Original Article

مجله دنیای میکروب ها
سال سوم، شماره دوم (پیاپی ۷)، تابستان ۱۳۸۹
صفحات۱۱۵- ۱۰۹

مقایسه روش PCR-RFLP با روش‌های بیوشیمیایی در تشخیص عوامل سل ریوی انسانی

بهنام رفیعی[۱]، دکتر علی اصغر فرازی[۲]، داود صادقی[۳]، سپیده غنی[۴]، دکتر راضیه نظری[۵]، دکتر روح اله کشاورز[۶]
دکتر کیوان تدین[۶]، دکتر نادر مصوری*[۶]

[۱]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، [۲]استادیار، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه بیماری‌های عفونی و گرمسیری
[۳]کارشناس ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه زیست شناسی، [۴]کارشناس ارشد، باشگاه پژوهشگران جوان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک
[۵]استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد قم، گروه میکروبیولوژی، [۶]استادیار، موسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالئین

چکیده

سابقه و هدف: بیماری سل هنوز هم یکی از مهم‌ترین عوامل مرگ و میر در بسیاری از کشورها است. کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس از مجموعه‌ای از باکتری‌ها با شباهت ژنتیکی زیاد تشکیل شده است که با توجه به طولانی بودن زمان کشت تعیین هویت آن‌ها بسیار مشکل است. هدف از این پژوهش، ارزیابی روش PCR-RFLP برای افتراق مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس و مایکوباکتریوم بویس و مقایسه نتایج آن با آزمون‌های بیوشیمیایی است.

مواد و روش‌ها: ۶۸ نمونه خلط از بیماران سل ریوی با اسمیر مثبت از مراکز بهداشتی و درمانی استان مرکزی جمع‌آوری و در محیط کشت‌های اختصاصی کشت شد. همچنین ۱۰ جدایه مایکوباکتریوم بویس مربوط به مناطق مختلف ایران و ۶ سویه استاندارد مایکوباکتریوم برای مقایسه استفاده گردید. پس از انجام تست‌های بیوشیمیایی، آزمون PCR براساس ژن کاذب *oxyR* انجام گرفت. سپس الگوی برش محصول تکثیر یافته با استفاده از آنزیم *AluI* مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: در همه جدایه‌های انسانی مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس یک قطعه و در جدایه‌های گاوی ۳ قطعه پس از برش توسط آنزیم مشاهده شد. از نمونه‌های مورد پژوهش تنها در یک مورد مایکوباکتریوم بویس تشخیص داده شد. همچنین نتایج حاصل از آزمون PCR-RFLP با نتایج حاصل از تست‌های بیوشیمیایی هماهنگی ۱۰۰٪ داشت.

نتیجه‌گیری: روش PCR-RFLP روشی سریع و دقیق به منظور افتراق مایکوباکتریوم بویس از سایر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس می‌باشد و می‌تواند در تشخیص اولیه و درمان مورد استفاده قرار گرفت.

واژگان کلیدی: کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس، PCR-RFLP، ژن کاذب *oxyR*

دریافت مقاله: بهمن ۸۸ پذیرش برای چاپ: اردیبهشت ۸۹

مقدمه

میزان گسترش بیماری سل پس از چندین دهه کاهش، هم زمان با شیوع ایدز در جهان افزایش یافته است. سازمان بهداشت جهانی تخمین زده است که اگر کنترل شیوع این بیماری در جهان بیشتر نگردد در فاصله سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۲۰ نزدیک به یک میلیارد نفر از مردم جهان آلودگی جدید به آن پیدا می‌کنند. از این تعداد تخمین

*آدرس برای مکاتبه: کرج، حصارک، موسسه تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، بخش تولید و تحقیق توبرکولین و مالئین.
تلفن: ۰۹۱۲۲۶۱۱۴۳۸ پست الکترونیک: nmosavari@yahoo.com

