

جداسازی و تعیین هویت مولکولی *Mycobacterium* از حیوانات باغ وحش استان البرز

زهره احمدی^۱، نادر مصوری^{۲*}، مصطفی قادری^۳، علیرضا پردیس^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران.

۲- دانشیار، آزمایشگاه سل گاوی، بخش تحقیق و تولید توپرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

۳- استادیار و ویروس شناسی، گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد کرج، ایران.

۴- پژوهشگر، بخش تحقیق و تولید واکسن های باکتری های بی هوازی، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان

تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران.

دریافت: ۱۴۰۳/۰۶/۱۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۵

چکیده مبسوط

زمینه و هدف مطالعه: سل یکی از مهم ترین و قدیمی ترین بیماری های مشترک بین انسان و دام محسوب می شود و همچنان تهدیدی جدی برای سلامت عمومی به شمار می رود. گونه های مختلف کمپلکس *Mycobacterium tuberculosis* عامل ایجاد سل در انسان و حیوانات هستند. این مطالعه با هدف جداسازی و تعیین هویت گونه های *Mycobacterium* از نمونه های مدفوع حیوانات جمع آوری شده از باغ وحش های استان البرز در سال های ۱۳۹۹ تا ۱۴۰۰ انجام شد. **مواد و روش ها:** در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه مدفوع پس از آلودگی زدایی با دو روش هگزادسیل پیریدینیوم کلراید و سود نرمال مورد بررسی قرار گرفتند. از هر نمونه گسترش تهیه و رنگ آمیزی اسیدفست انجام شد. کشت در دو محیط لوانشتاین جانسون پیرووات دار و گلیسرین دار صورت گرفت. از نمونه های دارای رشد کلنی، استخراج DNA انجام و آزمون PCR برای شناسایی ناحیه 16SrRNA و سکانس الحاقی IS6110 به منظور تشخیص اعضای کمپلکس *M. Tuberculosis* اجرا گردید. جهت افتراق *M. Bovis* از سایر گونه ها، از آزمون PCR-RFLP ژن OxyR با آنزیم برشی AluI استفاده شد. **نتایج:** از مجموع ۴۰ نمونه مدفوع اخذ شده، ۲۹ مورد دارای رشد کلنی و ۱۱ جدایه دارای باسیل اسیدفست بودند. آزمون PCR وجود جنس *Mycobacterium* را در تمامی ۱۱ جدایه حاوی باسیل اسید فست تأیید کرد. از میان این جدایه ها، ۹ مورد به عنوان *Mycobacterium* های غیرسلی (NTM) و ۲ مورد به عنوان *M. Bovis* شناسایی شدند. به کارگیری روش های مولکولی مانند PCR و PCR-RFLP، امکان شناسایی سریع و دقیق گونه های بیماری زای کمپلکس *M. Tuberculosis* را فراهم می سازد. **نتیجه گیری:** شناسایی *M. Bovis* در حیوانات باغ وحش اهمیت ویژه ای در کنترل سل زئونوتیک دارد و لزوم ارتقای آگاهی بهداشتی در مراکز نگهداری حیوانات و بازدید کنندگان را گوشزد می کند.

کلمات کلیدی: سل، کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، *Mycobacterium bovis*، PCR-RFLP، باغ وحش، استان البرز.

* نویسنده مسئول: نادر مصوری

آدرس: دانشیار، آزمایشگاه سل گاوی، بخش تحقیق و تولید توپرکولین و مالئین، مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج

کشاورزی (AREEO)، کرج، ایران

پست الکترونیک: n.mosavari@rvsri.ac.ir

مقدمه

مایکوباکتریوم‌ها، باکتری‌های هوازی هستند که اسپور تولید نمی‌کنند و به دلیل دارا بودن دیواره سلولی پیچیده، در برابر ازدست‌دادن رنگ خود به وسیله اسید یا الکل مقاومت کرده و به همین دلیل باسیل‌های مقاوم به اسید نامیده می‌شوند (Sharma, 2010). مایکوباکتریوم‌های آتپیک در بیمارانی که سیستم ایمنی ضعیفی دارند، به‌عنوان یک بیماری‌زای فرصت‌طلب عمل کرده و ایجاد بیماری می‌کنند (Reller et al., 2001). جنس مایکوباکتریوم شامل بیش از ۲۸۰ گونه رسمی شناخته شده است که اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از شاخص‌ترین آنها بوده و حاوی گونه‌هایی است که می‌توانند ایجاد بیماری سل تیپیک در انسان و دام نمایند (Clarke et al., 2016). از معروف‌ترین گونه‌های مذکور می‌توان به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل سل در انسان، مایکوباکتریوم لپره عامل بیماری جذام و مایکوباکتریوم بوویس اشاره کرد. از این بین مایکوباکتریوم بوویس دارای بالاترین طیف میزبانی بوده و به صورت اولیه در خانواده گاوسانان ایجاد بیماری می‌نماید. مایکوباکتریوم بوویس اساساً عامل عفونی‌کننده گاوها است، اما در بعضی موارد، دیگر پستانداران از جمله انسان را نیز آلوده می‌کند.

