاملی گونه‌های حال حاضر در کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از یک نمونه‌ی اجدادی بیان نمود (۱۵).

وارن و همکاران نیز در سال ۲۰۰۶، Multiplex PCR را طراحی کردند که بر اساس ۴ سری پرایمر ۳ تایی و بر پایه حضور یا عدم حضور لوکوس‌های RD1, RD4, RD9, RD12 می‌توان به‌راحتی اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از هم تفکیک کرد (۱۶). در مطالعه‌ی ما نیز از این تکنیک استفاده شد ولی به‌دلیل عدم وضوح و نزدیکی اندازه‌ی باندها در Multiplex PCR و ایجاد سردرگمی در شناسایی جدایه‌ها، از PCR های منفرد استفاده گردید.

روش بررسی

در این مطالعه ۲۷ نمونه کشت مثبت بیماران مسلول در طی سال ۱۳۹۲ از مرکز بیماری‌های ریوی و سل استان زنجان دریافت شد. سپس از نمونه‌های مذکور در دو محیط کشت لوین اشتاین جانسون گلیسیرینه و پیروات دار کشت مجدد تهیه شد. با روش استاندارد ون سولینگن، DNA تمام نمونه‌ها استخراج گردید. در ادامه، DNA های استخراجی مورد ارزیابی کمی توسط دستگاه نانودراپ، و ارزیابی کیفی با انجام الکتروفورز، قرار گرفتند. جهت تایید نمونه‌ها از لحاظ جنس باکتری و دسته بندی آن‌ها در گروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، به‌ترتیب آزمون‌های PCR-16SrRNA و PCR-IS6110 انجام پذیرفت.

شناسایی جنس مایکوباکتریوم: جهت اثبات جدایه‌ها در جنس مایکوباکتریوم، از آغازگرهای 16SrRNA (۱۷) بر اساس حضور قطعه ۵۴۳ جفت بازی روی ژل آگارز استفاده شد. مواد متشکله برای این PCR، در هر میکروتیوب شامل ۸ میکرولیتر Master Mix 2x (آمپلیکون- دانمارک)، ۱ میکرولیتر آغازگر (غلظت ۵ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (غلظت ۵ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر)، ۴ میکرولیتر آب مقطر استریل و ۲ میکرولیتر DNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر)، که حجم نهایی هر واکنش ۱۶ میکرولیتر بود، استفاده گردید.

شناسایی اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*: جهت اثبات جدایه‌ها در گروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از آغازگرهای IS6110 (INS1,INS2) (۱۸)، بر اساس حضور قطعه در جایگاه ۲۴۵ جفت بازی استفاده شد. در این آزمون هم از مقادیر مورد استفاده در آزمون PCR-16SrRNA استفاده شد.

شناسایی گونه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*: بررسی‌های مقایسه‌ای بر روی ژنوم کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بیانگر تعدادی مناطق ژنومی متغیر بین اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* می‌باشد که لوکوس‌های حذف شده اختصاصی محدود به گونه یا تحت گونه در بین تمامی اعضای کمپلکس وجود دارد که بر طبق این نواحی می‌توان اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از هم تفکیک کرد. در این ضمینه برای اثبات قرارگیری جدایه‌ها مورد مطالعه در گروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، با استفاده از آزمون PCR- RD Typing، که بر پایه چهار سری آغازگر (RD1, RD4, RD9, RD12) سه تایی می‌باشد اعضای این گروه را مورد شناسایی قرار می‌دهیم (جدول ۱). مواد متشکله برای این PCR، در هر میکروتیوب شامل ۸ میکرولیتر Master Mix 2x (آمپلیکون- دانمارک)، ۱ میکرولیتر آغازگر پیشرونده (غلظت ۵ میلی‌مولار در هر میلی‌لیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر معکوس (غلظت ۵ میلی مولار

در هر میلی‌لیتر)، ۱ میکرولیتر آغازگر میانی (غلظت ۵ میلی‌مولار در هر میلی لیتر)، ۳ میکرولیتر آب مقطر و ۲ میکرولیتر DNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم به ازای هر میکرولیتر)، که حجم نهایی هر واکنش ۱۶ میکرولیتر بود.

جدول ۱: الگوریتم ترکیبی تشخیص اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بر مبنای متد Warren

