Archive of SID

شناسایی سریع مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس:

استفاده از آنالیز شیمیایی اسیدهای مایکولیک دیواره سلولی توسط کروماتوگرافی مایع باکارآیی بالا (HPLC)

دکتر سیداصغر هوایی[1]، تقی ناصرپورفریور، دکتر غلامعلی نادری، دکتر حسن تمییزی‌فر

مقدمه. تاکنون روشهای مختلفی برای شناسایی مایکوباکتریومها ارایه گردیده است. یکی از جدیدترین و حساس‌ترین این روشها، انجام کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) بر روی مشتق فناسیل اسیدهای مایکولیک مایکوباکتریومها برای شناسایی سریعتر باکتری بعد از کشت اولیه می‌باشد. این بررسی استفاده از HPLC برای شناسایی و تفکیک سریعتر مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس را بررسی می‌کند.

روشها. در این تحقیق از روش برای آشکار سازی الگوهای استرهای مشتق پارابرومونفناسیل اسیدهای مایکولیک ۳ گونه اصلی مایکوباکتریومهای توبرکولوزیس، بویس و BCG و تمایز آنها از سایر گونه‌های مایکوباکتریومی HPLC استفاده شد. تمام سویه‌های بکار برده شده از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تهران اخذ گردید.

نتایج. انجام فرایند HPLC با شرایط فوق الذکر منجر به حصول کروماتوگرامهایی می‌گردد که بر روی محور افقی زمان بازداری پیک‌های مختلف موجود در نمونه و بر روی محور عمودی میزان جذب U.V این پیک‌ها رسم شده است. این کروماتوگرام‌ها در مورد نمونه‌های M.bovis و M.tuberculosis مشابه یکدیگر می‌باشند اما کروماتوگرام‌های این دو باکتری از کروماتوگرام‌های مربوط به BCG کاملاً مجزا می‌باشد.

بحث. با توجه به کروماتوگرام‌های حاصل می‌توان به سهولت مایکوباکتریوم‌های توبرکولوزیس، بویس و BCG را از سایر مایکوباکتریوم‌ها جدا نمود. همچنین با این روش امکان جداسازی BCG از مایکوباکتریوم بویس و توبرکولوزیس به سادگی میسر است زیرا BCG در کروماتوگرام خود دارای ۹ پیک و بویس و توبرکولوزیس در کروماتوگرام‌های خود واجد ۷ پیک می‌باشند.

● *واژه‌های کلیدی. مایکوباکتریوم، توبرکولوزیس، بویس*، BCG، HPLC

مقدمه

تقریباً ثلث جمعیت جهان به مایکوباکتریوم توبرکولوزیس آلوده هستند. سالانه حدود ۸ میلیون مورد جدید ابتلا به سل در جهان بروز می‌کند که منجر به مرگ ۲/۶ تا ۲/۹ میلیون نفر می‌شود. اکثر موارد سل در آسیا شیوع دارد (۱، ۲). پیدایش گونه‌های مقاوم به دارو سل را مجدداً به عنوان یکی از معضلات جامعهٔ انسانی مطرح کرده است (۱، ۲). آمار سل در ایران نوساناتی را نشان می‌دهد. بطوری که در سال ۱۹۹۳ به بیشترین میزان خود در بین سالهای ۱۹۸۱ تا ۱۹۹۵ رسید و به حدود ۳۵ در صد هزار نفر بالغ گردید. خوشبختانه این آمار به ۲۵ در صد هزار نفر در سال ۱۹۹۵ رسید (۳). علی‌رغم پیشرفتهای صورت گرفته، این بیماری هنوز از معدود بیماریهایی است که تشخیص آن به تیزهوشی بالینی بستگی دارد (۴). روشهای کلاسیک تشخیص آزمایشگاهی سل عمدتاً وقت‌گیر هستند و در نتیجه باعث تأخیر در تشخیص و ایجاد اشکال در کنترل و مبارزه با سل می‌شوند. با استفاده از روشهای جدیدی چون کشت رادیومتریک (BACTEC) می‌توان مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس (و سایر مایکوباکتریوم‌ها) را سریعتر کشف نمود. استفاده از روش High Performance Liquid Chromotography (HPLC) اسیدهای مایکولیک، سبب تعیین هویت سریع اعضای مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس در عرض چند ساعت می‌شود. لذا استفاده از این روش قویاً توصیه می‌شود (۵).

