Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

ORIGINAL ARTICLE

The Diagnostic Value of gyrB RFLP PCR Test in Differentiation between Pathogenic Mycobacteria in Patients Clinically Suspected of Contracting Tuberculosis in Mazandaran

Mohtaram Nasrollahi[1],
Maryam Pourhaji Bagher[2],
Mohammad Ahanjan[1],
Ali Reza Khalilian[3]

[1] Department of Microbiology, Molecular Cell-Biology Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[2] Department of Microbiology, Student Research Committee, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran
[3] Department of Biostatistics, Psychiatry & Behavioral Sciences Research Center, Faculty of Medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 27, 2011 ; Accepted January 8, 2012)

Abstract

Background and purpose: *Mycobacterium tuberculosis* complex (MTBC) members are causative agents of human and animal tuberculosis. Differentiation of MTBC members is essential for appropriate treatment of individual patients and reduce drug resistance.

Materials and methods: A total of 1345 samples were collected from patients clinically suspected of contracting tuberculosis that referred to health care center of Mazandaran from July 2010 to June 2011. The specimens were stained by the Ziehl-Neelsen staining technique and were cultured on Lowenstein-Jensen medium to detect the mycobacteria. For recognition of *Mycobacterium tuberculosis* complex members, MTUB-f and MTUB-r primers (gyrB-PCR1) were used. For differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex members, MTUB-756-Gf and MTUB- 1450Cr (gyrB-PCR2) and RFLP PCR using *RsaI* restriction enzyme were used.

Results: Of 1345 specimens, only 65(4.83%) isolates were positive culture. Out of 65, 59 (90.76%) were MTBC and 6 (9.24%) identified as Mycobacteria other than tuberculosis. All of 59 isolates were *M. tuberculosis* and showed the typical *RsaI* pattern.

Conclusion: The gyrB-RFLP PCR and the *RsaI* restriction enzyme is a rapid and easy technique for differentiation of the members of *M. tuberculosis* complex which is crucial for rapid treatment of patients.

Key words: *gyrB* RFLP PCR test, *RsaI* enzyme*, Mycobacterium tuberculosis* infection

J Mazand Univ Med Sci 2012; 22(86): 132-141 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و یکم شماره ۸۶ بهمن سال ۱۳۹۰ (۱۴۱-۱۳۲)

ارزش تشخیصی تست *gyrB*-RFLP PCR در تعیین گونه مایکوباکتریوم‌های بیماریزا در بیماران مسلول در استان مازندران

محترم نصرالهی[۱]
مریم پورحاجی باقر[۲]
محمد آهنجان[۱]
علیرضا خلیلیان[۳]

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

چکیده

سابقه و هدف: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس عامل ایجادکننده سل در انسان و حیوانات می‌باشد. شناسایی گونه‌های مایکوباکتریوم بیماریزا به درمان صحیح این بیماری کمک شایانی می‌کند. از طرفی، امکان ایجاد مقاومت دارویی را به حداقل می‌رساند.

مواد و روش‌ها: ۱۳۴۵ نمونه از افراد مشکوک به سل ارجاع یافته به مرکز بهداشت استان مازندران از تیر ۱۳۸۹ لغایت خرداد ۱۳۹۰ جمع‌آوری شد. از همه نمونه‌ها گسترش تهیه و روی محیط لوین اشتاین جانسون کشت داده شدند. جهت تشخیص کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از پرایمرهای MTUB-f و MTUB-r و جهت شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از پرایمرهای MTUB-756-Gf و MTUB-1450Cr و آنزیم محدودالاثر RsaI استفاده شد.

یافته‌ها: ۶۵ نمونه (۴/۸۳ درصد) از ۱۳۴۵ نمونه مشکوک به سل ریوی از نظر کشت و ۵۷ نمونه (۴/۲۳ درصد) اسمیر مثبت تشخیص داده شدند که از میان آن‌ها، ۵۹ نمونه (۹۰/۷۶ درصد) متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مابقی غیر توبرکلوزی تلقی شدند. تمامی ۵۹ نمونه مایکوباکتریومی که جزء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند، به گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس تعلق داشتند.

استنتاج : تکنیک PCR و به دنبال آن آنالیز محصول PCR توسط آنزیم های محدودالاثر (RFLP) روشی ساده و سریع برای شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد و این امر برای درمان سریع بیماران و جلوگیری از مرگ و میر ناشی از بیماری‌های مایکوباکتریومی مفید است.

واژه‌های کلیدی: تست gyrB RFLP PCR ، آنزیم RsaI ، عفونت های مایکوباکتریوم

مقدمه

سل ریوی یکی از دلایل عمده مرگ و میر ناشی از عفونت‌های باکتریال می‌باشد و ۹۵ درصد موارد آن در کشورهای درحال توسعه، آسیا، آفریقا، خاورمیانه و آمریکای لاتین که وسایل و امکانات محدودی برای تشخیص و درمان دراختیار دارند، رخ می‌دهد(۲،۱). تخمین زده شده که یک سوم مردم جهان با باکتری

این مقاله حاصل طرح تحقیقاتی شماره ۱۲۱- ۸۹ است که توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی مازندران تامین شده است.