آغازگر	توالی (۳'→۵')	M. canettii	M. tuberculosis	M. africanum	M. microti	M. pinnipedii	M. caprae	M. bovis	M. bovis BCG
پیشرونده	AAGCGGTTGCCGCCGACC	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Present (146 bp)	RD1 Absesent (196 bp)
میانی	CTGGCTATATTCCTGGGC								
معکوس	CCGG GAGGCGATCTGGCGGTT TGGGG								
پیشرونده	CAAGTTGCCGTTTCGAGC	RD4 Present (172 bp)	RD4 Present (172 bp)	RD4 Present (172 bp)	RD4 Present (172 bp)	RD4 Present (172 bp)	RD4 Present (172 bp)	RD4 Absesent (268 bp)	RD4 Absesent (268 bp)
میانی	C TGTACTATGCTGACCCAT								
معکوس	GCG AAAGGAGCACCATCGTC CAC								
پیشرونده	GGGAGCCCAGCATTTAC	RD9 Present (235 bp)	RD9 Present (235 bp)	RD9 Absesent (108 bp)	RD9 Absesent (108 bp)	RD9 Absesent (108 bp)	RD9 Absesen t (108 bp)	RD9 Absesent (108 bp)	RD9 Absesent (108 bp)
میانی	CTC CAATGTTTGTTGCGCTGC								
معکوس	GCTACCCTCGACCAAGT GTT								
پیشرونده	GGGAGCCCAGCATTTAC	RD12 Present (369 bp)	RD12 Present (369 bp)	RD12 Present (369 bp)	RD12 Present (369 bp)	RD12 Present (369 bp)	RD12 Absesen t (306 bp)	RD12 Absesent (306 bp)	RD12 Absesent (306 bp)
میانی	CTC GTGTTGCGGGAATTACTC								
معکوس	GG AGCAGGAGCGGTTGGAT ATTC								

یافته‌ها

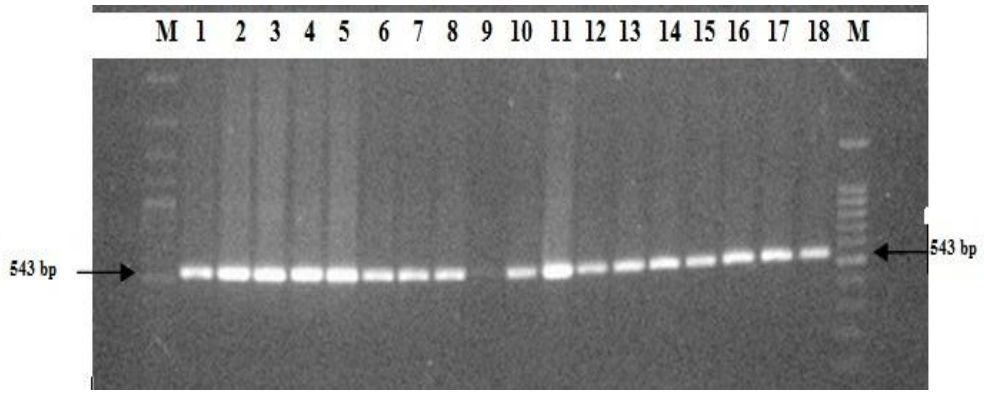
در این تحقیق ۲۷ جدایه استان زنجان در سال ۱۳۹۲ مورد مطالعه قرار گرفت که شامل ۱۱ زن و ۱۶ مرد با میانگین سنی ۵۷/۵ سال، ۱۹ مورد (۷۰/۴ درصد) شهرنشینی و ۸ مورد (۲۹/۶ درصد) روستا نشینی، ۲۲ نمونه خلط (۸۱/۵ درصد)، ۴ نمونه لاواژ معدی (۱۴/۸ درصد) و ۱ مورد نمونه مجهول (۳/۷ درصد) بودند. از ۲۷ جدایه، ۲۵ جدایه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و ۲ جدایه *مایکوباکتریوم بویس* حاصل شد که از دو جدایه *مایکوباکتریوم بویس*، یک مورد مربوط به یک زن ۴۸ ساله با نمونه لاواژ معدی مثبت ساکن شهر و دیگری مربوط به یک مرد ۸۳ ساله با نمونه خلط مثبت که او هم ساکن شهر بود (جدول ۲).

جدول ۲: مشخصات اپیدمیولوژیکی بیماران

ردیف	سن	محل سکونت	جنس	نوع آزمایش	شماره پایان نامه‌ای
۱	٤٨	روستا	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ01
۲	٦٢	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ02
۳	٥٨	شهر	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ03
٤	٥٢	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ04
٥	٦٨	شهر	مرد	بال مثبت	HPZ05
٦	٤٣	روستا	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ06
۷	٤٨	شهر	زن	بال مثبت	HPZ07
۸	١٥	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ08
۹	٣٢	شهر	مرد	خلط اسمیر منفی	HPZ09
۱۰	٨٣	شهر	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ10
۱۱	٤٥	شهر	مرد	خلط اسمیر مثبت-بال مثبت	HPZ11
۱۲	٧٧	شهر	مرد	خلط مثبت	HPZ12
۱۳	٧٩	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ13
١٤	٦٠	روستا	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ14
١٥	٧٩	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ15
١٦	٧٨	روستا	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ16
۱۷	٣٢	شهر	زن	خلط مثبت	HPZ17
۱۸	٥٦	شهر	مرد	بال مثبت	HPZ18
۱۹	٣٥	شهر	زن	خلط اسمیر مثبت	HPZ19
۲۰	٧١	روستا	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ20
۲۱	٧٨	روستا	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ21
۲۲	٦٠	روستا	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ22
۲۳	٥٢	روستا	زن	خلط اسمیر مثبت- بال مثبت	HPZ23
٢٤	٤٨	شهر	مرد	خلط کشت مثبت	HPZ24
٢٥	٦٣	شهر	مرد	خلط کشت مثبت	HPZ25
٢٦	٦٤	شهر	مرد	خلط اسمیر مثبت	HPZ26
۲۷	٦٢	شهر	مرد	بال مثبت	HPZ27

