View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by shahrekord university of medical scinces

دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد/ دوره ۷، شماره ۳/ پائیز ۱۳۸۴ / ۸-۱

تفکیک سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از پلی مورفیسم قطعه طولی محدود بر اساس ژن *hsp65*

دکتر آذردخت خسروی*، عبدالرزاق هاشمی**

*استادیار گروه میکروبیولوژی پزشکی و مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری اهواز- دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز (**مؤلف مسئول**)،
**کارشناسی ارشد میکروبیولوژی پزشکی - دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز.

تاریخ دریافت: ۸۳/۱۱/۱۵ - تاریخ تأئید: ۸٤/۷/۱٤

چکیده:

زمینه و هدف: **در سال‌های اخیر، به کارگیری تکنیک PCR (Polymerase Chain Reaction) و به دنبال آن آنالیز محصول PCR توسط آنزیم‌های محدودالاثر (Restriction Fragment Length Polymorphism=RFLP) برای افتراق مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه، استفاده شده است. در حالی که جزئیات افتراقی گونه‌های غیرتوبرکلوزی مایکوباکتریوم‌ها توسط این تکنیک مشخص شده و حتی در تعدادی از آنها این روش برای پیگیری مولکولار اپیدمیولوژی اثبات شده است، تنها تعداد کمی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفته‌اند. مطالعهٔ حاضر این متد افتراقی را برای سویه‌های جدا شده در مقیاس وسیع‌تر با هدف تعیین پلی مورفیسم احتمالی مورد ارزیابی قرار داد.**

روش بررسی: **یکصد و پنجاه سویه کلینیکی از بیماران مراجعه‌کننده به مرکز سل اهواز جمع‌آوری شد. رنگ‌آمیزی اسیدفست برای سویه‌ها انجام گرفت، سپس سویه‌ها به عنوان مایکوباکتریوم توبرکلوزیس توسط خصوصیات کشت و تست‌های بیوشیمیایی دسته‌بندی شدند. تکنیک PCR-RFLP با استفاده از DNA ژنومی استخراج شده به دنبال PCR بر مبنای تکثیر قطعه ۴۳۹bp از ژن *hsp65* توسط پرایمرهای اختصاصی جنس مورد استفاده قرار گرفت. بعد از هضم محصولات PCR توسط آنزیم‌های *Bst*EII و *Hae*III آنالیز آنزیمی انجام گرفت.**

یافته ها: **بر اساس نتایج بدست آمده، ۱۴۵ سویه کلینیکی (۹۶/۶٪) الگوهای یکسان شبیه به سویه‌های استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، برای *Hae*III فراگمنت‌هایی به طول ۱۶۵/۱۴۰/۷۲ و برای *Bst*EII به طول ۲۵۰/۱۲۰/۸۲، نشان دادند. سه الگوی متفاوت در پنج سویه کلینیکی در الگوهای بدست آمده از هضم *Hae*III با فراگمنت‌هایی به طول ۱۶۵/۱۴۵ (سه سویه)، ۱۸۰/۱۰۰/۸۰ (یک سویه) و ۱۹۴/۷۲ (یک سویه) مشاهده شد در حالی که الگوی بدست آمده از هضم *Bst*EII این سویه‌ها تنوع نداشت و شبیه به دیگر سویه‌ها بود.**

نتیجه‌گیری: **نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در موارد نادر، پلی‌مورفیسم‌هایی در توالی ژن *hsp65* سویه های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس ممکن است وجود داشته باشد.**

واژه‌های کلیدی: آنزیم های محدود الاثر، تشخیص مولکولی، ژن *hsp65*، مایکوباکتریوم توبرکلوزیس.

مقدمه:

به طور کلی تفریق گونه‌ها و تعیین هویت سریع مایکوباکتریوم‌ها یکی از مشکلات اساسی در راه تشخیص، کنترل و درمان بیماری‌های حاصل از خانوادهٔ مایکوباکتریومی است. این امر به صورت سنتی بر اساس خصوصیات ظاهری کلنی، سرعت رشد و تست‌های بیوشیمیایی استوار است (۱). با توجه به نیاز به امکانات ویژه، تست‌های بیوشیمیایی برای افتراق گونه‌ها در همهٔ آزمایشگاه های مایکوباکتریولوژی کشور به صورت

***آدرس:** اهواز – دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز - دانشکده پزشکی – گروه میکروبیولوژی و مرکز تحقیقات بیماری های گرمسیری و عفونی - تلفن: ۰۶۱۱-۳۳۶۷۵۴۳، Email: khosraviad@yahoo.com