مولف مسئول: مریم پورحاجی باقر- ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده پزشکی E-mail: mphd65@yahoo.com
۱. گروه میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات مرکز تحقیقات بیولوژی سلولی و مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۲. دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی پزشکی، گروه میکروبیولوژی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران
۳. گروه آمار زیستی، مرکز تحقیقات روانپزشکی و علوم رفتاری، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

تاریخ دریافت : ۹۰/۶/۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۹۰/۸/۵ تاریخ تصویب : ۹۰/۱۰/۱۸

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

مولد سل که معمولاً در ریه ایجاد عفونت می‌کند، آلوده می‌شوند(۴،۳). برطبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) تعداد افراد مبتلا به بیماری سل در سال ۲۰۰۳، ۸/۸ میلیون نفر تخمین زده شده است(۵). گونه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم آفریکانوم و مایکوباکتریوم میکروتی که کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (MTBC) را تشکیل می‌دهند، عوامل اصلی ایجادکننده توبرکلوزیس در انسان و حیوانات می‌باشند(۶). اگرچه گونه ها قرابت ژنتیکی با یکدیگر دارند اما از دیدگاه نوع میزبان، محدوده جغرافیایی و ویژگی‌های فنوتیپی و ژنوتیپی باهم متفاوت‌اند(۷). مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم آفریکانوم به انسان محدود می‌شوند در حالی که مایکوباکتریوم بویس سبب پیدایش بیماری در محدوده وسیعی از پستانداران خانگی و وحشی و همین طور انسان می‌گردد. اخیراً گزارش شده است که مایکوباکتریوم میکروتی نه تنها موش صحرایی را آلوده می‌کند بلکه باعث عفونت در انسان نیز می‌گردد(۸). تفریق گونه‌ها و تعیین هویت سریع مایکوباکتریوم‌ها یکی از مشکلات اساسی در راه تشخیص، کنترل و درمان بیماری‌های حاصل از خانواده مایکوباکتریوم است(۹). این امر به صورت سنتی براساس خصوصیات فنوتیپی از قبیل مورفولوژی کلنی، سرعت رشد، تست‌های بیوشیمیایی مانند تجمع نیاسین، احیای نیترات، مقاومت به تیوفن کربوکسیلیک اسید هیدرازید (TCH) و پیرازین آمید انجام می‌شود(۱۱،۱۰). براساس نیاز به امکانات ویژه، تست‌های بیوشیمیایی برای افتراق گونه‌ها در همه آزمایشگاه‌های مایکوباکتریومی کشور به صورت معمول انجام نمی‌شود.

روش‌های جدید براساس PCR یکی از مهم‌ترین و کاربردی‌ترین و درعین حال ساده‌ترین روش‌های مولکولی برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها است. وجود پلی‌مورفیسم در نواحی خاصی از چندین ژن مانند rpo B ، katG ، gyrA ، gyrB ، hsp 65 و 16srDNA امکان تعیین هویت سریع و تفکیک آسان‌تر گونه‌های مایکوباکتریوم را از یکدیگر فراهم آورده است(۱۲،۹). با توجه به این‌که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و مایکوباکتریوم بویس نیازمند رژیم درمانی متفاوتی هستند بدان جهت که اغلب سویه‌های بویس در مقایسه با مابقی گونه‌ها ذاتاً به داروی پیرازینامید (PZA[1]) و برخی از داروهای دیگر ضد سل مقاوم است، لذا افتراق این دو از هم واجد اهمیت است(۱۵-۱۳).

هدف از این مطالعه بررسی ارزش تشخیصی تکنیک gyrB-RFLP-PCR در تعیین گونه‌های مایکوباکتریوم بیماریزا در بیماران مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت استان مازندران است تا بتوان با استفاده از داروهای اختصاصی‌تر و با اثر بخشی مطمئن‌تر که از یک سو امکان درمان کم خطرتر و قابل تحمل‌تر را برای بیمار فراهم می‌سازند و از سوی دیگر امکان ایجاد مقاومت دارویی را به حداقل می‌رساند، میزان ضررهای اقتصادی خانواده‌ها و جامعه را کاهش داد. به‌علاوه با تفکیک گونه‌های مایکوباکتریوم بیماریزا می‌توان میزان شیوع سل ناشی از این گونه از مایکوباکتریوم‌ها را در جامعه مورد مطالعه، تعیین نمود.

مواد و روش ها

این مطالعه توصیفی، بر روی ۱۳۴۵ بیماران مشکوک به سل ریوی مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران در تیر ماه ۱۳۸۹ لغایت خرداد ماه ۱۳۹۰ با توجه به سن، جنس و نژاد صورت گرفته است. معیارهای ورود به مطالعه، مثبت شدن اسمیر خلط در افراد مشکوک به بیماری سل با داشتن حداقل یکی از شرایط زیر سرفه بیش از ۳ هفته، خلط فراوان، وجود خون در خلط، درد طولانی قفسه سینه، کم اشتهایی و کاهش وزن، تب و لرز طولانی مدت و معیارهای خروج

1. Pyrazinamide

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

از آن منفی شدن اسمیر خلط پس از رنگ‌آمیزی و مصرف داروی ضد سل بوده است.

تهیه اسمیر و کشت:

ابتدا نمونه‌های خلط ۱۲۲۲مورد (۹۰/۸ درصد)، مایع پلور ۱۵مورد (۱/۱۱ درصد)، مایع آسیت ۸ مورد (۰/۵ درصد)، خون ۲ مورد (۰/۱ درصد)، مایع برونش ۶۳ مورد (۴/۷ درصد)، زخم ۱ مورد (۰/۰۷ درصد)، شیره معده ۱۴ مورد (۱/۰۴ درصد)، ادرار ۱۲ مورد (۰/۹ درصد)، مایع کیست کبدی ۱ مورد (۰/۰۷ درصد)، آبسه ۱ مورد (۰/۰۷ درصد)، مایع مفصل ۱ مورد (۰/۰۷ درصد)، ترشحات گردن ۱ مورد (۰/۰۷ درصد)، بیوپسی پا ۱ مورد (۰/۰۷ درصد) و بافت ۳ مورد (۰/۲۲ درصد) که توسط بیمار یا پرستاران و پزشکان مربوطه جمع آوری شد، با استفاده از سودو N- استیل-L- سیستئین هموژنیزه و آلودگی‌زدایی گردید و سپس به کمک رنگ‌آمیزی ذیل نلسون از نظر وجود باسیل‌های اسیدفست مورد بررسی قرار گرفت و همچنین بر روی محیط لوین اشتاین جانسون (Lowenstein-Jensen) خریداری شده از شرکت بهارافشان ایران کشت داده شدند. جداسازی اولیه و کشت مایکوباکتریوم از نمونه های خلط طبق پروتکل استاندارد(۱۶) انجام گرفت.