بدون در نظر گرفتن راههای کشت مایکوباکتریوم‌ها، قدم بعدی تعیین هویت میکروب جدا شده از محیط کشت است. از سریعترین روشهای تعیین هویت، روش استفاده از آنالیز شیمیایی اسیدهای مایکولیک دیوارهٔ سلولی به روشهای مختلف از جمله استفاده از HPLC و GLC است (۶، ۷). کاربرد روشهای تشخیصی که بر مبنای اسیدهای نوکلئیک قرار دارند با مشکلات خاصی روبرو هستند. از جملهٔ این اشکالات می‌توان به عدم اختصاصی بودن هدف تکثیر مایکوباکتریوم، نبودن هدف تکثیر در بعضی از نمونه‌ها، آلودگیهای جانبی، موارد مثبت و منفی کاذب، کارایی اپراتور و تأثیر آن در نتایج حاصل از این روشها، مشکلات تهیهٔ امکانات مربوط، گرانی قیمت (به خصوص در مقایسه با HPLC و GLC) اشاره کرد (۸-۱۳). با عنایت به اینکه از نظر تشخیصی با توجه به اسمیر به تنهایی نمی‌توان مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس را از بقیهٔ مایکوباکتریومها تمیز داد، نیاز به تعیین

۱ - گروه میکروب‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان، اصفهان.

www.SID.ir

Archive of SID

هویت باکتری وجود دارد. HPLC یکی از روشهای بسیار ایده‌ال خواهد بود چرا که اختصاصی بودن تعیین هویت گروه مایکوباکتریوم توبرکولوزیس کمپلکس توسط HPLC بیش از ۹۹/۹ درصد می‌باشد (۵).

تمایز افتراقی گونه‌های مایکوباکتریومی بطور مرسوم براساس واکنشهای بیوشیمیایی صورت می‌گیرد (۱۴). زمان لازم برای انجام این آزمونهای بیوشیمیایی شناسایی تاکسونرمیک مرسوم را فرآیندی وقت‌گیر می‌نماید، لذا روشهای سریعتر برای شناسایی و افتراق گونه‌های مایکوباکتریومی لازم است. در آینده آنالیز شیمیایی اسیدهای چرب سلولی به خصوص اسیدهای مایکولیک β هیدروکسی با انشعاب در موقعیت α و وزن مولکولی زیاد به عنوان روش سریع در طبقه‌بندی مایکوباکتریوم‌ها هر چه بیشتر مورد استفاده قرار خواهد گرفت (۱۵). تحقیقاتی که تاکنون انجام شده نشان دهندهٔ اختصاصی بودن این اسیدهای مایکولیک برای گونه‌های مایکوباکتریومی است (۱۳).

پژوهش حاضر برای استفاده از تکنیک HPLC اسیدهای مایکولیک برای شناسایی مایکوباکتریوم‌ها صورت گرفته است.

روشها

صد باکتری مورد آزمایش شامل M.tuberculosis،M. bovis و M.bovis BCG از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی، مرکزبهداشتی ملاهادی سبزواری وابسته به دانشگاه علوم پزشکی اصفهان و کشتارگاه دام تهیه شد. باکتری‌ها ابتدا بر روی محیط لونشتین - جانسون انتقال داده و به مدت لازم تا مشاهدهٔ اولین کلنی در ۳۷°C نگهداری شدند (۱۶).

