جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مجله میکروب شناسی پزشکی ایران
سال ۲ شماره ۱ بهار ۱۳۸۷، صفحات ۱-۷

تشخیص مولکولی جدایه های گاوی *مایکوباکتریوم بویس* از جدایه های انسانی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در ایران به روش PCR-RFLP و مقایسه با ۵ سویه استاندارد

نادر مصوری[۱]، میترا صالحی[۲]، کیوان تدین[۱]، محمد محمد طاهری[۱]، کیومرث سلیمانی[۱]، رضا عارف پژوهی[۱]، سعید سپهری سرشت[۳]، مرضیه علوی[۱و۲]*

۱) بخش تولید PPD، موسسه واکسن و سرم سازی رازی، کرج
۲) گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
۳) گروه بیوتکنولوژی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران
نویسنده رابط: مرضیه علوی، گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال
همراه: ۰۹۱۲۲۳۸۳۲۸۳ m.alavi1387@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۲/۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۳/۲۹

چکیده:

زمینه و اهداف: کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از مجموعه مایکوباکتریوم های با شباهت ژنتیکی زیاد تشکیل شده که با توجه به طولانی بودن زمان انکوباسیون، تعیین هویت این باکتری ها بسیار مشکل است. به دلایل بهداشتی، تمایز بین مایکوباکتریوم بویس از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس از اهمیت ویژه ای برخوردار است. هدف این تحقیق ارزیابی یک روش جهت افتراق مایکوباکتریوم بویس از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می باشد.

روش بررسی: یک قطعه از شبه ژن *oxyR* به طول ۵۴۸ جفت باز هدف آزمایش PCR-RFLP قرار گرفت. نوکلئوتید ۲۸۵ از قطعه هدف مذکور در ژنوم مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG، حاوی باز آدنین، در حالی که در تمامی دیگر اعضاء کمپلکس توبرکلوزیس حاوی باز گوانین می باشد که باعث از بین رفتن یک سایت عملکرد آنزیم *AluI* می شود. لذا در قطعه مذکور، در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG چهار سایت برش، در حالی که در سایر مایکوباکتری های کمپلکس، سه سایت برش توسط این آنزیم وجود دارد. در ۶ جدایه بالینی مایکوباکتریوم جدا شده از انسان و ۵۰ جدایه گاوی و ۵ سویه استاندارد، قطعه مورد نظر از شبه ژن *oxyR* توسط PCR تکثیر و سپس با استفاده از آنزیم *AluI* برش داده شد و الگوهای برش با یکدیگر مقایسه شد.

یافته ها: در تمامی موارد مربوط به مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG سه قطعه ناشی از برش، در حالی که در تمامی موارد مربوط به سایر مایکوباکتری ها، یک قطعه ناشی از برش مشاهده شد.

نتیجه گیری: روش PCR-RFLP بر روی شبه ژن *oxyR* روشی سریع و دقیق جهت افتراق مایکوباکتریوم بویس از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس می باشد.

کلید واژه ها: *مایکوباکتریوم بویس*، کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*، شبه ژن *oxyR*، PCR-RFLP، *AluI*

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

مقدمه:

سل به عنوان بیماری عفونی مشترک بین انسان و دام از گذشته های دور مورد توجه بشر قرار گرفته است که در اثر مایکوباکتریوم به وجود می آید (۱). با وجود روش های مختلف درمان، این بیماری درصد بالایی از مرگ و میر را به خود اختصاص می دهد و در برخی کشورهای پیشرفته شیوع مجدد آن مشاهده گردیده است (۲). لذا به کارگیری روش های نوین جهت تشخیص سریع و دقیق این بیماری بخصوص همزمان با گسترش بیماری ایدز و مساله مقاومت چند دارویی بسیار حائز اهمیت می باشد. مایکوباکتری های پستانداران ژنوم مشابهی دارند و تمامی موارد بیماریزای شدید، در یک گروه به نام کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* قرار می گیرند (۳). در اکثر موارد، عامل بیماری سل در انسان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و در گاو *مایکوباکتریوم بویس* می باشد، اما مایکوباکتریوم بویس می تواند در انسان نیز ایجاد بیماری کند. از سوی دیگر، *مایکوباکتریوم بویس* دارای طیف میزبانی وسیع می باشد (۴)، لذا پیدا کردن سریع و به موقع منبع عفونت، در پیگیری مسیر انتقال ضروری می باشد. زیرا با وجود این که گاو میزبان اصلی این مایکوباکتریوم است، ولی در بسیاری از پستانداران دیگر نیز باقی می ماند. از آنجایی که مایکوباکتری های پاتوژن دارای دوره انکوباسیون طولانی می باشند، تشخیص آزمایشگاهی آنها با مشکلاتی مواجه می شود. به نحوی که تعیین هویت و حساسیت دارویی این باکتری ها، مستلزم گذشت مدت زمان ۲ تا ۴ ماه می باشد (۵). در حال حاضر جهت تشخیص این باکتریها، از تست های مختلف بیوشیمیایی مانند تست تجمع نیاسین، احیاء نیترات، کاتالاز و بررسی اثر تیوفن – ۲- کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) در ممانعت از رشد مایکوباکتری استفاده می شود (۶). همچنین روشهای ایمونولوژیک مانند روش آگلوتیناسیون توسط پادتن های سرم خرگوش، ایمونو فلورسانس، ایمو نودیفیوژن، ایمونو الکتروفورز و نیز روش الایزا برای آنالیز پادگنی مایکوباکتری ها مورد استفاده قرار می گیرند که معمولا وقت گیر، پر هزینه و بعضا دارای حساسیت و ویژگی پایین می باشند (۷). لذا در بررسی سیر تکاملی گونه ای و تشخیص گونه ای مایکوباکتری ها و نیز افتراق گونه های کند رشد و تند رشد می توان از تکنیک های مولکولی جدید بهره گرفت. برای ردیابی DNA مایکوباکتری ها در نمونه های بالینی، پروب های اسید نوکلئیک مورد استفاده قرار گرفته اند، ولی به دلیل حساسیت بسیار محدود آنها، استقبال خوبی از این روش ها نشده است (۸). روش PCR امکان تکثیر DNA را در چند ساعت فراهم می آورد. انجام چند واکنش متفاوت PCR به صورت همزمان توسط روش مالتیپلکس PCR امکان پذیر است. بنابراین می توان از این تکنیک جهت افتراق گونه های مایکوباکتریوم استفاده کرد (۹). یکی از مشکلات PCR آلودگی در حین انجام کار است که با بکارگیری تکنیک های اصلاحی، اشکالات آن مرتفع گردیده است (۱۰). هدف از این مطالعه، بکارگیری یک روش مولکولی جهت تشخیص مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس می باشد که در آن از تکنیک های PCR[1] و RFLP[2] به صورت همزمان استفاده شده است.

مواد و روش ها:

جداسازی و تشخیص جدایه ها: ۶ جدایه بالینی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۵۰ جدایه بالینی مایکوباکتریوم بویس که در مناطق مختلف ایران به ترتیب از خلط انسان و عقده لنفاوی گاو جداسازی شده و به موسسه واکسن و سرم سازی رازی ارسال شده بودند مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین از ۵ سویه استاندارد شامل سه سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (C, DT, PN)، یک سویه مایکوباکتریوم بویس (AN5) و یک سویه مایکوباکتریوم بویس BCG (1173P2) جهت مقایسه استفاده گردید. تمامی جدایه های بالینی و سویه های استاندارد جهت تکثیر و بررسی سرعت رشد در محیط های شیب دار لوونشتاین جانسون حاوی پیرووات (برای افتراق جدایه های مایکوباکتریوم بویس) و لوونشتاین جانسون حاوی گلیسیرین (برای افتراق جدایه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) کشت داده شدند. جهت افتراق گونه ها، تست های بیوشیمیایی شامل تجمع نیاسین، احیاء نیترات، تعیین فعالیت کاتالاز در دو دمای ۲۲ و ۶۸ درجه سانتیگراد و بررسی اثر تیوکسی فن – ۲- کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) انجام گرفت (۱۰) .

استخراج DNA: استخراج DNA از مایکوباکتری ها به روش معرفی شده توسط Van Soolingen انجام گرفت (۱۱). جهت بررسی کیفی و کمی DNA استخراج شده از الکتروفورز و اسپکتروفتومتری با روش نانودراپ استفاده گردید (۱۲).