استخراج DNA:

مقدار ۱۰۰ µl از آب مقطر استریل و یا TE (Tris-EDTA,PH=7.0) را در میکروتیوب ۱/۵ ml ریخته و یک کلنی از محیط کشت لوین اشتاین جانسون را وارد این میکروتیوب کرده سوسپانسیون تهیه شد. سپس مقدار ۴۰۰ µl از محلول DNG Plus را به آن اضافه نموده، میکروتیوب را به مدت ۲۰-۱۵ ثانیه ورتکس کرده سپس به آن مقدار ۳۰۰ µl ایزوپروپانل افزوده شد. بعد از ۱۵-۱۰ ثانیه ورتکس، میکروتیوب به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. بعد از گذشت این زمان، محلول رویی را خارج و این بار مقدار ۱ ml از اتانل ۷۵ درصد را وارد میکروتیوب کرده بعد از ورتکس کردن با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه میکروتیوب را سانتریفیوژ کردیم. با اتمام سانتریفیوژ محلول رویی را بیرون ریخته و مجدداً مقدار ۱ ml از اتانل ۷۵ درصد را وارد میکروتیوب کرده باز هم با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه میکروتیوب را سانتریفیوژ نمودیم. بعد از سانتریفیوژ، محلول رویی را بیرون ریخته میکروتیوب را در ترموبلاک در درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد تا زمانی که داخل میکروتیوب کاملاً خشک شد. مقدار ۵۰ µl از آب مقطر استریل را به میکروتیوب افزوده به مدت ۵ دقیقه در ترموبلاک با درجه حرارت ۶۵ درجه سانتیگراد قرار داده شد. بعد از به پایان رسیدن این زمان، میکروتیوب را ورتکس کرده به کمک سمپلر محتوای میکروتیوب‌ها را پر و خالی کرده دیواره آن شستشو داده شد. در این مرحله، میکروتیوب حاوی ۵۰ µl از DNA باکتری بود.

PCR جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس:

برای انجام PCR، از Master mix آماده تهیه شده از شرکت فرمنتاز کانادا و پرایمرهای MTUB-F (5´TCGGACGCGTATGCGATATC-3´) و MTUB-R (5´-ACATACAGTTCGGACTTGCG-3´) (سیناژن- ایران) استفاده گردید. برای آماده سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ µl برای هر واکنش از ۱۲/۵ µl از Master mix آماده، ۱/۳ µl از هر پرایمر، ۲ µl از DNA ژنومی هر سویه جدا شده و ۷/۹ µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد: ۵ دقیقه در حرارت ۹۵^{oC} سپس ۳۰ سیکل حرارتی شامل ۹۴^{oC} یک دقیقه، ۶۵^{oC} یک دقیقه، ۷۲^{oC} یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲^{oC} به مدت ۱۰ دقیقه. بعد از انجام واکنش، ۵ µl از نمونه‌های PCR شده در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردید. حضور باند قوی در منطقه

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

۱۰۲۰bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است. در فرایند PCR از آب مقطر به عنوان کنترل منفی و از DNA استخراج شده موجود در کیت MTB (سیناژن- ایران) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

PCR *جهت شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس:*

در این مرحله پرایمرهای MTUB-756-GF(5´- GAA GAC GGG TCA ACG GTG - 3´) و MTUB-1450-Cr (5´- CCT TGT TCA CAA CGA CTT T. CGC-3´) (سیناژن- ایران) جهت تشخیص اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم به کار برده شد. برای آماده‌سازی ترکیب PCR mix به حجم ۲۵ µl برای هر واکنش از ۱۲/۵ µl از Master mix آماده، ۱/۳ µl از هر پرایمر، ۲ µl از DNA ژنومی هر سویه جدا شده ۷/۹ µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر به شرح زیر انجام شد: ۵ دقیقه در حرارت ۹۵^{oC} سپس ۳۰ سیکل حرارتی شامل ۹۴^{oC} یک دقیقه، ۶۵^{oC} یک دقیقه، ۷۲^{oC} یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲^{oC} به مدت ۱۰ دقیقه. بعد از انجام واکنش، ۵ µl از نمونه‌های PCR شده در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۹۵ ولت به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز گردیدند. حضور باند قوی در منطقه ۷۳۴ bp مؤید تکثیر قطعه مورد بررسی و حضور مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است.

RFLP PCR:

از آنزیم محدودالاثر RsaI (فرمنتاز-کانادا) برای هضم آنزیمی محصول PCR استفاده گردید. ۱۰ µl از محصول PCR، ۲ µl آنزیم، ۲ µl بافر مخصوص آنزیم و ۱۸ µl آب مقطر استریل اضافه شد و در دمای $۳۷^{o}C$ به مدت ۱۶ ساعت انکوبه شد. نمونه‌های هضم شده در ژل آگاروز ۲ درصد حاوی اتیدیوم بروماید با ولتاژ ۱۰۰ به مدت ۴۰ دقیقه الکتروفورز شدند. ژل آگاروز تهیه شده در این مرحله وارد ژل داکومنتیشن می شد و از آن عکسبرداری می گردید.

یافته ها

در این مطالعه، ۱۳۴۵ بیمار مشکوک به سل در طول یکسال (تیر ۱۳۸۹ لغایت خرداد ۱۳۹۰) به مرکز بهداشت استان مازندران مراجعه کردند و نمونه های جمع‌آوری شده از آن‌ها از طریق تهیه اسمیر و کشت بر روی محیط لوین اشتاین جانسون مورد بررسی قرار گرفت. میانگین سنی افراد مسلول ۱۷/۹۳ ± ۴۵/۵ سال بوده است. حداقل سن بیماران ۱۵ سال و حداکثر آن ۷۹ سال بوده است. میزان شیوع بیماری سل ۳ تا ۵ درصد با ضریب اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد.