زده می‌شود که ۲۰۰ میلیون نفر بیمار و ۳۵ میلیون نفر مرگ به دنبال داشته باشد (۱). یکی از مشکلات بیماری سل، سرعت تشخیص این بیماری است. برای تشخیص عامل بیماری روش رنگ آمیزی زیل نلسون از دقت و حساسیت پایینی برخوردار (بین ۲۰ تا ۷۰ درصد) است. همچنین کشت خلط نیز مستلزم گذشت زمان طولانی ۲ تا ۴ ماه می‌باشد (۴-۲). در حال حاضر مهم‌ترین راه تشخیص این باکتری، کشت و برای تعیین هویت این باکتری استفاده از آزمون‌های بیوشیمیایی مختلف مانند تجمع نیاسین و احیای نیترات می‌باشد. برای تشخیص روش‌های دیگری مانند ایمنوفلورسانس و الایزا، رادیوایمنواسی، تست تثبیت کمپلمان و تست هماگلوتینین نیز وجود دارد. اما حساسیت روش‌های یاد شده بین ۱۶ تا ۸۸ درصد و ویژگی آن‌ها بین ۶۲ تا ۱۰۰ درصد گزارش شده است (۸-۵). در سال‌های اخیر روش‌های جدیدتری مانند انگشت نگاری DNA برای تعیین گونه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس مطرح شده است. اما روش‌هایی مانند IS6110-RFLP که برای اهداف اپیدمیولوژیکی مناسب می‌باشند، به دلیل هزینه زیادشان مورد استقبال قرار نگرفته‌اند (۹ و ۱۰). یکی از روش‌های پرکاربرد مولکولی برای تشخیص سریع گونه‌های مایکوباکتریوم، روش PCR-RFLP است که درآن تکنیک‌های PCR (Polymerase Chain Reaction) و RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) همراه با هم استفاده می‌شوند. در این روش قطعه خاصی از DNA پس از تکثیر با استفاده از روش PCR توسط آنزیم‌های محدود کننده برش خورده و قطعات DNA حاصل برروی ژل آگارز از طریق چشمی آنالیز می‌گردند (۱۱). ژن کاذب *oxyR* یک ژن کاذب با اندازه ۵۴۸ جفت باز است که در تمامی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس‌ها مشترک می‌باشد (۱۲). هدف از این پژوهش، ارزیابی روش مولکولی PCR-RFLP براساس ژن کاذب *oxyR* و به‌منظور افتراق جدایه‌های مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس انسانی و جدایه‌های مایکوباکتریوم بویس و مقایسه آن با سویه‌های استاندارد انسانی C، DT، PN و H37RV و سویه‌های گاوی BCG و AN5 و همچنین مقایسه روش مولکولی با آزمون‌های بیوشیمیایی بود.

مواد و روش‌ها

الف) نمونه گیری، جداسازی، کشت و تعیین هویت جدایه‌ها: ۶۸ نمونه خلط از بیماران اسمیر مثبت از مراکز بهداشتی و درمانی استان مرکزی جمع‌آوری شد. نمونه‌ها پس از آلودگی‌زدایی و فرآوری با روش N- استیل - L- سیستئین روی محیط لونشتاین جانسون گلیسیرین دار و پیروات دار (شرکت مرک، آلمان) کشت داده شدند (۱۳). ۱۰ جدایه مایکوباکتریوم بویس از بخش رفرانس سل گاوی کشور واقع در مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج (جدا شده از غدد لنفاوی گاوی) نیز مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین از سویه‌های استاندارد سل انسانی (ATCC 35808) :C، (ATCC 35810) DT، (ATCC 25618) :H37RV و (ATCC 35809) PN و سویه‌های استاندارد سل گاوی (ATCC 35726) :AN5 و (ATCC 1173p2) :BCG برای مقایسه استفاده گردید.

