

## Research Paper

# Isolation, Molecular Identification and Genomic Pattern of *Mycobacterium Bovis* Isolates Collected from Tuberculin-positive Cattle in Infected Farms of Shiraz, Iran



Hossein Ghaderi<sup>1</sup> , Masoud Haghkhah<sup>1</sup> , \*Nader Mosavari<sup>2</sup> , Keyvan Tadayon<sup>2</sup>

1. Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran.

2. Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.



**Citation** Ghaderi H, Haghkhah M, Mosavari N, Tadayon K. Isolation, Molecular Identification and Genomic Pattern of *Mycobacterium Bovis* Isolates Collected from Tuberculin-positive Cattle in Infected Farms of Shiraz, Iran. The Journal of Qazvin University of Medical Sciences. 2020; 23(6):526-239. <https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.5>

<https://doi.org/10.32598/JQUMS.23.6.5>



Received: 23 Jun 2019

Accepted: 27 Aug 2019

Available Online: 01 Feb 2020

### Keywords:

*Mycobacterium bovis*,  
Tuberculination,  
PGRS-RFLP, PVUII,  
Strain

## ABSTRACT

**Background** *Mycobacterium bovis* is the main cause of tuberculosis in cattle. The most commonly used method to identify bovis-infected cattle is tuberculin test.

**Objective** The present study aimed to investigate the population structure of *Mycobacterium bovis* in infected cattle farms of Shiraz City in Iran.

**Methods** In this descriptive cross-sectional study, 50 pathological samples from tuberculin-positive cattle that were collected from two abattoirs were cultured on glycerinated and pyruvated Lowenstein-Jensen media. Genomic material from culture-positive slopes was extracted and used in polymerase chain reaction (PCR)-16S rRNA, PCR-IS6110, and PCR--regions of difference (RD) typing. All the *M. bovis* isolates were then digested by PvuII restriction enzyme and genotyped by polymorphic guanine/cytosine-rich repetitive sequences (PGRS)-restriction fragment length polymorphism (RFLP) technique.

**Findings** In bacterial culture, 13 (26%) of samples had living mycobacteria where PCR test results revealed their identity as *Mycobacterium bovis*. Genotype profiling by RFLP-PGRS method displayed two patterns with 10 isolates shared a single profile identical to that of *M. bovis* bacillus calmette-guerin (BCG) strain (1173 P2) and three isolated with a different genotype.

**Conclusion** Higher prevalence of BCG-like *M. bovis* (as a typical characteristic of Iranian *M. bovis* population) in cattle farms of Shiraz City was expected. This may indicate the local evolution of new *M. bovis* strains in the region or the infiltration of such strains through cattle farming activities.

## Extended Abstract

### 1. Introduction

**B**ovine tuberculosis has been known for a long time as the most important zoonotic disease and a matter of concern in the dairy industry worldwide [1]. The *mycobacte-*

*rium tuberculosis* complex (MTC) consists of a number of species and subspecies that can cause tuberculosis in humans or animals [3, 4]. One of the globally important members of this complex is *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*) which is the leading cause of tuberculosis in cattle [7]. Tuberculin test is the most commonly used method for detection of *M. bovis* in cattle [8]. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) method using IS6110, direct repeat

### \* Corresponding Author:

Nader Mosavari

**Address:** Reference Laboratory for Bovine Tuberculosis, Razi Vaccine and Serum Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran.

**Tel:** +98 (912) 2611438

**E-Mail:** nmosavari@gmail.com

(DR) and Polymorphic Guanine/cytosine-rich Repetitive Sequences (PGRS) markers have been among the earliest strain typing systems used for genotyping of the *M. bovis* [12]. The present study aimed to improve the genomic knowledge of the population structure of *M. bovis* isolates collected from tuberculin-positive cattle in infected cattle farms of Shiraz, Iran.

## 2. Materials and Methods

In this descriptive cross-sectional study, conducted within 13 months (from January 2016 to February 2017), pathological samples were collected from 50 slaughtered tuberculin-positive cattle belonged to 6 cattle farms located in Shiraz, Iran which had been sent to two abattoirs. The frozen samples were then transferred to Bovine Tuberculosis Reference Laboratory of Razi Vaccine and Serum Research Institute in Karaj, Iran. Using sterile scissors, scalpels and forceps, the samples with tuberculosis lesions were dissected. The small cut tissue pieces were then homogenized using sterile sea sand, mortar and pestle. Ten ml of NaOH (4%), according to the Petroff's decontamination method, was added to the homogenates with continuous but gentle stirring of the pestle content using the mortar for 20 minutes to ensure the completion of decontamination process. After 20 minutes of settling, 5 mL of supernatant was transferred to a Falcon tube and centrifuged at 5,000 x g for 15 minutes. The supernatant was removed and the centrifuge deposit was used to inoculate traditional (glycerinated) and pyruvated (0.2% sodium pyruvate) Lowenstein-Jensen

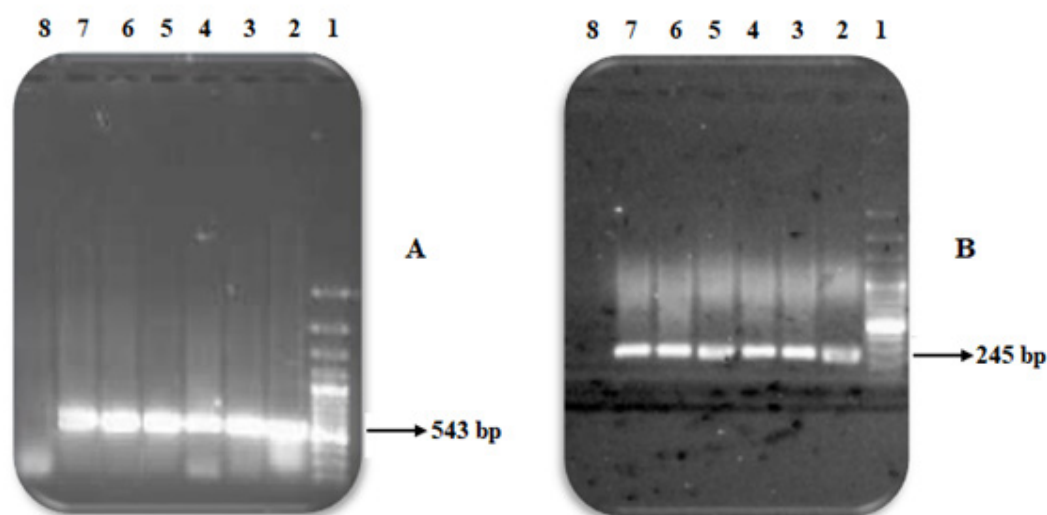
media [19, 20]. The genomic contents of the culture-positive slopes were extracted using the Van Soelingen method [1] and subjected to polymerase chain reaction (PCR)-16SrRNA, PCR-IS6110, and the quad PCR-regions of difference (RD) (RD1, RD4, RD9 and RD12) protocols [21-23]. The detected MTC isolates were further digested by PvuII restriction enzyme and the strain was typed by PGRS-RFLP technique. The obtained patterns were evaluated by the Gel-Pro Analyzer [24].

## 3. Results

Of 50 study samples, 13 (26%) had mycobacterial growth-positive culture. The PCR-16SrRNA and PCR-IS6110 results (Figure 1) confirmed their identity as MTC bacteria. No other MTC members except *M. bovis* was detected in PCR-RD typing between the isolates (Figure 2). All isolates were typeable by RFLP strain typing method. The genotype profiling of *M. bovis* isolates resulted in detection of two patterns among which 10 isolates (76.92%) shared a single profile identical to that of *M. bovis* Bacillus Calmette-Guerin (BCG) strain (1173 P2; Figure 3A), while the remaining three isolates (23.08%) displayed a different genotype (Figure 3B). Although it has been previously reported in Iran (Urmia City), but this type seems to be new in Shiraz City.