تکثیر قطعه DNA از شبه ژن *oxyR*: شبه ژن *oxyR* یک شبه ژن مشترک در تمامی مایکوباکتری ها می باشد. یک قطعه از شبه ژن *oxyR* که واجد ۵۴۸ جفت باز می باشد، در این مطالعه مورد

1. Polymerase Chain Reaction
2. Restriction Fragment Length Polymorphism

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

استفاده قرار گرفت. جهت تکثیر این قطعه از پرایمرهای موجود در جدول شماره ۱ استفاده گردید.

مخلوط واکنش در هر لوله شامل موارد ذیل بود: 5µl از بافر PCR (10mM Tris–HCl pH 9, 50mM KCl, and 0.1% Triton X-100)، 2.5mM MgCl2، 0.2mM از هر یک از dNTPs، 1µM از پرایمر و 1.25U از آنزیم *Taq* polymerase. حجم نهایی واکنش 50µl بود.

دناتوراسیون اولیه در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت یک دقیقه انجام شد، سپس تکثیر در ۳۰ سیکل به ترتیب زیر انجام گرفت: دناتوراسیون در ۹۴ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ ثانیه، اتصال پرایمرها (annealing) در ۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۲۱ ثانیه و پلی مریزاسیون (extension) در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۲۲ ثانیه. پلی مریزاسیون نهایی در ۷۲ درجه سانتیگراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد.

الکتروفورز محصولات PCR: جهت الکتروفورز محصولات PCR از ژل آگاروز ۱/۸٪ استفاده گردید. جهت تعیین وزن مولکولی از 100-1000 bp ladder (Roche, German) استفاده شد. الکتروفورز در ۸۶ ولت به مدت ۴۵ دقیقه انجام شد. سپس ژل در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۳٪ رنگ آمیزی شد. جهت مشاهده و تصویر برداری از باندهای احتمالی، از دستگاه ژل داک استفاده گردید.

RFLP: پس از مشاهده باند مورد نظر در محصولات PCR، از آنزیم *AluI* (Roche, German) جهت برش دادن محصول PCR استفاده شد. قطعه ۵۴۸ جفت بازی شبه ژن *oxyR* در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG واجد ۴ سایت برش توسط آنزیم *AluI* است، در حالی که در سایر مایکوباکتریهای کمپلکس توبرکلوزیس واجد ۳ سایت برش می باشد. ۵ میکروگرم از محصول PCR درون میکروتیوب تحت تاثیر ۲ میکرولیتر از آنزیم *AluI* قرار گرفت و میکروتیوب به مدت ۱۶ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید.

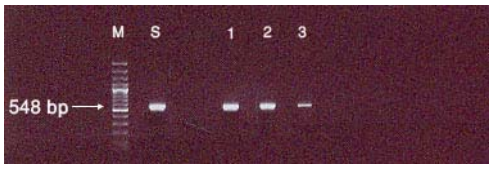
الکتروفورز محصولات RFLP: جهت الکتروفورز محصولات RFLP ژل آگاروز ۱/۸٪ تهیه گردید. الکتروفورز در ولتاژ ثابت ۸۶ ولت به مدت ۵۵ دقیقه انجام گرفت. پس از الکتروفورز، ژل آگاروز در محلول اتیدیوم بروماید ۰/۰۳٪ رنگ آمیزی و سپس برای مشاهده باندها از دستگاه ژل داک استفاده گردید.

یافته ها:

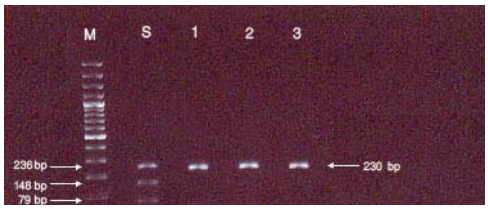
در این مطالعه از روش PCR-RFLP جهت افتراق گونه ها استفاده شد. ژن تکثیر یافته از طریق PCR در این تحقیق قطعه ای از شبه ژن *oxyR* بود. محصولات PCR پس از الکتروفورز بر روی ژل آگاروز جداسازی شدند. در تمامی جدایه های انسانی، جدایه های گاوی و سویه های استاندارد مورد مطالعه، باند مربوط به قطعه ۵۴۸ جفت بازی مشاهده شد (شکل شماره ۱). بنابراین ثابت شد که تمامی جدایه های مورد نظر به کمپلکس توبرکلوزیس تعلق دارند. پس از تکثیر قطعه مورد نظر، محصول PCR توسط آنزیم محدود کننده *AluI* برش داده شد. آنزیم *AluI* بر روی قطعه ۵۴۸ جفت بازی در مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم بویس BCG واجد ۴ ناحیه برش است، بنابراین باید پس از برش ۵ قطعه با اندازه های ۲۳۸، ۱۴۸، ۷۹، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی دیده شود، اما تنها یک الگوی سه باندی شامل قطعات ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده شد (شکل شماره ۲). در مورد سایر مایکوباکتریوم های کمپلکس توبرکلوزیس نیز قطعه ۵۴۸ جفت بازی واجد سه ناحیه برش برای آنزیم *AluI* است و باید قطعات ۲۳۶، ۲۲۷، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی دیده شود، اما تنها یک باند ۲۳۰ جفت بازی قابل رویت بود که این باند نماینده قطعات ۲۳۶ و ۲۲۷ جفت بازی بود (شکل شماره ۲). با استفاده از این روش، تمامی ایزوله های جدا شده از انسان، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تمامی ایزوله های جدا شده از گاو مایکوباکتریوم بویس تشخیص داده شدند (شکل شماره ۳).

