مجله میکروب شناسی پزشکی ایران

سال ۱ شماره ۴ زمستان ۱۳۸۶، صفحات ۱-۱۱

بررسی هتروژنیستی سویه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* جدا شده از نمونه های بالینی با روش MEE

محمد مهدی فیض آبادی[*۱]، احمد رضا بهره مند[۲]، پروین حیدریه[۳]، حسین شجاعی[۳]

۱) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲) بخش تحقیقات سل و بیماری های ریوی، انستیتو پاستور ایران

۳) گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان

نویسنده رابط: محمدمهدی فیض آبادی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

تلفن: ۸۸۹۵۵۸۱۰ mfeizabadi@tums.ac.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۹/۱۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۲/۲۲

چکیده:

زمینه و اهداف: با استفاده از روش MEE که کارایی آن در مطالعات اپیدمیولوژیک و تاکسونومی بر روی باکتری های مختلف به اثبات رسیده است، هویت ژنتیکی و روابط خویشاوندی سویه های متعلق به گونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* که در بخش تحقیقات سل و بیماری های ریوی از بیماران جدا شده بود مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی: در این پژوهش با استفاده از روش MEE، ۹ سویه ایرانی و۱۲ سویه غیر ایرانی از گونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* برای ۱۲ لوکوس آنزیمی مورد بررسی ومقایسه قرار گرفتند. از این سویه ها بعد از کشت برروی محیط LJ و BACTEC 13A با روش سونیکاسیون بر روی یخ آنزیم های مورد مطالعه استخراج گردید. عصاره آنزیمی با استفاده ژل نشاسته الکتروفورز افقی گردیده و آنزیم های مربوطه با استفاده از افزودن سوبسترای مربوطه به صورت محلول و یا Agar overlay که منجر به تغییرات کروموژنی در سطح ژل می گردید مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته ها: نتایج حاصله نشان دهنده تفرق ژنتیکی نسبتا زیاد بین سویه های این گونه و حضور زیر گونه های متفاوت در آن می باشد. همچنین نتایج نشان دهنده عدم دقت تست های بیوشیمیایی در تعیین هویت باکتری در پاره ای از موارد بود.

نتیجه گیری:سویه های ایرانی *مایکوباکتریوم کانزاسی* از تنوع ژنتیکی زیادی برخوردار می باشند. زیاد بودن فواصل ژنتیکی در بین سویه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* احتمالا به دلیل عدم جداسازی سویه های حدواسط می باشد.

کلید واژه ها: *مایکوباکتریوم کانزاسی* ، MEE، مایکوباکتریوم های غیر سلی

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه:

مایکوباکتریوم های غیر سلی یا به اختصار NTM (Non tuberculous mycobacteria) نامی است که برای مجزا ساختن مایکوباکتریوم های محیطی از مایکوباکتریوم هایی که عامل جذام و سل هستند بکار می رود (۳،۲،۱). NTM ارگانیسم هایی هستند که می توانند در انواع منابع آب- آب طبیعی، خاک، رسوبات دریا یا آب شیر- یافت شوند (۵ ،۴). مایکوباکتریوم های محیطی قادرند در حضور ترکیباتی مانند کلر یا ازن زندگی کنند این ترکیبات ترجیحا باعث مرگ باکتری هایی می شود که دارای رشد سریع بوده و با آنها بر سر مواد غذایی رقابت می کنند (۶). آنها بر خلاف *M. tuberculosis* و *M. leprea* پاتوژن هایی مطلق نیستند و به صورت طبیعی باعث بیماری در انسان نمی شوند. این باکتری ها، پاتوژن های فرصت طلبی بوده که در صورت ضعف سیستم دفاعی میزبان قادر به ایجاد بیماری هستند (۸ ،۷). از گونه های مهم این گروه گونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* می باشد. این گونه در بیشتر مناطق دنیا دومین یا سومین عامل ایجاد کننده بیماری های ریوی می باشد که از نظر کلینیکی یا مشخصات رادیولوژیک از سل ناشی از *M. tuberculosis* غیر قابل تفکیک می باشد (۱۱، ۹،۱۰). به کمک آزمایش های بیوشیمیائی، انواع ابزارهای پیشرفته مولکولی و با بکارگیری روش های آنالیز نومریکال تاکسونومی، کلاسترهای خویشاوندی آنها شناسایی و تاکسونومی مایکوباکتریوم ها مشخص می گردد (۱۳ ،۱۲). از جمله با استفاده از روش MEE[1] اطلاعات جالبی در تفرق گونه های مایکوباکتریال بدست آمده است که بیانگر وجود پیوستگی بین گروه بندی (clustering) این گونه ها با گروه بندی (grouping) رانیون می باشد. برای مثال تفرق ژنتیکی در بین سویه های MAC[2] در گزارشات Yarkus، Wasem و Feizabadi با استفاده از روش MEE به اثبات رسیده است (۱۵-۱۳). هنگامی که ویژگی های *مایکوباکتریوم کانزاسی* که فتو کروموژنی کند رشد است با استفاده از روش های استاندارد مورد شناسایی قرار می گیرد، بنظر می رسد این گونه شامل یک گروه ارگانیسم های هموژن باشد. در مطالعات نومریکال تاکسونومی، سویه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* کلاستر فشرده ای را می سازند که هر چند با سویه های *M. gastri* (یک گونه غیر کروموژن) رابطه خویشاوندی نزدیکی دارد ولی از آن متمایز می باشد. این دو گونه از لحاظ ژن های 16SrRNA واکنش های سرولوژی کاتالاز مشابه می باشند (۱۸-۱۶). هتروژنیسیتی در میان نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* در چند بررسی گزارش و به اثبات رسیده است (۲۴-۱۹, ۱۶ ,۷). و هر ژنوتیپ نیز نشانه های بالینی متفاوتی داشته است، ولی اساس ژنتیکی این تنوع هنوز مورد تفحص قرار نگرفته است (۲۸-۲۵). هدف از این پژوهش بررسی هویت ژنتیکی سویه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* در ایران با استفاده از روش MEE و تعیین روابط خویشاوندی و تنوع احتمالی سویه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* در ایران می باشد.