## 4. Discussion

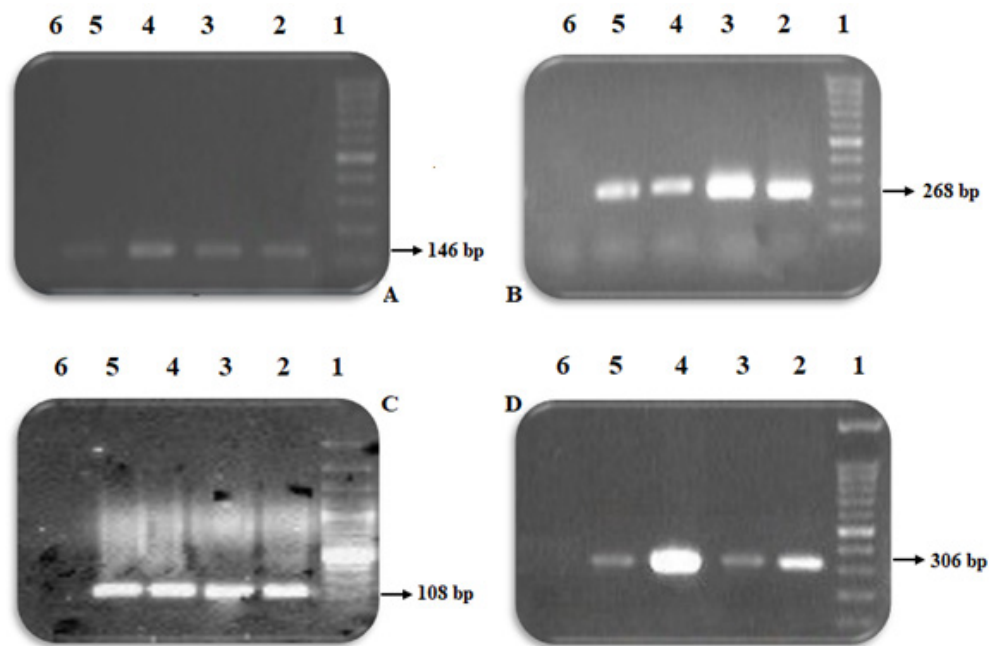
Our results showed a relatively high prevalence (77%) of the BCG-like *M. bovis* isolates in cattle farms of Shiraz city



**Figure 1.** Electrophoresis

A. PCR-16S rRNA; and B. PCR-IS6110 products

Lane 1: Marker 100 bp; lanes 2 to 6: Positive mycobacterial samples; lane 7: BCG (1173 P73) as positive control; lane 8: Negative control.

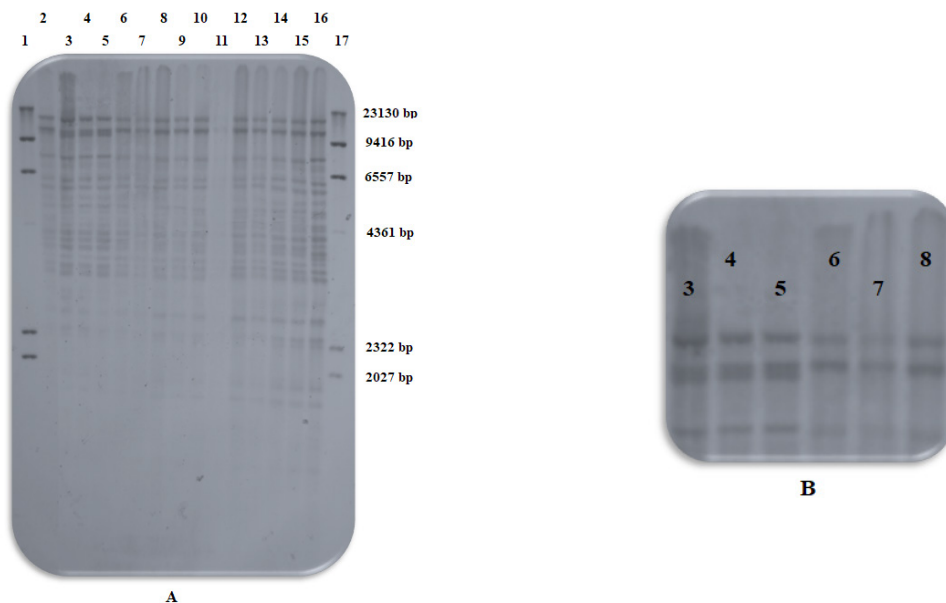


The Journal of  
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

**Figure 2.** Electrophoresis

A. PCR-RD1; B. PCR-RD4; C. PCR-RD9; and D. PCR-RD12 products

Lane 1: 100 bp marker; lane 2: (A) *M. bovis* strain C and (B, C, D) *M. bovis* strain AN5 as a positive control; lanes 3 to 5: Positive samples; lane 6: Negative control.



The Journal of  
Qazvin University of Medical Sciences (JQUMS)

**Figure 3.** RFLP patterns of PvuII-digested DNA from *M. bovis* isolates hybridized with PGRS probe

A: Lane 1, DNA molecular weight marker II; lane 2, BCG (1173 P2) as positive control; lanes 3 to 15, *M. bovis* isolates; lane 16, *M. bovis* (AN5 strain) as positive control; lane 17, DNA molecular weight marker II. B: Lanes 13 to 15, strains different from BCG strain; lanes 10 to 12, BCG like strain.

which is consisting with previous studies in Iran [9, 17, 30]. Finding homogeneous population of *M. bovis* isolates in Shiraz and in other cities of Iran at a larger scale indicates the local evolution of new *M. bovis* strains in the region or the entry of such strains through livestock production, specifically cattle farming.

## Ethical Considerations

### Compliance with ethical guidelines

The present study used the biological samples and tissues prepared from abattoirs by the inspectors of the Veterinary Department in Shiraz. No any experiment was performed on living animals.

### Funding

This study was extracted from the PhD. thesis of the first author approved by the School of Veterinary Medicine at Shiraz University. It received financial support from the Razi Vaccine and Serum Research Institute (Karaj, Iran) (Code: 95GCU4M1304).

### Authors' contributions

Conceptualization: Nader Mosavari, Masoud Haghkhah, Keyvan Tadayon; Field and laboratory experiments: Hossein Ghaderi; Data analysis, draft preparation: Nader Mosavari, Keyvan Tadayon, Hossein Ghaderi; Editing and review: Keyvan Tadayon.

### Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

### Acknowledgements

The authors would like to thank the staff of Deputy of Tuberculin and Mallein Research and Production Department of Razi Vaccine and Serum Research Institute and the School of Veterinary Medicine at Shiraz University for their cooperation in conducting this study.

---

This Page Intentionally Left Blank

---

## جداسازی، شناسایی مولکولی و تهیه الگوی ژنومی جدایه‌های مایکوباکتریوم بووئیس جدا شده از گاوهای توپر کولین مثبت در دامداری‌های آلوده شیراز

حسین قادری<sup>۱</sup>، مسعود حق خواه<sup>۱</sup>، نادر مصوری<sup>۲</sup>، کیوان تدین<sup>۲</sup>

۱. گروه پاتوبیولوژی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۲. آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماری‌زای دام مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات)، کرج، ایران.

### چکیده

**زمینه:** عامل اصلی سل در گاو، مایکوباکتریوم بووئیس است. متداول‌ترین روش در حال استفاده جهت شناسایی گاوهای آلوده، در مقیاس جهانی و همچنین در ایران، تست توپر کولین است.