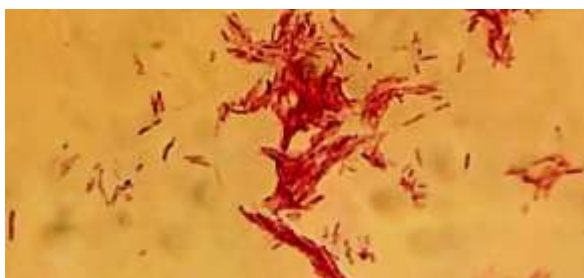
مایکوباکتریوم بوویس منتقله از حیوان به انسان از لحاظ علائم بالینی از بیماری ایجاد شده توسط مایکوباکتریوم توبرکلوزیس غیرقابل تشخیص است (Esteban and Muñoz-Egea, 2017). قبل از ظهور پاستوریزاسیون شیر، مایکوباکتریوم بوویس یکی از علل شایع سل در

انسان، به ویژه سل گوارشی در کودکان بود. این مطالعه بر جداسازی و بررسی مایکوباکتریوم از گونه‌های مختلف جانوری در باغ‌وحش استان البرز تمرکز دارد. سویه‌های مایکوباکتریوم بوویس جدا شده از گاو در حیوانات دیگر از جمله بز، میمون و فوک‌ها نیز شناسایی شده است که نشان می‌دهد این گونه به عنوان مخزن هم برای گاو و هم برای حیوانات حیات وحش عمل می‌کند. در هلند، عفونت مایکوباکتریوم بوویس در انسان عمدتاً از حیواناتی غیر از گاو منتقل می‌شود. تحقیقات قبلی شیوع متعدد مایکوباکتریوم بوویس را در بین حیوانات و انسان اثبات کرده است (Van Soolingen et al., 1994). مایکوباکتریوم بوویس پاتوژنی مهم بوده که دام‌ها و گونه‌های مختلف حیات وحش را در سطح جهان تحت تاثیر قرار می‌دهد. همچنین، به ویژه کسانی که در تماس نزدیک با حیوانات هستند، تهدید سرایت بین دام و انسان را به همراه دارند (Michel et al., 2010).

تقریباً یک‌چهارم جمعیت جهان حامل عفونت نهفته با *Mycobacterium tuberculosis* هستند. در سال ۲۰۲۳، حدود ۱۰/۸ میلیون مورد جدید سل فعال در سطح جهانی گزارش شده است که این آمار نشان‌دهنده بار پایدار و قابل توجه بیماری سل در سطح بین‌المللی است (Organization, 2024).

در هند که بیشترین تعداد موارد سل را دارد، مایکوباکتری‌های غیرسل (Non-Tuberculous Mycobacteria=NTM) اغلب در منابع طبیعی مانند آب، خاک و غذا یافت می‌شوند. این NTM‌ها می‌توانند





تصویر ۱ رنگ‌آمیزی زیل نلسون و حضور باسیل

اسیدفست

پس از آلودگی‌زدایی و کشت، نمونه‌ها در محیط لوانشتاین جانشون پیروات‌دار و گلیسرین‌دار در دمای 37°C انکوبه شدند. پس از انکوباسیون، نمونه‌ها تحت کشت مجدد و آماده‌سازی جهت رنگ‌آمیزی (تهیه لام) قرار گرفتند. از کلنی‌های رشد یافته که در رنگ‌آمیزی زیل-نلسون باسیل اسیدفست مشاهده شد (تصویر شماره ۱)، یک لوپ کامل باکتریایی رشد یافته به صورت آسپتیک برداشته و به یک میکروتیوب حاوی ۴۰۰ میکرولیتر بافر TE منتقل شد. برای جلوگیری از تشکیل آئروسول و آلودگی، پروتکل‌های ایمنی سختگیرانه رعایت شد. خالص‌سازی DNA با استفاده از ایزوآمیل الکل-کلروفرم مطابق روش ونسولینگن انجام شد (Figueroa-Bossi et al., 2022).

آزمون‌های تعیین هویت

برای تعیین هویت و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، تکثیر PCR با تکثیر شناسایی جنس 16SrRNA و برای گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس IS6110 انجام شد. پرایمرهای مورد استفاده به سفارش مؤسسه رازی از شرکت Eurofins آلمان تهیه شد (جدول شماره ۱).