غیر از نمونه‌هایی که از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی تهیه شدند و در آن مرکز آزمونهای بیوشیمیایی بر روی آنها انجام شده و مورد تأیید قرار گرفته بودند و یا متعلق به مجموعه‌های ATCC یا MYC بودند، سایر نمونه‌ها از نظر پیگمانتاسیون، سرعت رشد و تست نیاسین مورد بررسی قرار گرفتند.

صابونی کردن مایکوباکتریوم‌ها و مشتق‌سازی اسیدهای مایکولیک با برداشت یک لوپ از باکتری‌ها و حل کردن آن در محلول هیدروکسید پتاسیم، اتانل ۵۰ درصد به مدت دو ساعت در ۱۰۰°C انجام شد و سپس اسیدهای مایکولیک صابونی شده با ۱/۵ml محلول اسید کلریدریک - آب ۵۰ درصد اسیدی گردید. عمل استخراج اسیدهای مایکولیک با افزودن ۲ml کلروفورم صورت گرفت و سپس ۶۰ ثانیه ورتکس گردید. ۵ دقیقه به حال خود گذاشته شد تا لایهٔ کلروفورمی کاملاً ته نشین گردد. با یک پیپت پاستور لایهٔ کلروفرمی به لولهٔ دیگری منتقل شد و کلروفورم آن تبخیر گردید تا کاملاً خشک شود. به این لوله ۱۰۰ml از محلول ۰/۲ درصد بی‌کربنات پتاسیم افزوده شد و تا هنگام خشک شدن تبخیر گردید (۱۶-۱۸).

برای انجام مشتق سازی به لولهٔ فوق ۱ml کلروفورم و ۵۰ml مشتق‌ساز ۸ بروموفناسیل که حاوی بروموفناسیل بروماید و ترکیب ۱۸-crown است افزوده و به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۵°c قرار داده می‌شد. پس از مشتق‌سازی مجدداً به هر لوله ۰/۵ml محلول اسید کلریدریک - آب ۵۰ درصد و ۰/۵ml متانول افزوده به مدت ۶۰ ثانیه ورتکس کرده و ۵ دقیقه به حال خود گذاشته شد تا لایهٔ کلروفورمی کاملاً ته‌نشین گردد. با یک پیپت پاستور لایهٔ کلروفورمی را به یک لولهٔ در پیچ دار دیگر منتقل کرده و کلروفورم آن را تا خشک شدن تبخیر نموده و آنرا مجدداً در ۱۰۰ml کلروفورم حل کرده و به آن ۵۰ml استاندارد اسیدهای مایکولیک افزوده و 5ml از آن را به HPLC تزریق نمودیم (۱۶-۱۸).

کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) و شرایط آن به صورت ذیل بود. ستون مورد استفاده، ستون C_{18} به ابعاد ۲۵۰×۴/۶mm و متعلق به شرکت Hichrom بوده و در طی آزمایش از یک گرادیان متانول و کلروفورم به عنوان فازهای متحرک استفاده شد، به نحوی که غلظت کلروفورم در ابتدا ۱۰ درصد بود، در طی یک دقیقه به ۲۵ درصد و در مدت ۲۰ دقیقه به ۷۰ درصد می‌رسید. سپس در مدت ۱ دقیقه به ۱۰ درصد کاهش یافته و به مدت ۳ دقیقه برای کالیبراسیون ستون در همین غلظت نگه داشته می‌شد تا تزریق بعدی صورت گیرد. سرعت جریان فازهای متحرک نیز ۱/۴ میلی لیتر در دقیقه ثابت نگه داشته شده و دتکتور دستگاه در ۲۵۴nm تنظیم گردید.

دستگاه HPLC متعلق به شرکت Cecil با مشخصات زیر است. HPLC *مدل ۱۲۰۰ و دتکتور با طول موج متغیر (که در ۲۵۴ nm تنظیم شد) از شرکت سیل ستون* LIRP18(revers phase) *به ابعاد* ۲۵×۴/۶mm، *گرادیان متانول - دی کلرو متان و سرعت جریان* ۱/۴ml/min.

