

## جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از موش‌های موجود در یک دامداری دارای راکتور سلی استان تهران

خشیار منصوری<sup>۱</sup>، نادر مصوری<sup>۲</sup>، مهدی بابائی<sup>۳</sup>، شجاعت دشتی‌پور<sup>۴</sup>

- ۱- دکترای حرفه‌ای دامپزشکی، دانشکده دامپزشکی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، سمنان، ایران
  - ۲- دانشیار میکروبیولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
  - ۳- کارشناس ارشد بیوشیمی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
  - ۴- کارشناس ارشد بیوتکنولوژی، آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۵/۱۷

### چکیده

کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، عامل بیماری سل می‌باشد که باعث عوارض و مرگ و میر به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. بررسی احتمال سرایت مایکوباکتریوم به حیواناتی مانند موش حائز اهمیت می‌باشد، چرا که در اثر انتقال باکتری به موش، جمعیت موش‌های آلوده در دامداری زیاد می‌شود و امکان حذف کل جمعیت دامی واحد را فراهم می‌سازد. از این رو، ابزار انگشت نگاری DNA برای بهبود تشخیص سل توسعه یافته‌اند و از تکنیک‌های تاپینگ مولکولی برای تشخیص و پیگیری گسترش آن استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم از موش‌های موجود در دامداری‌های دارای راکتور سلی بود. پنج عدد موش از گاوداری آلوده به مایکوباکتریوم بوویس در سال ۱۳۹۷ انتخاب شدند. جهت بررسی وجود مایکوباکتریوم، نمونه‌ها در محیط لوین‌اشتاین-جانسون کشت داده شدند. برای تعیین هویت جدایه‌ها از تکنیک PCR براساس قطعه 16S rRNA و IS6110 استفاده گردید. در نهایت، با استفاده از RD-تاپینگ گونه مایکوباکتریوم تعیین هویت شد. با کشت نمونه‌ها و بررسی لام حاصل از آن مشخص شد که پنج موش آلوده با مایکوباکتریوم بودند. PCR برای 16S rRNA و IS6110 به ترتیب باند ۵۴۳ و ۲۴۵ جفت‌باز را نشان داد که تعلق جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را اثبات نمود. تکنیک RD-تاپینگ وجود مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در جدایه‌ها را تایید کرد. از این مطالعه نتیجه‌گیری شد که حیواناتی مانند موش می‌توانند باعث انتقال گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به فارم‌ها و سایر موجودات زنده شوند.

**کلمات کلیدی: سل، موش، مایکوباکتریوم، RD-تاپینگ، RFLP-PCR**

\*نویسنده مسئول: نادر مصوری

**آدرس:** آزمایشگاه رفرانس سل گاوی، موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (تات)، کرج، ایران

پست الکترونیک: nmosavari@gmail.com

## مقدمه

سل یک بیماری مشترک بین انسان و دام است که سالانه باعث مرگ و میر بسیاری در سراسر جهان شده است و امروزه نیز یکی از معضلات بهداشت جهانی می‌باشد (۳). از آنجا که کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در انسان باعث بیماری می‌شود. بنابراین، تشخیص آنها بسیار حیاتی می‌باشد. گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شامل مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم BCG، مایکوباکتریوم میکروتی، مایکوباکتریوم افریکانوم، مایکوباکتریوم کانتی، مایکوباکتریوم کاپری، مایکوباکتریوم پنی‌پدی، مایکوباکتریوم مونثی، مایکوباکتریوم اورینگیس، مایکوباکتریوم سوریکاته هستند که کند رشد بوده و کلنی‌های آنها رنگدانه ندارند (۷). همچنین از نظر ژنومی در سطح نوکلئوتید ۹۹/۹ درصد شبیه به هم هستند و بیشترین تفاوت آنها در پلی مورفیسم توالی‌های بزرگ ژنی می‌باشد (۱۲). تقسیم‌بندی اعضاء کمپلکس بر اساس پاتوژنیستی، جغرافیای متفاوت، مقاومت و حساسیت به آنتی بیوتیک ها می‌باشد (۱).