از طریق ذرات گرد و غبار موجود در هوا منتقل شوند و خطرات زیست محیطی ایجاد کنند. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی سل دومین عامل مرگ و میر ناشی از بیماری‌های عفونی و دومین بیماری شایع در میان بیماران ایدز است (Khanna et al., 2023).

با جداسازی و شناسایی مایکوباکتری‌های بیماری‌زا در حیوانات باغ‌وحش، موارد شناسایی شده را می‌توان برای مدیریت مناسب به مقامات بهداشتی کشور گزارش کرد تا در صورت لزوم مدیریت لازم در این زمینه اتخاذ گردد. این مطالعه شامل جداسازی و شناسایی مولکولی گونه‌های مایکوباکتریوم از حیوانات باغ‌وحش استان البرز با استفاده از تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR-RFLP برای افتراق مایکوباکتریوم بوویس از سایر گونه‌های مایکوباکتریوم است.

مواد و روش‌ها

۴۰ نمونه مدفوع از باغ‌وحش‌های استان البرز جمع‌آوری شد و به آزمایشگاه مرجع بیماری‌های مایکوباکتریایی دام موسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی انتقال یافت. برای کنترل، از دو سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (ATCC 35810) و مایکوباکتریوم بوویس (ATCC 35726) استفاده شد.

سپس هر نمونه با استفاده از دو روش مجزای HPC و سود نرمال آلودگی‌زدایی شد. از جدایه‌ها در شرایط استریل گسترش تهیه شد و سپس اقدام به رنگ‌آمیزی با روش زیل-نلسون گردید.

جدول ۱. پرایمرهای مورد استفاده در PCR

Primer	Sequence (5'→3')
16SrRNA (f)	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C
16SrRNA (r)	TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A
IS6110 (f)	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C
IS6110(r)	ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C
oxyR(f)	5'-GGTGATATATCACACCATA-3'
oxyR(r)	5'-CTATGCGATCAGGCGTACTTG-3'

جدول ۱. جزئیات واکنش‌های PCR

PCR Reaction	PCR Master Mix (μl)	Primer Forward (5pm/ μl)	Primer Reverse (5pm/ μl)	Primer Intermediate (5pm/ μl)	DNA Template (μl)	PCR Water (μl)	DMSO (μl)	Total Volume (μl)
16SrRNA	8	1	1	-	2	4	-	16
IS6110	8	1	1	-	2	4	-	16
OxyR	8	1	1	-	2	4	-	16

استفاده می شود. الکتروفورز در ولتاژ ۸۶ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس ژل با محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۳ درصد رنگ آمیزی شد. برای مشاهده و تصویربرداری باندها از دستگاه ژل داک استفاده شد.

تجزیه و تحلیل FLP

پس از شناسایی باند هدف در محصولات PCR، از آنزیم AluI (German, Roche) برای برش محصول PCR استفاده شد. قطعه ۵۴۸ جفت باز ژن OxyR در مایکوباکتریوم بویس حاوی چهار محل برش برای آنزیم AluI است، در حالی که سایر مایکوباکتریومهای کمپلکس دارای سه محل برش هستند. در مجموع ۵ میکروگرم از محصول PCR در یک میکرو تیوب قرار

با استفاده از پروتکل PCR برای هر سه آغازگر (OxyR, 16SrRNA و IS6110) مشابه و شامل ۳۰ سیکل با مراحل زیر بود: واسرشت سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، واسرشت سازی در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، اتصال در دمای ۶۰ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، گسترش در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه، و یک دقیقه طویل سازی در دمای ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه صورت گرفت (جدول شماره ۲).

الکتروفورز محصولات PCR با استفاده از ژل آگارز ۱/۸ درصد انجام شد. یک نردبان (ladder) ۱۰۰-۱۰۰۰ جفت باز (German, Roche) برای تعیین وزن مولکولی





تصویر ۳. پرایمر 16SrRNA سایز M مارکر، ستون یک کنترل مثبت وستون دو، چهار، پنج، دوازده، هفت، نمونه‌های مثبت وستون شانزده کنترل منفی

از ۱۱ جدایه مایکوباکتریوم، ۲ نمونه با PCR توالی IS6110 مثبت شدند و کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را تایید کردند و ۹ جدایه NTM بود. ژن تکثیر شده با PCR قطعه ای از شبه ژن OxyR را نشان می‌دهند. (تصویر ۳).



تصویر ۴. مربوط به پرایمر IS6110: سایز M مارکر، ستون یک کنترل منفی، وستون سه، چهار، پنج، هفت نمونه‌های مثبت، ستون نه کنترل مثبت AN5

در دو جدایه حیوانی و سویه‌های استاندارد مورد مطالعه، باند مربوط به قطعه ۵۴۸ جفت باز مشاهده شد که تایید می‌کند که این دو جدایه متعلق به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس هستند (تصویر ۴).