از ۱۳۴۵ نمونه جمع‌آوری شده، ۶۵ نمونه (۴/۸۳ درصد) از نظر باکتری سل مثبت (کشت مثبت) و ۵۷ نمونه (۴/۲۳ درصد) از نظر اسمیر مثبت بوده است. نتایج آزمایش کشت و اسمیر مثبت در جنس و گروه‌های سنی مختلف در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱: نتایج آزمایش اسمیر و کشت نمونه ها در دو جنس و گروه های سنی مختلف در افراد مشکوک به سل مراجعه کننده به مرکز بهداشت استان مازندران

گروه سنی	اسمیر مثبت		کشت مثبت	
	زن	مرد	زن	مرد
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
۱۹- ۱۰	۲ (۳/۵)	۳ (۵/۲)	۲ (۳/۰۷)	۳ (۴/۶۱)
۲۹- ۲۰	۷ (۱۲/۲۸)	۳ (۵/۲)	۸ (۱۲/۳)	۳ (۴/۶۱)
۳۹- ۳۰	۵ (۸/۷۷)	۲ (۳/۵)	۵ (۷/۷)	۳ (۴/۶۱)
۴۹- ۴۰	۱۱ (۱۹/۳)	۴ (۷/۰۱)	۱۳ (۲۰)	۴ (۶/۱۵)
۵۹- ۵۰	۷ (۱۲/۲۸)	۲ (۳/۵)	۸ (۱۲/۳)	۲ (۳/۰۷)
۶۹- ۶۰	۳ (۵/۲)	۱ (۱/۷۵)	۳ (۴/۶۱)	۲ (۳/۰۷)
۷۹- ۷۰	۲ (۳/۵)	۵ (۸/۷۷)	۲ (۳/۰۷)	۷ (۱۰/۷۶)
مجموع	۳۷ (۶۵)	۲۰ (۳۵)	۴۱ (۶۳/۰۷)	۲۴ (۳۶/۹۲)
تعداد کل	۵۷ (۴/۲۳)		۶۵ (۴/۸۳)	

علایم بیماری سل در گروه‌های سنی مختلف در افراد مسلول در جدول شماره ۲ مشاهده می‌شود.

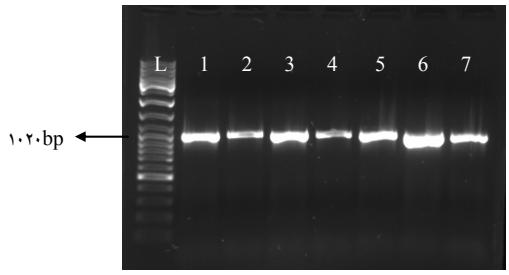
Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

جدول شماره ۲: علایم بیماری سل در افراد مسلول در گروه های سنی مختلف

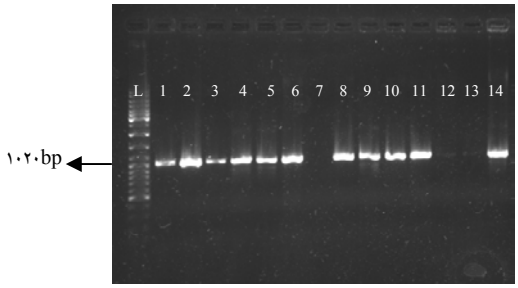
گروه سنی	موارد تعداد (درصد)	سرفه بیش از۳هفته تعداد (درصد)	خلط فراوان تعداد (درصد)	خون در خلط تعداد (درصد)	کم اشتهایی تعداد (درصد)	کاهش وزن تعداد (درصد)	درد قفسه سینه تعداد (درصد)	تب و لرز تعداد (درصد)
۱۰-۱۹	۵ (۷/۶۹)	۵ (۸/۰۶)	۴ (۶/۹)	۲ (۱۰/۵۲)	۵ (۹/۲۵)	۵ (۱۱/۱۱)	۱ (۲/۰۴)	۳ (۶/۲۵)
۲۰-۲۹	۱۱ (۱۶/۹۲)	۱۱ (۱۷/۷۴)	۱۱ (۱۸/۹۶)	۴ (۲۱/۰۵)	۱۱ (۲۰/۳۷)	۴ (۸/۸۸)	۱۰ (۲۰/۴)	۹ (۱۸/۷۵)
۳۰-۳۹	۸ (۱۲/۳۰)	۸ (۱۲/۹)	۶ (۱۰/۳۴)	۲ (۱۰/۵۲)	۷ (۱۲/۹۶)	۶ (۱۳/۳۳)	۷ (۱۴/۲۸)	۵ (۱۰/۴۱)
۴۰-۴۹	۱۷ (۲۶/۱۵)	۱۵ (۲۴/۲)	۱۶ (۲۷/۵۸)	۶ (۳۱/۵۷)	۱۴ (۲۵/۹۲)	۱۳ (۲۸/۸۸)	۱۳ (۲۶/۵۳)	۱۳ (۲۷/۰۸)
۵۰-۵۹	۱۰ (۱۵/۳۸)	۹ (۱۴/۵۱)	۹ (۱۵/۵۱)	۴ (۲۱/۰۵)	۸ (۱۴/۸۱)	۵ (۱۱/۱۱)	۵ (۱۰/۲)	۸ (۱۶/۶۶)
۶۰-۶۹	۵ (۷/۶۹)	۵ (۸/۰۶)	۴ (۶/۹)	۰ (۰)	۲ (۳/۷)	۵ (۱۱/۱۱)	۵ (۱۰/۲)	۴ (۸/۳۳)
۷۰-۷۹	۹ (۱۳/۸۴)	۹ (۱۴/۵۱)	۸ (۱۳/۸)	۱ (۵/۲۶)	۷ (۱۲/۹۶)	۷ (۱۵/۵۵)	۸ (۱۶/۳۲)	۶ (۱۲/۵)
مجموع	۶۵ (۴/۸۳)	۶۲ (۹۵/۳۸)	۵۸ (۸۹/۲۳)	۱۹ (۲۹/۲۳)	۵۴ (۸۳/۰۷)	۴۵ (۶۹/۲۳)	۴۹ (۷۵/۳۸)	۴۸ (۷۳/۸۴)