سل گاوی در ایران هاپواندمیک بوده و کنترل آن محدود به گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی است و تنها بخش محدودی از گاوهای کل کشور تحت پوشش برنامه تست و کشتار می‌باشند. از طرفی نسبت بالایی از مسلولان انسانی مبتلا به شکل خارج ریوی سل هستند. به دلیل عدم ایجاد پاسخ در برخی از حالت‌های بیماری، شیوع و گسترش آن در سطح گله به شکل پنهان اتفاق است و در اثر انتقال باکتری توسط حیوانات کوچکی مانند موش بوده است. به طوری که اگر جمعیت موش های آلوده در دامداری زیاد گردد، در یک غفلت

ناگهانی امکان حذف کل جمعیت دامی واحد را فراهم می‌سازد (۱).

مایکوباکتریوم بویس عامل حدود ۳/۱ درصد سل انسانی، ۲/۱ درصد سل ریوی و ۹/۴ درصد سل غیر ریوی در جهان، می‌باشد (۵). گونه موش ول (Vol) و برخی از حیوانات وحشی مخزن بیماری سل می‌باشند و همین تعدد گونه ریشه‌کنی را با مشکل روبرو کرده است (۱، ۶ و ۱۴). کنترل سل بخصوص سل گاوی در کشور ما محدود به گاوداری‌های صنعتی و نیمه صنعتی است و تنها بخش محدودی از گاوهای کل کشور تحت پوشش برنامه تست و کشتار می‌باشند. شناسایی عوامل مؤثر مانند اندازه گله، سطح سواد دامدار، حصارکشی اطراف گاوداری، امکان ورود حیوانات وحشی به فارم، رفت و آمد آزادانه حیوانات اهلی (سگ و گربه) در فارم، وضعیت بهداشتی فارم و وجود موش، بر آلودگی گاوداری‌های تحت پوشش برنامه غربال‌گری حائز اهمیت است. در این راستا، افزایش همه جانبه برنامه غربال‌گری بر اساس فرضیات این تحقیق، اهرم‌های دیگر کنترل بیماری علاوه بر تأکید بر لزوم تداوم برنامه تست و کشتار (با در نظر گرفتن حداکثر ممکن جمعیت تحت پوشش) در مناطق اقلیمی مختلف توصیه می‌شود (۸).

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 است.

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ژنوم خود نواحی کد کننده و غیر کد کننده زیادی را از دست داده است که از این تغییرات به وجود آمده می‌توان برای شناسایی بین



نمونه‌های موش در دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

### کشت

به دلیل خطرناک بودن مایکوباکتریوم‌ها، کشت در آزمایشگاه رفرانس سل گاوی موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی کرج با سطح ۳ ایمنی زیستی و با استفاده از هود بیولوژیک با رعایت تمامی روش‌های صحیح میکروب‌شناسی و آزمایشگاهی (GLP) صورت گرفت. پس از انجام کشت تمام مواد آلوده ضدعفونی یا اتوکلاو شدند. ابتدا کبد، ریه و طحال از تمامی نمونه‌ها جداسازی شد و بعد از همگن‌شدن، آلودگی‌زدایی و خنثی‌سازی، بر روی محیط کشت لوین‌اشتاین-جانسون حاوی گلیسرین و پیرووات کشت داده شدند و سپس به مدت هشت هفته در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. با گذشت زمان انکوباسیون و ظاهرشدن به تدریج کلونی‌ها در سطح محیط‌های کشت، از تمامی کلونی‌ها لام تهیه شد و وجود باسیل‌های اسیدفست با روش ذیل نلسون توسط میکروسکوپ نوری مورد بررسی قرار گرفت (۱۱ و ۱۳).

### استخراج DNA

به روش ون‌سولینگن و همکاران DNA ژنومی نمونه‌های رشد یافته بدون هیچ گونه شکستگی استخراج شد (۱۵). در این روش ابتدا سوسپانسیون تهیه شده از کلونی‌های رشد یافته تحت اثر آنزیم لیزوزیم قرار گرفتند. سپس با استفاده از سدیم دودسیل سولفات و آنزیم پروتئیناز K پیکره باکتری تخریب و DNA باکتری آزاد شد. به هر میکروتیوب سدیم کلرید ۵ مولار و ستیل تری‌متیل-آمونیم بروماید اضافه شد. در مرحله بعد ایزوآمیل الکل-کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه گردید. سپس میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز رویی که حاوی DNA است به میکروتیوب جدید انتقال یافت. در ادامه