در دو جدایه حیوانی و سویه‌های استاندارد مورد مطالعه، قطعه‌ای به طول ۵۴۸ جفت باز مربوط به ژن شبه OxyR مشاهده گردید که تعلق آن‌ها به کمپلکس *Mycobacterium tuberculosis* را تأیید نمود. پس از هضم با آنزیم محدودکننده AluI، در جدایه‌های *M.*

داده شد و با ۲ میکرولیتر آنزیم AluI تیمار شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد.

الکتروفورز محصولات RFLP

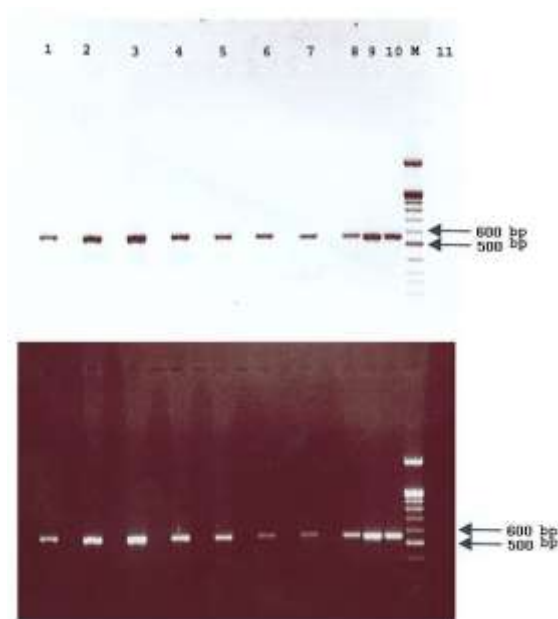
ژل آگارز ۱/۸٪ برای الکتروفورز محصولات RFLP تهیه شد. الکتروفورز با ولتاژ ثابت ۸۶ ولت به مدت ۵۵ دقیقه انجام شد. پس از الکتروفورز، ژل آگارز با محلول اتیدیوم پروماید ۰/۳٪ درصد رنگ آمیزی شد و باندها با استفاده از سیستم مستندسازی ژل مشاهده شدند. در این مطالعه از شبه ژن Oxy R مایکوباکتریوم‌ها استفاده شد. این شبه ژن حاوی ۵۴۸ جفت باز با استفاده از آغازگرهای فهرست شده در جدول (۱) تکثیر شد.

نتایج

در لام مستقیم هیچ یک از ۴۰ نمونه اخذ شده باسیل اسیدفستی مشاهده نگردید لیکن در محیط‌های کشت ۲۹ نمونه از ۴۰ نمونه کشت شده، کلنی قابل دیدن مشاهده گردید. لام مستقیم رنگ آمیزی با استفاده از تکنیک زیل-نلسون (اسیدفست)، که ۱۱ مورد دارای باسیل اسیدفست و مشخص گردید تمامی ۱۱ جدایه اسیدفست توسط PCR ناحیه 16SrRNA متعلق به جنس مایکوباکتریوم است. (تصویر ۱ و ۲).



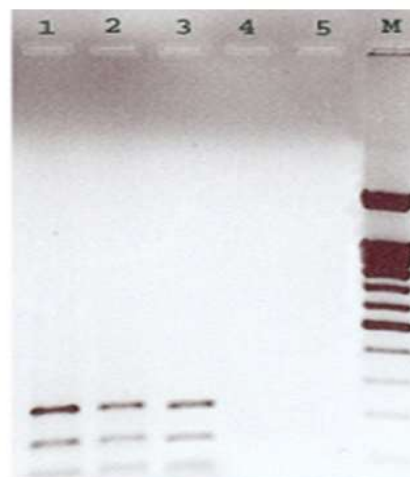
تصویر ۲. پرایمر 16SrRNA سایز M مارکر، ستون یک کنترل منفی، ستون نه کنترل مثبت، ستون سه و چهار و پنج و هفت نمونه‌های مثبت



bovis و *M. bovis* BCG سه باند با طول‌های تقریبی ۱۴۸، ۲۳۶ و ۷۹ جفت‌باز مشاهده شد (شکل ۵).

با این حال، در جدایه‌های *Mycobacterium tuberculosis* به علت عدم وجود باز گوانین در ناحیه نوکلئوتید ۲۸۵ از ژن شبه *OxyR*، یکی از محل‌های برش توسط آنزیم *AluI* شناسایی نشد و در نتیجه چهار قطعه به طول‌های تقریبی ۲۳۴، ۲۲۷، ۵۵ و ۳۰ جفت‌باز ایجاد گردید.