جدول ۱. تکرار پذیری الگوهای اسیدهای مایکولیک مایکوباکتریومی

گونه‌ها(تعداد سویه‌ها)	شماره پیک [تفاضل زمانی هر پیک از پیک استاندارد (±انحراف معیار)]				
	۱	۲	۳	۴	۵
M.bovis BCG MYC 2604	۴:۴۶/۶(۰/۰۰۲)	۴:۲۸/۶(۰/۰۰۲)	۴:۰۹/۴(۰/۰۱)	۳:۵۲/۱(۰/۰۲)	۳:۳۰/۷(۰/۰۲)
M.bovis (3)	-	-	۴:۰۹/۴(۰/۰۰۱)	۳:۵۰/۳(۰/۰۰۱)	۳:۳۱/۹(۰/۰۰۱)
M.tuberculosis (25)	-	-	۴:۰۹/۴(۰/۰۰۵)	۳:۵۰/۳(۰/۰۰۱)	۳:۳۰/۷(۰/۰۰۱)

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱. تکرار پذیری الگوهای اسیدهای مایکولیک مایکوباکتریومی (ادامه)

گونه‌ها(تعداد سویه‌ها)	شماره پیک [تفاضل زمانی هر پیک از پیک استاندارد (±انحراف معیار)]			
	۶	۷	۸	۹
M.bovis BCG MYC 2604	۳:۱۰/۹(۰/۰۱)	۲:۵۲/۴(۰/۰۱)	۲:۳۷/۱(۰/۰۱)	۲:۲۱/۴(۰/۰۲)
M.bovis (3)	۳:۱۱/۲(۰/۰۰۱)	۲:۵۲/۴(۰/۰۰۱)	۲:۳۷/۱(۰/۰۰۱)	۲:۲۱/۴(۰/۰۰۱)
M.tuberculosis (25)	۳:۱۰/۹۱(۰/۰۰۱)	۲:۵۲/۴(۰/۰۰۱)	۲:۳۷/۱(۰/۰۰۱)	۲:۲۱/۴(۰/۰۰۱)

نتایج

نتایج حاصل از آماده‌سازی و تزریق نمونه‌های مورد بررسی به دستگاه HPLC با شرایط مذکور در بخش مواد و روشها به صورت کروماتوگرام‌هایی که بر روی محور Xها، زمان بازداری و بر روی محور Yها، میزان جذب ماده‌ای که از جلوی دتکتور گذشته و توسط فازهای مایع متحرک حمل شده رسم می‌گردد. زمان بازداری پیک‌های موجود در کروماتوگرام نسبت به استانداردی که همراه تمام نمونه‌ها تزریق می‌گردد سنجیده می‌شود.

کروماتوگرام ۱، پیک‌های M.bovis BCG MYC 2604 را نشان می‌دهد. با شماره‌گذاری پیک‌ها بر حسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد، مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. از مشاهده کروماتوگرام یک مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری متشکل از یک دستهٔ ۹ پیکی می‌باشد.

کروماتوگرام دو، نمودار پیک‌های M.bovis BCG Institute Pasteur را که برای واکسیناسیون به‌کار می‌رود نشان می‌دهد. با شماره‌گذاری پیک‌هابر حسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد، مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری نیز پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. از مشاهدهٔ کروماتوگرام دو مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری نیز متشکل از یک دستهٔ ۹ پیکی می‌باشد.