۶۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس براساس کند رشد بودن، اسید فست بودن و رشد بر روی محیط کشت لوین اشتاین جانسون و آزمایش احیای نیترات شناسایی شدند. DNA کلنی‌های رشد یافته بر روی محیط لوین اشتاین جانسون جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و تفکیک گونه‌های آن استخراج و مورد بررسی قرار گرفت. از میان ۶۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس توسط PCR، ۵۹ نمونه، مایکوباکتریوم کند رشد و جزء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده، باندی در ناحیه ۱۰۲۰ bp را ایجاد کردند (تصویر شماره ۱) و ۶ نمونه جزء مایکوباکتریوم های تند رشد و غیر توبرکلوزی بودند و هیچ باندی از آن ها بر روی ژل آگاروز ۱ درصد رؤیت نشد (تصویر شماره ۲).

در دومین PCR که جهت شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام گرفت، همه‌ی ۵۹ گونه‌های شناسایی شده، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند و در ناحیه ۷۳۴ bp بر روی ژل باند ایجاد کردند (تصویر شماره ۳).

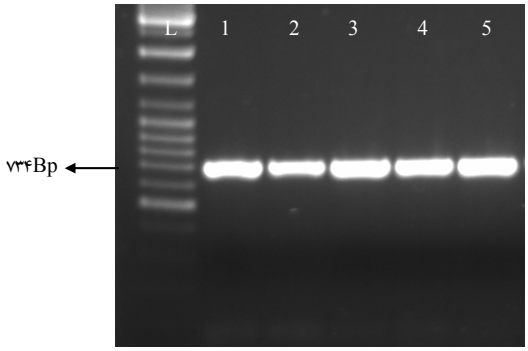


تصویر شماره ۱: PCR جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. مارکر 100 bp، Lane 1: کنترل مثبت، Lane 2,3,4,5,6,7: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (1020 bp).



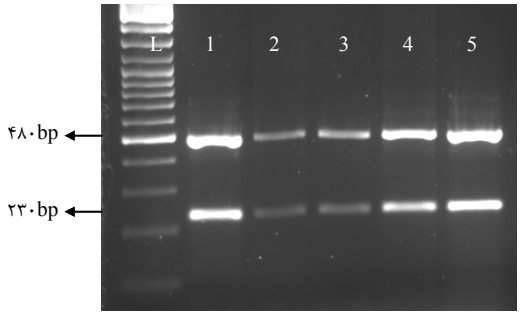
تصویرشماره۲: PCR جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس. مارکر 100 bp، Lane1: کنترل مثبت، Lane 2,3,4,5,6,8,9,10,11,14: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (1020 bp)، Lane 7: کنترل منفی، Lane 12,13: مایکوباکتریوم غیرتوبرکلوزی.

در هضم آنزیمی با روش RFLP-PCR، تمامی سویه‌های جدا شده از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، الگوهای یکسان، مشخص و کاملاً شبیه به هم ایجاد کردند. این سویه‌ها در کنار مارکر، دارای دو باند قوی با اندازه‌های ۲۳۰ bp و ۴۸۰ bp بودند (تصویر شماره ۴).



تصویر شماره۳: PCR جهت شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس: مارکر 100 bp، Lane 1: کنترل مثبت، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37RV، Lane 2,3,4,5: مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (734 bp).

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018



تصویر شماره ٤: الگوهای یکسان به‌دست آمده، حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR توسط آنزیم محدودالاثر RsaI. مارکر 100 bp ، Lane 1 : کنترل مثبت، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، Lane 2,3,4,5 : مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(230 bp و 480).

بحث

در دهه‌های اخیر میزان بروز سل در جهان به طور چشمگیری افزایش یافته است که مهم‌ترین عوامل مؤثر بر آن، رشد جمعیت، افزایش فقر، مهاجرت، شیوع عفونت با HIV و ظهور گونه‌های مقاوم می‌باشد(۱۷،۲). با توجه به این‌که عفونت‌های مایکوباکتریومی در حال افزایش است، هدف اصلی این پژوهش، شناسایی و افتراق مایکوباکتریوم‌های بیماری‌زا (کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) با یک روش سریع، حساس، ساده و اختصاصی RFLP-PCR بوده است. این امر بسیار مهم و حیاتی است و همچنین با تشخیص سریع و دقیق مایکوباکتریوم‌های بیماریزا می‌توان موفقیت‌هایی در درمان نیز به‌دست آورد. هدف اولیه این مطالعه نیز بیشتر معطوف به همین موضوع بوده است.

۱۳۴۵ نمونه از افراد مشکوک به سل مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت استان مازندران جمع‌آوری شد که شامل خلط، مایه پلور، مایع آسیت، خون قاعدگی، مایع برونش، زخم، شیره معده، ادرار، مایع کیست کبدی، آبسه، مایع مفصل، ترشحات گردن، بیوپسی پا و بافت بودند که فراوان‌ترین آن‌ها، ۱۲۲۲ مورد (۹۰/۸ درصد) مربوط به خلط بود.