**هدف:** مطالعه حاضر با هدف بهبود دانش ما از ساختار جمعیت مایکوباکتریوم بووئیس‌های جدا شده در گاو‌داری‌های شیراز صورت پذیرفت. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه مقطعی - توصیفی که بین دی ۱۳۹۴ تا بهمن ۱۳۹۵ انجام شد، ۵۰ نمونه پاتولوژیک جمع‌آوری شده از گاوهای توپر کولین مثبت، از دو کشتارگاه در شیراز، بر روی محیط لونشتاین جانسون گلیسرینه و پیروانه کشت داده شدند. استخراج ژنوم از کشت‌های مثبت انجام شد و از آن‌ها در آزمون‌های PCR-IS6110، PCR-16SrRNA، و PCR-RD Typing استفاده شد. تمام جدایه‌های مایکوباکتریوم بووئیس با استفاده از هضم آنزیمی با آنزیم pvu II و روش PGRS-RFLP مورد ژنوتایپینگ قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** در کشت باکتریایی، در مجموع ۱۳ نمونه (۲۶ درصد) حاوی مایکوباکتریوم زنده بودند که با استفاده از آزمون‌های PCR، هویت همه جدایه‌ها به عنوان مایکوباکتریوم بووئیس تأیید شد. ژنوتایپینگ با استفاده از روش PGRS-RFLP، دو الگو را نشان داد که ۱۰ جدایه ژنوتیپ مشابه و سه جدایه ژنوتیپ متفاوتی با سویه مایکوباکتریوم بووئیس BCG (P2 1173) داشتند.

**نتیجه‌گیری:** در حالی که تداوم مایکوباکتریوم بووئیس شبه BCG (به عنوان یک ویژگی معمول در جمعیت مایکوباکتریوم بووئیس ایرانی) در گاو‌داری‌های شیراز تعجب‌آور نیست، ممکن است که شناسایی یک سویه بسیار مشابه در کار ما بتواند نشان‌دهنده تکامل موضعی سویه‌های جدید مایکوباکتریوم بووئیس در منطقه یا نفوذ چنین سویه‌هایی از طریق فعالیت‌های دامپروری باشد.

تاریخ دریافت: ۰۲ تیر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۵ شهریور ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۲ بهمن ۱۳۹۸

### کلیدواژه‌ها:

مایکوباکتریوم بووئیس،  
تست توپر کولین،  
PGRS-RFLP، PVU  
ا، سویه

### مقدمه

مایکوباکتریوم توپرکلوزیس قادر به ایجاد بیماری سل در انسان هستند، تشخیص افتراقی گونه‌های این کمپلکس بسیار حائز اهمیت است [۵].

عفونت ناشی از مایکوباکتریوم بووئیس به طور معمول در گاو اتفاق می‌افتد، اما جداسازی این باکتری از انسان نیز گزارش شده است. مایکوباکتریوم بووئیس از طریق تماس مستقیم با حیوان آلوده، ذرات معلق در هوا و شیر خام و غیرپاستوریزه می‌تواند به انسان منتقل شود. سل گاوی در کشورهای کمتر توسعه یافته هنوز معمول است و زیان‌های اقتصادی بسیاری از جمله مرگ‌ومیر، بیماری مزمن و محدودیت‌های تجاری در گاو و حیوانات مزرعه را به دنبال دارد [۶، ۷]. مایکوباکتریوم بووئیس، در میان اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، گسترده‌ترین تنوع میزبانی را داراست؛ به طوری که علاوه بر گاو می‌توان آن را از انسان

بیماری سل یکی از قدیمی‌ترین بیماری‌های عفونی مشترک بین انسان و دام است که هنوز هم به عنوان یکی از معضلات بهداشتی جامعه جهانی مطرح است. اغلب موارد بیماری در انسان و حیوانات ناشی از باکتری‌های اسید فست و دیر رشد اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس<sup>۱</sup> است [۱]. این کمپلکس شامل گونه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، (م) بووئیس، (م) میکروتی، (م) آفریکانوم، (م) کاپیری، (م) کانتی، (م) پنی پدی، (م) مانژی، (م) آریگیس و (م) سوریکانه است [۲، ۳]. مایکوباکتریوم توپرکلوزیس یک پاتوژن بالقوه در انسان است و بر اساس گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۴ تقریباً یک‌سوم از جمعیت جهان را آلوده کرده است [۴]. از آنجایی که گونه‌های کمپلکس

#### 1. *Mycobacterium tuberculosis*

\* نویسنده مسئول:

نادر مصوری

نشانی: کرج، آزمایشگاه رفرانس مایکوباکتریوم بیماری‌زای دام مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی سازمان تحقیقات آموزش و ترویج (تات).

تلفن: ۲۶۱۱۴۳۸ (۹۱۲) ۹۸+

رایانامه: nmosavari@gmail.com

حیوانات خانگی و حیوانات وحشی نیز جدا کرد [۸، ۹].

در ایران، سل گاوی برای اولین بار در سال ۱۳۰۹ گزارش شد و در حال حاضر به عنوان یک بیماری اندمیک توصیف می‌شود. در پی برنامه ملی تست و کشتار در سال ۱۳۴۲، شیوع سالانه سل گاوی تا سال ۱۳۸۶ از ۰/۵ درصد به کمتر از ۰/۰۵ درصد در گاوهای مورد آزمایش در سراسر کشور کاهش یافت [۹]. روش‌های مولکولی یکی از ابزارهای قدرتمند در تشخیص، تعیین هویت و طبقه‌بندی کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس است [۱۰]. از روش‌های موجود می‌توان به PCR-RD Typing بر پایه نواحی ژنومی متغیر مانند توالی‌های بزرگ چندشکلی<sup>۲</sup>، آنالیز به روش پلی‌مورفیسم طول قطعات حاصل از برش<sup>۳</sup> به عنوان روش استاندارد ژنوتایپینگ که عمدتاً برای تایپینگ اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس استفاده می‌شود، اشاره کرد [۱۱]. از روش‌های دیگر می‌توان اسپولیوتایپینگ<sup>۴</sup> و تکرارهای پشت سرهم متغیر<sup>۵</sup> را نام برد [۱۰]. به کارگیری روش RFLP با نشانگر IS6110، متداول‌ترین روش ژنوتایپینگ مایکوباکتریوم هاست، اما به دلیل تعداد کم کپی‌های توالی IS6110 در ژنوم مایکوباکتریوم بوویس از روش‌های دیگر مانند RFLP-PGRS (روش مورداستفاده در مطالعه حاضر) و روش اسپولیوتایپینگ استفاده می‌شود. در روش اسپولیوتایپینگ تجزیه و تحلیل داده‌ها راحت‌تر و سریع‌تر است، ولی روش RFLP متمایزکننده‌تر است و برای آنالیز اپیدمیولوژی دقت بیشتری دارد [۱۲].

با توجه به بزرگ‌بودن ژنوم مایکوباکتریوم‌ها با اندازه حدود ۴/۴ جفت مگا باز، تفسیر الگوی حاصل از RFLP به‌تنهایی و بدون هیبریداسیون مشکل است، در حالی که پس از انتقال DNA به غشا و هیبریداسیون با پروب PGRS و DR و سپس آشکارسازی، تفسیر امکان‌پذیر می‌شود. انتخاب آنزیم Pvu II برای برش آنزیمی توصیه‌ای بوده که در روش استاندارد ارائه شده توسط ون سولینگن<sup>۶</sup> در دستورالعمل WHO برای انگشت‌نگاری ژنومی کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس ارائه شده است [۱]. بنابراین در این تحقیق نیز از برش آنزیمی کامل DNA جدایه‌های مایکوباکتریوم بوویس با آنزیم Pvu II و هیبریداسیون آن با پروب PGRS استفاده شد.

در سال ۱۹۹۸ مطالعه‌ای توسط کازینز<sup>۷</sup> و همکاران روی ۲۷۳ مایکوباکتریوم بوویس جدا شده از استرالیا، کانادا، جمهوری ایرلند، بریتانیا، نیوزلند، ایران و یک سویه استاندارد AN5 به روش RFLP با استفاده از نشانگرهای PGRS، IS6110 و DR و همچنین اسپولیوتایپینگ صورت پذیرفت که در استفاده از این روش،

2. Large sequence polymorphisms (LSPs)
3. Restriction fragment length polymorphism (RFLP)
4. Spoligotyping
5. Variable number of tandem repeats (VNTR)
6. Van soelingen
7. Cousins

نشانگرهای DR، IS6110 و PGRS توانستند به ترتیب ۲۳ الگو، ۳۵ الگو و ۷۷ الگو را شناسایی کنند [۱۳].