جدول ۱: پرایمرهای مورد استفاده جهت تکثیر قطعه ۵۴۸ جفت بازی از شبه ژن *oxyR* در مایکوباکتری ها

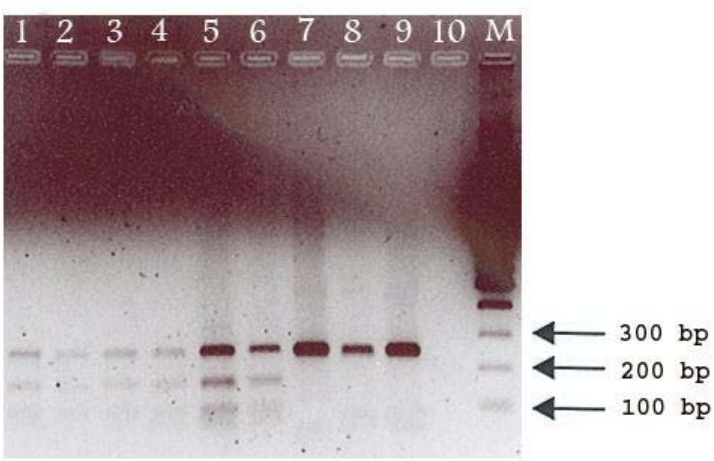
Target gene	Primer	Oligonucleotide sequence (5′–3′)	Fragment size (bp)	Annealing temperature	Reference
oxyR	F R	5′-GGTGATATATCACACCATA-3′ 5′-CTATGCGATCAGGCGTACTTG-3′	548	55	Musser et al. (1996) (15)



شکل ۱: در تمامی جدایه های انسانی و سویه های استاندارد پس از تکثیر ژن *oxyR* یک باند واجد ۵۴۸ جفت باز مشاهده شد. *M*: مارکر *100-1000bp*. *S*: محصول تکثیر شبه ژن *oxyR* در یکی از سویه های استاندارد



شکل ۲: الکتروفورز آگاروز محصولات *PCR* شبه ژن *oxyR* پس از برش خوردن توسط آنزیم *AluI*. در جدایه های انسانی (ردیف های ۱ و۲ و۳) تنها یک باند ۲۳۰ جفت بازی دیده می شود، با توجه به شرایط کنترل شده الکتروفورز، این جدایه ها مایکوباکتریوم توبرکلوزیس هستند. در سویه استاندارد (ردیف *S*) که مربوط به مایکوباکتریوم بویس BCG (1173P2) می باشد، سه باند ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده می شود.



شکل ۳: الکتروفورز آگاروز محصولات *PCR* شبه ژن *oxyR* پس از برش خوردن توسط آنزیم *AluI*. در جدایه های گاوی (ردیف های ۱ تا ۵) سه باند ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی دیده می شود. در ردیف ۶ مایکوباکتریوم بویس *BCG (1173P2)* قرار گرفته است. در ردیفهای ۷ و ۸ دو ایزوله انسانی جهت مقایسه با ایزوله های گاوی قرار داده شده است که در آنها تنها باند ۲۳۰ جفت بازی دیده می شود. در ردیف ۹ سویه استاندارد *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و در ردیف ۱۰ کنترل منفی قرار گرفته است.