اما با توجه به شرایط الکتروفورز به کار گرفته شده در این مطالعه، تنها یک باند حدود ۲۳۰ جفت‌باز مشاهده شد که مربوط به دو قطعه‌ی ۲۳۶ و ۲۲۷ جفت‌باز بود. این نتایج نشان می‌دهد که روش PCR-RFLP ژن *OxyR* می‌تواند به‌طور مؤثر در افتراق *M. bovis* از سایر اعضای کمپلکس *M. tuberculosis* به کار رود و صحت روش به‌کاررفته در این مطالعه را تأیید می‌نماید.



تصویر ۳ ستون M ساین مارکر، ستون دو و سه نمونه مثبت نشخوارکننده به (مایکوباکتریوم بوویس)، ستون یک کنترل مثبت AN5

بحث

هیدروکسید سدیم (NaOH) یک ضدعفونی‌کننده قوی است که به طور مؤثر مواد موکوییدی را تجزیه کرده، از رشد آلاینده‌ها جلوگیری می‌کند و جداسازی مایکوباکتریوم‌ها از نمونه‌ها را تسهیل می‌کند و همچنین به امولسیون شدن نمونه‌ها کمک کرده و کارایی و پردازش آنها را افزایش می‌دهد و به دلیل ارزان بودن و در دسترس بودن گزینه‌ای مقرون به صرفه برای ضدعفونی است از سوی دیگر، HPC حساسیت و ویژگی بالایی را ارائه می‌دهد و امکان جداسازی و شناسایی دقیق اجزای مایکوباکتریایی را فراهم می‌کند و منجر به تشخیص و تجزیه و تحلیل دقیق‌تری می‌شود. ترکیب این دو روش کارایی و دقت تشخیص و آنالیز مایکوباکتریوم را به میزان قابل توجهی افزایش می‌دهد (Sattar et al., 2018).

روش رنگ آمیزی Ziehl-Neelsen همچنان یک ابزار تشخیصی راحت و پرکاربرد برای تشخیص مایکوباکتریوم است. این روش امکان شناسایی سریع مایکوباکتریوم‌ها را در زیر میکروسکوپ فراهم می‌سازد و نتایج سریع‌تری را ارائه می‌نماید که برای تشخیص و درمان به موقع بسیار مهم است که به ویژه در شرایطی که به دلیل محدودیت منابع که نیاز به تشخیص سریع است بسیار موثر است. این روش مقرون به صرفه و ساده است و نیازی به تجهیزات پیچیده یا آموزش گسترده ندارد و در شرایط مختلف مراقبت‌های بهداشتی در دسترس است. سادگی و مقرون به صرفه بودن این روش، کارآمدی و کاربردی بودن آن را جهت تشخیص عفونت‌های مایکوباکتریایی، به ویژه در مناطقی که دسترسی محدود به ابزارهای تشخیصی پیشرفته دارند، به اثبات رسانده است لیکن برای مشاهده گسترش دارای باسیل اسید فست مثبت نیاز به پنجاه تا یکصد هزار باسیل در هر میلی‌لیتر نمونه می‌باشد، به همین جهت و احتمالاً بدلیل کمبود باسیل اسید فست در نمونه اولیه، در لام اولیه هیچگونه باسیل اسیدفستی مشاهده نگردید (Zurac et al., 2022).

در شناسایی مایکوباکتریوم‌ها، روش‌های کشت عموماً حساس تر از تهیه لام و مشاهده میکروسکوپی هستند. روش‌های کشت می‌توانند حداقل ۱۰ تا ۱۰۰ باسیل زنده در هر میلی‌لیتر خلط را شناسایی کنند، در حالی که لام مستقیم به حداقل ۱۰^۴ تا ۱۰^۵ باسیل در میلی‌لیتر نیاز دارد (Campelo et al., 2021, Asare et al., 2024). استفاده از کشت، تشخیص باسیل اسیدفست را

در مقایسه با لام مستقیم به تنهایی ۳۰ تا ۵۰ درصد افزایش می‌دهد و در حال حاضر سیستم شناسایی مسلولین در تب انسانی (سیستم DOTs (Direct Observation Therapeutic System) از این روش پیروی می‌نماید. همچنین کشت امکان شناسایی گونه‌ها، آزمایش حساسیت دارویی و تعیین ژنوتیپ را فراهم می‌کند که برای درمان مؤثر و کنترل عفونت‌های مایکوباکتریایی حیاتی هستند. با این حال، اسلایدهای مستقیم نتایج سریع‌تری غالباً در عرض چند ساعت را ارائه می‌دهند که برای غربالگری اولیه در تشخیص موثرتر است (Mahana et al., 2016).