طی مطالعه‌ای که در سال ۱۳۸۰ در ایران بر روی سنین افراد مبتلا به سل انجام گرفت، کمترین میزان بروز بیماری سل در گروه سنی ۹-۵ سال با ۱/۵ در یکصد هزار نفر و بیشترین بروز بیماری در سنین بالای ۶۵ سال با ۸۸/۲ در یکصد هزار نفر مشاهده گردیده است(۲). در مطالعه حاضر، کمترین میزان بروز بیماری سل در گروه‌های سنی ۱۹-۱۰ سال (۵ مورد، ۷/۶۹ درصد) و ۶۰- ۶۹ سال (۵ مورد، ۷/۶۹ درصد) و بیشترین بروز بیماری در گروه سنی ۴۹- ۴۰ سال (۱۷ مورد، ۲۶/۱۵ درصد) مشاهده شد که ۴ مورد (۲۳/۵۲ درصد) مردان و ۱۳ مورد (۴۷/ ۷۶ درصد) را زنان تشکیل دادند. میانگین سنی افراد مسلول ۱۷/۹۳ ± ۴۵/۵ سال بوده است. حداقل سن بیماران ۱۵ سال و حداکثر آن ۷۹ سال بوده است. میزان شیوع بیماری سل ۳ تا ۵ درصد با ضریب اطمینان ۹۵ درصد می‌باشد. شایع‌ترین علایم بیماری سل به ترتیب، سرفه بیش از ۳ هفته (۹۵/۳۸ درصد)، خلط فراوان (۸۹/۲۳ درصد)، کم اشتهایی (۸۳/۰۷ درصد)، درد قفسه‌سینه (۷۵/۳۸ درصد)، تب و لرز (۷۳/۸۴ درصد)، کاهش وزن (۶۹/۲۳ درصد) و وجود خون در خلط (۲۹/۲۳ درصد) بوده است.

در تحقیقاتی که در سایر نقاط دنیا به عمل آمده، رابطه معنی‌داری بین جنس و عفونت‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وجود دارد و این عفونت در مردان بیش از زنان گزارش شده است و نسبت مرد به زن بین ۳ به ۱ و ۵ به ۱ متغیر است(۲۱-۱۸) اما با توجه به مطالعاتی که در ایران انجام گرفته است، میزان ابتلاء به بیماری سل در زنان بیش از مردان بوده است که در استان‌های مختلف کشور، میزان شیوع متفاوت می‌باشد. براساس تحقیقی که در مرکز تحقیقات سل بیماری‌های ریوی تبریز انجام گرفته است، شیوع بیماری سل در زنان بیشتر از مردان بوده است(۲). در این تحقیق، از میان ۵۷ مورد اسمیر مثبت، ۳۷ مورد (۶۵ درصد) مربوط به زنان و ۲۰ مورد (۳۵ درصد) مربوط به مردان بود و از ۶۵ مورد کشت مثبت، ۴۱ مورد (۶۳/۰۷ درصد) مربوط به زنان و ۲۴ مورد (۳۶/۹۲ درصد) مربوط به مردان بود. بنابراین در این مطالعه، میزان شیوع بیماری سل در زنان بیشتر از

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

مردان می‌باشد که از این جهت با نتایج سایر مطالعات انجام شده در ایران مطابقت دارد(۲). در مطالعه‌ای که توسط نخجوانی و همکاران در سال ۲۰۰۶ بر روی ۹۰۰ نمونه انجام گرفته بود، ۵۲ نمونه (۵/۷ درصد) از نظر کشت و ۴۶ نمونه (۵/۱ درصد) از نظر اسمیر مثبت گزارش شدند(۲۲). طی مطالعه‌ی دیگری توسط بهادر در سال ۲۰۰۵، از میان ۷۸ نمونه، ۱۷ نمونه (۲۱/۷ درصد) توسط کشت و ۳ نمونه (۳/۸ درصد) توسط رنگ‌آمیزی مثبت بودند(۲۳). Verma-Basil و همکاران در سال ۲۰۱۰ تحقیقی را بر روی ۲۲۶ نمونه انجام دادند که در طی مطالعه‌ی آن‌ها اسمیر ۱۴۹ نمونه (۸۴/۵ درصد) مثبت گزارش شد(۲۴). نتایج کشت و اسمیر مثبت در مطالعه‌ی حاضر با نتایج حاصل از مطالعه نخجوانی مطابقت دارد(۲۲). در مطالعه حاضر، بیشترین کشت مثبت (۱۷ مورد، ۲۶/۱۵ درصد) به گروه سنی ۴۹-۴۰ سال تعلق داشت به‌طوری‌که ۱۳ مورد (۲۰ درصد) در زنان و ۴ مورد (۶/۱۵ درصد) در مردان مشاهده شد. همچنین در تحقیقاتی که توسط Bum-Joon و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام شده است، رابطه معنی‌داری بین ملیت و عفونت‌های مایکوباکتریومی وجود دارد. مثلاً سیاهپوستان و سرخپوستان آمریکایی نسبت به جمعیت سفید پوست از استعداد بیشتری برای ابتلاء به سل برخوردار هستند(۲۵). در این مطالعه، تمامی افراد مراجعه‌کننده به مرکز بهداشت استان مازندران از افراد ایرانی مقیم در این استان بودند.

به‌منظور تفکیک و شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از غیرتوبرکلوزیس، پرایمرهای MTUB-F و MTUB-R مورد استفاده قرار گرفته است. ژن gyrB یکی از ژن‌های منحصر به فرد می‌باشد زیرا برای استفاده‌های معمول در آزمایشگاه‌های تشخیص طبی کاربرد دارد(۲۶). در این تحقیق نیز ژن gyrB برای تفکیک اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مایکوباکتریوم‌های دیگر به‌کار برده شد.