بحث:

بکارگیری روش های مولکولی نظیر PCR-RFLP که در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفته است، افتراق سریع و دقیق بین اعضاء کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* را امکان پذیر می نماید. از سوی دیگر، برخی مایکوباکتری های آتیپیک نیز می توانند علائم بالینی و نشانه های پرتونگاری غیر قابل تمیز از بیماری سل را در انسان ایجاد نمایند (۱۳). استفاده از روش PCR-RFLP در این زمینه نیز می تواند مفید واقع شود. افتراق موارد فوق الذکر در راستای برنامه کنترل و ریشه کنی بیماری سل اهمیت بیشتری می یابد. محققان توانسته اند با بررسی ژنوم کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* مناطقی را پیدا کنند که بیشتر دچار جهش می شوند. این مناطق اکثرا مربوط به نواحی ژن های کاذب می باشد، زیرا ژن های کاذب نسبت به ژن های عملکردی بیشتر دچار تغییرات می شوند (۱۴). از جمله این مناطق می توان به منطقه ۵۴۸ جفت بازی *oxyR* اشاره کرد. در اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی، ژن *oxyR* همانند یک حسگر و یک تنظیم کننده رونویسی پروتئین های درگیر در واکنش استرس اکسیداتیو عمل می کند. این ژن در اعضاء کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* درگیر جهش شده است و به احتمال زیاد *oxyR* در *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* یک پروتئین عملکردی را بیان نمی کند، بنابراین از آن به عنوان یک ژن کاذب (pseudogene) نام برده می شود (۱۵).

در گذشته روش های متعددی جهت افتراق بین گونه های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بررسی شده است. در سال ۱۹۹۶ سریواتسان و همکاران در ایالات متحده پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن *oxyR* را جهت افتراق بین گونه ها در ۱۰۵ نمونه بالینی مورد مطالعه قرار دادند و ثابت کردند که ۲۹ نمونه مایکوباکتریوم بویس و ۷۶ نمونه *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* بوده اند و بین نتایج تست های بیوشیمیایی و نتایج حاصل از مطالعه آنها هماهنگی ۱۰۰٪ وجود داشت (۱۵). از جمله ژن های دیگری که در گونه های کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* دچار تغییرات تک بازی شده اند، ژن پیرازینامید *pncA169* است که *مایکوباکتریوم بویس* دارای گوانین در موقعیت ۱۶۹ از این ژن می باشد، در حالی که سایر مایکوباکتریوم ها واجد سیتوزین در این موقعیت هستند. در سال ۱۹۹۸ مونترئوس و همکاران از تکثیر ژن *pncA169* با استفاده از *PCR* جهت افتراق بین *مایکوباکتریوم بویس* و مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده کردند و نشان دادند که تمامی ۱۲۱ جدایه ای که قبلا به عنوان *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* شناخته شده اند و اکثر جدایه هایی که قبلا به عنوان *مایکوباکتریوم بویس* شناخته شده اند، با این روش قابل افتراق می باشند، اما جدایه های *مایکوباکتریوم بویس* که از بز جدا شده بودند، با این روش *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داده شدند (۱۶). در سال ۲۰۰۴ پرابهاکار و همکاران در ایالات متحده جهت افتراق بین *مایکوباکتریوم بویس* و *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از روش *PCR* برای ارزیابی وجود ژن *hupB* استفاده کردند و نشان دادند که اولا این ژن در هیچیک از سایر مایکوباکتریوم های غیر متعلق به کمپلکس توبرکلوزیس وجود ندارد، ثانیا به خوبی می تواند بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بویس افتراق ایجاد کند (۱۷). در سال ۲۰۰۵ چوهان و همکاران یک روش نوین *Nested PCR* را برای افتراق بین مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و بویس ارزیابی کردند و نشان دادند که این روش می تواند حتی وجود ۵ باسیل توبرکل را در نمونه های بالینی ردیابی کند (۱۸). در سال ۲۰۰۶ ارایز و همکاران از یک روش مالتیپلکس *PCR* جهت افتراق *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و *مایکوباکتریوم بویس* بهره گرفتند (۱۹).