نتایج PCR جهت تشخیص جنس مایکوباکتریوم: در این روش PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی 16SrRNA و مشاهده‌ی یک باند الکتروفورز به اندازه‌ی ۵۴۳ جفت باز، نشان دهنده‌ی این بود که همگی ۲۷ نمونه متعلق به باکتری

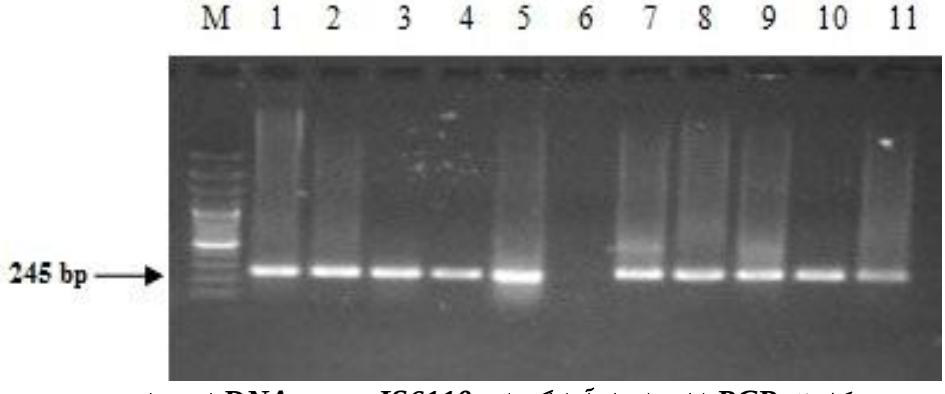
جنس مایکوباکتریوم بودنـد و از سـویه C *مایکوباکوبـاکتریوم توبرکلوزیس* به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید (شکل ۱).



شکل ۱: PCR با استفاده از آغازگرهای 16SrRNA بر روی DNA استخراج شده.

ستون M: اندازه‌ی مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱-۷: جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ستون ۸: جدایه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به‌عنوان کنترل مثبت، ستون ۹: نمونه‌ی کنترل منفی، ستون‌های ۱۰-۱۸: جدایه‌های مایکوباکتریایی

نتایج PCR جهت تشخیص اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*: در این روش با بررسی باند ۲۴۵ جفـت بـازی جدایـه‌هـا روی ژل الکتروفـورز، تمـامی ۲۷ نمونـه در گـروه کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قرار گرفتند و از سویه‌ی C *مایکوباکوباکتریوم توبرکلوزیس* بـه‌عنـوان نمونـه‌ی کنتـرل مثبت استفاده گردید (شکل ۲).

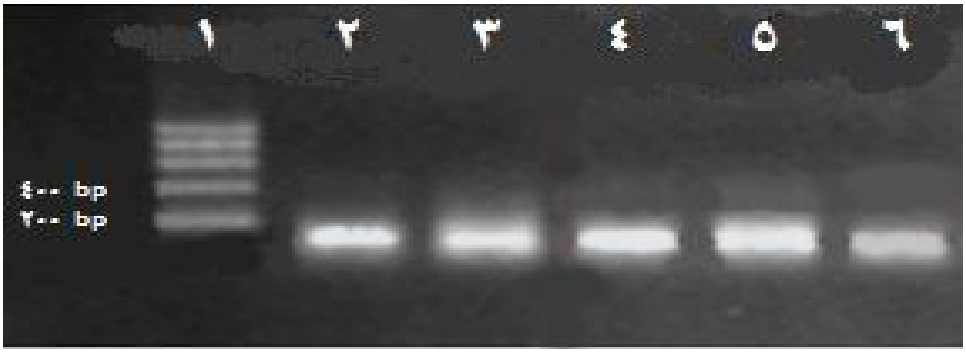


شکل ۲: PCR با استفاده از آغازگرهای IS6110 بر روی DNA استخراج شده

ستون M: اندازه‌ی مارکر ۱۰۰ جفت بازی، ستون‌های ۱-۵: جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، ستون ۶: نمونه‌ی کنترل منفی، ستون ۷: جدایه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به‌عنوان کنترل مثبت، ستون‌های ۸-۱۱: جدایه‌های مایکوباکتریایی