کروماتوگرام شمارهٔ سه، نمودار مربوط به پیک‌های یکی از M. tuberculosisهای شناسایی و تأیید شده از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی را نشان می‌دهد. با شماره‌گذاری پیک‌ها بر حسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. از مشاهدهٔ کروماتوگرام سه مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری متشکل از یک دستهٔ ۷ پیکی می‌باشد. کروماتوگرام شمارهٔ چهار، نمودار مربوط به پیک‌های یکی از M.tuberculosisهایی است که متعلق به بیماران بوده و پس از کشت اولیه با رشد اولین کلنی مورد HPLC اسیدهای مایکولیک قرار گرفته است. سپس بعد از آنکه رشد باکتری به میزان کافی رسید، از نظر سرعت رشد، پیگمانتاسیون و تستهای بیوشیمیایی نیاسین و احیای نیترات توبرکولوزیس بودن آن مشخص گردید. با شماره‌گذاری پیک‌ها برحسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد، مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. از مشاهدهٔ کروماتوگرام چهار مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری نیز متشکل از یک دستهٔ ۷ پیکی می‌باشد.

کروماتوگرام ۵، مربوط به پیک‌های M.bovis ATCC 19210 می‌باشد. با شماره‌گذاری پیک‌ها بر حسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد، مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری نیز پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. از مشاهدهٔ کروماتوگرام پنج مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری متشکل از یک دستهٔ ۷ پیکی می‌باشد.

کروماتوگرام شمارهٔ ۶، نمودار مربوط به پیک‌های یکی از M.bovisهایی است که از کشتارگاه دام گرفته شد. پیک این سویه‌ها شبیه توبرکولوزیس می‌باشد اما تست‌های نیاسین و نیترات آنها برخلاف توبرکولوزیس منفی بوده است. با شماره‌گذاری پیک‌ها برحسب زمان خروج آنها نسبت به استاندارد، مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به شناسایی این باکتری پس از ۲۱ دقیقه و به صورت جدول ۱ نسبت به استاندارد از ستون خارج می‌شوند. با مشاهدهٔ کروماتوگرام شش مشخص می‌شود که پیک‌های مربوط به این باکتری نیز متشکل از یک دستهٔ ۷ پیکی می‌باشد.

بحث

همانطور که از بررسی کروماتوگرام یک و دو مشاهده می‌شود، پیک‌های M.bovis BCG صرف نظر از منبع جداسازی باکتری از یک fingerprint تُه پیکی تشکیل شده‌اند. این نتایج با نتایج مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۳، ۱۸-۲۰، ۲۳).