پس از گذشت زمان گرم‌خانه گذاری (۸-۶ هفته)، شناسایی اولیه با رنگ آمیزی زیل نلسون انجام گرفت و تمام باکتری‌های رشد یافته از چهار گروه، مقاوم به اسید بودند. سپس آزمون‌های بیوشیمیایی مانند تجمع نیاسین، احیای نیترات، فعالیت کاتالازی در دماهای ۲۲ و ۶۸ درجه سانتی‌گراد و بررسی اثر تیوفن ۲ - کربوکسیلیک هیدرازید اسید (TCH) انجام گرفت (۱۴)

ب) واکنش زنجیره ای پلی مراز: DNA ژنومی مایکوباکتریوم‌ها با روش استاندارد مورد تأیید سازمان بهداشت جهانی soolingen Van، با استفاده از ایزوآمیل الکل کلروفرم و CTAB استخراج شد (۱۵). برای تکثیر ژن کاذب *oxyR*، از پرایمرهای طراحی شده 5'-GGTGATATCAACACATA-3' و 3'-CTATGCGATCAGGCGTACTTG-5' استفاده شد. مخلوط واکنش در هر میکروتیوب شامل: ۴/۵میکرولیتر بافر PCR(10X) حاوی $MgCl_2$ و KCl، ۰/۵ میکرولیتر مخلوط dNTPs، ۱میکرولیتر از پرایمرهای پیشرو و معکوس با غلظت ۱۵pmol/µl و ۱/۲۵U آنزیم DNA پلی مراز *Taq* (شرکت سیناژن، ایران)، ۳ میکرولیتر DNA (۱۰۰ng/µl) و ۱۵ میکرولیتر آب مقطر استریل در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر بود. سپس واکنش PCR در شرایط واسرشت شدن ابتدایی در دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت یک دقیقه و سپس تکثیر در ۳۰ دور (واسرشت شدن

جدول۱: نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی برای افتراق مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس و مایکوباکتریوم بویس.

گونه	تولید نیاسین	کاتالاز ۲۲°C	کاتالاز ۶۸°C	احیای نیترات	کشت درمحیط واجد TCH
مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس	+	+	-	+	+
مایکوباکتریوم بویس	-	-	-	-	-

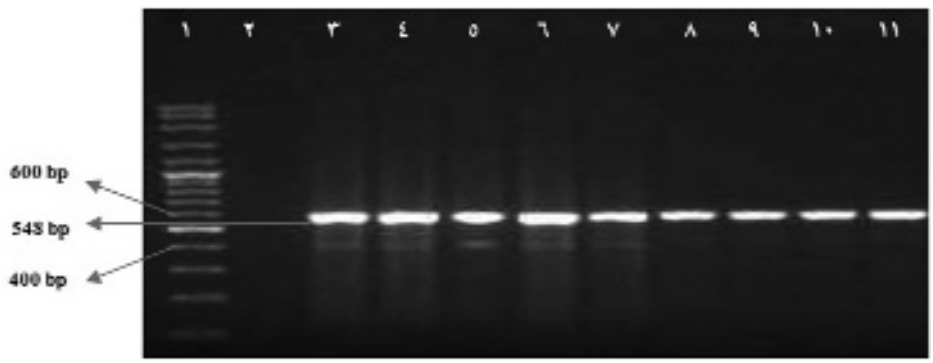
در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ ثانیه، اتصال پرایمرها در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۱ ثانیه و تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۲ ثانیه) و تکثیر نهایی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. سپس محصول PCR، بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ در کنار نشانگر ۱۰۰bp (شرکت Roche، آلمان) الکتروفورز و سپس ژل در اتیدیوم بروماید ۰/۰۳ درصد رنگ آمیزی و توسط دستگاه ژل داک (شرکت Biorad، آمریکا) تصویر برداری شد.

ج) واکنش *PCR-RFLP*: پس از مشاهده باندهای ۵۴۸ جفت بازی مورد نظر به عنوان محصول PCR، از آنزیم برش‌دهنده *AluI* (شرکت Roche، آلمان) برای هضم محصول PCR استفاده گردید (۱۲). به منظور هضم آنزیمی، ۱ µl محصول PCR همراه با ۰/۶ µl از آنزیم *AluI*(۱۰U /µl) و ۵ µl بافر آنزیم ۱۰X و ۳۴/۴ µl آب مقطر استریل در حجم نهایی ۵۰µl به مدت ۱ ساعت در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد.