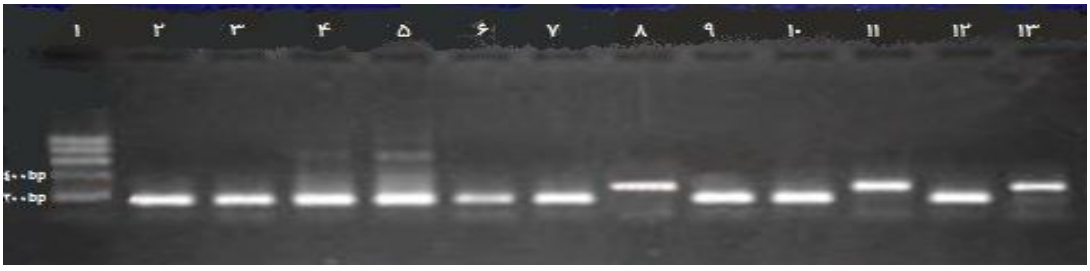
نتـایج PCR جهـت تـشخیص گونـه‌هـای کمـپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*: حضور این مارکر با اندازه‌ی ۱۴۶ جفت باز بـرای شناسـایی اعـضای کمـپلکس مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس به جز مایکوباکتریوم بویس BCG که با سـایز ۱۹۶ جفت باز مشخص می‌گردد، استفاده می‌شود. این تـست بر روی کلیه ۲۷ جدایه انجام شد و در تمامی نمونه‌هـا سـایز

۱۴۶ جفت بازی مشاهده گردید و موردی غیر از این سایز (*مایکوباکتریوم بویس* BCG) مشاهده نشد (شکل ۳).



شکل ۳: PCR با استفاده از آغازگرهای RD1 بر روی DNA استخراج شده
ستون ۱: اندازه مارکر ۲۰۰ جفت بازی زوج، ستون ۲: جدایه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به عنوان کنترل مثبت، ستون ۳: نمونه HPZ01، ستون ۴: نمونه HPZ07، ستون ۵: نمونه HPZ10، ستون۶: نمونه HPZ11

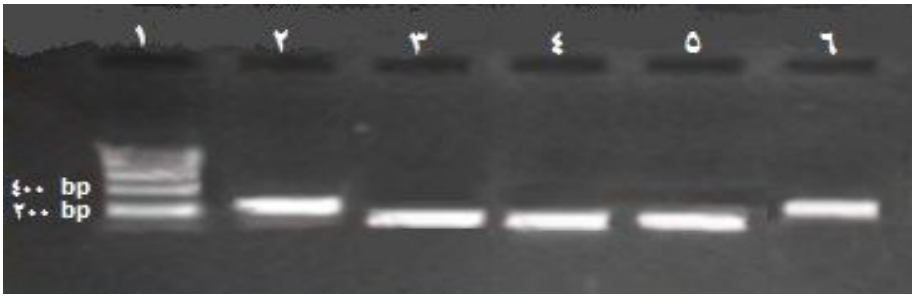
با بررسی حضور این مارکر با اندازه‌ی ۱۷۲ جفت باز برای اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به جز *مایکوباکتریوم بویس* و *مایکوباکتریوم بویس BCG* (سایز ۲۶۸ جفت بازی) مشاهده گردید که از بین ۲۷ جدایه، ۲۵ جدایه سایز ۱۷۲ جفت باز را نشان دادند اما در دو نمونه با کدهای HPZ07 و HPZ10 سایز ۲۶۸ جفت بازی مشاهده شد. که نشان دهنده‌ی وجود دو جدایه *مایکوباکتریوم بویس* یا *مایکوباکتریوم بویس BCG* گردید (شکل ۴).



شکل ۴: PCR با استفاده از آغازگرهای RD9 بر روی DNA استخراج شده
ستون ۱: اندازه مارکر ۲۰۰ جفت بازی زوج ستون ۲: جدایه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به عنوان کنترل مثبت، ستون‌های ۳- ۷: جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تحقیق، ستون ۸: نمونه HPZ07، ستون‌های ۹- ۱۰: جدایه‌های مایکوباکتریایی، ستون ۱۱: نمونه HPZ10، ستون۱۲: جدایه مایکوباکتریایی، تون۱۳: جدایه استاندارد مایکوباکتریوم بویس سویه AN5

در بررسی نمونه‌ها با این مارکر با اندازه‌ی ۲۳۵ جفت باز برای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم کانتی* و بقیه‌ی اعضای کمپلکس با سایز ۱۰۸ جفت باز مشخص می‌گردد که مشاهده شد از بین ۲۷ جدایه، ۲۵ جدایه سایز