انجام آزمایش PCR نیز برای تشخیص عفونت‌های مایکوباکتریایی از جمله سل بسیار موثر است. PCR امکان تشخیص سریع و دقیق DNA مایکوباکتریومی را فراهم کرده و زمان تشخیص را در مقایسه با روش‌های کشت سنتی به میزان قابل توجهی کاهش می‌دهد و می‌تواند بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم غیرسل تمایز قائل شده که برای رویکردهای درمانی مناسب بسیار مهم است (Broccolo et al., 2003). PCR همچنین می‌تواند

سویه‌های مایکوباکتریوم‌های مقاوم به دارو را شناسایی و به مدیریت سل مقاوم به دارو کمک کند (Palomino, 2009). تکنیک PCR-RFLP نیز به دلیل قابلیت تکرارپذیری بالا و توانایی تشخیص تنوع ژنتیکی به ویژه برای شناسایی جنس‌ها و گونه‌های مایکوباکتریوم در کنار سایر روشها مناسب است و تمایز سریع و دقیق را در بین اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس



امکان پذیر می کند که برای کنترل موثر سل و برنامه های ریشه کنی ضروری است (Oryan et al., 2022).

در سال ۲۰۰۵، مالیک و همکارانش از Multiplex PCR برای شناسایی همزمان مایکوباکتریوم بویوس و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند و با امکان تشخیص پاتوژن های متعدد در یک سنجش، فرآیند تشخیصی را ساده کردند (Bakshi et al., 2005). در سال ۲۰۱۱، سانکار و همکاران از تکنیک PCR-RFLP برای بهبود تشخیص و درمان سل استفاده کرد که امکان شناسایی دقیق سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تسهیل رویکردهای درمانی هدفمند را فراهم نمود (Sankar et al., 2011). چاووهان و همکاران در سال ۲۰۰۵ یک روش Nested PCR را برای تمایز بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویوس ارزیابی کردند که حساسیت و توانایی بالقوه آن را برای تشخیص زودهنگام نشان داد (Kamra et al., 2022).

در مطالعه ای دیگر مصوری و همکاران (۲۰۰۸)، جدایه های گاوی مایکوباکتریوم بویوس را از جدایه های انسانی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران با استفاده از روش PCR-RFLP شناسایی نمودند. آنها جدایه های بالینی انسان، ۵۰ ایزوله گاو و پنج سویه استاندارد را تجزیه و تحلیل کردند. در این مطالعه قطعه کاذب OxyR توسط PCR تکثیر و با آنزیم AluI هضم شد. الگوهای برش حاصل سه قطعه برای مایکوباکتریوم بویوس و مایکوباکتریوم بویوس BCG و یک قطعه برای سایر مایکوباکتریوم ها نشان داد. این مطالعه تایید

کرد که روش PCR-RFLP می تواند به طور موثر انواع مختلف مایکوباکتریوم ها را شناسایی کند (Mosavari et al., 2008).

در مطالعه دیگری توسط علیزاده و همکاران، جداسازی و شناسایی مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از جوندگان در دامداری ها انجام شد. وجود مایکوباکتریوم از طریق کشت و آزمایش های مولکولی مختلف تأیید شد و خطر بالقوه انتقال از جوندگان آلوده به گاو را مشخص نمود. این مطالعه بر اهمیت نظارت بر انتشار مایکوباکتریوم در بین حیوانات، از جمله حیوانات باغ وحش، برای جلوگیری از شیوع بیماری تأکید نمود (علیزاده et al., 2018).

در سال ۲۰۰۸، Srivastava و همکارانش از آزمایشات بیوشیمیایی برای تشخیص سل در ۷۶۸ نمونه استفاده نموده و ۵۴ مورد مثبت را یافتند (Srivastava et al., 2008). طی ۵۰ سال گذشته بیماری سل در گله های گاو ایران به دلیل برنامه های کنترلی کاهش چشمگیری داشته است. شیوع مایکوباکتریوم بویوس در سطح جهانی متفاوت است و نرخ های متفاوتی در بریتانیا، اروپا و آمریکای لاتین مشاهده شده است.

نتیجه گیری

ادغام روشهای مولکولی با دیگر روشهای تشخیصی سنتی می تواند به طور قابل توجهی تشخیص و مدیریت سل را بهبود ببخشد. تشخیص سریع و دقیق برای کنترل شیوع سل بسیار مهم است، به ویژه در مناطقی که شیوع بیماری بالا است.



- Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Veterinary Microbiology*, **109**, 211-216.
4. BROCCOLO, F., SCARPELLINI, P., LOCATELLI, G., ZINGALE, A., BRAMBILLA, A. M., CICHERO, P., SECHI, L. A., LAZZARIN, A., LUSSO, P. & MALNATI, M. S. 2003. Rapid diagnosis of mycobacterial infections and quantitation of *Mycobacterium tuberculosis* load by two real-time calibrated PCR assays. *Journal of clinical microbiology*, **41**, 4565-4572.
 5. CAMPELO, T. A., CARDOSO DE SOUSA, P. R., NOGUEIRA, L. L., FROTA, C. C. & ZUQUIM ANTAS, P. R. 2021. Revisiting the methods for detecting *Mycobacterium tuberculosis*: what has the new millennium brought thus far? *Access Microbiol*, **3**, 000245.
 6. CLARKE, C., VAN HELDEN, P., MILLER, M. & PARSONS, S. 2016. Animal-adapted members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex endemic to the southern African subregion. *Journal of the South African Veterinary Association*, **87**, 1-7.
 7. ESTEBAN, J. & MUÑOZ-EGEA, M.-C. 2017. *Mycobacterium bovis* and other uncommon members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections*, 753-765.
 8. FIGUEROA-BOSSI, N., BALBONTÍN, R. & BOSSI, L. 2022. Preparing bacterial genomic DNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2022, pdb. prot107853.
 9. KAMRA, E., ALAM, D., SINGH, V., KUMAR, M., CHAUHAN, M. & MEHTA, P. 2022. Diagnosis of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* based on a 12.7-kb fragment by a single tube multiplex-PCR. *Veterinary Microbiology*, **109**, 211-216.
- برای حل چالش‌های موجود در بحث سل، سرمایه‌گذاری در تحقیق و توسعه تشخیص مولکولی مرتبط با این بیماری ضروری است. با اجرای تکنیک‌های تشخیصی بروز و نظارت دقیق مداوم، می‌توان مدیریت و پایش و درمان بیماری سل را افزایش داد. با این رویکرد نه تنها بهبود تکنیک‌های تشخیصی بیماران افزایش می‌یابد، بلکه به طور قابل توجهی به کاهش بروز سل در سطح جهانی کمک می‌کند. علاوه بر این، تقویت همکاری بین محققان، کادر درمان و سیاست‌گذاران در مدیریت نوآوری و اطمینان از به کارگیری روش‌های تشخیصی پیشرفته بسیار اهمیت دارد.
- منابع**
۱. عزیزاده، خ.، مصوری، م.، نظری، ع. (۱۳۹۷). جداسازی و تعیین هویت مولکولی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از جوندگان دامداری‌های آلوده به مایکوباکتریوم. تحقیقات دامپزشکی و فرآورده‌های بیولوژیک، **۳۱** (۱)، ۷۴-۸۶.
 2. ASARE, K. K., AZUMAH, D. E., ADU-GYAMFI, C. O., OPOKU, Y. K., ADELA, E. M., AFFUL, P., ABOTSI, G. K., ABBAN, E. A., DUNTU, P. E., ANYAMFUL, A., MOSES, A. B., BOTCHWAY, E., MWINTIGE, P., KYEI, S., AMOAH, L. E. & EKUMAN, E. O. 2024. Comparison of microscopic and xpert MTB diagnoses of presumptive mycobacteria tuberculosis infection: retrospective analysis of routine diagnosis at Cape Coast Teaching Hospital. *BMC Infectious Diseases*, **24**, 660.
 3. BAKSHI, C., SHAH, D., VERMA, R., SINGH, R. & MALIK, M. 2005. Rapid differentiation of



- cattle and humans. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, **82**, 101767.
16. PALOMINO, J. C. 2009. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **56**, 103-111.
17. RELLER, L. B., WEINSTEIN, M. P., HALE, Y. M., PFYFFER, G. E. & SALFINGER, M. 2001. Laboratory diagnosis of mycobacterial infections: new tools and lessons learned. *Clinical infectious diseases*, **33**, 834-846.
18. SANKAR, S., KUPPANAN, S., BALAKRISHNAN, B. & NANDAGOPAL, B. 2011. Analysis of sequence diversity among IS6110 sequence of *Mycobacterium tuberculosis*: possible implications for PCR based detection. *Bioinformation*, **6**, 283.
19. SATTAR, A., ZAKARIA, Z., ABU, J., AZIZ, S. A. & GABRIEL, R.-P. 2018. Evaluation of six decontamination procedures for isolation of *Mycobacterium avium* complex from avian feces. *PLoS One*, **13**, e0202034.
20. SHARMA, P. 2010. *Microbiology & Plant Pathology*, Rastogi Publications.
21. SRIVASTAVA, K., CHAUHAN, D., GUPTA, P., SINGH, H., SHARMA, V., YADAV, V., THAKRAL, S., DHARAMDHEERAN, J., NIGAM, P. & PRASAD, H. 2008. Isolation of *Mycobacterium bovis* & *M. tuberculosis* from cattle of some farms in north India-possible relevance in human health. *Indian Journal of Medical Research*, **128**, 26-31.
22. VAN SOOLINGEN, D., DE HAAS, P., HAAGSMA, J., EGER, T., HERMANS, P., RITACCO, V., urogenital tuberculosis by multiplex-nested PCR targeting mpt64 (Rv1980c) and IS6110: comparison with multiplex PCR and GeneXpert® MTB/RIF. *Letters in Applied Microbiology*, **75**, 857-868.
10. KHANNA, A., SAHA, R. & AHMAD, N. 2023. National TB elimination programme-what has changed. *Indian Journal of Medical Microbiology*, **42**, 103-107.
11. MAHANA, S., TOMAR, R., AGRAWAL, R., SAKSENA, R., MANCHANDA, V. & GUPTA, R. 2016. Tuberculous lymphadenitis: Comparison of cytomorphology, Ziehl-Neelsen staining, and rapid mycobacterial culture at a pediatric superspecialty hospital. *Cytojournal*, **13**.
12. MICHEL, A. L., MULLER, B. & VAN HELDEN, P. D. 2010. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not? *Veterinary microbiology*, **140**, 371-381.
13. MOSAVARI, SALEHI, TADAYON, MOHAMMAD TAHERI, SOAIMANI, AREF PAJOUHI, SEPEHRISERESHT & ALAVI 2008. Molecular differentiation between bovine *Mycobacterium bovis* isolates and human *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Iran through PCR-RFLP method and comparison with 5 standard strains. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, **2**, 1-7.
14. ORGANIZATION, W. H. 2024. *Global tuberculosis report 2024*, Geneva, World Health Organization.
15. ORYAN, A., YAZDI, H. S., ALIDADI, S. & DOOSTMOHAMMADI, S. 2022. Use of a gyrB PCR-RFLP method to diagnose tuberculosis and identify the causative *Mycobacterium* sp. in