معمول انجام نمی‌شود. تکنیک‌های متفاوتی از قبیل تکنیک کروماتوگرافی با کیفیت عالی (HPLC)، کروماتوگرافی گاز مایع (GLC)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) برای این منظور به کار رفته‌اند (۲،۱). این تکنیک‌ها یا به دلیل هزینه‌های بالا و یا قابل اعتماد نبودن نتایج در بعضی از موارد، استفادهٔ معمول از آنها برای تعیین هویت و جداسازی گونه‌های مایکوباکتریومی رایج نشده است. هیبریدیزاسیون پروب بر پایه RNA یا DNA علی‌رغم سریع و کارآمد بودن، به دلیل عدم توانایی در تفکیک انواعی از گونه‌ها نیز کاربرد روتین پیدا نکرده است (۳). متدهای جدید بر اساس PCR یکی از مهمترین و کاربردی‌ترین، در عین حال ساده‌ترین روش‌های مولکولار برای تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها هستند. وجود پلی‌مورفیسم در نواحی خاصی از چندین ژن با توالی محافظت شده جنس مایکوباکتریومی مانند ژن کدکننده پروتئین ۳۲ کیلودالتونی (۴) ژن *dnaJ* (۵)، ژن *sod* (۶)، ژن *rpo*B (۷)، ژن *hsp*65 (۸) و ژن *rrs* (16SrDNA) (۸)، امکان تعیین هویت سریع و آسان‌تر گونه‌های مایکوباکتریومی را از همدیگر فراهم آورده است. از کاربردی‌ترین توالی‌های فوق برای این مقصود، استفاده از وجود پلی‌مورفیسم در توالی ژن‌های *rrs* و *hsp*65 است (۱). پروتئین شوک حرارتی ۶۵ کیلو دالتونی یکی از مهمترین آنتی‌ژن‌هایی است که در همه گونه‌های مایکوباکتریومی وجود دارد. ژن مسؤل آن، *hsp*65، به صورت کامل، تعیین توالی شده است (۹). در سال ۱۹۹۳ محققی به نام Telenti و همکارانش یک متد سریع مولکولی برای تعیین هویت و افتراق مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه معرفی نمودند. در مطالعه وی، قطعه ژنی به طول ۴۳۹bp در موقعیت ۸۳۶-۳۹۸ از توالی *hsp*65 توسط دو پرایمر مخصوص جنس توسط PCR تکثیر گردید و محصول PCR توسط دو آنزیم محدودالاثر (*Bst*EII, *Hae*III) مورد تجزیه قرار گرفت. با بررسی الگوهای بدست آمده از هضم محصول PCR، گونه‌های مورد مطالعه مایکوباکتریومی از همدیگر تفکیک گردیدند (۸). تکنیک هضم آنزیمی (RFLP) بر اساس توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp*65 مایکوباکتریومی در تعیین هویت مایکوباکتریوم‌ها بسیار کارآمد است. با این وجود در بعضی از گونه‌های مایکوباکتریومی از جمله در مایکوباکتریوم فلاوسنس (*M.flavescens*) و گوردونه (*M.gordonae*) (۸) مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم (*M.scrofulaceum*) (۱۰)، مایکوباکتریوم فورچوئیتوم (*M.fortuitum*)، مایکوباکتریوم اسمگماتیس (*M.smegmatis*)، مایکوباکتریوم کانزاسی (*M.kansasii*) و مایکوباکتریوم آویوم (*M.avium*) (۱۱)، بر اساس تایپینگ با این تکنیک، بیش از چند نوع الگوی هضم آنزیمی مشاهده شده است که بیانگر حضور زیر گونه‌هایی در این مایکوباکتریوم‌ها است. در مطالعه اولیه (۸) و نیز در مطالعات بعدی در مناطق مختلف (۱۴-۱۲)، اشاره شده است که کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس و پاتوژن مهم آن (مایکوباکتریوم توبرکلوزیس) دارای پلی‌مورفیسم در توالی فوق از ژن *hsp*65 نمی‌باشند و از لحاظ انگشت‌نگاری یکسان می‌باشند. با توجه به اینکه در مطالعات انجام شده قبلی تنها گونه‌های استاندارد و یا تعداد معدودی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد بررسی قرار گرفته بودند، لذا در این مطالعه تعداد قابل توجهی از سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با هدف

تعیین پلی مورفیسم احتمالی با استفاده از روش بررسی گردید.