مواد و روش ها:

در این تحقیق تعداد ۹ گونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* جدا شده از نمونه های بالینی از انستیتو پاستور ایران و ۱۲ گونه از همین باکتری از کشورهای استرالیا و بلژیک مورد استفاده قرار گرفت. نمونه ها از آزمایشگاه مایکوباکتریولوژی کواینزلند و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری بلژیک مستقر در شهر Antwerpen دریافت شده بود.

کشت- در سه مرحله انجام گردید: ۱) تهیه کشت تازه بر روی محیط Lowenstein Jensen با شرایط ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴-۳ هفته ۲) انتقال نمونه های تازه به محیط BACTEC 13A همراه با مکمل در شرایط استریل به مدت ۷-۵ روز در ۳۷ درجه سانتی گراد ۳) در صورت مثبت بودن رشد باکتری، نمونه ها به بطری های بزرگتر شیشه ای حاوی ۱۵۰cc از همین محیط مایع تحت شرایط استریل منتقل و به مدت ۷-۳ روز در انکوباتور شیکر دار در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. بطری های دارای رشد جهت استخراج عصاره آنزیمی مورد استفاده قرار گرفتند.

برداشت سلول- سویه های کشت داده شده در ۳۰۰۰ rpm و در شرایط $4^{\circ}C$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شده سپس رسوب حاصل در بافر PBS حل و مجدداً در تحت همان شرایط سانتریفوژ گردید. این عمل دو بار تکرار و رسوب نهایی تا مرحله استخراج آنزیمی در فریزر $-20^{\circ}C$ نگهداری شد.

استخراج عصاره آنزیمی- عصاره آنزیمی با روش سونیکاسیون متناوب در ظرف یخ انجام گرفت. در این روش به هر لوله سانتریفوژ حاوی سلول های برداشته شده ، ۱cc محلول بافر سونیکاسیون (NADP0.5mM, Tris10mM, EDTA1mM و PH=۶/۸) اضافه و سوسپانسیون حاصل از هر سویه به یک

[1] Multi locus enzyme electerophoresis
[2] *Mycobacterium avium complex*

Archive of SID

www.SID.ir

بطری bijou حاوی 500mg glass bead در روی ظرف یخ منتقل شدند. سپس هر بطری جداگانه شش بار، هر بار به مدت یک دقیقه و با تناوب یک دقیقه در حمام یخ به کمک دستگاه سونیکاتور با پروب سونیک (Lab Sonic 1510) 50w سونیکه شده تا عصاره حاوی آنزیم از هر سویه بدست آید. آنگاه محتویات هر بطری به لوله های پلاستیکی استریل میکروفیوژ منتقل و در 11000 rpm به مدت ۲۰دقیقه در دستگاه میکروفیوژ قرار گرفتند. محلول رویی حاوی عصاره آنزیمی به لوله های میکروفیوژ جدید منتقل و در $^{\circ}C$ ۲۰- تا زمان الکتروفورز نگهداری شدند (۱۳).

تهیه ژل- طبق دستور العمل Selander وهمکاران (۱۹) در تهیه ژل نشاسته جهت الکتروفورز افقی بسته به نوع آنزیم، پودر نشاسته سیب زمینی از هر دو نوع هیدرولیزات و محلول به نسبت های معین با یکدیگر مخلوط سپس بافر ژل و آب مقطر دو بار تقییر به آن اضافه گردید (جدول۱). سوسپانسیون تهیه شده مرتباً بر روی شعله گاز چرخانیده تا حرارت آن به بالای نقطه جوش برسد، سپس سریعاً در حالیکه حرکات چرخشی ارلن ادامه داشت به لوله تخلیه هوا متصل تا از ظهور حباب های بزرگ در سطح سوسپانسیون (۶۰-۳۰ ثانیه) جلوگیری شود آنگاه ارلن از لوله تخلیه هوا جدا و سوسپانسیون داغ بطور یکنواخت و تا لبه قالب ژل ریخته شد. بعد از اینکه دیگر از سطح ژل بخاری متصاعد نگردید، سطح ژل با درپوش پلاستیکی با احتیاط و بدون ایجاد حبابی بر سطح آن پوشانیده و در همان حال به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار داده تا خنک شود. قالب ژل به همراه درپوش در کیسه نایلونی پیچیده و به مدت یک ساعت در یخچال $^{\circ}C$ ۴ گذاشته تا بدون خشک شدن ژل خنک شدن آن ادامه یابد.

قرار دادن نمونه ها در ژل- با توجه به به نوع ژل، cc ۲۰۰ از الکترود بافر مناسب را در محفظه بافر ریخته سپس ژل خنک شده را از کیسه نایلونی و درپوش مخصوص جدا و در عرض آن برش سه سانتیمتری ایجاد می کنیم. برای قرار دادن نمونه ها در این شکاف از کاغذ فیلتر واتمن شماره ۳ به ابعاد cm ۱× ۰/۵ استفاده شد. یک قطعه از این فیلترها در اپندورف حاوی عصاره آنزیمی (۳۰ µl) بعلاوه لودینگ بافر (۱۰ µl) قرار داده وبعد از گرفتن مایع اضافی در سطح کاغذ خشک کن در محل شکاف عرضی ژل با فاصله mm ۲ قرار داده شد. به این ترتیب تا بیست نمونه بطور همزمان الکتروفورز می گردید (۲۹).

الکتروفورز- بعد از قرار دادن در نمونه ها در ژل طوریکه قسمت دارای شکاف نزدیک کاتد قرار گیرد، چرخه الکتریکی تکمیل گردید. سپس الکتروفورز با پوشانیدن سطح ژل با کاغذ سلیفون و قرار دادن قالب و محفظه های بافر به همین شکل در شرایط $^{\circ}C$ ۴ و ولتاژ مناسب بر حسب نوع ژل (جدول ۲) و زمان لازم برای الکتروفورز هر ژل انجام گرفت. بعد از رسیدن Tracking dyeبه انتهای ژل، منبع الکتریکی خاموش وژل از تماس با بافر جدا می شد.