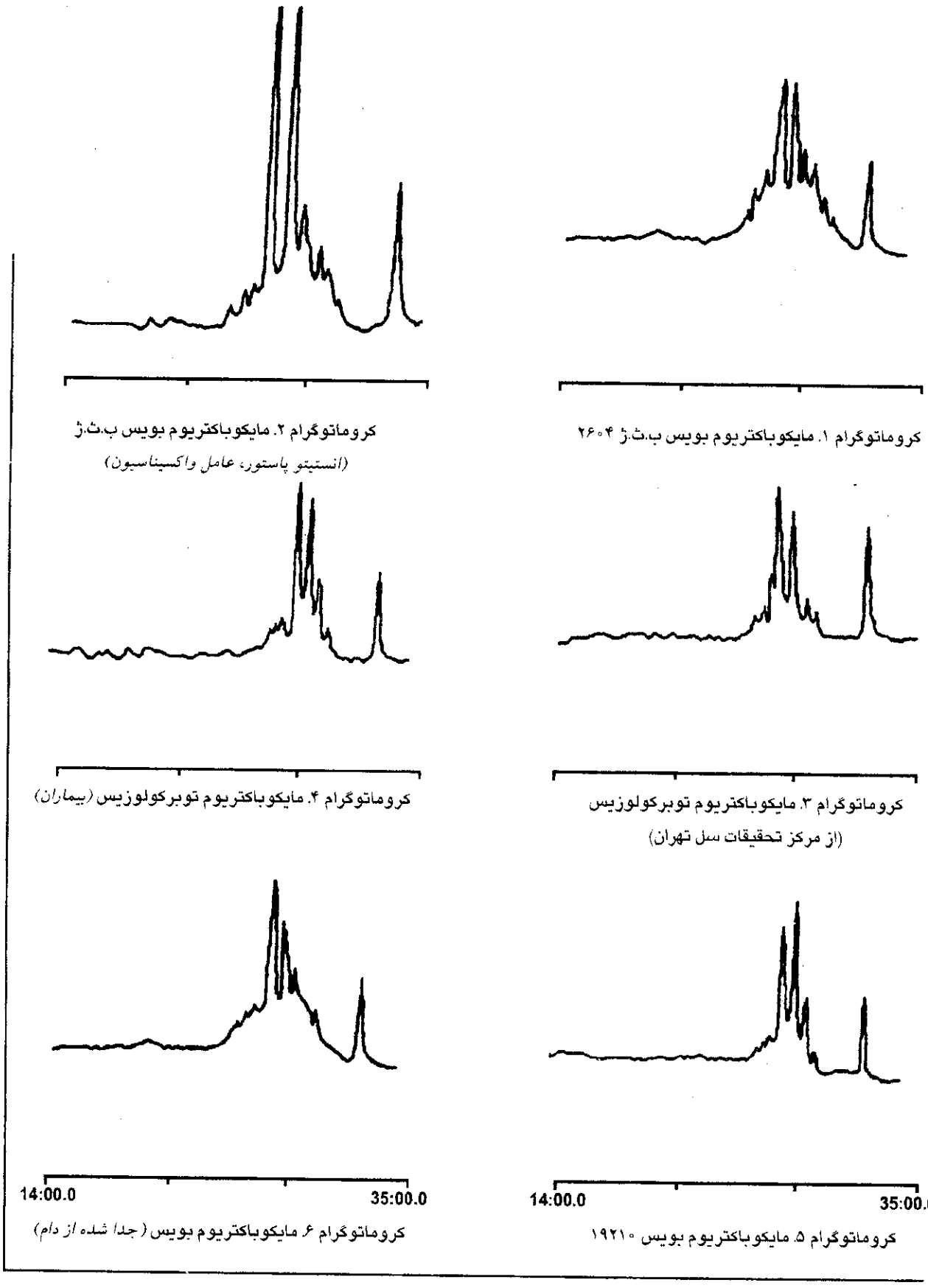
بررسی کروماتوگرام‌های ۳ و ۴ نیز نشان دهندهٔ آن است که پیک‌های M.tuberculosis صرف نظر از منبع جداسازی باکتری از یک فینگر پرینت ۷ پیکی تشکیل شده‌اند. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۳، ۱۸-۲۲).

بررسی و مقایسهٔ کروماتوگرام‌های ۵ و ۶ نیز نشان دهندهٔ آن است که پیک های M.bovis صرف نظر از منبع جداسازی باکتری از یک فینگر پرینت ۷ پیکی تشکیل شده اند. این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات Floyd،Thibert،Glickmanوگونزالس مطابقت دارد (۱۳، ۱۹، ۲۰، ۲۳).

تفاوت زمان پیک‌ها با نتایج حاصل از مطالعات انجام شده به دلیل

www.SID.ir

Archive of SID



کروماتوگرام ۱. مایکوباکتریوم بویس ب.ث.ژ ۲۶۰۴

کروماتوگرام ۲. مایکوباکتریوم بویس ب.ث.ژ
(انستیتو پاستور، عامل واکسیناسیون)

کروماتوگرام ۳. مایکوباکتریوم توبرکولوزیس
(از مرکز تحقیقات سل تهران)

کروماتوگرام ۴. مایکوباکتریوم توبرکولوزیس *(بیماران)*

کروماتوگرام ۵. مایکوباکتریوم بویس ۱۹۲۱۰

کروماتوگرام ۶. مایکوباکتریوم بویس *(جدا شده از دام)*

www.SID.ir

Archive of SID

استفاده از ستونهایی با ابعاد متفاوت است. بنابراین تغییر در زمان بازداری در تمام پیک‌ها و از جمله پیک استاندارد رخ می‌دهد. با توجه به یکسان بودن زمانهای بازداری نسبی (تفاضل زمان بازداری هر پیک با پیک استاندارد) پیک‌های این مطالعه با مطالعات قبلی مطابقت دارد (۱۳، ۱۸-۲۰، ۲۳).