روش بررسی:

در یک مطالعه توصیفی تعداد ۱۵۰ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس از بهمن ماه ۱۳۸۲ تا آذرماه ۱۳۸۳ از انواع نمونه‌های کلینیکی کشت داده شده در مرکز رفرانس سل و جذام اهواز جداسازی و تعیین هویت شدند. دو سویه استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس H37Rv (انستیتو پاستور ایران) و BKH37 (مؤسسه رازی کرج) و یک سویه استاندارد مایکوباکتریوم بوویس BCG سویه 1173-p2 (انستیتو پاستور ایران) به عنوان کنترل برای انجام تست های بیوشیمیایی و کارهای مولکولار مورد استفاده قرار گرفت.

تست‌های بیوشیمیایی: از نمونه ابتدا اسمیر تهیه گردید و با استفاده از روش رنگ‌آمیزی اسیدفست (زیل نلسون) مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفتند (۱). کلیه نمونه‌ها پس از آلودگی‌زدایی به روی محیط کشت لوین اشتاین جانسن (Lowen stein-Jensen) کشت داده شدند و در دمای ۳۷°C انکوبه گردیدند. از کلنی‌های رشد یافته به روی محیط کشت، پس از ۱۲-۱۰ روز جهت تست‌های بیوشیمیایی تفکیکی شامل بررسی تولید نیاسین (Niacin) در محیط کشت، احیاء نیترات (Nitrate) و کاتالاز (Catalase) (در دمای اتاق و در دمای ۶۸°C) استفاده گردید (۱).

استخراج DNA ژنومی: حداقل دو کلنی از هر سویه برای استخراج DNA به روش جوشاندن ساده مورد استفاده قرار گرفت (۸). نمونه‌های استخراج شده توسط اسپکتروفتومتر دارای طول موج UV (Shimatzo، آلمان) از لحاظ خلوص DNA استخراج شده در دو طول موج ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر مورد سنجش قرار گرفتند.

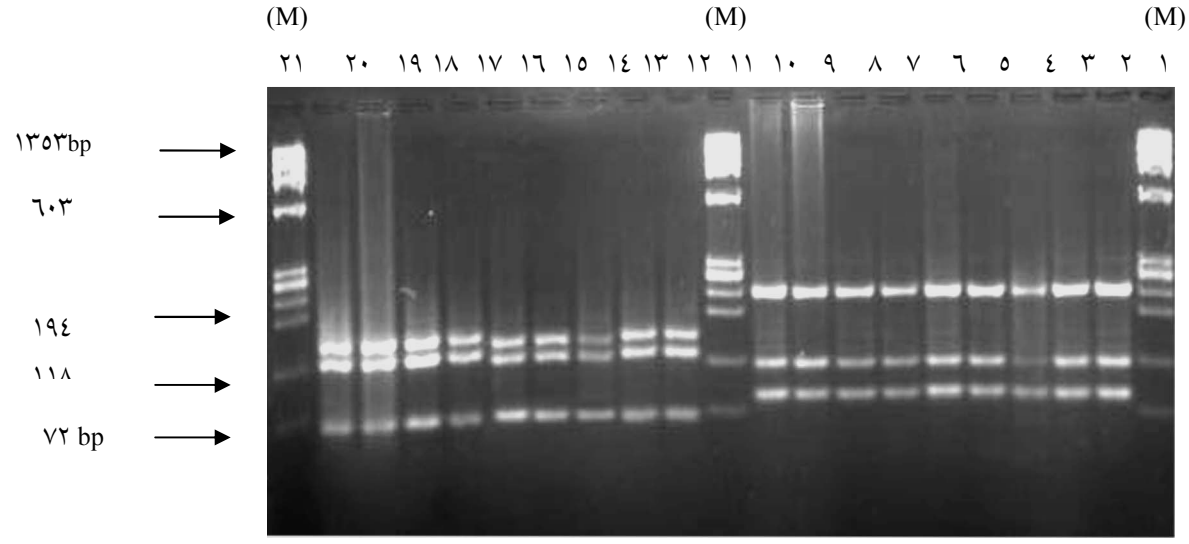
PCR: توالی به طول ۴۳۹bp از ژن *hsp*65 توسط دو پرایمر اختصاصی جنس Tb11.5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT و 5'-CTTGTCGAACCGCATACCCT و Tb12 از سویه‌های کلینیکی جدا شده تکثیر شد (۸). برای انجام PCR از کیت Set system (سیناژن – ایران) استفاده گردید. ترکیب PCR mix به حجم ۵۰µl برای هر واکنش از KCl با غلظت ۵۰Mm، Tris-HCl با غلظت ۱۰Mm (pH:۸/۴)، هر داکسی ریبونوکلئوتید تری فسفاته ۲۰۰µM، MgCl2 با غلظت ۱/۵mM، ۰/۵µM از هر پرایمر، ۱/۲۵ واحد از آنزیم Taq-DNA Polymerase، ۲۰۰-۷۵ نانوگرم از DNA ژنومی هر سویه جدا شده و ۲۸/۱µl آب مقطر استریل دیونیزه استفاده شد. واکنش PCR در دستگاه ترموسایکلر (Techgene، انگلستان) به شرح زیر انجام شد: ۵ دقیقه در حرارت ۹۵°C سپس ۴۵ سیکل حرارتی شامل ۹۴°C یک دقیقه، ۶۰°C یک دقیقه، ۷۲°C یک دقیقه و در نهایت یک سیکل حرارتی ۷۲°C به مدت ۱۰ دقیقه. از ژنوم باکتری اشریشیاکلی که به روش جوشاندن استخراج شده بود نیز به عنوان کنترل منفی استفاده گردید. بعد از انجام واکنش PCR، ۵µl از نمونه‌های PCR شده در ژل آگاروز ۱ درصد حاوی اتیدیوم بروماید در کنار مارکر ϕX 174 (فرمنتاز-کانادا) با ولتاژ ۹۰ ولت الکتروفورز گردیدند. حضور باند قوی در منطقهٔ ۴۵۰bp-۴۲۰ این مارکر مؤید تکثیر شدن قطعه مورد بررسی بود.