محققان جهت طبقه بندی اعضاء کمپلکس توبرکلوزیس از نوکلئوتید چند شکلی کاتالاز *(katG463)* و ژیراز *(gyrA95)* نیز استفاده کرده اند (۲۰). تفاوتهای موجود در *DR (Direct Repeat)* که در تکنیک *DNA fingerprinting* از آن استفاده می شود (۲۱)، همچنین نواحی ژنومی متغیر ژن زیرواحد بتای *RNA* پلی مراز *(rpoB)* و ناحیه بسیار متغیر از *16srRNA* و نیز نواحی حذف شده *RD5* و *RD7* با استفاده از تکنیک *Spoligo typing* نیز جهت تمایز بین اعضاء کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* استفاده می شوند (۲۲). محققان با مطالعه توأم این ژنها به وجود یک طیف از مشخصات ژنوتایپی- علی رغم مشخصات فنوتایپی مشابه- در میان جدایه های *مایکوباکتریوم بویس* پی برده اند، در حالی که تحقیقات نشان می دهد که در بین جدایه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تنوع ژنتیک کم می باشد (۲۳). تحقیقی که بر این اساس توسط سیلز و همکاران در سال ۲۰۰۱ انجام شده دلالت بر وجود یک فیلوژنی پیچیده بین جدایه های مایکوباکتریوم بویس مربوط به نمونه های با منشاء انسانی و حیوانی دارد که در مورد جدایه های این باکتری در ایران تحقیقات بیشتری در این زمینه لازم می باشد (۲۴).

نتیجه گیری:

گرچه یافته های این تحقیق که با استفاده از روش مولکولی *PCR-RFLP* به دست آمده نشان می دهد که می توان با دقت و سرعت بالا و بی نیاز از گذراندن دوره های انکوباسیون طولانی مایکوباکتری و انجام تست های افتراقی، *مایکوباکتریوم بویس* را از *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تشخیص داد، اما این امکان وجود دارد که آنالیز شمار بیشتری از جدایه ها باعث شناسایی ارگانیسم هایی شود که با بکارگیری روش فوق نتیجه مشابهی به دست نیاورند که علت آن را می توان به ارتباط بسیار نزدیک ژنتیک و فیلوژنی پیچیده بین اعضاء کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* نسبت داد و نیاز به تحقیقات بیشتر را طلب می کند، اما می توان نتیجه گرفت که در حال حاضر روش *PCR-RFLP* مبتنی بر *oxyR* یک روش ارزشمند جهت افتراق سریع و دقیق *مایکوباکتریوم بویس* از سایر مایکوباکتری های کمپلکس توبرکلوزیس است که این خود علاوه بر کنترل سریع بیماری در دام و انسان، در درمان به موقع بیماران مبتلا به سل ریوی و خارج ریوی، بخصوص بیماران دارای نقص ایمنی از اهمیت بالایی برخوردار است (۲۵). مایکوباکتریوم بویس را می توان از سل انسانی نیز جدا نمود، همچنین احتمال جداسازی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* از موارد سل غیر انسانی وجود دارد. تعیین میزان شیوع و بروز عفونت های انسانی که توسط مایکوباکتریوم بویس ایجاد می شود، بسیار ارزشمند می باشد و به عنوان شاخص بهداشتی جامعه مطرح می باشد (۲۶). روش استفاده شده در این تحقیق مشابه روش سریواتسان و همکاران (۱۵) بود که هدف از تکرار آن بررسی کارایی این روش در افتراق ایزوله های ایران و در بهینه سازی تولید توبرکولین بود.

تقدیر و تشکر:

جا دارد از تمامی کارکنان محترم موسسه واکسن و سرم سازی رازی بخصوص پرسنل فداکار بخش توبرکولین که در راستای تحقق اهداف این پروژه از هیچ کوششی دریغ نکردند نهایت تشکر و قدردانی به عمل آید.

فهرست مراجع:

1. Rastogi N, Legrand E and Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 2001; **20** (1): 21-54.
2. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, and de Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. *J Clin Microbiol* 1993; **31** (5):1143-1147.
3. Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Richter E, and Niemann S. Use of the Genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(8):3699–3703.
4. Pavlik I, Yayo Ayelle W, Havelkova M, Svejnochova M, Katalinik-Jankovic V, and Zolnir-Dovc M. *Mycobacterium bovis* in human population in four Central European countries during 1990–1999. *Vet Med – Czech* 2003; **4**: 90–98.
5. Shinnick TM, and Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Europ J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**(11):884-901.
6. Kent PT, and Kubika GP. 1985; *Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory.* U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta, Ga.
7. Miller DS, Collins MT, Smith BB, Anderson PR, Kramsky J, Wilder G, *et al*. Specificity of four serologic assays for *Mycobacterium avium* ss *paratuberculosis* in llamas and alpacas: a single herd study. *J Vet Diagnos Invest* 2000; **12**(4):345-353
8. Heifets LB, and Good RC, Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR, ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control*. Washington DC; American Society for Microbiology. 1994; pp.85–109.
9. Brand NJ, Vallins WJ, Yacoub M and Barton PJR, The polymerase chain reaction and its applications to basic research in molecular biology. In: Grange JM, Fox A and Morgan NL eds. *Genetic manipulation: techniques and*