برش ژل- ژل از یخچال خارج، پوشش سلیفون آن جدا و سطح آن خشک می گردید. سپس برروی سطح سلیفون دیگر برگردانیده و به کمک سیمی نازک بسته به تعداد آنزیم های مورد آزمایش به ۴-۳ برش افقی با قطر تقریبی ۲-۱ میلی متر بریده می شد.

رنگ آمیزی هیستوشیمیایی- ۱۲ آنزیم که بر حسب سیستم بافری مورد استفاده به ۴ گروه تقسیم می گردند.

catalase (CAT),adenylate kinase (ADK),esterase (EST1, EST2)
superoxid dismutase (SOD),maltase dehydrogenase (MDH), phosphogluco isomerase(PGI)
isocitrate dehydrogenase(IDH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (PGD)
proxidase(PER),leucyl-glycine peptidase (LGG)

شرایط و دستور العمل رنگ آمیزی در جدول ۳ آمده است. بعد از رنگ آمیزی، ژل ها در تاریکی و $^{\circ}C$ ۳۷ به مدت ۱۰ دقیقه تا ۲ الی ۳ ساعت قرار داده شدتا باندها ظاهر و نتایج بر حسب مسافت پیموده شده از نقطه شروع ثبت گردید.

جدول ۱: ژل های استفاده شده در این پژوهش

نوع ژل	مواد مورد استفاده ومیزان آنها			
	D.D Water (ml)	Gel buffer (ml)	Potato Starch	
			soluble (gr)	Hydrolysed (gr)
TC8	۳۰۰	۹/۶	۵/۵	۳۱/۳
TC6	۳۱۵/۶	۴/۴	۵/۷	۳۲
LiOH	۲۹۰	۳۰	۵/۷	۳۲
SP7	۳۱۰	۷	۵/۷	۳۲

جدول۲: انواع ژل وسیستم های بافری و شرایط آن در این پژوهش

ژل	سیستم بافری	جریان (mA)	ولتاژ (V)	زمان (ساعت)
TC8	TC8	۴۵	۵۰	۲۰
TC6	TC6	۳۰	۵۰	۱۶
LiOH	LiOH	۳۰	۱۵	۱۶
SP7	SP7	۴۰	۵۰	۱۶

Archive of SID

www.SID.ir

جدول۳: دستورالعمل هیستوشیمیایی برای آنزیم های مورد آزمایش : الف- آنزیم های دهیدروژناز

Anzyme Dehydrogenase	substrate,copling enzyme compound or solution	buffer and salt type(amt)	coenzyme
MDH	substrate solution ۱۰ ml (L malic acid ۱۳/۴ gr, ۲ M Na_2Co_3 ۴۹ml, H_2O to ۱۰۰ ml)	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8) ۲۰ ml	NAD ۳ mg
IDH	Isocitric acid ۲۰ mg	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8) ۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	NADP ۲/۵ mg
6 GP (PGD)	6-Phosphogluconicacid (barium salt) ۴۰ mg	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8) ۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	NADP ۲/۵ mg
6 GP (PGD)	Glucose 6- phosphate (disodium salt hydrate) ۱۰۰ mg	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8) ۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	NADP ۲/۵ mg

ادامه جدول ۳: دستورالعمل رنگ آمیزی هیستوشیمیایی برای آنزیم های مورد آزمایش ب) سایر آنزیم ها

Enzyme	Substrate,coupling enzyme Coenzyme/Compound(amt)	Buffer and salt type (amt)	Dye and Catalyst type(amt)
ADK	Glucose ۲۰ mg, ADP ۱۰ mg, NAD ۳ mg G-6-PD ۲۵u , Hexokinase ۱۰ mg	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8) ۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	MTT ۴ mg PGM ۲۰ unit
EST	α-1β- Naphtyl acetate or α-1β- Naphtyl propionate (٪۱ solution in acetone) ۱/۵ ml	Sodium phosphate(pH8) ۴۰ ml	Fast Blue RR salt ۲۵ mg in ۲۰ ml Double distilled water
PGI	Fructose 6-phosphate ۴۰mg , NAD ۳ mg Glucose-6-phosphate dehydrogenase ۱۰u	MTT ۴ mg, PMS ۰/۲ mg, Tris HCl (pH8)۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	MTT ۴ mg PMS ۰/۲ mg
LGG	Lysyl-Glycyl Glycin ۲۰ mg , Horseradish Peroxidase ۵ mg Amino acid oxidase ۵ mg, O.Dinasidine phopho ۵ mg	Sodium phosphate buffer (pH7) ۲۰ ml	
SOD	NAD ۱۰ ml	Tris HCl (pH8) ۲۰ ml ٪۱ $MgCl_2$ ۵۰ µl	MTT ۴ mg PMS ۰/۲ mg

ادامه جدول ۳: دستور العمل رنگ آمیزی هیستوشیمیایی برای آنزیم های مورد آزمایش ج- سایر آنزیم ها

Enzyme	Compound or solution (amt)
کاتالاز	ژل را بـه مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰ ml از محلولی حاوی ۱/۵ ml پراکسید هیدروژن ۰/۰۰۶ درصد در انکوباتور بمدت نیم سـاعت قرار می دهیم سپس محلول بالا را خالی کرده و ژل را با آب می شوییم ودر محلول تازه حاوی ۱۰۰ میلی گرم پتاسیم فری سیانید در ۵۰ ml آب $FeCl_3$ 6 H_2O قرار می دهیم تا باندها ظاهر شوند.
پراکسیداز	ژل را در محلول O.Dinasidine ۵ mg و $KH_2PO_4$۱۳۶ mg قرار داده ودر $37^{\circ}C$ به مدت ۴۵ دقیقه گرمـادهی مـی نمـاییم سپس محلول را خالی کرده و ژل را در محلول ۰/۰۰۶ درصد H_2O_2 قرار می دهیم تا باندها ظاهر شوند.