مصوری و همکاران در سال ۱۳۸۵ طی مطالعه‌ای روی جدایه‌های مایکوباکتریوم بوویس در ایران با استفاده از روش RFLP با نشانگرهای PGRS و DR نشان دادند که با استفاده از نشانگر DR هشت الگو و با نشانگر PGRS، هفت الگو شناسایی شد [۱۴]. نتایج مطالعه ریگانی و همکاران در سال ۱۳۸۷ بر روی جدایه‌های مایکوباکتریوم بوویس جدا شده از گاوهای آلوده کشور، به کمک روش PGRS-RFLP نشان داد که از ۲۵ جدایه مایکوباکتریوم بوویس با استفاده از روش PGRS-RFLP دو الگو شناسایی شد [۱۵].

نتایج مطالعه رفیعی و همکاران در سال ۱۳۹۰ با عنوان انگشت‌نگاری ژنومی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بر روی بیماران سل ریوی استان مرکزی به روش PGRS-RFLP، حاکی از تنوع بالای PGRS در جدایه‌های مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بود [۱۶]. در سال ۱۳۸۹ طی مطالعه مصوری و همکاران بر روی ۱۲۳ جدایه مایکوباکتریوم بوویس با استفاده از روش‌های PGRS-RFLP و DR-RFLP، مشخص شد در روش PGRS-RFLP هفت الگو و در DR-RFLP ۹ الگو به دست آمد [۹]. در مطالعه دیگری که توسط نیمروز و همکاران در استان قم روی ۲۱ جدایه مربوط به کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از گاوهای توپرکلین مثبت انجام شد، سه الگو با استفاده از روش PGRS-RFLP شناسایی شد [۱۷].

در مطالعه مصوری و همکاران جهت شناسایی و تعلق جدایه‌ها به کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از PCR-IS6110 و در ادامه جهت تهیه الگوی ژنومی جدایه‌ها از روش RFLP با نشانگر PGRS استفاده شد [۱۴]. به طور مشابه در مطالعات رفیعی و همکاران و نیمروز و همکاران از روش‌های فوق جهت شناسایی و تهیه الگوی ژنومی جدایه‌ها استفاده شد [۱۶، ۱۷].

دهقانپور و همکاران در سال ۱۳۹۵ جهت شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از PCR-16SrRNA، PCR-RD Typing، IS6110 و همچنین جهت انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌ها از روش PGRS-RFLP استفاده کردند [۱۸]. در مطالعه حاضر نیز با هدف جداسازی، شناسایی مولکولی و تهیه الگوی ژنومی جدایه‌های مایکوباکتریوم جدا شده از گاوهای توپرکلین مثبت در دامداری‌های آلوده شیراز، به ترتیب از روش‌های مولکولی PCR-RD، PCR-IS6110، PCR-16SrRNA، Typing برای شناسایی، آنالیز به روش RFLP در قطعات غنی از GC (PGRS) و در ادامه ساترن بلاتینگ<sup>۸</sup> و DNA هیبریداسیون جهت تهیه الگوی ژنومی گونه‌های مایکوباکتریوم جدا شده استفاده شد.

#### 8. Southern blotting

جدول ۱. توالی پرایمرهای مورد استفاده در مطالعه

سایز محصول	توالی پرایمر	پرایمر
543 bp	5' (ACG GTG GGT ACT AGG TGT GGG TTT C) 3'	16S rRNA (F)
	5'(TCT GCG ATT ACT AGC GAC TCC GAC TTC A) 3'	16S rRNA (R)
245 bp	5'(CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC)3'	INS -1 (F)
	5'(GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) 3'	INS -2 (R)

مجله علمی  
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه مقطعی - توصیفی، نمونه‌گیری از دی سال ۱۳۹۴ تا بهمن ۱۳۹۵ (۱۳ ماه) انجام شد. نمونه‌ها شامل عقده‌های لنفاوی از جمله مدیاستینال، مزانتریک، برونشیا، کبدی، کلیوی، عقب حلقی، تحت فکی و فوق پستانی و بافت‌های ضایعه‌دار بودند که از ۵۰ رأس گاو توپر کولین مثبت متعلق به شش دامداری از مناطق مختلف شیراز که به کشتارگاه‌های مرودشت و شیراز (دو کشتارگاه) منتقل شده بودند، جمع‌آوری شد. کلیه نمونه‌ها پس از انتقال به دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز در دمای منهای ۲۰ درجه سانتی‌گراد فریز شدند و با رعایت زنجیره سرد به آزمایشگاه فرانس سل دامی مؤسسه رازی منتقل شدند.

در آزمایشگاه فرانس سل دامی مؤسسه رازی، به منظور کشت، نمونه‌ها پس از همگن شدن با شن استریل، آلودگی زدایی (سود یک نرمال) و خنثی‌سازی (با تامپون فسفات‌ها بدون فنل) بر روی محیط کشت لونشتاین - جانسون<sup>۱</sup> حاوی گلیسرین و پیرووات کشت داده شدند و به مدت هشت هفته در آنکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از گذشت زمان آنکوباسیون و ظاهر شدن کلونی‌ها در سطح محیط‌های کشت، از کلونی‌ها لام تهیه شد و با استفاده از روش فلوروکروم رنگ‌آمیزی شدند و با میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار گرفتند. در صورت مشاهده باسیل‌های فلورسنت، وجود باسیل‌های اسیدفست با روش ذیل نلسون<sup>۱۰</sup> توسط میکروسکوپ نوری نیز مورد بررسی قرار گرفت [۱۹، ۲۰].

DNA ژنومیک نمونه‌های رشد کرده بدون هیچ‌گونه شکستگی استخراج شد. در این روش ابتدا سوسپانسیون تهیه شده از کلونی‌های رشد یافته تحت اثر آنزیم لیزوزیم قرار گرفتند. در مرحله بعد با استفاده از سدیم دودسیل سولفات<sup>۱۱</sup> و آنزیم پروتئیناز K پیکره باکتری تخریب و DNA باکتری آزاد شد. سپس به هر میکروتیوب سدیم کلرید پنج مولار و ستیل - تری متیل - آمونیوم

بروماید<sup>۱۲</sup> اضافه شد. در مرحله بعد ایزوآمیل الکل - کلروفرم به هر میکروتیوب اضافه شد. سپس میکروتیوب‌ها سانتریفیوژ شدند و فاز بالایی که حاوی DNA است به میکروتیوب جدید منتقل شد. در ادامه با استفاده از ایزوپروپانول و اتانول ۷۰ درصد سرد کلاف‌های DNA در کف میکروتیوب رسوب کرد. در نهایت DNA استخراج شده برای استفاده در مراحل بعدی ذخیره شد [۱]. ارزیابی کیفی و کمی استخراج DNA، به ترتیب با استفاده از الکتروفورز و دستگاه نانودراپ انجام گرفت.

جهت تأیید باکتری‌های جدا شده از لحاظ جنس و قرارگیری آن‌ها در کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، به ترتیب از آزمون‌های PCR-16S rRNA و PCR-IS6110 استفاده شد. شناسایی جنس مایکوباکتریوم با استفاده از زوج پرایمر 16S rRNA بر اساس حضور قطعه ۵۴۳ جفت بازی انجام شد و در ادامه جهت شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از زوج پرایمرهای IS6110 (INS1، INS2) بر اساس حضور قطعه ۲۴۵ جفت بازی روی ژل آگارز استفاده شد (جدول شماره ۱) [۲۱، ۲۲].

در کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس، تعدادی مناطق ژنومی متغیر وجود دارد که بر اساس این نواحی می‌توان اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس را از یکدیگر تفکیک کرد. در مطالعه حاضر جهت افتراق گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توپرکلوزیس از PCR- RD Typing که بر اساس چهار سری پرایمر سه تایی (RD1، RD4، RD9، RD12) است، استفاده شد.