POPP, C., NICHITA, L.,
CIOPLEA, M., CEACHI, B.,
STICLARU, L. & CIOROIANU, A.
2022. A new artificial intelligence-
based method for identifying
mycobacterium tuberculosis in
Ziehl–Neelsen stain on tissue.
Diagnostics, **12**, 1484.

ALITO, A. & VAN EMBDEN, J.
1994. Use of various genetic
markers in differentiation of
Mycobacterium bovis strains from
animals and humans and for
studying epidemiology of bovine
tuberculosis. *Journal of clinical
Microbiology*, **32**, 2425-2433.
23. ZURAC, S., MOGODICI, C.,
PONCU, T., TRĂSCĂU, M.,

Isolation and Molecular Identification of Mycobacterium from Zoo Animals in Alborz Province

Zohreh Ahmadi¹, Nader Mosavari^{*2}, Mostafa Ghaderi³, Alireza Pardis⁴

1. M.Sc. Student in Microbiology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

2. Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

3. Assistant Professor of Virology, Department of Microbiology, Faculty of Science, Islamic Azad University, Karaj Branch, Karaj, Iran.

4. Researcher, Anaerobic Bacterial Vaccine Research and Production Department, Razi Vaccine and Serum Research Institute,

Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Received: 24 January 2025

Accepted: 26 November 2025

Extended Abstract

Introduction: Tuberculosis (TB) is one of the most important and ancient zoonotic diseases that continues to pose a serious threat to public health. Various species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex are responsible for tuberculosis in humans and animals. Due to the pathogenic nature of these bacteria, precise identification, control, and preventive measures are crucial to prevent TB outbreaks in both animal and human populations. This study aimed to isolate and identify *Mycobacterium* species from fecal samples collected from zoo animals in Alborz Province during 2020–2021. **Materials and Methods:** A total of 40 fecal samples were decontaminated using two separate methods—hexadecyl pyridinium chloride (HPC) and normal sodium hydroxide—and subjected to acid-fast staining on prepared smears. Cultivation was performed on Löwenstein–Jensen media containing glycerol and pyruvate. DNA was extracted from colonies grown on culture media, and PCR assays were conducted to amplify the 16S rRNA gene and insertion sequence IS6110 for the identification of members of the *M. tuberculosis* complex. To differentiate *M. bovis* from other species, PCR-RFLP analysis targeting the *OxyR* pseudogene with the restriction enzyme *AluI* was employed. **Results:** Among the 40 samples, 29 exhibited visible colony growth, and 11 isolates were identified as acid-fast bacilli. PCR confirmed the presence of the genus *Mycobacterium* in all 11 acid-fast isolates. Of these, nine isolates were classified as non-tuberculous mycobacteria (NTM), and two were confirmed as *Mycobacterium bovis*. Molecular methods such as PCR and PCR-RFLP provide rapid and accurate tools for the identification and differentiation of pathogenic members of the *M. tuberculosis* complex. **Conclusion:** The detection of *M. bovis* in zoo animals highlights the importance of continuous molecular surveillance and the need to enhance public and veterinary health awareness in animal facilities and among zoo visitors.

Keywords: Tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* complex, *Mycobacterium bovis*, PCR-RFLP, Zoo animals, Alborz Province.

* Corresponding Author: Nader Mosavari

Address: Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

Email: n.mosavari@rvsri.ac.ir