Archive of SID

www.SID.ir

یافته ها:

تعداد ۲۱ نمونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* انتخاب شده برای ۱۲ لوکوس آنزیمی با استفاده از روش MEE مورد آزمایش قرار گرفتند. نتایج این آزمایشات در جدول (۶، ۵، ۴) آورده شده است. اعداد این جداول نشان دهنده هر فرم آللی بر روی ژل است که با توجه به مهاجرت آنزیم مورد نظر و در مقایسه با فرم های آللی همان آنزیم تعیین شده است. هر آنزیمی که از خود فعالیتی نشان نداده است با عدد صفر (و به عنوان Null allele) مشخص شده است. تفرق ژنتیکی (Genetic diversity (h)) برای هر لوکوس آنزیمی از روی فرمول $h= 1- \Sigma_{xi}^2[n/(n-1)]$ محاسبه شده است. که در آن xi = فرکانس i امین آلل در آن لوکوس ، n = تعداد نمونه ها یا تیپ های الکتروفورزی (ETs) در نمونه و n/(n-1) تصحیحی برای تمایل در نمونه هایی با تعداد کم می باشد. تفرق ژنتیکی کل (H) بصورت میانگین تفرق در تمام لوکوس ها محاسبه شده است. فاصله ژنتیکی (genetic distance=D) بین جفت ETs نیز به صورت نسبت لوکوس های ثابتی که در آن آلل های ناجور رخ می دهد (میزان ناجور بودن آلل ها) محاسبه شده است (۳۰) که در آن از برنامه کامپیوتری Phentree که بر اساس پکیج TAXAN2 می باشد استفاده شده است. این برنامه دندوگرامی را به وجود می آورد که در آن با استفاده از روش UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic average) و استراتژی clustering fusion ، روابط ژنتیکی در داخل دستجات ET و بین آنها را نشان می دهد. در نمونه هایی که با توجه به آزمایشات بیوشیمیایی به عنوان *مایکوباکتریوم کانزاسی* تحت الکتروفورز آنزیمی قرار گرفتند، برای لوکوسهای PGI,MDH,SOD و CAT هر کدام سه آلل، برای لوکوس های G6PD,IDH,6PGD,ADK,PER,LGG و EST2 هر کدام چهار آلل و برای لوکوس EST1 پنج آلل شناسایی شد. ۲۱ نمونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* مورد بررسی در ۲۰ تیپ الکتروفورزی قرار گرفتند (جدول۴).

با در نظر گرفتن فاصله ژنتیکی به مقدار ۰/۵ [Genetic distance (D) =0.5] در صد ناجور بودن آللی به مقدار ۵۰٪ (Dissimilarity matrix =50%) چهار گروه عمده در نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* بررسی شده به چشم می خورد که این چهار گروه روی هم ۱۸ نمونه را در بر می گیرند (جدول۵). بزرگترین گروه یا کلاستر، گروه IV است شامل ۱۰ نمونه می گردد که ۳ نمونه آن (نمونه شماره ۸ و۹و۲۱) ایرانی و بقیه نمونه ها غیر ایرانی می باشند. نمونه های ۵،۶ کاملا یکسانند و لذا در یک تیپ الکتروفورزی و به فاصله ژنتیکی صفر از یکدیگر قرار گرفته اند. گروه های II و III هر کدام سه نمونه را شامل می شوند که همگی ایرانی اند و گروه ۲، کوچکترین گروه قابل تشخیص در فاصله ژنتیکی ۰/۵، شامل دو نمونه غیر ایرانی می باشد. میانگین تفرق ژنتیکی بدست آمده برای ۲۱ نمونه *مایکوباکتریوم کانزاسی* در ۱۲ لوکوس آنزیمی ۰/۶۶۸ است. بیشترین تفرق ژنتیکی مربوط به لوکوس آنزیم PRR (۰/۸۱۹) و کمترین تفرق ژنتیکی مربوط به لوکوس آنزیم SOD (۰/۲۶۷) می گردد (جدول۶).

جدول ۴: فرکانس آللی ۱۲ لوکوس آنزیمی در ۲۰ تیپ الکتروفورزی *مایکوباکتریوم کانزاسی*

ET	PER	IDH	6PGD	PGI	MDH	SOD	G6PD	CAT	ADK	EST1	LGG	EST2
۱*	۰	۰	۳	۲	۲	۲	۰	۱	۲	۰	۰	۰
۲*	۰	۰	۳	۰	۲	۲	۲	۱	۰	۴	۰	۰
۳*	۰	۲	۱	۱	۱	۲	۲	۰	۲	۲	۱	۱
۴*	۰	۲	۳	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۱
۵*	۱	۱	۳	۱	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲
۶*	۱	۲	۰	۱	۱	۲	۰	۱	۱	۰	۲	۰
۷	۱	۲	۲	۱	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۲
۸	۱	۲	۲	۰	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۲
۹	۱	۶	۰	۲	۲	۰	۰	۱	۲	۰	۰	۰
۱۰	۱	۶	۰	۰	۲	۲	۰	۲	۳	۵	۰	۰
۱۱	۱	۶	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۳	۵	۰	۰
۱۲	۲	۰	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۲	۴	۲
۱۳*	۲	۲	۱	۱	۳	۲	۱	۱	۲	۱	۲	۲
۱۴	۲	۲	۲	۲	۲	۳	۲	۲	۳	۶	۰	۴
۱۵*	۲	۲	۳	۲	۲	۲	۳	۱	۲	۲	۱	۲
۱۶*	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۲	۱	۲	۲	۱	۲
۱۷*	۲	۳	۱	۱	۱	۲	۲	۰	۲	۲	۲	۱
۱۸*	۲	۳	۳	۱	۱	۲	۳	۲	۱	۳	۱	۰
۱۹	۲	۶	۲	۲	۲	۳	۲	۲	۳	۶	۴	۴
۲۰	۳	۲	۳	۲	۲	۲	۳	۱	۰	۲	۱	۲