در PCR- RD1، شناسایی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس و مایکوباکتریوم بوویس بر اساس حضور قطعه ۱۴۶ جفت بازی؛ در PCR-RD4، شناسایی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بر اساس حضور قطعه ۱۷۲ جفت بازی و مایکوباکتریوم بوویس بر اساس حضور قطعه ۲۶۸ جفت بازی؛ در PCR-RD9، شناسایی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بر اساس حضور قطعه ۲۳۵ جفت بازی و مایکوباکتریوم بوویس بر اساس حضور قطعه ۱۰۸ جفت بازی و نهایتاً در PCR-RD12، شناسایی مایکوباکتریوم توپرکلوزیس بر

9. Lowenstein jensen medium

10. Ziehl-Neelsen staining

11. Sodium dodecyl sulfate (SDS)

12. Cetyl tri-methyl ammonium bromide (CTAB/NaCl)



سوبسترای نیترو - بلو - تترازولیوم<sup>۱۳</sup> و ۵ - برمو - ۴ - کلرو - ۳ - ایندولیل - فسفات<sup>۱۴</sup> انجام پذیرفت و در پایان، باندهای ایجاد شده مورد بررسی و تحلیل قرار گرفتند [۲۴].

### یافته‌ها

در مطالعه حاضر عقده‌های لنفاوی از ۵۰ رأس گاو توبرکولین مثبت، در آزمایشگاه بخش سل مؤسسه رازی روی محیط‌های کشت لونشتاین - جانسون حاوی گلیسرین و پیرووات کشت داده شدند که از ۵۰ نمونه گاوی مشکوک به سل، ۱۳ نمونه (۲۶ درصد) کشت مثبت و دارای باسیل اسید فست بودند.

با استفاده از آزمون‌های PCR-16S rRNA و PCR-IS6110، تمام نمونه‌های رشد یافته، متعلق به جنس میکوباکتریوم و کمپلکس میکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند (شکل شماره ۱). در هر دو آزمون PCR از سویه BCG (1173 P2) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

کلیه نمونه‌های کشت شده در PCR-RD1 دارای باند ۱۴۶ bp بودند (شکل شماره ۲A). در این آزمون PCR، از سویه استاندارد میکوباکتریوم توبرکلوزیس سوش C به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

در PCR-RD4 کلیه نمونه‌ها دارای باند ۲۶۸ bp (شکل شماره ۲B)، در PCR-RD9 دارای باند ۱۰۸ bp (شکل شماره ۲C) و

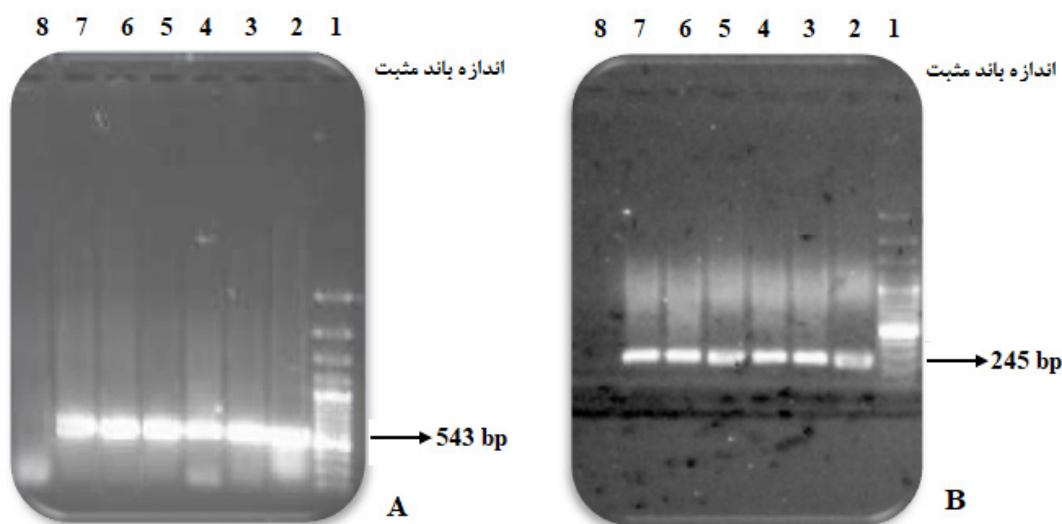
اساس حضور قطعه ۳۶۹ جفت بازی و میکوباکتریوم بوویس بر اساس حضور قطعه ۳۰۶ جفت بازی انجام گرفت [۲۳].

جهت انجام آزمون‌های PCR، هر میکروتیوب شامل هشت میکرولیتر Master Mix 2x (آمپلیکون)، یک میکرولیتر پرایمر پیش‌رونده (با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر پرایمر میانی (با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر)، یک میکرولیتر پرایمر معکوس (با غلظت ۱۰ پیکومول در هر میکرولیتر)، دو میکرولیتر DNA (با غلظت ۱۰۰ نانوگرم در هر میکرولیتر) و سه میکرولیتر آب مقطر استریل بود و حجم نهایی در هر واکنش برابر با ۱۶ میکرولیتر بود.

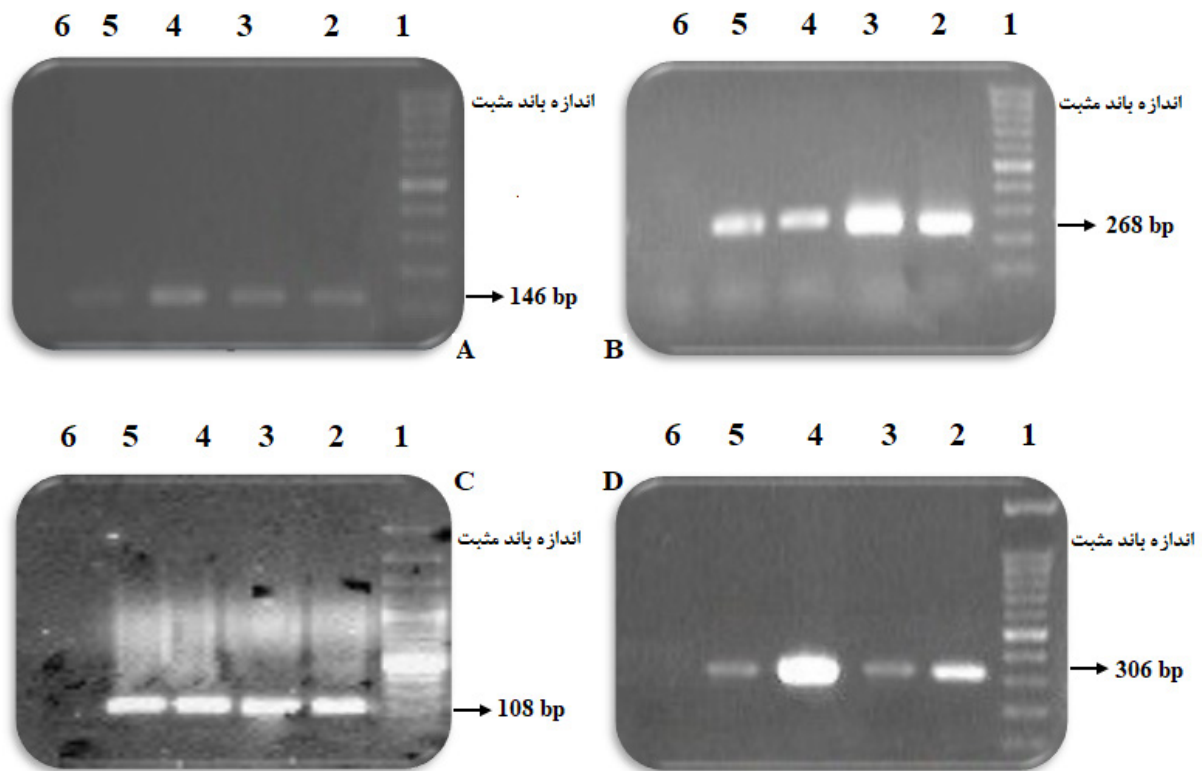
به منظور برش DNA با استفاده از آنزیم محدودکننده Pvu DNA، II ژنومی استخراج شده از نمونه‌ها (پس از ارزیابی کمی و کیفی) در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای یک شبانه‌روز قرار گرفتند. در مرحله بعد، الکتروفورز DNA برش‌خورده صورت پذیرفت تا قطعات به طور کامل از یکدیگر جدا شوند. در مرحله بعدی جهت انتقال باندهای ایجاد شده از روی ژل بر روی غشا با بار الکتریکی مثبت، ساترن بلاتینگ انجام شد. باندهای منتقل شده با پروب PGRS لیبل شده، با دیگوکسیژنین (5'-CGGCCGTTG CCG CCG TTGCCGCCGTTG CCG-) جهت هیبریداسیون با قطعات موجود بر روی غشا مواجه شدند و سپس غشای هیبرید شده با محلول آنتی دیگوکسیژنین آنتی بادی کنژوگه با آلکالاین فسفاتاز، پوشانده شد و در مرحله بعدی آشکارسازی و شناسایی پروب‌های هیبرید شده با استفاده از