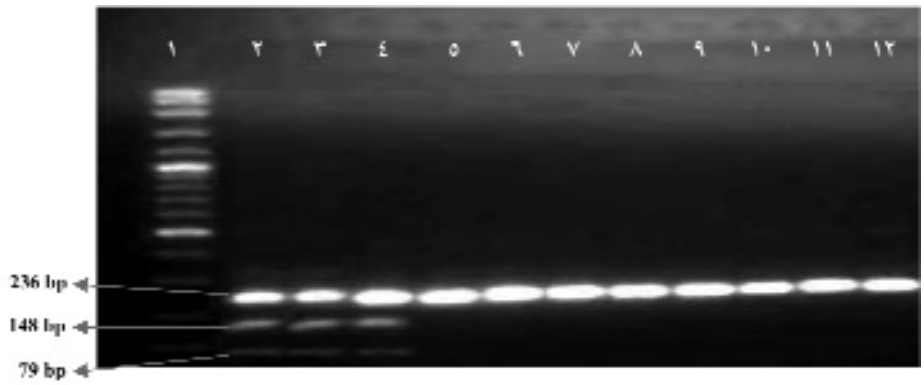
یافته‌ها

الف) نتایج تست‌های بیوشیمیایی: بر اساس آزمون‌های بیوشیمیایی، ۶۷ نمونه از ۶۸ نمونه جداشده از بیماران سل ریوی، مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس شناسایی شدند. یک نمونه جدا شده به عنوان مایکوباکتریوم بویس شناسایی گردید که نتایج آزمون‌های بیوشیمیایی آن مشابه۱۰ جدایه گاوی مایکوباکتریوم بویس مورد پژوهش بود (جدول ۱).

ب) نتایج آزمون *PCR-RFLP*: با استفاده از آزمون PCR مشخص شد که تمامی سویه‌های استاندارد، ژن کاذب *oxyR* به اندازه ۵۴۸ جفت باز را دارند (شکل ۱). در مایکوباکتریوم بویس به دلیل داشتن ۴ جایگاه برشی، پس از هضم آنزیمی با *AluI*، ۵ قطعه ۲۳۶، ۱۴۸، ۷۹، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی مورد انتظار می‌باشد. اما به دلیل اندازه کوچک قطعات ۵۵ و ۳۰ جفت بازی، تنها الگوی ۳ باندی ۲۳۶، ۱۴۸ و ۷۹ جفت بازی قابل مشاهده بود (شکل ۲). در سایر کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس‌ها قطعات ۲۳۶، ۲۷۷، ۵۵ و ۳۰ جفت بازی به دلیل وجود ۳ جایگاه برش قابل انتظار است. اما به دلیل اندازه کوچک قطعات ۵۵ و ۳۰ جفت بازی و نزدیکی قطعات ۲۳۶ و ۲۲۷ جفت بازی، تنها یک الگوی ۲۳۰ جفت بازی قابل رؤیت بود. مقایسه نتایج حاصل از روش PCR-RFLP با آزمون‌های بیوشیمیایی هماهنگی ۱۰۰٪ آزمون‌های یاد شده را نشان داد. همچنین نتایج نشان داد که عامل اصلی سل ریوی در استان مرکزی مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس می‌باشد.



شکل ۱: تکثیر ژن کاذب *oxyR*. ستون ۱) سایز مارکر، ۲) کنترل منفی، ۳) سویه استاندارد BCG، ۷-۴) به ترتیب سویه های استاندارد انسانی H37RV، DT، C و PN و ۱۱-۸) جدایه های مایکوباکتریوم توبرکیلوسیس انسانی استان مرکزی.