* نمونه های غیر ایرانی

Archive of SID

www.SID.ir

جدول ۵: تعداد آلل ها و تفرق ژنتیکی ۱۲ لوکوس آنزیمی در *مایکوباکتریوم کانزاسی*

Enzyme	۱	۲	۳	۴	۵	h
فسفوگلوکوایزومراز (PGI)	۰/۱۴۳	۰/۴۲۹	۰/۴۲۹	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۶۴۳
مالات دهیدروژناز (MDH)	۰/۱۹۰	۰/۷۶۲	۰/۰۴۸	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۴۰۰
سوپراکسید دیسموتاز (SOD)	۰/۰۴۸	۰/۸۵۷	۰/۰۹۵	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۲۶۷
ایزوسیترات دهیدروژناز (IDH)	۰/۱۴۳	۰/۰۹۵	۰/۴۷۶	۰/۰۹۵	۰/۰۰۰	۰/۷۷۱
۶فسفوگلوکونات دهیدروژناز (6PGD)	۰/۱۴۳	۰/۱۴۳	۰/۲۸۶	۰/۴۲۹	۰/۰۰۰	۰/۷۲۹
گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز (G6PD)	۰/۱۹۰	۰/۰۴۸	۰/۶۱۹	۰/۱۴۳	۰/۰۰۰	۰/۵۸۶
کاتالاز (CAT)	۰/۰۹۵	۰/۵۷۱	۰/۳۳۳	۰/۰۰۰	۰/۰۰۰	۰/۵۸۱
آدنیلات کیناز (ADK)	۰/۰۹۵	۰/۰۹۵	۰/۵۷۱	۰/۲۳۸	۰/۰۰۰	۰/۶۲۹
استراز ۱ (EST1)	۰/۱۴۳	۰/۰۴۸	۰/۵۲۴	۰/۰۴۸	۰/۰۹۵	۰/۷۲۶
پراکسیداز (PER)	۰/۱۹۰	۰/۱۹۰	۰/۳۸۱	۰/۰۴۸	۰/۰۰۰	۰/۸۱۹
لیسین گلیسیل گلیسین پپتیداز (LGG)	۰/۲۸۶	۰/۴۷۶	۰/۰۹۵	۰/۰۹۵	۰/۰۰۰	۰/۷۰۷
استراز ۲ (EST2)	۰/۳۳۳	۰/۱۴۳	۰/۴۲۹	۰/۰۹۵	۰/۰۰۰	۰/۷۱۰
Mean Genetic Diversity (H)						۰/۶۸۸

Archive of SID

www.SID.ir

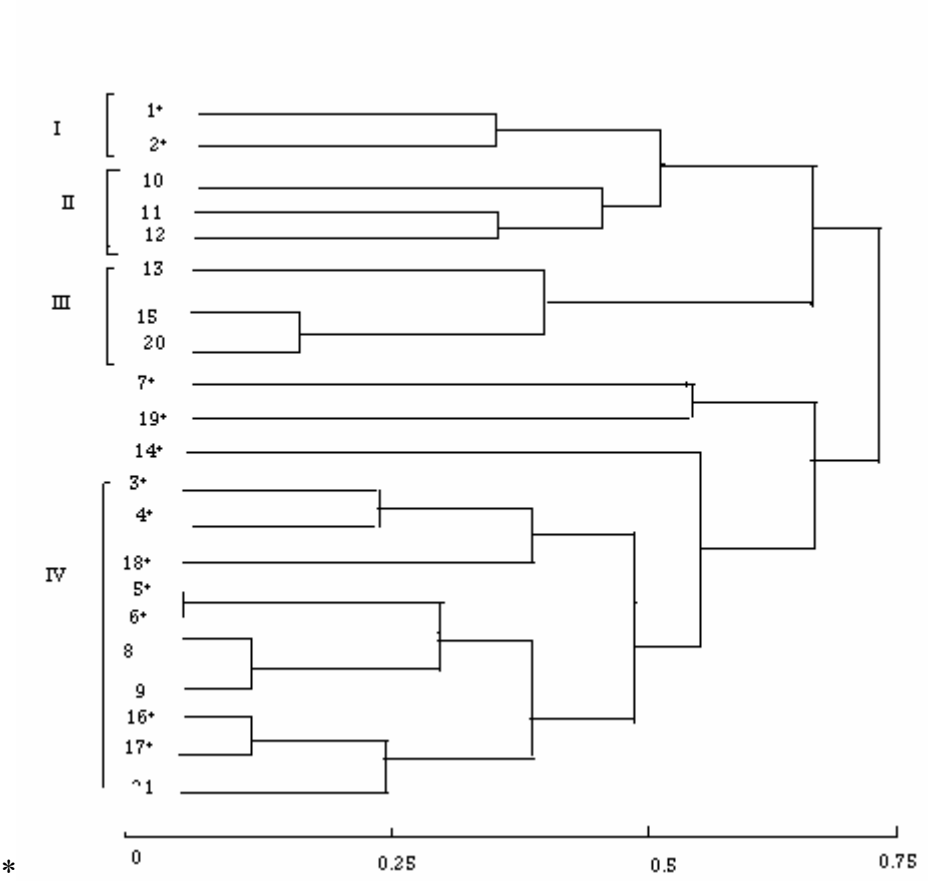
جدول ۶: درصد ناجور بودن آللی برای نمونه های مایکوباکتریوم کانزاسی