سویه‌های مختلف باکتری شناسایی شود. بنابراین برای آگاه شدن از خط سیر میکروارگانیزم و سویه‌ها می‌توان از تفاوت‌های ژنتیکی آنها استفاده نمود (۲). در این رابطه، می‌توان از روش‌هایی مانند RD-تایپینگ استفاده نمود. با بررسی‌های انجام گرفته، مشخص شده است که در ژنوم مایکوباکتریوم‌ها مناطقی به نام منطقه حذف شده (RD) وجود دارد که وجود یا فقدان این مناطق ژنتیکی از نظر تکاملی معنادار و به صورت هدفمند انجام می‌پذیرد و براساس آن می‌توان سیر تکاملی پیدایش گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از یک نمونه اجدادی بیان کرد. با انجام PCR و به کار گیری لوکوس‌های RD1، RD4، RD9 و RD12 امکان تشخیص افتراقی میان اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به صورت قطعی فراهم می‌گردد (۱۶).

امروزه تکنیک‌های جدید مولکولی زیادی وجود دارند که به شناسایی دقیق و متمایز نمودن جدایه‌های مایکوباکتریوم با ویژگی و حساسیت بالا کمک می‌کنند که در این میان می‌توان به روش‌های انگشت‌نگاری DNA یا آنالیز به روش پلی‌مورفیسم طولی قطعات محدود شونده (RFLP) اشاره کرد (۲). با استفاده از تکثیر ژن توسط قطعه IS6110 می‌توان عضویت آن‌ها را در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مشخص نمود. لذا هدف از این مطالعه جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم از موش‌های موجود در یک دامداری دارای راکتور سلی در استان تهران می‌باشد.

### مواد و روش‌ها

#### نمونه‌ها

نمونه‌ها شامل پنج عدد موش (رت وحشی) از دامداری آلوده به سل استان تهران بدست آمد که در سال ۱۳۹۷ تست توبرکولین گاوهای آن مثبت اعلام شده بود.

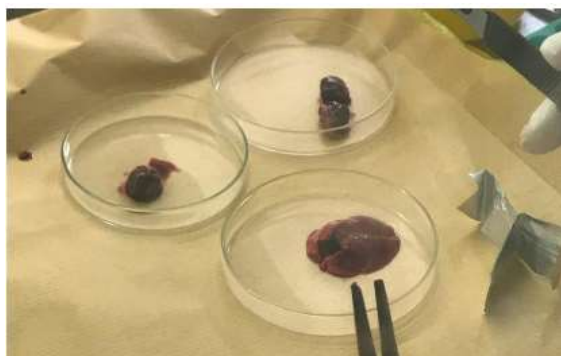


دقیقه پایان یافت. در آزمون‌های تعیین هویت، کنترل مثبت شامل مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و کنترل منفی مایکوباکتریوم/ویوم بود.

آزمون RD-typing جهت تمایز اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از نواحی متغیر RD که شامل چهار ناحیه RD1، RD4، RD9 و RD12 می‌باشند. توالی پرایمرها (۴ دسته ۳ تایی) و اساس کار به روش Warren انجام گرفت (۱۶).

#### یافته‌ها

جداسازی کبد، ریه و طحال تمامی نمونه‌ها با موفقیت انجام گرفت (شکل ۱). با کشت نمونه‌ها در محیط لوین اشتاین-جانسون مقادیر کافی از توده باکتری بدست آمد. رشد کلنی باکتری با ظاهری خشن، مومی، فاقد رنگدانه، مورد تأیید قرار گرفت (شکل ۲).



شکل ۱- جداسازی کبد، ریه و طحال تمامی نمونه‌های موش

با استفاده از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، مشخص گردید که ۵ نمونه کشت مثبت، به ترتیب متعلق به جنس مایکوباکتریوم (با بانندی در محدوده ۵۴۳ جفت باز؛ شکل ۳) و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (با بانندی در محدوده ۲۴۵ جفت باز؛ شکل ۴) بودند.