هضم اندونوکلئازی: از دو آنزیم محدودالاثر *Hae*III و *Bst*EII (فرمنتاز - کانادا) برای هضم آنزیمی محصول PCR استفاده گردید (۸). برای هضم آنزیمی *Hae*III، ۱۰µl از محصول PCR، ۵ واحد آنزیم و بافر مخصوص آنزیم اضافه شد و در دمای ۳۷°C به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. برای هضم آنزیمی *Bst*EII نیز ۱۰µl از محصول PCR به ۵ واحد آنزیم

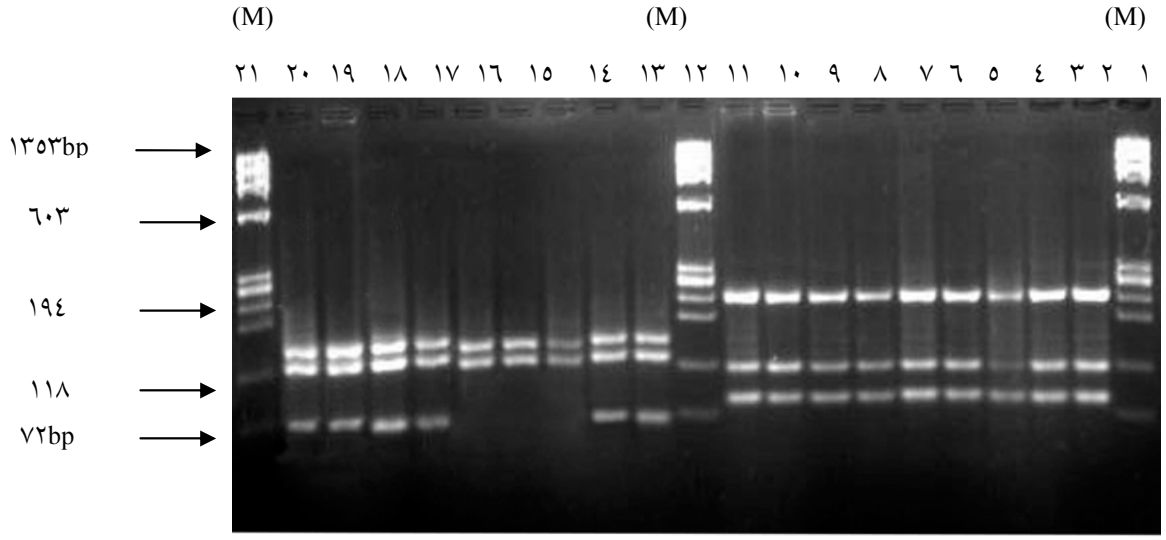
و بافـــر مخصوص آنزیم اضافه شد (۸). بعـد از اتمـام زمـان فـوق بـه هـر لولـه ۱۰µl از EDTA بـا غلظـت ۰/۵M به عنوان متوقف کنندهٔ فعالیت دو آنزیم اضافه شد. نمونه‌های هضم شده در کنـار مـارکر ϕX 174 در ژل آگاروز ۲درصد حـاوی اتیـدیوم بروماید بـا ولتاژ ۱۰۰ ولت الکتروفورز شدند. ژل آگاروز تهیـه شـــده در ایـــن مرحلـــه وارد ژل داکومنتیـــشن (Vilber Lormant، آلمـــان) مـــی‌شـــد و از آن عکسبرداری می گردید.