13. Nitro Blue Tetrazolium (NBT)

14. 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate (BCIP)

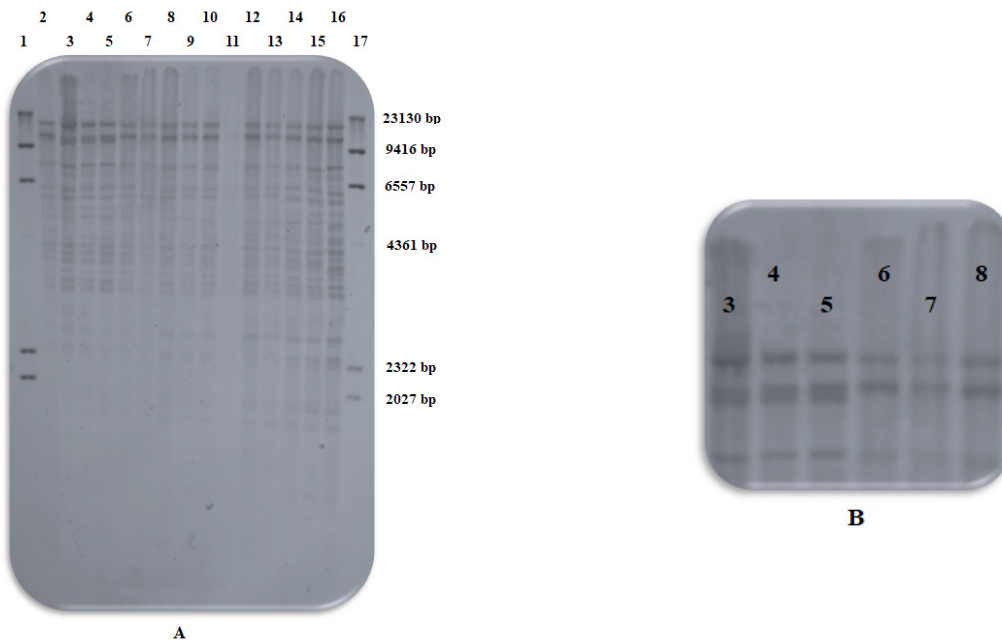


شکل ۱. الکتروفورز محصولات PCR-16 S rRNA (A) و PCR-IS6110 (B) ستون یک نشانگر 100bp، ستون دو تا شش نمونه‌های میکوباکتریایی مثبت، ستون هفت سویه استاندارد BCG (1173 P2) به عنوان کنترل مثبت، ستون هشت کنترل منفی.



مجله علمی  
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۲. الکتروفورز محصولات (A) PCR-RD1، (B) PCR-RD4، (C) PCR-RD9 و (D) PCR-RD12. ستون یک نشانگر 100 bp، ستون دو سویه استاندارد مایکوباکتریوم تویرکلوزیس سوش (A) و استاندارد مایکوباکتریوم بوویس سویه AN5 (B، C و D) به عنوان کنترل مثبت، ستون سه تا پنج نمونه‌های مثبت، ستون شش کنترل منفی.



مجله علمی  
دانشگاه علوم پزشکی قزوین

شکل ۳. RFLP با آنزیم Pvu II و هیبریداسیون با پروب PGRS. A: ستون یک نشانگر شماره دو شرکت رش آلمان، ستون دو سویه BCG (1173 P2) به عنوان کنترل مثبت، ستون‌های ۳ تا ۱۵ جدایه مایکوباکتریوم بوویس مطالعه، ستون ۱۶ سویه استاندارد مایکوباکتریوم بوویس (AN5) به عنوان کنترل مثبت، ستون ۱۷ نشانگر شماره ۲ شرکت رش آلمان. B: ستون‌های سه تا پنج سویه متفاوت از سویه استاندارد BCG، ستون‌های شش تا هشت سویه مشابه با سویه استاندارد BCG.

لیبانا<sup>۱۶</sup> و همکاران در سال ۱۹۹۷ گزارش کردند که تنها یک کپی از IS6110 در کروموزوم باکتری *مایکوباکتریوم بوویس* در ناحیه Hot Spot در خوشه تکرارشونده‌های مستقیم قرار دارد [۲۷]. رومانو<sup>۱۷</sup> و همکاران نیز نشان دادند ۸۲ درصد از جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* گاوهای آرژانتین تنها دارای یک کپی IS6110 بودند و الگوی حاصل به صورت مونومورفیک است [۲۸]؛ بنابراین نشانگر IS6110 برای سل حیوانی به دلیل کپی‌های کم آن در *مایکوباکتریوم بوویس* بدون استفاده است. در مطالعه حاضر ۱۳ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس* با روش RFLP-GRS - مورد ژنوتایپینگ قرار گرفت. بر اساس نتایج، از ۱۳ ژنوتیپ شناسایی شده تعداد دو الگو به دست آمد. الگوی اول که مربوط به ۱۰ جدایه است، کاملاً شبیه به الگوی سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بوویس* BCG بود و الگوی دوم نیز که مربوط به سه جدایه است (شکل شماره ۳، ستون‌های سه تا پنج) با الگوی سایر جدایه‌ها و همچنین سویه‌های استاندارد متفاوت است. سویه اخیر در مطالعات گذشته در ارومیه رؤیت شده است [۱۴].

مایکل<sup>۱۸</sup> و همکاران در سال ۲۰۰۸ در آفریقای جنوبی برای تعیین شیوع بالاترین تنوع ژنتیکی *مایکوباکتریوم بوویس*، تحقیقاتی روی ۳۵ گله گاو انجام دادند که از تعداد ۹۱ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس* به روش RFLP-GRS تعداد ۲۹ الگو شناسایی شد [۲۹]. در مطالعه نیمروز و همکاران در استان قم که روی ۲۱ جدایه *مایکوباکتریوم بوویس*، از گاوهای توبرکولین مثبت انجام شد، سه الگو با استفاده از روش RFLP - GRS - شناسایی شد، که الگوی غالب، الگوی سویه *مایکوباکتریوم بوویس* BCG بود [۱۷].

در مطالعه حاضر از برش آنزیمی DNA جدایه‌ها با آنزیم Pvu II و هیبریداسیون آن‌ها با پروب PGRS استفاده شد. به طور مشابه مطالعه‌ای توسط ریگانی و همکاران در سال ۱۳۸۹ روی جدایه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* گاوهای آلوده کشور انجام گرفت. در این مطالعه از آنزیم Pvu II جهت برش آنزیمی DNA استفاده و سپس مرحله انگشت‌نگاری ژنومی جدایه‌ها با روش RFLP-GRS انجام شد. نتایج مطالعه نشان داد از ۲۵ جدایه *مایکوباکتریوم* دو الگو شناسایی شد [۱۵]. در مطالعه مصوری و همکاران برش DNA با استفاده از آنزیم Pvu II، سپس هیبریدسازی با PGRS و آشکارسازی انجام گرفت که نتایج نشان داد از ۱۲۴ جدایه مورد مطالعه هفت الگوی مختلف به دست آمد [۱۴].