شکل ۲: PCR-RFLP بر مبنای ژن کاذب *oxyR*. ستون ۱) سایز مارکر، ۲) سویه استاندارد BCG، ۳) جدایه گاوی مایکوباکتریوم بویس (آرشیو موسسه رازی)، ۴) جدایه انسانی مایکوباکتریوم بویس، ۷-۵) به ترتیب سویه های استاندارد انسانی H37RV، DT و C، ۱۲-۸) جدایه های مایکوباکتریوم توبرکلوسیس انسانی (استان مرکزی).

بحث

محققان توانسته‌اند با بررسی ژنوم کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوسیس مناطقی را بیابند که بیشتر دچار جهش می‌شوند. این مناطق به طور عمده مربوط به نواحی ژن های کاذب می باشند. زیرا ژن‌های کاذب نسبت به ژن‌های عمل کردی بیشتر دچار تغییر می‌شوند، از جمله این مناطق می‌توان به منطقه ۵۴۸ جفت بازی *oxyR* اشاره نمود، نوکلئوتید ۲۸۵ از قطعه مذکور در ژنوم مایکوباکتریوم بویس حاوی باز آدنین می‌باشد این در حالی است که در ژنوم سایر کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوسیس‌ها این نوکلئوتید حاوی باز گوانین است که باعث از بین رفتن یک جایگاه عمل کرد آنزیم *AluI* طی آزمون PCR-RFLP می‌شود، بنابراین قطعه *oxyR* در مایکوباکتریوم بویس واجد ۴ سایت برشی و در سایر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوسیس واجد ۳ سایت برشی برای آنزیم محدودکننده *AluI* می‌باشد، به طوری که در مطالعه مشابهی که توسط سریواتسان (Sreevatsan) و همکاران بر اساس این روش انجام گرفته است، پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی در ژن کاذب *oxyR* را برای افتراق ۱۰۵ جدایه کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوسیس مورد بررسی قرار دادند که مشخص شد ۷۶ جدایه مایکوباکتریوم توبرکلوسیس و ۲۹ جدایه مایکوباکتریوم بویس بودند و بین این یافته‌ها و نتایج حاصل از آزمایش‌های بیوشیمیایی هماهنگی ۱۰۰٪ وجود داشت. نتایج پژوهش یاد شده با نتایج پژوهش حاضر کاملا هم‌خوانی داشت (۱۲). به‌طورکلی روش‌های مولکولی متعددی برای تشخیص دقیق گونه‌های مختلف مایکوباکتریوم پیشنهاد شده است که از این میان روش PCR-RFLP از مزیت‌هایی چون سریع و آسان بودن برخوردار می‌باشد (۱۶ و ۱۷). مناطق دیگری نیز وجود دارند که پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی دارند و باعث ایجاد تمایز بین مایکوباکتریوم بویس و مایکوباکتریوم توبرکلوسیس می‌شوند. در مطالعه استرمن (Sterman) و همکاران، تغییرات تک بازی توالی *nar*GHJI که کد کننده فعالیت احیای نیترات در مایکوباکتریوم توبرکلوسیس است، مورد بررسی قرار گرفت (۱۸). وارن (Warren) و همکاران در سال ۲۰۰۶ روش PCR چندگانه با استفاده از ۴ دسته پرایمر ۳ تایی بر پایه حضور یا عدم حضور توالی‌های RD1، RD4، RD9 و RD12 برای شناسایی و تفکیک اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوسیس طراحی کردند (۱۹). در مطالعه‌ای در ایران پلی‌مورفیسم تک نوکلئوتیدی در مورد ژن بتا ۱ رسپتور اینترلوکین ۱۲ با استفاده از آزمون PCR-RFLP به منظور شناسایی ارتباط میان پلی مورفیسم این ژن و بیماری سل ریوی صورت پذیرفت و نتایج الگوهای PCR-RFLP از گروه هدف بیمار و گروه شاهد سالم کاملا یکسان بود و مشخص شد هیچگونه ارتباطی میان پلی‌مورفیسم ژن بتا ۱ رسپتور اینترلوکین ۱۲ و سل ریوی وجود ندارد (۲۰). با توجه به این که در این مطالعه از یک بیمار سل ریوی، مایکوباکتریوم بویس جداسازی و شناسایی گردید. این موضوع می‌تواند با شرایط بهداشتی محیط زندگی بیمار و ارتباط مستقیم با دام‌های آلوده و نیز تغذیه از محصولات لبنی مربوط به گاو آلوده به مایکوباکتریوم بویس ارتباط داشته باشد. سل گاوی