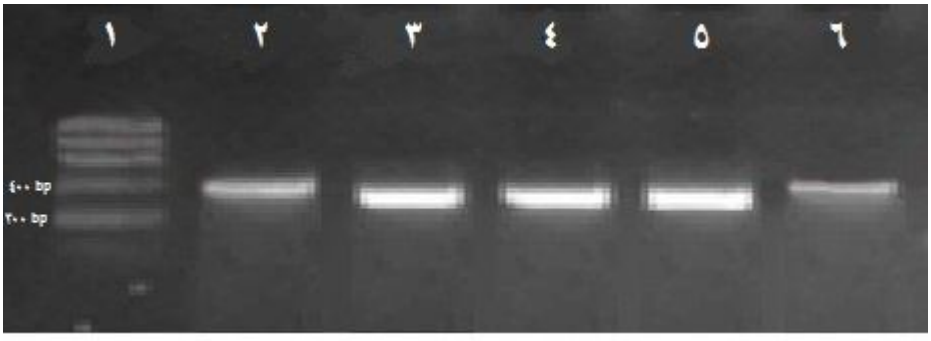
۲۳۵ جفت بازی و دو نمونه با کدهای HPZ07 و HPZ10 سایز ۱۰۸ جفت بازی مشاهده شد که نشان دهنده‌ی این بود که این دو نمونه یکی از *مایکوباکتریوم‌های افریکانوم*، بویس، بویس BCG، میکروتی، کاپری و پنی پدی می‌باشد و بقیه‌ی نمونه‌ها *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* یا *مایکوباکتریوم کانتی* می‌باشد و با توجه به نتایج قبلی آزمون‌های RD مدعی حضور ۲۵ جدایه‌ی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و دو جدایه‌ی *مایکوباکتریوم بویس* گردید (شکل۵).



شکل ۵: PCR با استفاده از آغازگرهای RD9 بر روی DNA استخراج شده

ستون ۱: اندازه‌ی مارکر ۲۰۰ جفت بازی زوج، ستون ۲: جدایه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به‌عنوان کنترل مثبت، ستون ۳: جدایه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم بویس سویه AN5، ستون ۴: نمونه HPZ07، ستون ۵: نمونه HPZ10، ستون ۶: نمونه HPZ01.

این مارکر با اندازه‌ی ۳۶۹ جفت باز، برای شناسایی اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و در *مایکوباکتریوم بویس* و *مایکوباکتریوم بویس* BCG با سایز ۳۰۶ جفت بازی را و عدم حضور این ژن در *مایکوباکتریوم کانتی* استفاده می‌گردد. که در این آزمون از بین ۲۷ جدایه، ۲۵ نمونه سایز ۳۶۹ جفت بازی و دو نمونه با کدهای HPZ07 و HPZ10 سایز ۳۰۶ جفت بازی مشاهده شد و این لوکوس تست‌های قبلی را مجددا تایید نمود (شکل ۶).



شکل ٦: PCR با استفاده از آغازگرهای RD12 بر روی DNA استخراج شده

ستون ۱: اندازه‌ی مارکر ۲۰۰ جفت بازی زوج، ستون ۲: جدایه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه C به‌عنوان کنترل مثبت، ستون ۳: جدایه‌ی استاندارد مایکوباکتریوم بویس سویه AN5، ستون ٤: نمونه HPZ07، ستون ٥: نمونه HPZ10، ستون ٦: جدایه مایکوباکتریایی

با توجه به‌نتایج حاصل از آزمون‌های PCR بالا، دو جدایه‌ی HPZ07 و HPZ10، *مایکوباکتریوم بویس* بودند و بقیه‌ی جدایه‌ها *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* هستند. همچنین نتایج آزمون‌های PCR بالا با مطالعه و بررسی نحوه‌ی رشد جدایه‌ها بر روی هر دو محیط کشت لوین اشتاین جانسون گلیسیرین دار و محیط کشت لوین اشتاین جانسون پیروات دار مطابقت داشت، به‌نحوی که جدایه‌های *مایکوباکتریوم بویس* در محیط لوین اشتاین جانسون پیروات دار بهتر از محیط لوین اشتاین جانسون گلیسیرین‌دار رشد کردند و برعکس جدایه‌های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* روی محیط لوین اشتاین جانسون گلیسیرین‌دار بهتر از محیط لوین اشتاین جانسون پیروات دار رشد کردند.

بحث

سل گاوی در انسان که به سل زئونوتیک معروف می‌باشد، عموما از طرق مصرف شیر غیر پاستوریزه و یا گوشت آلوده و نیز از طریق استنشاق ذرات آلوده، به انسان می‌تواند منتقل شود. در مطالعه‌ی منجم زاده و همکاران روی گله گاوهای ایران، به وجود *مایکوباکتریوم بویس* به‌صورت اندمیک تقریبا در تمام استان‌های کشور اشاره شده است (۱۹).

در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۲ توسط تاکاهاشی با روش PCR-IS6110 و RFLP-IS6110 انجام شد، انتقال *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بین یک شخص با بیماری ریوی و یک سگ بررسی شد. در واقع با استفاده از این روش مشخص شد که سگ عامل انتقال توبرکلوزیس به انسان بوده است و سگ‌های بیمار قابلیت انتقال توبرکلوزیس به انسان را دارند و می‌توانند به‌عنوان منبع انتقال توبرکلوزیس به انسان مطرح باشند (۲۰). در این مطالعه نیز وجود دو جدایه‌ی *مایکوباکتریوم* بویس و جدا شدن آن‌ها از نمونه‌های انسانی نشان دهنده‌ی این واقعیت است که بیماری سل از طریق یک منبع حیوانی به انسان منتقل شده است 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.