از میان ۶۵ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس توسط PCR، ۵۹ نمونه، مایکوباکتریوم کند رشد و جزء کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بوده باندی در ناحیه bp ۱۰۲۰ را ایجاد کردند و ۶ نمونه جزء مایکوباکتریوم‌های تند رشد و غیر توبرکلوزی بودند و هیچ باندی از آن‌ها رؤیت نشد. در مطالعه‌ی Abass که در سال ۲۰۱۰ انجام شد، ۷۹ نمونه مورد مطالعه قرار گرفت که از میان آن‌ها، ۷۷ نمونه (۹۷/۵ درصد) به عنوان اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۲ نمونه (۲/۶ درصد) به‌عنوان مایکوباکتریوم غیر توبرکلوزیس شناخته شدند(۲۷). در مطالعه خسروی در سال ۱۳۸۴ از ۱۵۰ سویه کلینیکی، ۱۴۵ سویه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند مابقی غیر توبرکلوزی بودند(۲۸). در سایر مطالعاتی که پرایمرهای MTUB-F و MTUB-R جهت شناسایی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس به کار رفته بودند باندی در ناحیه bp ۱۰۲۰ ایجاد شد(۲۶،۲۹،۳۰،۳۱).

در دومین PCR که جهت شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس انجام گرفت، همه‌ی ۵۹ گونه شناسایی شده، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بودند و در ناحیه bp ۷۳۴ بر روی ژل باند ایجاد کردند. بنابراین میزان فراوانی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس صد درصد و میزان فراوانی مایکوباکتریوم بویس، مایکوباکتریوم آفریکانوم و مایکوباکتریوم میکروتی صفر درصد می‌باشد. در مطالعه‌ی Abass در سال ۲۰۱۰ نیز تمامی ۷۷ نمونه به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناخته شدند و باندی در ناحیه bp ۷۳۴ را ایجاد نمودند(۲۷). در مطالعه‌ای که Parason نیز در سال ۲۰۰۲ انجام داد، از ۸۸ نمونه مورد بررسی، ۱۶ نمونه توالی مربوط به مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را داشتند و مابقی متعلق به مایکوباکتریوم بویس بودند(۳۲). در مطالعه Verma-Basil در سال ۲۰۱۰، از ۲۲۶ نمونه خلط مورد آزمایش، ۱۴۹ نمونه اسمیر مثبت بودند و به کمک RFLP PCR، ۱۲۶ نمونه (۸۴/۵ درصد) مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناخته شدند(۲۴). در

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

مطالعه Chimara در سال ۲۰۰۴، که بر روی ۳۰۷ نمونه مایکوباکتریوم انجام گرفت، ۳۰۶ نمونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و ۱ نمونه مایکوباکتریوم بویس بودند(۳۳).

در مطالعه حاضر، در روش هضم آنزیمی با آنزیم محدودالاثر RsaI با روش RFLP-PCR، تمامی سویه‌های جدا شده از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، الگوهای یکسان، مشخص و کاملاً شبیه به هم ایجاد کردند. این سویه‌ها در کنار مارکر، دارای دو باند قوی با اندازه‌های bp ۲۳۰ و ۴۸۰ بودند. بنابراین آنزیم محدودالاثر RsaI را ابزاری سریع و آسان برای افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دانستند(۳۴،۳۱،۲۶).

روش RFLP-PCR که در این مطالعه به کار برده شد، ابزاری قدرتمند برای افتراق مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس در عفونت‌های انسانی است و همچنین برای تفکیک و شناسایی انواع گونه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نیز به کار گرفته شده است(۳۵،۲۵) و این امر برای درمان سریع بیماران و جلوگیری از مرگ و میر ناشی از بیماری‌های مایکوباکتریومی مفید است(۳۳).

بیماری سل گاوی که عامل ایجادکننده آن مایکوباکتریوم بویس می‌باشد، بیماری مشترک میان انسان و دام است. خوشبختانه در مطالعه حاضر، مایکوباکتریوم بویس از افراد مسلول جدا و شناسایی نشد و این حاکی از کنترل دام‌ها و استاندارد بودن روش‌های استریلیزاسیون و پاستوریزاسیون شیرها می‌باشد.

با توجه به اقداماتی که جهت شناسایی مایکوباکتریوم میکروتی که موجب عفونت درموش صحرایی و انسان می‌شود و همچنین مایکوباکتریوم آفریکانوم(۷) صورت گرفت، باکتری‌های مذکور از افراد مسلول مورد مطالعه جدا نشدند.

لازم به ذکر است که برای اجتناب از ابتلاء به بیماری سل و کاهش عوارض آن نه تنها پیشگیری و کنترل بیماری سل در انسان و حیوان بلکه همزمان با آن ارتقاء فرهنگ فردی و اجتماعی و اعتلای سطح اقتصادی جامعه نقش غیر قابل انکاری دارد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل پایان نامه دانشجویی کارشناس ارشد خانم مریم پورحاجی باقر می باشد.

References

1. ATS-American Thoracic Society. Diagnostic standards and classification of tuberculosis in adults and children. Am J Resp Crit Care 2000; 161: 1376-1395.
2. Rafi A, Maaddab R. Principles of Mycobacteriology. First ed. Tabriz: Sotude Publications; 2003. PP 73-76.
3. Mostrom P, Gordon M, Sola C, Ridell M, Rastogi N. Methods used in the molecular epidemiology of tuberculosis. Clin Microbiol Infect 2002; 8(11): 694-704.
4. Tiwari RP, Tiwari D, Sanjay K, Garg SK, Chandra R, Bisen PS. Glycolipid of Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv Are Potential Serological Markers for Diagnosis of Active Tuberculosis. Clin Diag Lab Immun 2005; 12(3): 465-473.
5. Talor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol 1997; 35: 79-85.
6. Brosch R, Gordon SV, Mariess M, Bordin P, Buchrieser C, Eiglmeier K, et al. A new evolutionary scenario for Mycobacterium tuberculosis complex. Proc Natl Acad Sci USA 2002; 99(6): 3684-3689.
7. Richter E, Weizenegger M, Fahr A, Rusch-Gerdes S. Usefulness of the Genotype MTBC

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

Assay for differentiating Species of the Mycobacterium tuberculosis complex in Cultures Obtained from Clinical Specimens. J Clin Microbiol 2004; 42(9): 4303-4306.