یافته ها:

۱۵۰ ســویه کلینیکــی مــایکو بــاکتریوم تــوبر کلوزیس بر اساس کند رشد بودن، اسید فست بـودن و مثبت بودن تست های بیوشیمیایی چون نیاسین، نیترات و کاتالاز در دمای اتاق و همچنین منفی بـودن کاتـالاز در دمای ۶۸ͦC جدا سازی و تعیین هویت شـدند (۱) تمـامی این سویه ها در الکتروفورز اولیـه بعـد از انجـام واکـنش PCR دارای میـزان کـافی از تـوالی هـدف تکثیـر شـده بودند. در هضم آنزیمی ۱۴۵ سویه کلینیکی جدا شده بـا ۳ ســویه اســتاندارد مــورد اســتفاده ، دارای الگوهــای یکسان، مشخص و کاملاً شبیه به همدیگر بودند از ژنـوم باکتری BCG برای کنترل نمودن پرایمرهای اختـصاصی جنس استفاده گردید (تصویر شماره ۱). این سویه‌هـا در هضم آنزیم *Bst*EII در کنار مارکر دارای سه بانـد قـوی بـا انـدازه هـای ۲۵۰/۱۲۰/۸۲bp بودنـد. همچنـین همـهٔ سویه‌های فوق در هضم آنزیمی *Hae*III دارای سـه بانـد به طول‌های ۱۶۵/۱۴۰/۷۲bp بودند. حضور بانـدهایی بـا طــول کمتــر از ۶۰bp بــه عنــوان پرایمــر دایمــر



تصویر شماره ۱: الگوهای یکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلئازی محـصول PCR **تـوالی** ۴۳۹bp **از ژن** ***hsp***65 **مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم‌های** ***Hae***III **و** ***Bst***EII **به روی ژل آگـاروز ۲ درصـد.** *شـماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکر است (۷۲bp-۱۳۵۳). شماره‌های ۱۰-۲ توسط آنزیم* *Bst*EII *هضم شده‌اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه* H37Rv*، شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سـویه* BKH37*، شـماره ٤ مایکوبـاکتریوم بـوویس* (BCG) *و شـماره‌هـای ۱۰-۵ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. همچنین شماره‌های ۲۰-۱۲ توسـط آنـزیم* ***Hae***III *هـضم شـده‌انـد کـه شـماره ۱۲ مایکوبـاکتریوم توبرکلوزیس سویه* H37Rv*، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه* ***BKH37****، شماره ١٤ مایکوبـاکتریوم بـوویس* ***(BCG)*** *و شماره‌های ۲۰-۱۵ سویه‌های کلینیکی می‌باشند.*