نتایج حاصل از RFLP-GRS مطالعه حاضر نشان داد بیشتر جدایه‌ها (حدود ۷۷ درصد) دارای الگوی ژنتیکی مشابه با الگوی ژنتیکی سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بوویس* BCG به عنوان

در نهایت محصولات PCR-RD12 دارای باند ۳۰۶ bp (شکل شماره ۲د) بودند. در سه آزمون PCR-RD9، PCR-RD4 و PCR-RD12 از استاندارد *مایکوباکتریوم بوویس* سویه AN5 به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

در این آزمون تمام جدایه‌ها به همراه دو سویه استاندارد *مایکوباکتریوم بوویس* (AN5) و سویه BCG (1.173 P2) به عنوان کنترل مثبت، جهت انگشت‌نگاری ژنومی و بررسی پلی مورفیسم، مورد بررسی قرار گرفتند. با استفاده از آنزیم محدودکننده PvuII، ۱۳ ژنوتیپ مربوط به سویه‌های *مایکوباکتریوم بوویس* شناسایی شدند. در بررسی چشمی تصاویر به دست آمده در ژل الکتروفورز که در نتیجه کاربرد نرم‌افزار نیز مورد تأیید قرار گرفتند، در این ۱۳ ژنوتیپ، دو الگوی ژنتیکی متفاوت دیده شد که یکی از الگوها مشابه الگوی ژنتیکی سویه‌های استاندارد (مربوط به ۱۰ جدایه) و دیگری (مربوط به سه جدایه) متفاوت نسبت سویه‌های استاندارد بودند (شکل شماره ۳).

### بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر از ۵۰ نمونه گاو توبرکولین مثبت، پس از کشت بر روی محیط کشت لونشتاین - جانسون، در ۱۳ نمونه (۲۶ درصد) حضور *مایکوباکتریوم* گزارش شد که پس از انجام آزمون‌های مولکولی، کلیه جدایه‌ها به عنوان *مایکوباکتریوم بوویس* تأیید شدند.

در مطالعه شاهرادی و همکاران در سال ۱۳۹۵ در استان اصفهان از ۱۴۳ مورد گاو توبرکولین مثبت، ۲۸ مورد (۱۹/۵۸ درصد) رشد *مایکوباکتریوم* تشخیص داده شد که پس از انجام آزمون‌های بیوشیمیایی، کلیه موارد به عنوان *مایکوباکتریوم بوویس* در نظر گرفته شد [۲۵]. در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۵ که توسط آکوستا<sup>۱۵</sup> و همکاران در پاناما انجام شد، تعداد ۱۶۸۰ گاو شیری مورد ارزیابی قرار گرفت. با استفاده از آزمون توبرکولین (قطر بیشتر از چهار میلی‌متر)، ۹ مورد به عنوان گاو توبرکولین مثبت مشخص شدند که پس از کشتار و کشت گره‌های لنفاوی، هفت مورد از نمونه‌ها آلوده به اعضای کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داده شدند [۲۶].

توالی‌های غنی از GC به نام PGRS و رونوشت‌های مستقیم (DR) به عنوان مارکرهایی سودمند در RFLP انواع جدایه‌های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مورد استفاده قرار می‌گیرد [۲۶]. با توجه به نتایج مطالعات انجام گرفته، به دلیل حضور تنها یک کپی از سکانس IS6110 در بیشتر *مایکوباکتریوم بوویس*‌های جدادیده از گاوهای سراسر دنیا به‌ویژه در آسیا (به غیر از اسپانیا)، از هیبرید کردن DNA برش خورده با پروب PGRS استفاده شد و از پروب IS6110 صرف نظر شد.

16. Liebana  
17. Romano  
18. Michel

15. Acosta

### مشارکت نویسندگان

مفهوم‌سازی: نادر مصوری، مسعود حق خواه و کیوان تدین؛  
آزمایش‌های میدانی و آزمایشگاهی: حسین قادری؛ تحلیل داده‌ها:  
نادر مصوری، کیوان تدین و حسین قادری؛ ویراستاری و نگارش:  
حسین قادری، کیوان تدین و نادر مصوری.

### تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از همیاری کارکنان دانشکده دامپزشکی دانشگاه  
شیراز و بخش توبرکولین و مالئین مؤسسه رازی به واسطه  
مساعدت در اجرای این تحقیق تشکر می‌کنند.

کنترل مثبت هستند؛ مطالعه حاضر از این نظر با سایر مطالعات  
انجام شده مطابقت دارد.

مطالعه مصوری و همکاران در سال ۱۳۸۵ نشان داد غالب‌ترین  
الگو در تمامی استان‌های مورد بررسی، شباهت کامل با الگوی  
به‌دست‌آمده از سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG استاندارد 1173  
P2 دارد [۱۴]. در سال ۱۳۸۶ تدین و همکاران مطالعه‌ای روی  
۱۳۳ جدایه گاوی مایکوباکتریوم بوویس از سراسر ایران انجام  
دادند. در این مطالعه از روش‌های VNTR و اسپولیگوتایپینگ  
جهت تایپینگ جدایه‌ها استفاده شد. در نهایت مشخص شد که  
اسپولیگوتایپ سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG فراوان‌ترین  
طبقه ژنتیکی در ایران است [۳۰].

بر اساس نتایج مطالعات گذشته که در بالا به آن‌ها اشاره شد،  
احتمال می‌رود سویه‌های شبیه به BCG که در ایران غالب هستند  
از یک منشأ مشترک باشند. با مرور مسیر ورود گاوهای اصیل به  
ایران (تهران) و سپس پخش شدن آن‌ها در سرتاسر کشور این  
احتمال وجود دارد که گاوهای وارداتی اولیه حامل این باکتری  
بوده‌اند و این باکتری از طریق فعالیت‌های دامپروری به سایر نقاط  
ایران منتقل شده باشد [۱۴].

در مقایسه دو سویه مایکوباکتریوم بوویس جداشده از شیراز  
با سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG، الگوهای حاصل از برش  
آنزیمی با آنزیم PvU II و هیبریداسیون با PGRS، تنها اختلاف  
در یک یا چند باند است و هر دو الگو نیز بسیار شبیه با BCG  
هستند. سویه اخیر قبلاً در ارومیه دیده شده بود و در استان  
فارس وجود نداشت. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده این باشد  
که در سال‌های اخیر انتقال یک سویه جدید به استان فارس اتفاق  
افتاده است. به طور کلی، سویه غالبی که در شیراز وجود دارد  
شبیه به سویه مایکوباکتریوم بوویس BCG است.

### ملاحظات اخلاقی

#### پیروی از اصول اخلاق پژوهش

مطالعه حاضر با استفاده از بافت‌ها و نمونه‌های بیولوژیکی  
اخذشده از کشتارگاه توسط بازرسین اداره دامپزشکی در شیراز  
انجام شده است. هیچ نوع کار آزمایشگاهی بر روی حیوان زنده  
انجام نشده است.

#### حامی مالی

تأمین مالی و فضای آزمایشگاهی مورد نیاز برای انجام این تحقیق  
توسط مؤسسه تحقیقات واکسن و سرم‌سازی رازی کرج فراهم شده  
است. مطالب مندرج در این مقاله ناظر بر بخشی از یافته‌های پروژه  
تحقیقاتی رساله دکترای نویسنده اول (حسین قادری) با کد ثبت  
95GCU4M1304 در دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز است.