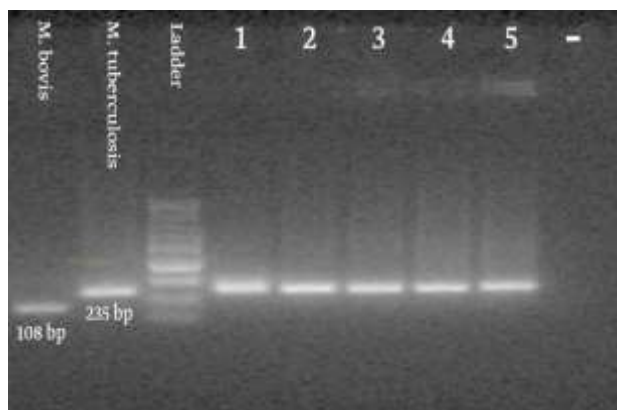
با استفاده از ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد سرد کلاف‌های DNA در کف میکروتیوب رسوب داده شد. در نهایت DNA استخراج شده برای استفاده در مراحل بعدی ذخیره شد. ارزیابی کیفی و کمی استخراج DNA، به ترتیب با استفاده از الکتروفورز (Bio-Rad, USA) و دستگاه نانودراپ (Thermo scientific nanodrop 1000, USA) انجام گرفت.

#### آزمون‌های تعیین هویت

برای اطمینان از لحاظ جنس و قرارگیری باکتری‌های جداشده در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110 استفاده شد (۱۵). تکثیر در ۳۰ چرخه، برای مراحل واسرشت سازی اولیه (۹۵ درجه سانتی گراد، ۱۰ دقیقه)، واسرشت سازی (۹۴ درجه سانتی گراد، یک دقیقه)، اتصال (۶۰ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) و طولیل سازی (۷۲ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) و طولیل سازی نهایی (۷۲ درجه سانتی گراد، یک دقیقه) صورت گرفت.

در آزمون RD-تایپینگ، هر میکروتیوب شامل هفت میکرولیتر مستر میکس (آمپلیکون)، یک میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده (با غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۵ پیکومول در هر میکرولیتر)، دو میکرولیتر DNA الگو (با غلظت ۳۵۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و ۱ میکرولیتر آب مقطر استریل با حجم نهایی در هر واکنش برابر با ۱۲ میکرولیتر بود. تکثیر در چرخه دمایی، با دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای واسرشت سازی اولیه شروع شد و با دمای واسرشت سازی ۹۴ به مدت یک دقیقه، دمای اتصال پرایمر ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و دمای طولیل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه ادامه یافت. این چرخه ۴۵ مرتبه تکرار شد و با دمای نهایی طولیل سازی ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰

با استفاده از آزمون RD9، مشخص گردید که ۵ نمونه مثبت، متعلق به جنس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (با باندی در محدوده ۲۳۵ جفت باز؛ شکل ۵) بودند.



شکل ۵- الکتروفورز محصول RD9 (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)

#### بحث و نتیجه گیری

سل یک بیماری مشترک می‌باشد و انسان علاوه بر مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌تواند در اثر آلودگی به مایکوباکتریوم بویس نیز به سل زئونوز 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 و به همین دلیل باید نقش حیواناتی مانند گاو یا موش را در انتقال بیماری مهم دانست (۲). علی‌رغم تلاش برای درمان و ریشه‌کنی سل، متأسفانه هنوز یک بیماری مهم عفونی در سطح جامعه انسانی می‌باشد.

میزان فراوانی سل در گله‌های گاو ایران در طول ۵۰ سال گذشته در نتیجه اجرای برنامه کنترل و به دلیل انجام تست و کشتار در گاوهای توبرکلین مثبت روند کاهشی داشته و از ۵ درصد در سال ۱۳۵۱ به ۰/۲ درصد در سال ۱۳۹۰ رسیده است (۸). میزان وضعیت بهداشتی در کشورهای مختلف را می‌توان از میزان آلودگی افراد آن



شکل ۲- کشت نمونه‌ها و ایجاد پرگنه‌های مربوط به رشد نمونه‌ها بر روی محیط لوین-اشتاین-جانسون



شکل ۳- الکتروفورز محصول PCR-16S rRNA (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)



شکل ۴- الکتروفورز محصول PCR-IS6110 (۱ تا ۵: نمونه‌های موش؛ کنترل مثبت: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس؛ کنترل منفی: مایکوباکتریوم اویوم، لدر: ۱۰۰ جفت بازی)

کشور به مایکوباکتریوم بوویس تشخیص داد (۸)، در انگلستان و اروپا به ترتیب این میزان ۵/۰ و ۴/۱ درصد (۵) و در آمریکای لاتین بین ۴۳/۰ و ۱ درصد بوده است (۴).