در یک مطالعه که در سال ۲۰۰۷ توسط هریس و همکاران به دلیل شیوع عفونت توبرکلوزیس در پنیرهای آلوده به مایکوباکتریوم تهیه شده در مکزیک انجام شد، ۲۰۳ نمونه از پنیرهای آلوده تهیه و کشت شدند که از یکی از نمونه‌ها *مایکوباکتریوم بویس* جدا شد. در این مطالعه الگوی *مایکوباکتریوم بویس* جداشده از پنیرهای آلوده با استفاده از دو روش RFLP-IS6110 واسپولیگوتایپینگ با الگوهای گاوهای وارداتی از مکزیک مورد مقایسه قرار گرفت که این الگوها دارای شباهت بالایی بودند و با استفاده از روش RFLP-IS6110 تمام نمونه‌های جدا شده تنها یک سکانس IS6110 را داشتند (۲۱). در سال ۲۰۰۵ انجمن پزشکی-دامپزشکی امریکا مطالعه‌ای در مورد نقش انتقال *مایکوباکتریوم بویس* به انسان از طریق شیر، گوشت و آئروسل‌های آلوده از حیوانات عفونی، انجام دادند و بیان کردند که *مایکوباکتریوم بویس* در بیشتر کشورهای جهان وجود دارد اما در افریقا، *مایکوباکتریوم بویس* از ۱۷ کشور گزارش شده است (۲۲).

در اطلاعیه‌ی رسمی سازمان بهداشت جهانی درباره بیماری توبرکلوزیس ناشی از *مایکوباکتریوم بویس* در حیوانات ۱٤ کشور از ٥٦ کشور افریقایی، ۳۰ کشور معیارهای کنترلی برای این بیماری را اعمال کردند (۲۳). در بیش از ۵۰ درصد گاوها و لبنیات مصرفی در کشورهایی که معیارهای کنترلی در مورد سل زئونوتیک اعمال نمی‌شود، *مایکوباکتریوم بویس* وجود دارد که در این باره سازمان بهداشت جهانی اطلاعیه‌ای منتشر نمود که در آن ۹۰ درصد انسان‌ها در افریقا، در کشورهایی که کمترین کنترل را در مورد سل گاوی در میان

لبنیات گاوی و گوسفندی دارند، زندگی می‌کنند (۲۴). همچنین در یک گزارش بین المللی، به انتقال *مایکوباکتریوم بویس* به انسان در کشورهای مصر، نیجریه، تانزانیا، زامبیا و زئیر اشاره شده است (۲۵). در کل به خاطر ضعف بهداشتی در کنترل بیماری و اصول پرورش و نگهداری دام در بیشتر کشورهای افریقایی، این معضل همچنان باقی و به‌عنوان یکی از کانون‌های سل انسانی و دامی مطرح می‌باشد. با توجه به اهمیت ویژه *کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در موارد سل، بسیاری از انواع گونه‌های مایکوباکتریوم می‌توانند موجب ظاهرات بالینی در انسان شوند که وفور این گونه موارد در ایران پیش از این توسط محققین دیگر مورد توجه و تاکید قرار گرفته است (۲۹-۲۶) که به این ترتیب شناسایی این موارد از اهمیت درمانی برخوردار می‌باشد. در ایران از میان اعضای *کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، آلودگی انسان تنها به *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* (۳۱و ۳۰)، *مایکوباکتریوم بویس* (۱۹) و *مایکوباکتریوم بویس BCG* (۲۰و۱۹) گزارش گردیده است. در مطالعه‌ی یعقوبی (۳۲) با روش RFLP-IS6110 و سلیمان پور (۳۳) با روش PCR-RFLP برای Oxy R، در نمونه‌های مورد مطالعه شان ۲ جدایه‌ی *مایکوباکتریوم بویس* جداسازی گردید و در مطالعه‌ی دیگری که مظفری (۳٤) بر روی ۱۲٤۲ نمونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از ۲۴ استان با روش Spoligotyping انجام داد ۴ مورد جدایه *مایکوباکتریوم بویس BCG* و ۶ مورد جدایه *مایکوباکتریوم بویس* جداسازی نمود. تمامی نمونه‌های این مطالعه بر روی هر دو محیط کشت لوین اشتاین جانسون گلیسیرین‌دار و پیروات دار، کشت داده شدند که نتایج خوبی به دست آمد و نتیجه‌ی آن جدا شدن دو جدایه‌ی *مایکوباکتریوم بویس* از دو بیمار مسلول بود و این نتیجه با نتایج تحقیقات گذشته یعقوبی (۳۲)، سلیمان پور (۳۳) و مصوری (۳۵) که در مطالعات خود از هر دو محیط استفاده کرده بودند مطابقت داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد با توجه به اینکه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* عامل اصلی سل در مسلولین می‌باشد اما با توجه به جداسازی *مایکوباکتریوم بویس* از مسلولین استان زنجان انتقال عامل بیماری سل از حیوان به انسان امکان پذیر می‌باشد و با استفاده از یک روش ساده و قابل دسترس بر پایه PCR، می‌توان *مایکوباکتریوم بویس* عامل سل گاوی و سایر گونه‌های اعضای *کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را از مسلولین جداسازی و تفریق داد. لذا پیشنهاد می‌گردد با توجه به نتایج حاصل از این گونه مطالعات، بهتر است نتایج در اختیار مراکز مرتبط قرار گیرد تا تصمیمات مقتضی در جهت کنترل و پیشگیری از انتقال توبرکلوزیس صورت گیرد.