معمولاً در انسان به شکل تک‌گیر (فعال شدن عفونت قدیمی در افراد سالمند یا مهاجرین مناطق ریشه‌کن نشده سل گاوی) درکم‌تر از ۱٪ از کل موارد سل مشاهده می‌شود. تعیین میزان شیوع و بروز عفونت‌های انسانی ناشی از مایکوباکتریوم بویس بسیار اهمیت دارد و به عنوان یک شاخص بهداشتی مهم در جوامع انسانی مطرح می‌باشد (۲۱ و ۲۲). عفونت در انسان بیشتر از طریق مصرف فرآورده‌های غذایی حاوی این باکتری ایجاد می‌شود، علت موازی نبودن میزان شیوع این باکتری درگاوها و انسان را به حساسیت پایین انسان به این عفونت مرتبط دانسته‌اند (۲۳). این در حالی است که ایزابل (Esabel) و همکاران در سال ۲۰۰۸ در مطالعه‌ای که در ۱۰ کشور آمریکای لاتین در مورد سل گاوی در انسان انجام دادند نشان دادند که در یکی از شهرهای آرژانتین از ۲۱۷۵ مورد سل گزارش شده در سال ۱۹۷۱، در ۳۸ مورد آلودگی به مایکوباکتریوم بویس وجود دارد. اما در همین شهر پس از برنامه کنترل سل در سال‌های ۲۰۰۰ تا ۲۰۰۶ تنها ۱۲ مورد مایکوباکتریوم بویس شناسایی شد. به طور کلی با توجه به این که یکی از دلایل اصلی مرگ و میر ناشی از سل ریوی درکشورهای درحال توسعه، ضعف و تاخیر در تشخیص قطعی است، بنابراین تشخیص به موقع این بیماری اهمیت بسیار زیادی دارد (۲۴ و ۲۵).

نتیجه گیری

بررسی‌های مولکولی براساس روش PCR-RFLP به خوبی می‌تواند گونه‌های مایکوباکتریوم را از هم تمایز دهد. همچنین با توجه به احتمال جداسازی مایکوباکتریوم بویس از انسان، آزمون PCR-RFLP برمبنای ژن کاذب *oxyR* می‌تواند در تشخیص سریع و فرآیند درمان بسیار سودمند باشد. اما برای کاربردی شدن این روش در آزمایشگاه‌های بالینی در کشور نیاز به پژوهش‌های گسترده تری وجود دارد.

تشکر و قدر دانی

نویسندگان این مقاله از بخش تحقیق و تولید توبرکولین و مالئین مؤسسه واکسن و سرم سازی رازی کرج و پرسنل محترم درمانگاه سل مرکز بهداشت استان مرکزی به دلیل همکاری صمیمانه کمال امتنان را دارند.