در سال‌های اخیر با استفاده از روش‌های PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، انتقال مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بین یک شخص با بیماری ریوی و یک حیوان بررسی شده است. در واقع 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 کند و در کاهش این بیماری موثر باشد (۱۰).

در مطالعه حاضر نیز با استفاده از روش PCR با تکثیر قطعه 16S rRNA و IS6110، مشخص گردید که ۵ نمونه کشت مثبت در موش، به ترتیب متعلق به جنس مایکوباکتریوم و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. در نهایت با استفاده از آزمون RD9، مشخص گردید که ۵ نمونه مثبت، متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند. در نتیجه با توجه به این نتایج می‌توان دامدارها و دامداری‌های آلوده را شناسایی کرد و از انتقال بیماری در بین افراد ممانعت نمود.

در مطالعه لونی و همکاران در سال ۲۰۱۷، نقش موش در حضور عامل سل در گاوداری‌های آلوده در استان خوزستان به اثبات رسید. آن‌ها با استفاده از تست توبرکولین، از تعداد ۴۰ کانون آلوده به سل گاوی ۱۶ نمونه موش از دامداری‌های آلوده به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انتخاب کردند و با

استفاده PCR توسط 16S rRNA جنس مایکوباکتریایی جدایه‌ها را تأیید نمودند. سپس با استفاده از قطعه الحاقی IS6110، تعلق جدایه‌ها به اعضاء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را مشخص کردند. لونی و همکاران، فقط عضو کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را تشخیص دادند و گونه مورد نظر را تعیین نکردند. اما در مطالعه حاضر علاوه بر هم‌خوانی نتایج با پژوهش آن‌ها، گونه مورد نظر (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) نیز با روش RD-تایپینگ تعیین شد (۸).

در مطالعه‌ای در سال ۱۹۳۷، توبرکولوزیس برای اولین بار در جوندگان وحشی کشف شد و همچنین در این مطالعه میزان شیوع مایکوباکتریوم میکروتی به میزان ۱۱ درصد در Bank vole، میزان شیوع ۲ درصدی در Wood mice و ۵/۱ درصدی در حشره خوارها به دست آمد (۲).

پالمر و همکاران در سال ۲۰۰۶، توانستند مشخص کنند که اپوسوم در انتقال مایکوباکتریوم بوویس نقش دارد و توانستند مایکوباکتریوم بوویس را در صاریخ، گورکن اروپایی، بوفالوی آفریقایی، گراز وحشی و آهوی دم سفید شناسایی کنند (۱۲).

ارگات و همکاران در سال ۲۰۱۳، توانستند مایکوباکتریوم بوویس را از طریق PCR- IS6110 و اسپولیگوتایپینگ (Spoligotyping) از نمونه بافتی و شیر گاو و بز جداسازی و تعیین هویت کردند (۵).

در ایران، بر روی ۱۵ عدد موش از دامداری آلوده به مایکوباکتریوم آزمایش انجام شد که مشخص شد سه عدد از جدایه‌ها آلوده به مایکوباکتریوم میکروتی و دو عدد از جدایه‌ها آلوده به مایکوباکتریوم کانزاسی می‌باشند (۹).





Tuberculosis in dairy farms covered by the tuberculin screening test: A herd level case control study. *Iranian Journal of Epidemiology*, 10: 15-24.