References

1- Getahun H, Matteelli A, Abubakar I. et al. Management of latent mycobacterium *tuberculosis* infection: WHO guidelines for low tuberculosis burden countries. *Eur Res J*. 2015; 46: 1563-76.

2- Selgelid MJ. Ethics, tuberculosis and globalization.*Public Health Ethics*.2008; 1: 10-20.

3- Shorten RJ. The molecular epidemiology of Mycobacterium tuberculosis in north London: *UCL*. 2011.

4- Al-Hajoj SA, Zozio T, Al-Rabiah F, et al. First insight into the population structure of *mycobacterium tuberculosis* in Saudi Arabia. *J Clin Microbiol*. 2007; 45: 2467-73.

5- Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al.

Novel *mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emer Infec Dis*. 2010; 16: 1296-9.

6- Salek S, Emami H, Masjedi MR, Velayati AA. Epidemiologic status of tuberculosis in Golestan province. *Tanaffos*. 2008; 7: 63-8.

7- Alcaide F, Coll P. Advances in rapid diagnosis of tuberculosis disease and anti-tuberculous drug resistance. *Enfermedades Infecciosasy Microbiol Clín*. 2011; 29: 34-40.

8- Daniel TM. The history of tuberculosis. *Resp Medic*. 2006; 100: 1862-70.

9- Nastasee S. Zoonotic tuberculosis in Africa. *Med J Therapeut Africa*. 2008; 1: 53-8.

10- Ayele W, Neill S, Zinsstag J, Weiss M, Pavlik I. Bovine tuberculosis: an old disease but a new threat to Africa. *Int J Tuberc and Lung Dis*. 2004; 8: 924-37.

11- Lantos Á, Niemann S, Mezősi L, et al. Pulmonary tuberculosis due to *mycobacterium bovis* in Captive Siberian Tiger. *Emer Infec Dis*. 2003; 9: 1462-69.

12- Stewart GR, Newton SM, Wilkinson KA, et al. The stress-responsive chaperone a-crystallin 2 is required for pathogenesis of *mycobacterium tuberculosis. Mole Microbiol*. 2005; 55: 1127-37.

13- Maguire H, Dale J, McHugh T, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995–7 showing low rate of active transmission. *Thorax*. 2002; 57: 617-22.

14- Mostowy S, Cousins D, Brinkman J, Aranaz A, Behr MA. Genomic deletions suggest a phylogeny for the *mycobacterium tuberculosis* complex. *J Infec Dis*. 2002; 186: 74-80.

15- Medeiros L, Marassi C, Duarte R, da Silva M, Lilenbaum W. Comparison of decontamination methods for primary isolation of *mycobacterium bovis* in paucibacillary bovine tissues. *Letters in App Microb*. 2012; 54: 182-6.

16- Warren R, Gey van Pittius N, Barnard M, et al. Differentiation of *mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc and Lung Dis*. 2006; 10: 818-22.

17- Goude R, Parish T. Electroporation of mycobacteria. *mycobacteria Protocols: Springer*; 2009; 203-15.

18- Pym AS, Brodin P, Brosch R, Huerre M, Cole ST. Loss of RD1 contributed to the attenuation of the live tuberculosis vaccines *Mycobacterium bovis BCG* and *Mycobacterium microti*. *Mole Microbiol*. 2002; 46: 709-17.

19- Monajemzadeh M, Shahsiah R, Zarei A, et al. Frequency of bacille calmette-guerin (bcg) and *mycobacterium tuberculosis* in tissue biopsy specimens of children vaccinated with bcg. *American J Clin Pathol*. 2010; 133: 102-6.

20- Takahashi M. Molecular epidemiology of *Mycobacterium tuberculosis* using by RFLP analysis between genomic DNA--its accomplishment and practice. *Tuberculosis*. 2003; 78: 641-51.

21- Harris NB PJ, Bravo D, Osorio R, et al. Recovery of *mycobacterium bovis* from soft fresh

cheese originating in Mexico. *App Env microbiol*. 2007; 73: 1025-8.