از مطالب فوق مشخص می‌شود که M.bovis BCG , M.bovis, M.tuberculosis را می‌توان به راحتی پس از رشد اولین کلنی از سایر مایکوباکتریوم‌ها تمایز داد چرا که الگوی فرینگر پرینت آنها با مایکوباکتریوم‌های دیگر کاملاً متفاوت است (۱۶-۱۸).

از طرفی مقایسهٔ کروماتوگرام‌های ۱ و ۲ باکروماتوگرام‌های ۳ و ۴ و ۵ و ۶ نشان دهندهٔ آن است که کروماتوگرام‌های مربوط به BCG دارای دو پیک اضافی (نسبت به کروماتوگرام‌های M.tuberculosis و M.bovis) می‌باشند لذا می‌توان این باکتری را از دو باکتری دیگر تشخیص داد.

بررسی کروماتوگرام‌های ۳ و ۴ و ۵ و ۶ نشان دهندهٔ آن است که این کروماتوگرام‌ها با یکدیگر کاملاً شبیه می‌باشند و با شرایط به‌کار رفته در این بررسی و بررسیهای دیگری که توسط Thibert،Floyd و همکارانشان تاکنون صورت گرفته قابل تمایز از یکدیگر نمی‌باشند اما تمایز این باکتریها از سایر مایکوباکتریوم‌ها به سهولت امکان پذیر می‌باشد.

با عنایت به مطالب بالا مشخص می‌شود که پس از کشت اولیه به راحتی می‌توان به کمک آنالیز شیمیایی اسیدهای مایکولیک دیوارهٔ سلولی مایکوباکتریومها توسط HPLC و بدون نیاز به انجام آزمونهای بیوشیمیایی، هویت باکتری ایزوله شده را تعیین نمود و بدون آنکه از دقت تشخیص کاسته شود زمان تشخیص را چندین برابر کاهش داد.

قدردانی و تشکر

از راهنمایی سرکار خانم دکتر عسکری، آقای دکتر کیومرث قاضی‌سعیدی، آقای دکتر ناصر بادامی و آقای دکتر حسین صنعتی، از مرکز تحقیقات سل و بیماریهای ریوی و سرکار خانم ابطحی از مرکز ملاهادی سبزواری به خاطر در اختیار قرار دادن نمونه‌ها، از آقای پروفسور پرودینگر از دانشگاه اینسبروک به خاطر اهداء استاندارد داخلی اسیدهای مایکولیک شرکت Ribi و از سرکار خانم دکتر صراف زادگان ریاست مرکز تحقیقات قلب که امکان انجام این تحقیق را در آن مرکز فراهم نموده‌اند، کمال تشکر و امتنان را دارد. این تحقیق به عنوان بخشی از پایان نامهٔ دکترای میکروب شناسی آقای تقی ناصرپور فریور در مرکز تحقیقات قلب اصفهان صورت گرفته است.

منابع

1- Magdalena J, Supply P, Locht C. Specific differentiation between Mycobacterium bovis BCG and virulent strains of Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol 1988; 36: 2471-2476.

2- Nunn P. The effect of hvman immunodeficieny virus type - 1 in infectiousness of tuberculosis. Tubercle and Lung Disease 1994; 75(1): 21-6.

۳- مرندی ع. وضعیت بیماریهای عفونی و سیاست کنترل آنها در جمهوری اسلامی ایران. مجلهٔ بیماریهای عفونی و گرمسیری ۱۳۷۵؛ ۱: ۱۸-۶.