References

1. Sohn KY, Shrestha S, Khagi A, Malla SS, Pokharel BM, Khanal MP, Rijal B, Bajracharya P. Polymerase chain reaction detection of *Mycobacterium tuberculosis* from sputum. J Nepal Med Assoc. 2003; 42: 65-70.
2. Shinnick TM, and Good RC. Mycobacterial taxonomy. Europ J Clin Microbiol Infect Dis. 1994; 13(11): 884-901.
3. Salian NV, Rish JA, Eisenach KD, Cave MD, Bates JH. Polymerase chain reaction to detect *Mycobacterium tuberculosis* inhistologic specimens. Am J Respir Crit Care Med. 1998; 158(4): 1150-1156.
4. Palomino JC. Nonconventional and new methods in the diagnosis of tuberculosis: Feasibility and applicability in the field. Eur Respir J. 2005; 26(2): 339-350.
5. Collins DM, Erasmuson SK, Stephens DM, Yates GF, De Lisle GW. DNA fingerprinting of *Mycobacterium bovis* strains by restriction fragment analysis and hybridization with insertion elements IS1081 and IS6110. J Clin Microbiol. 1993; 31 (5):1143-1147.
6. Pavlik I, Yayo Ayelle W, Havelkova M, Svejnochova M, Katalinik-Jankovic V, Zolnir-Dovc M. *Mycobacterium bovis* in human population in four Central European countries during 1990-1999. *Vet Med - Czech.* 2003; 48(4): 90-98.
7. Cruciani M, Mengoli C. An overview of meta-analyses of diagnostic tests in infectious diseases. Infect Dis Clin North Am. 2009; 23(2): 225-267.
8. Ben-selma W, Harizi H, Marzouk M, Ben Kahla I, Ben Lazreg F, Ferjeni A, Boukadida J. Evaluation of the diagnostic value of measuring IgG, IgM and IgA antibodies to mycobacterial A60 antigen in active tuberculosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2010; 68(1): 55-59.

9. Heifets LB, and Good RC, Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis. In: Bloom BR, ed. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington DC; American Society for Microbiology. 1994: 85-109.
10. Murray M, Nardell E. Molecular epidemiology of tuberculosis: achievements and challenges to current knowledge. Bull World Health Organ. 2002; 80(6): 477-482
11. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SY, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequencebased extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 48.
12. Sreevatsan S, Escalante P, Pan X, Gillies DA, Siddiqui S, Khalaf CN, Kreiswirth BN, Bifani P, Adams LG, Ficht T, Perumaalla VS, Cave MD, van Embden JD, Musser JM. Identification of a polymorphic nucleotide in oxyR specific for Mycobacterium bovis. J Clin Microbiol. 1996; 34(8): 2007-2010.
13. Jeon CY, Hwang SH, Min JH, Prevots DR, Goldfeder LC, Lee H, Eum SY, Jeon DS, Kang HS, Kim JH, Kim BJ, Kim DY, Holland SM, Park SK, Cho SN, Barry CE 3rd, Via LE. Extensively drug-resistant tuberculosis in South Korea: risk factors and treatment outcomes among patients at a tertiary referral hospital. Clin Infect Dis. 2008; 46(1): 42-49.
14. Van Soolingen D, de Haas PE, Kremer K. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) typing of mycobacteria. Methods Mol Med. 2001; 54: 165-203.
15. Collins CH, Grange JN, Yates MD. Tuberculosis bacteriology. 2 nd edn. Oxford: Butter word- Heinemann. 1997; pp. 110-117.
16. Alcaide F, Richter I, Bernascoin C, Springer B, Hagenau C, Schulze-R?bbecke R, Tortoli E, Mart?n R, B?ttger EC, Telenti A. Heterogeneity and clonality among isolates of *Mycobacterium kansasii*: implications for epidemiological and phathogenicity studies. J Clin Microbiol. 1997; 35(8): 1959-1964.
17. Devallois A, Goh 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 differentiate 34 mycobacterial species. J Clin Microbiol. 1997; 35(11): 2969-2973.
18. Stermann M, Bohrssen A, Diephaus C, et al. Polymorphic nucleotide within the promoter of nitrate reductase (NarGHJI) is specific for *Mycobacterium tuberculosis*. J Clin Microbiol. 2003; 41(7): 3252-3259.
19. Warren RM, Gey van Pittius NC, Barnard M, Hesseling A, Engelke E, de Kock M, Gutierrez MC, Chege GK, Victor TC, Hoal EG, van Helden PD. Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex by PCR amplification of genomic regions of difference. Int J Tuberc Lung Dis. 2006; 10(7): 818-822.
20. Sadaii jahromi N, Frania P, Kargar M, Kazempour M ,Noruzi J, Masjedi MR, Velayati AA. Relationship between interleukin12 receptor beta1 gene polymorphisms with pulmonary tuberculosis among the Iranian population. J Microb World. 2009; 2: 113-116. [In persian]
21. Biet F, Boschiroli ML, Thorel MF, Guilloteau LA. Zoonotic aspects of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium avium*-intracellulare complex (MAC). Vet Res. 2005; 36(3): 411-436.
22. Blazquez J, Espinosa de Los Monteros LE, Samper S, Martin C, Guerrero A, Cobo J, Van Embden J, Baquero F, Gomez-Mampaso E. Genetic characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium bovis* strains from a hospital outbreak involving human immunodeficiency virus positive patients. J Clin Microbiol. 1997; 35(6): 1390-1393.
23. de la Rua-Domenech R. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. Tuberculosis (Edinb). 2006; 86(2): 77-109.
24. de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osorio Ribeiro M, Garzon Torres MC, Llerena Polo C, Ribon W, Garcia V, Kuffo D, Asencios L, Vasquez Campos LM, Rivas C, de Waard JH. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis (Edinb). 2008; 88(4): 358-365.
25. Rezaeetalab F, Akbari H, Rezaeetalab GH. A delay in diagnosis patient with pulmonary tuberculosis. Med J Mashhad Univ Med Sci. 2008; 51(99): 37-40 [In persian].