## References

- [1] Cousins DV, Bastida R, Cataldi A, Quse V, Redrobe Sh, Dow S, et al. Tuberculosis in seals caused by a novel member of the *Mycobacterium tuberculosis* complex: *Mycobacterium pinipedi* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003; 53(5):1305-14. [DOI:10.1099/ijs.0.02401-0] [PMID]
- [2] Rodriguez-Campos S, Smith NH, Boniotti MB, Aranaz A. Overview and phylogeny of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms: Implications for diagnostics and legislation of bovine tuberculosis. *Res Vet Sci*. 2014; 97(Suppl):S5-S19. [DOI:10.1016/j.rvsc.2014.02.009] [PMID]
- [3] Alexander KA, Laver PN, Michel AL, Williams M, van Helden PD, Warren RM, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16(8):1296-9. [DOI:10.3201/eid1608.100314] [PMID] [PMCID]
- [4] World Health Organization. Global tuberculosis report 2013. Geneva: World Health Organization; 2013. <https://books.google.com/books?id=1rQXDAAQBAJ&dq>
- [5] Smith NH. The global distribution and phylogeography of *Mycobacterium bovis* clonal complexes. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(4):857-65. [DOI:10.1016/j.meegid.2011.09.007] [PMID]
- [6] Aneesh T, Mandeep S, Katoch VC, Dhar P, Katoch RC. Detection of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* from Cattle: Possible public health relevance. *Indian J Microbiol*. 2012; 52(2):289-91. [DOI:10.1007/s12088-011-0200-8] [PMID] [PMCID]
- [7] Kelly RF, Hamman SM, Morgan KL, Nkongho EF, Ngwa VN, Tan-ya V, et al. Knowledge of bovine tuberculosis, cattle husbandry and dairy practices amongst pastoralists and small-scale dairy farmers in Cameroon. *PLoS One*. 2016; 11(1):e0146538 [DOI:10.1371/journal.pone.0146538] [PMID] [PMCID]
- [8] Whitman W, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo M, Ludwig W, et al, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology: The actinobacteria*. Vol. 5. New York: Springer-Verlag; 2012. [DOI:10.1007/978-0-387-68233-4]
- [9] Mosavari N, Feizabadi MM, Jamshidian M, Seifiabadi Shahpouri MR, Forbes KJ, Tadayon K, et al. Molecular genotyping and epidemiology of *Mycobacterium bovis* strains obtained from cattle in Iran. *Vet Microbiol*. 2011; 151(1-2):148-52. [DOI:10.1016/j.vetmic.2011.02.038] [PMID]
- [10] Maguire H, Dale J, McHugh T, Butcher P, Gillespie S, Costet-sos A, et al. Molecular epidemiology of tuberculosis in London 1995-7 showing low rate of active transmission. *Thorax*. 2002; 57(7):617-22. [DOI:10.1136/thorax.57.7.617] [PMID] [PMCID]
- [11] Sweetline Anne N, Ronald BSM, Senthil Kumar TMA, Kannan P, Thangavelu A. Molecular identification of *Mycobacterium tuberculosis* in cattle. *Vet Microbiol*. 2017; 198:81-7. [DOI:10.1016/j.vetmic.2016.12.013] [PMID]
- [12] Flores L, Jarlsberg LG, Kim EY, Osmond D, Grinsdale J, Kawamura M, et al. Comparison of restriction fragment length polymorphism with the polymorphic guanine-cytosine-rich sequence and spoligotyping for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with five or fewer copies of IS6110. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 48(2):575-8. [DOI:10.1128/JCM.01604-09] [PMID] [PMCID]
- [13] Cousins DV, Skuce RA, Kaswala RR, van Embden JDA. Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis*. *Int J Tuberc Lung Dis*. 1998; 2(6):471-8. [PMID]
- [14] Mosavari N. [Polymorphism survey of *M. bovis* strains isolated of samples sent to Razi Vaccine & Serum Research Institute by RFLP and DNA hybridization] [PhD. dissertation]. Ahvaz: Shahid Chamran University of Ahvaz; 2005. [In Persian]
- [15] Reference Laboratory for Animal Tuberculosis (Bovine Reference Laboratory). [Comparison of genomic pattern of two genomic fingerprinting techniques in *Mycobacterium bovis* isolated from infected cattle in 2007] [Internet]. 2009 [Updated 2020]. Available from: <https://cutt.ly/oybml5q> [In Persian]
- [16] Rafiee B, Mosavari N, Farazi AA, Nazari R, Keshavarz R, Tadayon K. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* isolates of pulmonary tuberculosis patients in Markazi Province by PGRS-RFLP method. *J Arak Univ Med Sci*. 2012; 15(6):35-44. [In Persian]
- [17] Nimrooz S, Mosavari N, Zahraei Salehi T. Isolation, identification and genomic pattern of *Mycobacterium tuberculosis* from tuberculin positive cattle from Qom Province with RFLP method by PGRS prob. *Biol J Microorganism*. 2017; 6(21):47-52. [In Persian]
- [18] Dehghanpour M, Baghcheh Saraei H, Mosavari N, Mazloom Zadeh S. Isolation of *Mycobacterium bovis* from tuberculosis patients in Zanjan Province (2013). *J Adv Med Biomed Res*. 2016; 24(107):71-83. [In Persian]
- [19] American Thoracic Society, CDC, Infectious Diseases Society of America. Treatment of tuberculosis [Internet]. 2003 [Updated 2003 June 20]. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5211a1.htm>
- [20] Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis bacteriology: Organization and practice. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997. <https://books.google.com/books?id=dAxxAAAAMAAJ&dq>
- [21] Goude R, Parish T. Electroporation of mycobacteria. In: Parish T, Brown A, editors. *Mycobacteria Protocols, Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. Vol. 465. Totowa, NJ: Humana Press; 2009. p. 203-15. [DOI:10.1007/978-1-59745-207-6\_13] [PMID]
- [22] 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*. *Mol Microbiol*. 2002; 46(3):709-17. [DOI:10.1046/j.1365-2958.2002.03237.x] [PMID]
- [23] Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesselting A, Engelke E, de Kock M, et al. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2006; 10(7):818-22. [PMID]
- [24] van Soolingen D, de Haas PEW, Kremer K. Restriction Fragment Length Polymorphism typing of mycobacteria. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Mycobacterium tuberculosis Protocols, Methods in Molecular Medicine*. Vol. 54. Totowa, NJ: Humana Press; 2001. p. 165-203. [DOI:10.1385/1-59259-147-7:165] [PMID]

- [25] Shahmoradi AH, Tadayon K, Arefpajohi R, Noaman V, Soleymani Babadi K. Detection and recognition of *Mycobacterium tuberculosis* in PPD positive cattle by microbacterial culture and biochemical tests in Esfahan Province. *Vet J (Pajouhesh & Sazandegi)*. 2016; 29(2):75-80. [In Persian]
- [26] Acosta F, Chernyaeva E, Mendoza L, Sambrano D, Correa R, Rotkevich M, et al. *Mycobacterium bovis* in Panama, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2015; 21(6):1059-61. [DOI:10.3201/eid2106.141821] [PMID] [PMCID]
- [27] Liebana E, Aranaz A, Dominguez L, Mateos A, Gonzalez Llamazares O, Rodrigues Ferri EF, et al. The insertion element IS6110 is a useful tool for DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* isolates from cattle and goats in Spain. *Vet Microbiol*. 1997; 54(3-4):223-33. [DOI:10.1016/S0378-1135(96)01282-5]
- [28] Romano MI, Fisanotti JC, Alito A, Bigi F, Latini O, Roxo E, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* isolates from South America. *Vet Microbiol*. 1998; 60(2-4):251-7. [DOI:10.1016/S0378-1135(98)00150-3]
- [29] Michel AL, Hlokwe TM, Coetzee ML, Maré L, Connaway L, Rutten VPMG, et al. High *Mycobacterium bovis* genetic diversity in a low prevalence setting. *Vet Microbiol*. 2008; 126(1-3):151-9. [DOI:10.1016/j.vetmic.2007.07.015] [PMID]
- [30] Tadayon K, Mosavari N, Sadeghi F, Forbes KJ. *Mycobacterium bovis* infection in Holstein Friesian Cattle, Iran. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(12):1919-21. [DOI:10.3201/eid1412.070727] [PMID] [PMCID]