4- Bennedsen J. Utility of PCR in diagnosing pulmonary tuberculosis. J Clin Microbiol 1996; 34: 407-411.

۵- شفقی ب، محمدی ف. تکنولوژی نوین در تشخیص سل. مجلهٔ بیماریهای عفونی و گرمسیری ۱۳۷۵؛ ۱ (۱): ۶۱-۵۷.

6- Mac-Clathey KD. Mycobacterium tuberculosis: Clinical Laboratory Medicine. 3rd Ed. Maryland, Williams & Wilkins Co. 1994: 1291-1307.

7- Tisall PA. Identification of clinical isolates of Mycobacteria with Gas Liquid Chromatography alone. J Clin Microbiol 1979; 10: 506-514.

8- Kent L. Demonstration of homology between IS6110 of Mycobacterium tuberculosis and DNAs of other mycobacterium Spp. J Clin Microbiol 1995; 33: 2290-2293.

9- MC-Hugh TD. Is 6110 homologs are present in multiple copies in mycobacterium other than tuberculosis causing mycobacteria. J Clin Microbiol 1997; 35: 1769-1771.

10- Yuen LK. Characterization of M.tuberculosis strains from vietnamese patient by southern blot hybridization. J Clin Microbiol 1993; 31: 1615-1618.

11- Zwody KP. Rendering of Mycobacteria safe for molecular diognostic studies and development of a lysis method for strand diognostic studies and development of a lysis method for strand displacement amplification and PCR. J Clin Microbiol 1994; 32: 2140-46.

12- Noordhook GT. Sensitivity and specifity of PCR for detection of M.tuberculosis: a blind comparision study among seven laboratory. J Clin Mivrobiol 1994; 32: 277-289.

www.SID.ir

Archive of SID

13- Thiebert L. Routin application of HPLC for identification of Mycobacteria. J Clin Microbiol 1993; 31: 1759-1763.
14- Kubica GP. Differential identification of Mycobacteria. Am Rev Respir Dis 1975; 107:9-21.
15- Minnikin DE. Lipid composition and identification of acid fast bacteria. in: Goodfellow M. Microbiological identification. 2nd Ed. London, Academic Press 1996.
16- Butler WR. Identification of major slow growing pathogenic Mycobacteria and Mycobacterium gordonae by High Performance Liquid Chromatography of their mycolic acids. J Clin Microbiol 1988; 26: 50-53.
17- Butler WR. High Performance Liquid chromatographiy patterns of mycolic acids as criteria for identification of Mycobacterium chelonae, Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium smegmatis. J Clin Microbiol 1990; 28: 2094-2098.
18- Butler WR, Jost KC, Kilborn JO. Identification of Mycobacteria by High Performance Liquid Chromatography. J Clin Microbiol 1991; 29: 2468-2472.
19- Floyd MM, Silcox AV. Separation of Mycobacterium bovis BCG from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis by using high performance liquid chromatograghy of mycolic Acids. J Clin Microbiol 1992; 30: 1327-1330.
20- Glickman SE, Kilburn JO. Rapid identification of Mycolic acid pattern of Mycobacteria by high performance liquid chromatograghy using pattern recognation software and a Mycobacterium library. J Clin Microbiol 1994; 32: 740-745.
21- Butler WR, Kilburn JO. Identification of major slow growing pathogenic Mycobateria and Mycobacterium gordonae by high performance liquid chromatograghy of their Mycolic acids. J Clin Microbiol 1988; 26: 50-53.
22- Jost KC, Dunbar DF. Identification of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium avium complex directly from smear positive sputum specimens and BACTEC 12B cultures by high performance liquid chromatograghy with fluorescence detection and computer driven pattern recognition models. J Cli Microbiol 1995; 33: 1270-1277.
23- Garza-Gonsalez E, Guerrero-Olazaran M. Identification of Mycobacteria by Mycolic acid patter. Arch Med Res 1998; 29: 303-6.

www.SID.ir