Journal of Microbial World
Volume 3, No. 2, June 2010

Comparison of PCR-RFLP and Biochemical Methods for Detection of Human Pulmonary Tuberculosis Agents

Behnam Rafiee[1], Ali asghar Farazi[2], Davoud Sadeghi[3], Sepideh Ghani[4], Razieh Nazari[5], Rohulah Keshavarz[6], Keyvan Tadayon[6], Nader Msavari[6]

[1]M.Sc.,Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
[2]Assistant professor, Department of Infectious and Tropical Diseases, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.
[3]M.Sc., Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[4]M.Sc.,Young Researcher's Club, Arak Branch, Islamic Azad University, Arak, Iran.
[5]Assistant Professor, Department of Microbiology, Qom Branch, Islamic Azad University, Qom, Iran.
[6]Assistant Professor, Razi Vaccine & Serum Research Institute, Karaj, Iran.

Abstract

Background and Objective: Tuberculosis is one of important cause of death in several countries. *Mycobacterium tuberculosis* complex is consisted of homogenous slow growing mycobacteria that their isolation and identification are difficult and time consuming. The objective of this study was to evaluate a molecular method for differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from *Mycobacterium bovis*, and at the same time, to compare the method with biochemical tests.

Material and methods: In this study 68 sputum specimens were collected from the smear positive patients who hospitalized in health centers of Markazi province. The samples were cultivated in the specialized cultures. Also, 10 isolates of *Mycobacterium bovis* that were obtained from different area of Iran as well as 6 standard strains have been used for comparison. After performance of biochemical tests, *oxyR* pseudogene was amplified by PCR and the PCR products were digested by *AluI* endonuclease.

Results: The digestion on PCR products of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium bovis showed one and three fragment panel, respectively, on the gele. Only one isolate of human Mycobacterium bovis strain has been identified. The results of PCR-RFLP were consistent with biochemical tests.

Conclusion: Since PCR-RFLP is a rapid and accurate method for differentiation between *Mycobacterium bovis* and other *Mycobacterium tuberculosis* complex and the results are important in terms of diagnosis and treatment of tuberculosis.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis complex, PCR-RFLP, *oxyR* pseudogene

Correspondence to: Nader Mosavari
Tel: +989122611438
Email:nmosavari@yahoo.com
Journal of Microbial World 2010 3(2): 110-115