application. Oxford; Blackwell. 1991; pp.279-293.

10. Herrera EA, Perez O and Segovia M, Differentiation between *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by a multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Bacteriol* 1996; **80**(6):596-604.
11. van Soolingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM, Ritacco V, *et al.* Use of various genetic markers in differentiation of *Mycobacterium bovis* strains from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994; **32**(10):2425–2433.
12. Shanks OC, Atikovic E, Blackwood D, Lu J, Nobel RT, Domingo JS, *et al.* Quantitative PCR for Detection and Enumeration of Genetic Markers of Bovine Fecal Pollution. *Appl Environ Microbiol* 2008; **74**(3):745–752.
13. Leite CQF, de Souza CWO, and Leite SR, Identification of mycobacteria by thin layer chromatographic analysis of mycolic acids and conventional biochemical method: four years of experience. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1998; **93**(2):801–805.
14. Li WH, Gojobori T, and Nei M. Pseudogenes as a paradigm of neutral evolution. *Nature (London)* 1981; **292**(5820):237–239.
15. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, Siddiqui S, Khalaf CA, *et al.* Identification of a polymorphic nucleotide in *oxyR* specific for *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 1996; **34**(8):2007–2010.
16. de los Monteros LEE, Galan JC, Gutierrez M, Samper S, Garcia Marin JF, Martin C, *et al*. Allele-specific PCR method based on *pncA* and *oxyR* sequences for distinguishing *Mycobacterium bovis* from *Mycobacterium tuberculosis*: intraspecific *M. bovis pncA* sequence polymorphism. *J Clin Microbiol* 1998; **36**(1):239–242.
17. Prabhakar S, Mishra A, Singhal A, Katoch VM, Thakral SS, Tyagi JS, *et al.* Use of the *hupB* encoding a histone-like protein of *Mycobacterium tuberculosis* as a target for detection and differentiation of *M.tuberculosis* and *M.bovis*. *J Clin Microbiol* 2004; **42**(6):2724-2732.
18. Chauhan DS, Katoch VM, Srivastava K, Katoch VM, Srivastava K, Thakral SS, *et al.* Direct detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* in bovine samples by a novel Nested PCR assay: correlation with conventional techniques. *J Clin Microbiol* 2005; **43**(11):5670-5678.
19. Arraiz N, Romay Z, Faria N and Mujica D, Differential identification of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* clinical isolates by multiplex PCR assay. *Revista Cientifica-Facultad de Ciencis Veterinarias* 2006; **16**(5):622-628.
20. Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS, *et al.* Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**:9869–9874.
21. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, *et al.* Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(4):907–914.
22. Kox LFF, van Leeuwen J, Knijper S, Jansen HM and Kolk AHJ, PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples. *J Clin Microbiol* 1995; **33**(12):3225–3233.
23. Huard RC, Fabre M, de Hass P, Lazzarini LCO, van Soolingen D, Cousins D, *et al*. Novel genetic polymorphisms that further delineate the phylogeny of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Bacteriol* 2006; **188**(12):4271-4287.
24. Sales MPU, Taylor GM, Hughes S, Yates M, Hewinson G, Young DB, *et al*. Genetic diversity among *Mycobacterium bovis* isolates: a preliminary study of strains from animal and human sources. *J Clin Microbiol* 2001; **39**(12):4558–4562.
25. Kristjansson M, Green P, Manning HL, Slutsky AM, Brecher SM, Fordham Von Reyn C, *et al.* Molecular confirmation of bacillus Calmette-Gue´rin as the cause of pulmonary infection following urinary tract instillation. *Clin Infect Dis* 1993; **17**(2):228–230.
26. Blazquez J, Espinosa LE, de Los Monteros LEE, Samper L, Martin C, Guerrero A, *et al.* Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(6):1390–1393.