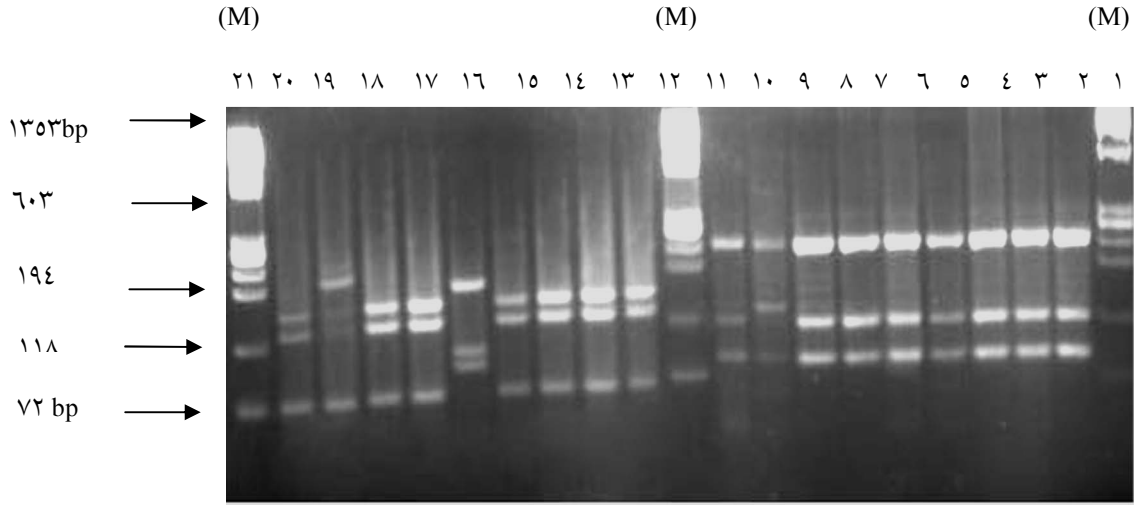


تصویر شماره ۲: الگوهای غیریکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلئازی محصول PCR ٤۳۹bp از ژن *hsp*65 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم‌های *Hae*III و *Bst*EII به روی ژل آگاروز ۲ درصد. *شماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکر است (۷۲bp-۱۳۵۳). شماره‌های ۱۰-۲ توسط آنزیم *Bst*EII هضم شده‌اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37RV شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۱۰-٤ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. همچنین شماره‌های ۲۰-۱۲ توسط آنزیم *Hae*III هضم شده‌اند که شماره ۱۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۲۰-۱٤ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. سویه‌های ۱٤، ۱۵، ۱٦ سویه‌های کلینیکی می‌باشند که فاقد توالی ۷۰bp در هضم *Hae*III خود می‌باشند. این سه سویه (به ترتیب شماره‌های ٤، ۵، ٦) در هضم *Bst*EII خود دارای الگوی یکسان با بقیه سویه‌ها می‌باشند.*

(Primer dimmer) در نظر گرفته شد. ۵ سویه کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس جدا شده، در الگوهای بدست آمده از هضم *Hae*III خود دارای تفاوت‌های الگویی با بقیه بودند. سه سویه فاقد فراگمنت ۷۰bp (تصویر شماره۲) و یک سویه جدا شده دارای سه فراگمنت به طول‌های ۱۸۰/۱۰۰/۸۰ و یک سویه دارای دو فراگمنت به طول‌های ۱۹۴/۷۲ بودند (تصویرشماره ۳). ۵ سویه کلینیکی فوق مجدداً توسط کیت PCR تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مورد تأیید قرار گرفتند.

بحث:

روش PCR-RFLP بر اساس توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp*65 مایکوباکتریومی یکی از تکنیک‌های مناسب در تایپینگ سریع انواع مایکوباکتریوم‌ها تا سطح گونه در آزمایشگاه های رفرانس مایکوباکتریولوژی است (۱۳-۸،۱۰). با این حال در تعدادی از گونه‌های مایکوباکتریومی توسط این تکنیک بیش از یک الگوی خاص مشاهده شده است (۱۳-۸،۱۰). با مشخص شدن ساب تایپ هایی در تعدادی از گونه های غیر توبرکلوزی مانند اسکروفولاسئوم (۶)، گوردونه، چلونه ای و کانزاسی (۱) محققان، استفاده از این تکنیک را برای دنبال کردن اپیدمیولوژی مولکولی این گونه ها توصیه نموده اند. با توجه به مطالعات انجام شده پلی‌مورفیسم مشخصی در الگوهای حاصل از هضم آنزیمی محصول PCR این ژن در کمپلکس



تصویر شماره ۳: الگوهای غیریکسان بدست آمده، حاصل از هضم اندونوکلئازی محصول ٤۳۹bp PCR از ژن *hsp*65 مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با آنزیم‌های *Hae*III و *Bst*EII به روی ژل آگاروز ۲ درصد. *شماره ۱، ۱۱، ۲۱ (M) مربوط به مارکر است (۷۲bp-۱۳۵۳). شماره‌های ۱۰-۲ توسط آنزیم *Bst*EII هضم شده‌اند که شماره ۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۱۰-٤ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. همچنین شماره‌های ۲۰ ۱۲ توسط آنزیم *Hae*III هضم شده‌اند که شماره ۱۲ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه H37Rv، شماره ۱۳ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس سویه BKH37 و شماره‌های ۲۰-۱٤ سویه‌های کلینیکی می‌باشند. سویه‌های ۱٦، ۱۹ سویه‌های کلینیکی می‌باشند که در هضم *Hae*III خود دارای الگوی متفاوت می‌باشند. این دو سویه (به ترتیب شماره‌های ٦، ۹) در هضم *Bst*EII خود دارای الگوی یکسان با بقیه سویه‌ها می‌باشند.*