ET	۲	۲	۳	۴	۵	۶	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲	۱۳	۱۴	۱۵	۱۶	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰
۲	۰/۳۳																			
۳	۰/۷۵۰	۰/۷۵۰																		
۴	۰/۵۰۰	۰/۵۰۰	۰/۲۵۰																	
۵	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۵۰۰	۰/۲۵۰																
۶	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۵۰۰	۰/۲۵۰	۰/۰۰۰															
۷	۰/۵۸۳	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷														
۸	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۴۱۷	۰/۳۳۳	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰	۰/۶۶۷													
۹	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۵۰۰	۰/۴۱۷	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۷۵	۰/۰۸۳												
۱۰	۰/۳۳۳	۰/۵۸۳	۰/۹۱۷	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۵۰	۰/۷۵۰	۰/۷۵۰											
۱۱	۰/۵۸۳	۰/۵۰۰	۰/۹۱۷	۰/۸۳۳	۰/۷۵۰	۰/۷۵۰	۰/۵۸	۰/۶۹۷	۰/۵۸۳	۰/۴۱۷										
۱۲	۰/۵۰۰	۰/۶۶۷	۰/۸۳۳	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۶۶	۰/۵۸۳	۰/۴۱۷	۰/۸۳۳	۰/۳									
۱۳	۰/۶۶۷	۰/۸۳۳	۰/۸۵۰	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۹۱	۰/۴۱۷	۰/۴۱۷	۰/۸۳۳	۰/۶	۰/۸۳۳								
۱۴	۰/۸۵۰	۰/۸۳۳	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۵۸	۰/۵۸۳	۰/۶۶۷	۰/۸۳۳	۰/۹	۰/۸۳۳	۰/۷۵۰							
۱۵	۰/۸۵۰	۰/۸۵۰	۰/۸۳۳	۰/۷۵۰	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	۰/۹۱	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۷۵۰	۰/۶	۰/۵۰۰	۰/۴۱۷	۰/۸۳						
۱۶	۰/۵۰۰	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۳۳۳	۰/۷۵	۰/۴۱۷	۰/۴۱۷	۰/۶۶۷	۰/۸	۰/۶۶۷	۰/۵۰۰	۰/۵۰	۰/۶۶۷					
۱۷	۰/۵۰۰	۰/۵۸۳	۰/۵۰۰	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰	۰/۲۵۰	۰/۷۵	۰/۳۳۳	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۸	۰/۵۸۳	۰/۴۱۷	۰/۵۰	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳				
۱۸	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	۰/۲۵۰	۰/۵۰۰	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۶۶	۰/۸۳۳	۰/۶۶۷	۰/۹۱۷	۰/۹	۰/۸۳۳	۰/۶۶۷	۰/۵۰	۰/۸۳۳	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳			
۱۹	۰/۷۵۰	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۶۶۷	۰/۵۸	۰/۶۶۷	۰/۷۵۰	۰/۹۱۷	۰/۷	۰/۸۳۳	۰/۷۵۰	۰/۷۵	۰/۸۳۳	۰/۵۸۳	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳		
۲۰	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	۰/۹۱۷	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	۰/۰۰	۰/۶۶۷	۰/۷۵۰	۰/۷۵۰	۰/۶	۰/۵۰۰	۰/۳۳۳	۰/۹۱	۰/۱۶۷	۰/۷۵۰	۰/۶۶۷	۰/۸۳۳	۰/۸۳۳	
۲۱	۰/۵۸۳	۰/۵۸۳	۰/۶۶۷	۰/۴۱۷	۰/۴۱۷	۰/۴۱۷	۰/۷۵	۰/۵۰۰	۰/۵۰۰	۰/۷۵۰	۰/۸	۰/۶۶۷	۰/۵۸۳	۰/۶۶	۰/۷۵۰	۰/۱۶۷	۰/۲۵۰	۰/۸۳۳	۰/۶۶۷	۰/۸۳۳

Archive of SID

www.SID.ir

تصویر دندوگرام رسم شده برای نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* که در این پژوهش استفاده شده اند



* غیرایرانی

بحث:

مطالعات طبقه بندی و تاکسونومی تنها جنبه پژوهشی ندارد. تلاش های جدی که در راه توصیف کامل و طبقه بندی صحیح یک ارگانیسم صورت می گیرد، اطلاعات مهمی را عاید می سازد که در کاربردهای بالینی نیز از اهمیت خاصی برخوردار است. مطالعاتی که در زمینه فیلوژنی انجام شده است نیز منجر به پیشرفت هایی در تشخیص های آزمایشگاهی شده است از جمله می توان به پیشرفت در ساخت پروب اسیدهای نوکلئیک و الگوی اختصاصی اسید مایکولیک اشاره کرد (۳۵-۳۱). در زمینه آنالیز ژنتیکی سویه های مایکوباکتریال، روش های الکتروفورزی پروتئینی مختلفی وجود دارد. با استفاده از روش های الکتروفورزی، دو نوع کلی از اطلاعات پروتئینی را می توان به طور همزمان جمع آوری کرد. یک دسته از این اطلاعات از ایزو آنزیم ها (isoenzyme or isozme) بدست می آید که اشکال مختلف آنزیم می باشند که عمل (function) مشابه دارند. دسته دوم اطلاعات از آلوزیم ها (allozymes) بدست می آید که زیر مجموعه ایزوزیم ها می باشند. هر دو نوع اطلاعات در سیستماتیک مولکولی اهمیت دارند و آنچه در هر دو مطرح است، وجود پروتئین هایی است که قادرند بر اساس شارژ خالص و اندازه از یکدیگر تفکیک یابند (۳۶). از آنجایی که شارژ خالص و متعاقب آن نرخ مهاجرت پروتیین ها در الکتروفورز توسط توالی اسیدهای آمینه مربوطه تعیین می گردد، تنوعاتی که در حرکت آنزیم (ایزوزیم یا آلوزیم) مشاهده می گردد را می توان با آلل های موجود در لوکوس ژن های ساختمانی مربوطه برابر در نظر گرفت (۲۹). تحقیقات اخیر بر روی پروتئین هایی که توالی های آنها شناخته شده است نشان داده که ژل الکتروفورزی قادر به ردیابی ۸۰ تا ۹۰ درصد جانشینی های آمینو اسیدی می باشد (۲۹). در این زمینه روش های الکتروفورزی پروتئینی مختلفی وجود دارد ولی موارد