2. Alizadeh, K., Mosavari, N. and Nazari, R. (2018). Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex from rodents of infected cattle husbandry. *Veterinary Researches and Biological Products*, 31: 74-86. <https://doi.org/10.22092/vj.2017.110383.1302>
3. Barberis, I., Bragazzi, N.L., Galluzzo, L. and Martini, M. (2017). The history of tuberculosis: from the first historical records to the isolation of Koch's bacillus. *Journal of Preventive Medicine and Hygiene*, 58: 9-12. PMID: PMC5432783
4. Costello, E., O'Grady, D., Flynn, O., O'Brien, R., Rogers, M., Quigley, F., Egan, J. and Griffin, J. (1999). Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of *Mycobacterium bovis* infection. *Journal of Clinical Microbiology*, 37: 3217-3222. <https://doi.org/10.1128/JCM.37.10.3217-3222.1999>
5. Ereqat, S., Nasereddin, A., Levine, H., Azmi, K., Al-Jawabreh, A., Greenblatt, C.L., Abdeen, Z. and Bar-Gal, G.K. (2013). First-time detection of *Mycobacterium bovis* in livestock tissues and milk in the West Bank, Palestinian Territories. *PLoS neglected tropical diseases*, 7: 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002417>
6. Kipar, A., Burthe, S.J., Hetzel, U., Rokia, M.A., Telfer, S., Lambin, X., Begon, M. and Bennet, M. (2014). *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host,

در مطالعه دیگر که در ایران انجام گرفت، از ۱۰۰ عدد موشی که از دامداری آلوده به مایکوباکتریوم جدا شد ۶ عدد از آنها آلوده به مایکوباکتریوم بوویس بودند (۲). در مطالعه اکبرین و همکاران، مشخص شد که وجود موش در انتقال و آلودگی با مایکوباکتریوم بوویس در گله‌های گاو شیری نقش بسیار مهمی را ایفا می‌کند (۱).

### نتیجه گیری نهایی

در این مطالعه برای اولین بار مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از گاوداری آلوده به مایکوباکتریوم بوویس از طریق کبد، ریه و طحال جدا سازی شد. در این رابطه نقش موش در حضور عامل سل در گاوداری آلوده به اثبات رسید و مشخص گردید که این جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعلق دارد، لذا اهمیت نقش جوندگانی مانند موش در سل دامی و متعاقب آن در سل انسانی به اثبات رسید. در نهایت، می‌توان اظهار داشت که اثبات مخازن نگهداری باکتری‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در جوندگان از نظر بهداشت عمومی و خطر گردش بیماری سل بین جوندگان، حیوانات و انسان بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان از تمامی کسانی که در انجام این تحقیق آنها را یاری کردند، بخصوص اعضای آزمایشگاه رفرانس سل گاوی تشکر و قدردانی می‌کنند.

### تعارض منافع

بین نویسندگان تعارض در منافع گزارش نشده است.

### منابع

1. Akbarein, H., Bahonar, A., Bokaie, S., Mosavar, N., Rahimi-Foroushani, A., Sharifi, H., Makenali, A.S., Rokni, N.D., Marhamati-Khameneh, B. and Broumanfar, S. (2014). Determinants of bovine