مایکوباکتریوم توبرکلوزیس شناسایی نشده است (۱۳-۸،۱۰). الگوی باندهای ایجاد شده پس از هضم آنزیمی در ۱۴۵ سویه کلینیکی ثابت بود و با یافته‌های Telenti و همکاران وی مطابقت داشت. Taylor و همکاران در سال ۱۹۹۷ استفاده از تکنیک فوق را برای استفاده روتین تشخیص مایکوباکتریوم‌های رشد کرده در محیط مایع توصیه نمودند. در این مطالعه اشاره شده است که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای الگوی ثابت هضم آنزیمی است (۱۴). نتایج مطالعهٔ وی با نتایج مطالعهٔ حاضر در ۱۴۵ سویه کلینیکی مطابقت دارد ولی در این مطالعه ۳ الگوی متفاوت و غیرقابل انطباق با هم در هضم محصول PCR با آنزیم *Hae*III مشاهده گردید. همچنین در مطالعات انجام شده توسط DaRocha و همکاران وی (۱۱) و همچنین Hafner و همکارانش (۱۳) اشاره شده است که مایکوباکتریوم توبرکلوزیس دارای الگوی ثابت و مشخص است ولی در موارد نادر در سویه‌های کلینیکی ممکن است مواردی از پلی‌مورفیسم (۳ پلی‌مورفیسم متفاوت در این مطالعه) مشاهده گردد. نتایج دو مطالعه فوق نیز با نتایج بدست آمده در ۱۴۵ سویه کلینیکی از تعداد ۱۵۰ سویه منطبق می‌باشد.

سه سویه دارای الگوی هضمی مشابه با هم بودند (هر سه فاقد باند ۷۰ bp در هضم *Hae*III) که از زندان جدا شده بودند. وجود تطابق الگو هضمی حاکی از منشاء مشترک بیمارانی بود که این سه سویه از آنها جدا سازی شدند. وجود ۳ الگوی متفاوت بدست آمده از هضم آنزیمی *Hae*III از طریق وجود موتاسیون‌های نقطه‌ای در توالی هدف این آنزیم

توجیه‌پذیر است (۱۶،۱۵). این یافته‌ها ثابت می‌کند که ممکن است در توالی این ژن در گونه مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در سویه‌های کلینیکی در موارد نادری تفاوت‌هایی موجود باشد. در مطالعه تکمیلی دیگر که باید از سویه های کلینیکی تمام نقاط کشور استفاده شود نتیجه این مطالعه می تواند کمک کننده باشد همچنین پیشنهاد می شود که علاوه بر بررسی تکمیلی سویه های کلینیکی مایکو باکتریوم توبر کلوزیس تمام نقاط کشور این روش در مورد گونه های غیر توبرکلوزی نیز بررسی گردد. تکنیک PCR-RFLP بر اساس توالی ژن *hsp*65 قادر نیست که سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم توبرکلوزیس را از هم افتراق دهد و لذا نمی‌تواند کاربردی در تایپینگ سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس مانند روش‌هایی چون استفاده از PCR-RFLP بر اساس توالی IS 6110 و یا Spoligo typing داشته باشد. اگرچه تایپینگ بر اساس IS 6110 به عنوان Gold standard پذیرفته شده است (۱) ولی در سویه‌هایی که دارای تعدادکپی پائین از توالی IS 6110 اند یا فاقد این توالی‌اند Spoligo typing بسیار کمک‌کننده است (۱۷). همچنین بر طبق منابع موجود استفاده از Sequencing توالی ۴۳۹bp از ژن *hsp*65 بسیار قابل اعتماد در افتراق گونه‌های مایکوباکتریومی از همدیگر است و به راحتی می‌تواند پلی‌مورفیسم‌های درون گونه‌ای را نیز شناسایی کند (۱).

نتیجه گیری :

به طور کلی نتایج این مطالعه حاکی از ثابت و یکسان بودن الگوهای بدست آمده از هضم محصول PCR ژن *hsp*65 ۱۰۰ درصد با آنزیم *Bste*II و ۹۷ درصد با آنزیم *Hae*III در سویه‌های کلینیکی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس داشت. نتایج فوق نشان داد که اگرچه تکنیک PCR-RFLP بر اساس ژن *hsp*65 در تایپینگ سویه های مایکوباکتریوم توبر کلوزیس ارزش چندانی ندارد ولی در موارد نادری، در سویه های کلینیکی ممکن است پلی مورفیسم هایی (۵ سویه با سه الگوی متفاوت) نیز مشاهده گردند که چنانچه در مقیاس بسیار وسیع تر این تکنیک بکار رود ممکن است همچون تعدادی از مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزی الگوهای خاص اپیدمیولوژیک بدست آید (۸،۱۱) با این وجود تکنیک PCR-RFLP بر اساس ژن *hsp*65 می‌تواند به عنوان یک تکنیک معمول و قابل انجام در تمام آزمایشگاه های رفرانس کشور و یا حداقل در تعدادی از این آزمایشگاه ها برای تعیین هویت سریع تعداد زیادی نمونه مایکوباکتریومی جدا شده از لحاظ مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، به کار رود. لذا توصیه می‌شود که در آزمایشگاه های رفرانس برای تأیید سویه‌ها در مقیاس زیاد از این روش استفاده گردد.