8. Kasai H, Ezaki T, Harayama SH. Differentiation of phtlogenetically related slowly growing Mycobacteria by their gyrB sequence. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 301-308.
9. Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington D.C: ASMP Press; 2003. PP 532-560.
10. Collins CH, Grange JM, Yates MD. Tuberculosis Bacteriology, Organization and Practice. 2nd ed. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997.
11. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies D, Siddiqui S, Khalaf C, et al. Identifiction of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for Mycobacterium bovis. J Clin Microbiol 1996; 34: 2007-2010.
12. Aranaz A, Liebaba E, Gomez-Mampaso E, Galan J, Cousins D, Ortega A, et al. Mycobacterium tuberculosis subsp. Caprae subsp. Nov. a taxonomic study of a new member of the Mycobacterium tuberculosis complex isolated from goats in Spain. Int J Syst Bacteriol 1999; 49: 1263-1273.
13. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, M.Agterveld D, Soolingen S, Kuijper A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of Mycobacterium tuberculosis fordiagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-914.
14. Konno K, Feldman FM, Mcdermott W. Pyrazinamide susceptibility and amidase activity of tubercle bacilli. Am. Rev. Respir. Dis 1967; 95: 461-469.
15. Hannan MM, Desmond EP, Morlock GP, Mazurek GH, Crawford JT. Pyrazinamidemono resistant Mycobacterium tuberculosis in the United States. J Clin Microbiol 2001; 39(2): 647-650.
16. Hobson W. Theory and Practice of Public Health. Fifth edition. Oxford: University Press; 1979.
17. McCray E, Weinbaum CM, Braden CR, Onorato IM. The epidemiology of tuberculosis in the United States. Clin Chest Med 1997; 18(1): 99-113.
18. Niemann S, Richter E, Rusch-Gerdes S. Differentiation among members of Mycobacterium tuberculosis complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptiblesubtypes of M. bovis. J Clin Microbiol 2000; 38(1): 152-157.
19. Gruft H, Falkinham JO, Parker BC. Recent experience in the epidemiology of disease by atypical mycobacteria. Rev Infect Dis 1981; 3: 990-996.
20. Meissner G, Anz W. Sources of mycobacterium avium complex infection resulting in human disease. Am Rev Pespir Dis 1977; 116: 1057-1064.
21. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA. Jawetz, Melnick, Adelberg's medical microbiology. 24th ed. USA: Mac Grous Hill; 2007. p. 234-247.
22. Nakhjavani FA, Bahador A. Direct Detection of Mycobacterium sp in Respiratory Specimen with rpoB-PCR and Comparison with Concentration Flurochrome Staining. Res J Medicine & Med Sci 2006; 1(2): 68-71.
23. Bahador A, Etemadi H, Kazemi B, Ghorbanzadeh R, Nakhjavan FA, Ahmadi Nejad Z. Performance Assessment of IS1081-PCR for Direct Detection of Tuberculous Pleural Effusion: Compared to

Downloaded from jmums.mazums.ac.ir at 13:09 +0430 on Friday May 25th 2018

rpoB-PCR. Res J Agric Biol Sci 2005; 1(2): 142-145.

24. Verma-Basil M, Pathak R, Singh K, Dwivedi ShK, Garima K, Kumar S, et al. Direct early identification of Mycobacterium tuberculosis by PCR Restriction Fragment Length Polymorphism analysis from clinical samples. Jpn J Infect Dis 2010; 63(1): 55-57.
25. Bum-Joon K, Seung-Hyun L, Mi-Ae L, Seo Jeong K, Gue-Tae C, Eui Chong K, et al. Identification of mycobacterial species analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Clin Microbiol 1999; 37(6): 1714-1720.
26. Castellanos E, Aranaz A, Romero B, Juan L, Alvarez J, Bezos J, et al. Polymorphisms in gyrA and gyrB Genes among Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Type I, II, and III Isolates. J Clin Microbiol 2007; 45(10): 3439-3442.
27. Abass NA, Suleiman KM, EL Jalii IM. Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis complex isolates by their gyrB polymorphism. Indian J Med Microbiol 2010; 28(1): 26-29.
28. Khosravi A, Hashemi A. Differentiation of clinical Mycobacterium tuberculosis by restriction fragment length polymorphism hsp65. J Shahrekord Univ Med Sci 2005; 7(3): 1-8.
29. Richter E, Weizenegger M, Rusch-Gerdes S, Niemann S. Evaluation of Genotype MTBC Assay for Differentiation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates. J Clin Microbiol 2004; 41(6): 2672-2675.
30. Kasai H, Ezaki T, Harayama Sh. Differentiation of Phylogenetically Related Slowly Growing Mycobacteria by Their gyrB Sequences. J Clin Microbiol 2000; 301-308.
31. Niemann S, Harmsen D, Rusch-Gerdes S, Richter E. Differentiation of Clinical Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates by gyrB DNA Sequence Polymorphism Analysis. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3231-3234.
32. Parason LM, Brosch R, Cole ST, Somoskovi A, Loder A, Bretzel G, et al. Rapid and Simple Approach for Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Isolates by PCR-Based Genomic Deletion Analysis. J Clin Microbiol 2002; 40(7): 2339-2345.
33. Chimara E, Ferrazoli L, Cardoso Leao S. Mycobacterium tuberculosis complex differentiation using gyrB RFLP analysis. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 2004; 99(7): 745-748.
34. Goh KS, Febre M, Huard RC, Schmid S, Sola Ch, Rastogi N. Study of the gyrB gene polymorphism as a tool to differentiate among Mycobacterium tuberculosis complex subspecies further underlines the older evolutionary age of Mycobacterium canettii. Mol Cell Probe 2006; 20: 182-190.
35. Bum-Joon K, Keun-Hwa L, Bo-Na P, Seo Jeong K, Gill-Han B, Sang-Jae K, et al. Differentiation of mycobacterial species by PCR- Restriction analysis of DNA (342bp) of the RNA polymerase gene (rpoB). J Clin Microbiol 2001; 39(6): 2102-2109.