Archive

www.SID.ir

استفاده روش نشاسته افقی (horizontal starch gel) وکارایی آن از سایر روش ها بیشتر است (۳۶). میانگین تفرق ژنتیکی بدست آمده برای تمام لوکوس ها (۰/۶۸۸) در این پژوهش نشان دهنده تفرق ژنتیکی زیاد در بین نمونه های مورد مطالعه وتاییدی بر مطالعات قبلی است. نحوه قرار گرفتن نمونه های ایرانی و غیر ایرانی در داخل وخارج از کلاستر ها در دندوگرام رسم شده برای نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* می تواند اطلاعاتی را در قرابت و یا دوری این نمونه ها در اختیار ما بگذارد. از جمله اینکه وجود دو گروه II و III که فقط شامل نمونه های ایرانی می شوند و گروه I که فقط از نمونه های غیر ایرانی تشکیل شده می تواند دلیلی بر تعلق سویه های این دو گروه به دو زیر گونه متفاوت باشد. همچنین با توجه به دندوگرام نمونه ها ۷، ۱۹و ۱۴ که در فاصله ژنتیکی زیادی از بقیه قرار گرفته اند، می تواند دلیلی بر تعلق سویه های مربوطه به گونه ای متفاوت باشد. اما با مراجعه به نتایج آزمایشات بیوشیمیایی این نمونه ها تفاوت قابل توجهی بین این سویه ها ودیگر سویه های این گونه به چشم نمی خورد. پراکندگی نمونه های ایرانی و غیر ایرانی در گروه بزرگ IV می تواند میزان قرابت این سویه ها به یکدیگر و احتمال تعلق آنها به یک زیر گونه را مطرح سازد. وجود اختلافات جزئی بین سویه های واقع در یک کلاستر نیز می تواند بدلیل رخ دادن پدیده نوترکیبی ژنی باشد. لذا احتمالا آزمایشات بیوشیمیایی انجام شده روی این نمونه ها از دقت لازم برخوردار نبوده واین سویه ها متعلق به گونه یا گونه های نزدیک به *مایکوباکتریوم کانزاسی* بوده اند و اشتباها بعنوان *مایکوباکتریوم کانزاسی* شناسایی شده اند. کمترین تفرق ژنتیک در نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* مورد آزمایش مربوط به لوکوس SOD می باشد که معادل ۰/۲۶۷ می باشد. این بدان معناست که نزدیک به ۲۰٪ نمونه های مورد بررسی در این لوکوس اختلاف نشان داده اند و نزدیک به ۸۰٪ از نمونه ها در این لوکوس، تنوع آللی نشان نداه اند. چنین نتیجه ای می تواند در تحلیل نمونه هایی که در چنین لوکوسی اختلاف دارند موثر باشد. به عنوان مثال ، تنها نمونه های ۹،۱۴ و۱۹ در لوکوس SOD اختلاف نشان داده اند. با مراجعه به جدول۴ مشخص می گردد که نمونه ۹ جوابی برای آزمایش مربوط به لوکوس SOD نداده است ولی نمونه های ۱۴ و ۱۹، دو نمونه از سه نمونه ای هستند که در دندوگرام مربوطه بیشترین فاصله ژنتیکی را از بقیه سویه ها نشان داده اند. و این خود نقطه قوت دیگری در احتمال تعلق این سویه ها به گونه ای غیر *مایکوباکتریوم کانزاسی* است. در عین حال بیشترین تفرق ژنتیکی نیز در نمونه های *مایکوباکتریوم کانزاسی* در لوکوس PER مشاهده شده است که بیش از ۸۰٪ نمونه های بررسی شده در لوکوس مربوطه تنوع آللی نشان داده اند. در یک جمع بندی از نتایج بدست آمده در این تحقیق، تنوع زیادی در بین سویه های ایرانی به چشم می خورد. وجود تنوع در بین سویه های گونه های مختلف جنس مایکوباکتریوم، مخصوصا *مایکوباکتریوم کانزاسی* در نقاط مختلف جهان در گزارش های متعددی به ثبت رسیده است ولی تاکنون هیچ مطالعه ای درباره هویت ژنتیکی سویه های مایکوباکتریال موجود در ایران صورت نگرفته است. این بررسی که برروی نمونه های جدا شده از مراجعه کنندگان به انستیتو پاستور ایران انجام شده است نشان می دهد که سویه های ایرانی از تنوع ژنتیکی زیادی برخوردار می باشند. از سویه های غیر ایرانی در آزمایشات هر یک از گونه ها استفاده شد تا رابطه خویشاوندی آنها با سویه های ایرانی بررسی گردد. نتایج حاصل وجود قرابت های ژنتیکی بین این سویه ها را در عین برخی اختلافات نشان می دهد.

نتیجه گیری:

در این تحقیق اغلب نمونه ها از دستگاه تنفسی جدا شده بودند. این مساله هر چند باعث می شود تا این پژوهش به گستردگی کارهای انجام یافته توسط محققین بنام نباشد اما نشان دهنده اهمیت بالینی سویه های مهم آتیپیک در ایجاد بیماری های مزمن دستگاه تنفسی در ایران می باشد. تفرق ژنتیکی مشاهده شده با این روش در برخی از سویه ها از طرفی نشان دهنده عدم دقت لازم آزمایشات بیوشیمیایی در تعیین هویت این نمونه ها است و از طرفی نشان دهنده تنوع ژنتیکی بین سویه های گونه مورد نظر در ایران می باشد. تفرق ژنتیکی مورد نظر می تواند در تحقیقات بالینی و توجیه پاسخ بیماران به داروهای اختصاصی برای سویه های تیپیکال مورد توجه و استفاده قرار گیرد. همچنین با توجه به عدم دقت آزمایشات بیوشیمیایی و نتایج مبهم آن در برخی موارد روش MEE می تواند بعنوان ابزاری دقیق در تشخیص موارد مشکوک مبتنی بر آزمایشات بیوشیمیایی مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

فهرست مراجع:

1. Huard RC, Lazzarini LC, Butler WR, van Soolingen D, Ho JL. PCR based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:1637-50.
2. Herdman AV, Steele JC. The new mycobacterial species-emerging or newly distinguished pathogens. *Clin Lab Med* 2004; **24**:651-90.
3. Mostowy S, Behr MA. The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis. Clin Chest Med* 2005; **26**:207-16.
4. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 1996; **9**:177-215.
5. Falkinham, JO, III Nontuberculous mycobacteria in the environment. *Clin Chest Med* 2002; **23**:529-51.
6. Primm TP, Lucero CA, Falkinham JO. Health impacts of environmental mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**:98-106.
7. Thomsen VO, Andersen, AB, Miorner, H. Incidence and clinical significance of non-tuberculous mycobacteria isolated from clinical specimens during a 2-y nationwide survey. *Scand J Infect Dis* 2002; **34**:648-53.
8. Haverkort F. National atypical mycobacteria survey, 2000. *Commun Dis Intel* 2003; **27**:180-9.
9. Martín-Casabona N, Bahrmand AR, Bennedsen J, Thomsen VO, Curcio M, Fauville-Dufaux M et al. Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation: a multi-country retrospective survey. *Int J Tuberc Lung Dis* 2004; **8**:1186-93.
10. Taillard C, Greub G, Weber, R, et al. Clinical implications of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity: Swiss national survey. *J Clin Microbiol* 2003; **41**:1240-4.
11. Santin M, Alcaide F, Benitez MA, Salazar A, Ardanuy C, Podzamczer D et al. Incidence and molecular typing of *Mycobacterium kansasii* in a defined geographical area in Catalonia, Spain. *Epidemiol Infect* 2004; **132**:425-32.
12. Christensen EE, Dietz GW, Ahn CH, Chapman JS, Murry RC, Anderson J et al. Pulmonary manifestations of *Mycobacterium intracellularis. Am J Roentgenol* 1979; **133**:59-66.
13. Feizabadi MM, Robertson ID, Cousins DV, Dawson D, Chew W, Gilbert GL, Hampson DJ. Genetic characterization of *Mycobacterium avium* isolates recoverd from humans and animals in Australia. *Epidemiol Infect* 1996; **116**:41-9.
14. Feizabadi MM, Robertson ID, Cousins DV, Dawson DJ, Hampson DJ. Use of multilocus of enzyme electrophoresis to examine genetic relationships amongst isolates of Mycobacterium interacellulare and related species. *Microbiology* 1997; **143**:1461-9.
15. Yakrus MA, Reeves MW, Hunter SB. Characterization of isolates of *Mycobacterium avium* serotypes 4 and 8 from patients with AIDS by multilocus enzyme electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1992; **30**:1474-8.
16. Alcaide F, Richter I, Bernasconi C, Springer B, Hagenau C, Schulze-Röbbecke R et al. Heterogenesity and colonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and pathogenicity studies. *J Clin Microbiol* 1997; **35**(8):1959-64.
17. Roall T, Wolters J, Bottger EC. Towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. *Int J Sys Bacteriol* 1990; **40**:323-30.
18. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**(11):884-901.
19. Inuma Y, Ichiyamam S, Hasegawa Y, Shimokata K, Kawahara S, Matsushima T. Large-restriction fragment analysis of *Mycobacterium kansasii* genomic DNA and its application in molecular typing. *J Clin Microbiol* 1997; **35**:596-9.
20. Yang M, Ross BC, Dwyer B, Identification of an insertion like element in a subspecies of Mycobacterium kansasii. J Clin Microbil,1993; **31**:2074-9
21. Woolford AJ, Hewinson RG, Woodward M, Dale JW. Sequence heterogeneity of an mpb70 gene analogue in *Mycobacterium kansasii*. *FEMS Microbiol Lett* 1997; **148**:43-8.
22. Richter E, Niemann S, Rusch-Gerdes S, Hoffner S. Identification of *Mycobacterium kansasii* by using a DNA probe (AccuProbe) and molecular techniques. *J Clin Microbiol* 1999; **37**:964-70.

Archive of SID

www.SID.ir

23. Abed Y, Bollet C, de Micco P. Identification and strain differentiation of Mycobacterium species on the basis of DNA 16s-23s spacer region polymorphism. *Res Microbiol* 1995; **146**:405-13.
24. Alcaide F, Benitez MA, Martin R. Epidemiology of *Mycobacterium kansasii*. *Ann Intern Med* 1999; **131**:310-1.
25. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria. **Clin Microbiol Rev** 1996; **9**:177-215.
26. Picardeau M, Prodhom G, Raskine L, Le Pennec MP. Vincent V. Genotypic characterization of five subspecies of *Mycobacterium kansasii*. J Clin Microbiol, 1997; **35**:25-32.
27. Ross BC, Jackson K, Yang M, Sievers A, Dwyer B. Identification of a genetically distinct subspecies of Mycobacterium kansasii. *J Clin Microbiol* 1992; **30**: 2930-3.
28. Tortoli E, Sionetti MT, Lacchini C, Penati V, Urbando P. Tentative evidence of Aids associated biotype of *Mycobacterium kansasii*. *J Clin Microbiol* 1994; **32**: 1779-82.
29. Selander RK, Caugant DA, Ochman H, Musser JM Glimour MN, Whittman TS. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *App Environ Microbiol* 1996; 51(5): 873-84.
30. Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small sample of individuals. Genetics 1978; **89**:583-90.
31. Cousins DV, Williams SN, Ross BC, Ellis TM. Use of repetitive element isolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization with *M. bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol* 1993; **37**:1-17.
32. Devallois A, Goth KS, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR restriction fragment length polymorphism analysis of the *hsp65* gene and proposition of an algorithm to differential 34 mycobacterial species. *J Clin Microbiol* 1997; **35**:2969-73.
33. Feizabadi MM, Robertson ID, Cousins DV, Hampson DJ. Genomic analysis of *Mycobacterium bovis* and other members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by isoenzyme analysis and pulsed-field gel electrophoresis. J Clin Microb 1996; **34**(5):1136-42.
34. Shinnick TM, Good RC. Mycobacterial Taxonomy. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1994; **13**(11):884-901.
35. Van Solingen D, de Haas PEW, Haagsma J, Eger T, Hermans PWM, Ritacco V, Altio A, Van Embden JDA. Use of various genetic markers in identification of *Mycobacterium bovis* strain from animals and humans and for studying epidemiology of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 1994; **32**:2425-33.
36. Hillis DM, Moritz C, Mabble BK. Molecular systematics, 2nd ed,1996, Sinauer Associates Inc, Sunderland, Massachusetts, USA.

Archive of SID

www.SID.ir