تشکر و قدردانی :

با تشکر و قدردانی از تمامی اعضاء هیئت علمی گروه میکروبیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه جندی شاپور اهواز و تشکر خاص از جناب آقای دکتر ضیغمی، آقای دکتر منفرد و آقای دکتر فرخ نیا و همچنین تشکر از کارشناسان محترم مرکز رفرانس سل و جذام اهواز آقای فریدون کمایی و خانم ها منیژه اسکندری و حمیرا عسکری که در این طرح نهایت همکاری را با ما لحاظ نمودند.

References:

1.Murray PR, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. Manual of clinical microbiology. 8th ed. Washington D.C: ASM Press. 2003; p: 532-60.

2.Butler WR, Jost KC, Kilburn JO. Identification of mycobacteria by high performance liquid chromatography. J Clin Microbiol. 1991; 29: 2468-72.

3.Musial C, Tice L, Stockman L, Robert G. Identification of mycobacteria from culture by using the Gen-Prob, rapid diagnostic system for *mycobacterium avium* complex and *mycobacterium tuberculosis* complex. J Clin Microbiol. 1988; 26: 2120-3.

4.Soini H, Bottger CE, Viljanen MK. Identification of mycobacteria by PCR based sequence determination of the 32-Kilodalton protein gene. J Clin Microbiol. 1994; 32: 2944-7.

5.Takewaki SI, Okuzumi K, Manabe I, Tanimura M, Miyamuraik T. Nucleotide sequence comparison of the *mycobacterial dnaj* gene and PCR-restriction length polymorphism analysis for identification of *mycobacterial species*. Int J Syst Bacteriol. 1994; 44: 159-66.

6.Zolg JW, Philippi-Schulz S. The superoxide dismutase gene, a target for detection and identification of *mycobacteria by PCR.* J Clin Microbiol. 1994; 32: 2801-12.

7.Kim BJ, Lee SH, Lyu MA, Kim SJ, Bai GH, Chae GT, et al. Identification of *mycobacterial species* by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (rpoB). J Clin Microbiol. 1999; 37: 1714-20.

8.Telenti A, Marches F, Balz M, Bally F, Bottger E, Bodmer T. Rapid identification of *mycobacteria to species* level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J Clin Microbiol. 1993; 31(2): 175-8.

9.Shinnick TM. The 65-Kilodalton antigen of *mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 1987; 169(3): 1080-8.

10.Khosravi AD, Stanford JL, Donoghue HD, Rook GA. Variation within *mycobacterim scrofulaceum*. J Appl Microbiol. 1997; 83: 596-602.

11.Da Rocha AS, Werneck Barreto AM, Compos CED, da Silva MVB, Fonseca L, Suffys PN. Novell allelic variants of *mycobacteria isolated* in Brazil as determined by PCR-restriction enzyme analysis of *hsp*65. J Clin Microbiol. 2002; 40(11): 4169-91.

12.Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E, Bonora S, Tortoli E, Fontana R. Identification of 54 *mycobacterial species* by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol. 2002; 39(8): 2799-806.

13.Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Diffrente molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new *hsp*65 restriction fragment length polymorphism patterns. Mol Cell Probes. 2004; 18: 59-65.

14.Taylor.TB, Patterson.C, Hale.Y, Safranek.WW,. Routine use of PCR-restriction length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997; 35: 79-85.

15.Mizrahi V, Andersen SJ,. DNA repair in *mycobacterium tuberculosis*: what have we learnt from the genome sequence? Mol Microbiol. 2004; 29(6): 1331-9.

16.Sreevatsan S, Pan X, Stockbaure KE, Connell ND, Kerswirth BN, Wittam TS, etal,. Restricted structural gene polymorphism in *the mycobacterium tuberclulosis* Complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci. 2004; 94: 9869-74.

17.Goyal M, Saunders AN, Van Embden AD, Shaw JR. Differentiation of mycobacterium tuberculosis isolated by spoligotyping and IS 6110 restriction fragment length polymorphism. J Clin Microbiol. 1997; 35(3): 647-51.