11. Mosavari, N., Karimi, A., Tadayon, K., Shahhosseini, G., Zavarani Hosseini, A. and Babaie, M. (2021). Evaluation of heating and irradiation methods for production of purified protein derivative (PPD) of *Mycobacterium tuberculosis*. *Archives of Razi Institute*, 75: 439-449.  
<https://doi.org/10.22092/ari.2019.123082.1238>
12. Palmer, M.V. (2006). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. *Emerging Infectious Disease*, 12: 1306-1310.  
<https://doi.org/10.3201/eid1208.060526>
13. Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J. and Leonard, F.C. (2002). *Veterinary microbiology and microbial disease*. 2st Edition. Iowa State University Press: 44-56.
14. Tortoli, E., Gitti, Z., Klenk, H.P., Lauria, S., Mannino, R. and Mantegani, P. (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. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 401-411.  
<https://doi.org/10.1099/ijms.0.038737-0>
15. van Soolingen, D., de Haas, P.E., Kremer, K. (2001). Restriction fragment length polymorphism typing of mycobacteria. *Methods in Molecular Medicine*, 54: 165-203.  
<https://doi.org/10.1385/1-59259-147-7:165>. PMID: 21341076.
16. Warren, R.M., Gey van Pittius, N.C., Barnard, M., Hesselning, A., Engelke, E., de Kock, M., Gutierrez, M.C., Chege, G.K., Victor, T.C., Hoal, E.G. and van Helden, P.D. the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Veterinary Pathology*, 51: 903-914.  
<https://doi.org/10.1177/0300985813513040>
7. Lekko, Y. M., Ooi, P. T., Omar, S., Mazlan, M., Ramanoon, S.Z., Jasni, S., Jesse, F. and Che-Amat, A. (2020). *Mycobacterium tuberculosis* complex in wildlife: Review of current applications of antemortem and postmortem diagnosis. *Veterinary world*, 13, 1822-1836.  
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2020.1822-1836>. PMID: 33132593
8. Loni, R., Mosavari, N., Tadayon, K., Keshavarz, R., Ghaem-Maghamsi, S., Dashtipour, S. and Mohammad Taheri, M. (2017). Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria from rodents of infected cattle farms in Khuzestan province. *Journal of Veterinary Microbiology*, 13: 109-119.
9. Moradi, E., Mosavari, N., Tebianian, M., Tadayon, K., Ghaderi, R., Soleymani-Babadi, K., Mohammad Taheri, M., Dashtipour, S., Loni, R., Moradi Garavand, M., Keshavarz, P., Azarvandi, A. and Aref Pajoochi, R. Pest rodents as the essential elements of *Mycobacterium bovis* controlling programs. *International Journal of Mycobacteriology*, 4: 137-144.  
<https://doi.org/10.1016/j.ijmyco.2014.09.007>
10. Moravkova, M., Slany, M., Trcka, I., Havelkova, M., Svobodova, J., Skoric, M., Heinigeova, B. and Pavlik, I. (2011). Human-to-human and human-to-dog *Mycobacterium tuberculosis* transmission studied by IS6110 RFLP analysis: a case report. *Veterinárni Medicína*, 56: 314-317.





International Journal of  
Tuberculosis And Lung Disease, 10:  
818-822. PMID: 16850559  
17.

(2006). Differentiation of  
Mycobacterium tuberculosis  
complex by PCR amplification of  
genomic regions of difference. The



## **Isolation and identification of *Mycobacterium tuberculosis* from mice in a farm with tuberculosis reactor in Tehran province**

**Khashaiar Mansouri<sup>1</sup>, Nader Mosavari<sup>2</sup>, Mahdi Babaie<sup>3</sup>, Shojaat Dashtipour<sup>4</sup>**

1- PhD of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Garmsar Branch, Islamic Azad University, Garmsar, Semnan, Iran

2- Associate Professor of Microbiology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

3- Master of Biochemistry, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

4- Master of Biotechnology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

Received: 03 March 2021

Accepted: 07 August 2024

---

### **Abstract**

*Mycobacterium tuberculosis* complex, the agent of tuberculosis, causes morbidity and mortality particularly in developing countries. It is important to investigate the possibility of mycobacterium transmission to animals such as mice, because as a result of the bacterial transmission to mice, the population of infected mice increases in animal husbandry and makes it possible to eliminate the entire livestock population.

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 study was to isolate and identify of *Mycobacterium* from mice with tuberculosis reactors. Five mice are selected from a *Mycobacterium bovis*-infected farm in 2019. To investigate the presence of *Mycobacterium*, the samples are cultured in Löwenstein-Jensen medium. PCR technique based on 16S rRNA and IS6110 fragment is used to identity of the isolates. Finally, *Mycobacterium* species are identified using RD-typing. After examining the resulting slide from the cultured samples, it is found that five mice are infected with *Mycobacterium*. Results of 16S rRNA and IS6110 PCR analysis shows the presence of 543 and 245 bp bands respectively, which supports that the isolates belonged to the *Mycobacterium tuberculosis* complex. The RD-typing technique confirms the presence of *Mycobacterium tuberculosis* in isolates. Animals such as mice can transmit various species of *Mycobacterium tuberculosis* complex to other farm animals and living organisms.

**Keywords: Tuberculosis, Mice, *Mycobacterium*, RFLP-PCR, RD Typing**

---

\* Corresponding Author: Nader Mosavari

Address: Associate Professor of Microbiology, Reference Laboratory of Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran, E-mail: [nmosavari@gmail.com](mailto:nmosavari@gmail.com)