22- K OR. Teasing out *mycobacterium bovis*' role in the *tuberculosis crisis. J Am Vet Assoc*. 2005; 227: 871-78.

23- Müller B, Dürr S, Alonso S, et al. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans. *Emer Infec Dis.* 2013; 19: 899-908.

24- De la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis*. 2006; 86: 77-109.

25- Akhavan R, Meshkat Z, Khajekaramadini M, Meshkat M. Eight-year study of *mycobacterium tuberculosis* in Mashhad, northeast of Iran. *Iranian J Pathol*. 2013; 8: 73-80.

26- Hashemi A, Shojaei H, Heidarieh P, Aslani MM, Naser AD. Genetic diversity of Iranian clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis. New Microbio*. 2012; 35: 61-5.

27- Shojaei H, Heidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, Naser AD. Species identification of neglected nontuberculous mycobacteria in a developing country. *Japanese J Infec Dis*. 2011; 64: 265-71.

28- Tabarsi P, Baghaei P, Farnia P, et al. Nontuberculous mycobacteria among patients who are suspected for multidrug-resistant tuberculosis-need for earlier identification of nontuberculosis mycobacteria. *The American J Med Sci*. 2009; 337: 182-4.

29- Shojaei H, Rahimi-Hajiabadi H, Heidarieh P, et al. Molecular microbiological investigation of post-vaccination bacille Calmette-Guérin infection in Iranian patients. *Int J Tuber and Lung Dis*. 2011; 15: 1497-504.

30- Velayati A, Farnia P, Boloorsaze M, et al. *mycobacterium bovis* infection in children in the same family: transmission through inhalation. *Monaldi Archives for Chest Dis*. 2007; 67: 169.

31- Tadayon K, Mosavari N, Feizabadi MM. An epidemiological perspective on bovine tuberculosis spotlighting facts and dilemmas in Iran, a historically zebu-dominant farming country. *Iranian J microbiol*. 2013; 5: 1-13.

32- Yaghoubi S, Mosavari N, Moradi BS, et al. Molecular typing of *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated from patients in Markazi Province. *Iran South Med J*. 2014; 17: 602-611

33- Soleimanpour S MN, Asl DH, Tadayon K, et al. Zoonotic tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*, central province, Iran. *J Lung Pulm Res*. 2015; 2: 54-7.

34- Mozafari M, Farnia P, Afraei M, Derakhshani-Nezhad Z, Masjedi MR, Velayati AA. Molecular diversity of *Mycobacterium tuberculosis* strains indifferent provinces of Iran. *Iranian J of microbiol.* 2013; 5: 366-73.

35- Mosavari N, Feizabadi MM, Jamshidian M, et al. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle in Iran. *Vet Microbiol*. 2011; 151: 148-52.

Isolation of *Mycobacterium Bovis* from Tuberculosis Patients in Zanjan Province (2013)

Dehghanpour M[1], Baghcheh Saraee H[1], Mosavari N[2], Mazloom Zadeh S[3]

[1]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Razi Vaccine and Serum Research Institute, Reference Laboratony for Bovine Tuberclusis, Kraj, Iran

[3]Zanjan Social Determinants of Health Research Center, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Corresponding Author: Dehghanpour M, Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: m.dehghanpour1983@yahoo.com

Received: 30 Sep 2015 **Accepted:** 10 Apr 2016

***Background and Objective*:** Tuberculosis (TB) is amongst the common infectious diseases in the world so that the World Health Organization (WHO) has declared it as a global emergency as well as an extremely contagious disease. Although the cause of the disease and its therapy are well known, TB is considered as a global dilemma. The present study was set to isolate and identify *Mycobacterium Tuberculosis Complex* by PCR-RD typing from TB patients in Zanjan province and to verify cases of zoonotic tuberculosis.

***Materials and Methods*:** In this study, 27 positive samples were collected from center of pulmonary diseases and tuberculosis in Zanjan Province during 2013 and were grown on Lowenstein–Jensen medium (LJP and LJG). DNA was extracted from the bacterial isolates by Van Solengen method and at genus level identification was done by PCR-16SrRNA. To confirm the *mycobacterium tuberculosis complex*, PCR-IS6110 was used. Identification of species was performed by PCR-RD typing (RD1, RD4, RD9 and RD12).

Results: A total of 27 isolates were obtained which were identified as genus Mycobacterium belonging to *Mycobacterium tuberculosis complex*. Twenty five of the isolates were *Mycobacterium tuberculosis* while 2 isolates were identified as *M.bovis.*

Conclusion: The results of the study indicates that *M.bovis* species is present among the human TB cases in Zanjan province, which indicates the zoonotic potential of the species and the possible transmission of the species from animals to humans. These results might be alarming owing to the spread of the bovine strains among the human subjects. Thus, it is essential that during research on suspected human TB cases, the zoonotic species capable of transmission from animal to human be considered.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis complex, Mycobacterium bovis, Mycobacterium tuberculosis, PCR-RD typing