

## مطالعه مایکوباکتریوم بویس سویه مورد استفاده در تولید توپر کولین

### گاوی موسسه رازی

مرجان حیدرزاده<sup>۱\*</sup>، نادر مصوری<sup>۲</sup>، میترا صالحی<sup>۳</sup>، رضا عارف پژوهی<sup>۴</sup>

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی پژوهشگاه استاندارد

۲ و ۴- به ترتیب استادیار و کارشناس خبره موسسه سرم سازی رازی

۳- استادیار دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

\* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: M.Heidarzadeh@standard.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۸۹/۱۰/۲۰- تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۲/۹)

### چکیده

توپر کولین آنتی ژن های پروتئینی تخلیص شده از کشت خالص باسیل توپر کول است که برای تشخیص عفونت های پنهانی به باسیل سل، به افراد مشکوک تزریق می شود. در موسسه رازی که تولید کننده انحصاری توپر کولین گاوی در ایران است از سال ۲۰۰۴ میلادی همگام با سایر نقاط دنیا از مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 برای تولید این فرآورده استفاده می شود که این امر ضرورت مطالعات ژنومی این سویه را محرز می نماید. در این پژوهش ابتدا این سویه روی محیط کشت لونشتاین جانسون کشت داده شد. از کلنی های مشخص طبق روش ون-سولینگن، DNA های لازم استخراج شد. در بررسی و اثبات این مطلب که نمونه مورد استفاده در موسسه رازی متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توپر کلوزیس است، با استفاده از آغازگرهای Ins-1 و Ins-2 که نشان دهنده حضور توالی IS6110 می باشد و مختص خانواده کمپلکس مایکوباکتریوم توپر کلوزیس می باشد PCR انجام شد. در بررسی نتایج حاصل از PCR توالی IS6110 مشاهده باند در ناحیه ۲۴۵ جفت بازی متعلق بودن نمونه مورد بررسی را به کمپلکس مایکوباکتریوم توپر کلوزیس اثبات نمود. بخشی از DNA استخراج شده، توسط آنزیم های *PvuII* و *AluI* هضم و پس از الکتروفورز بر روی کاغذ نایلونی منتقل و با پروب PGRS. هیبریداسیون انجام شد. الگوی های ژنومی DNA حاصل از RFLP با الگوی سویه مورد استفاده در تولید توپر کولین گاوی سایر نقاط دنیا، مقایسه شد.

### مقدمه

بیماری سل یکی از قدیمی ترین بیماری های عفونی مشترک بین انسان و دام است. با وجود روش های مختلف درمانی، هر سال مرگ و میر بسیاری را در پی دارد و هنوز هم به عنوان یکی از معضلات بهداشتی جوامع مطرح می باشد، در حال حاضر با توجه به داده های آماری شاید بتوان گفت که بیماری سل از مهم ترین بیماری های عفونی مشترک انسان و دام می باشد

(Mosavari et al. 2009)

### واژه های کلیدی

توپر کولین،  
مایکوباکتریوم بویس سویه AN5،  
هیبریداسیون با پروب PGRS،  
IS6110  
PCR  
RFLP

این سویه اطلاعات ژنومی کمی در اختیار است. تقریباً در میان تمام سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکولوزیس بین یک تا بیش از ۲۰ نسخه از یک اینسرشن سکانس به نام IS6110 یافت شده است. موقعیت و نیز تعداد این اینسرشن سکانس‌ها در بین سویه‌های مختلف تا حد زیادی متفاوت است و در عین حال در یک سویه واحد نسبتاً پایدار و ثابت می‌باشد از طرف دیگر تیپ‌های به دست آمده توسط RFLP از سویه‌های دختری واکسن BCG با وجود کشت‌های مجدد فراوان در شرایط مختلف و در آزمایشگاه‌های متعدد سرتاسر جهان، به صورت مشخص ثابت و بدون تغییر باقی مانده‌اند (Hooper et al. 1986) در تکنیک<sup>۱</sup> DNA, RFLP از کشت‌های تهیه شده، استخراج می‌شود و پس از هضم توسط یک آنزیم اندونوکلاز محدود کننده، به کمک ژل الکتروفورز تفکیک می‌گردد. پس از این مرحله قطعات DNA جدا شده توسط تکنیک ساترن بلاتینگ<sup>۲</sup> به یک غشاء نایلون انتقال داده می‌شوند و با پروب‌های DNA که با استفاده از ترکیب کروموزوم دیگوکسی ژنین<sup>۳</sup> نشان‌دار شده‌اند هیبریداسیون جهت نمایان‌سازی منطقه خاصی از ژنوم به کار گرفته می‌شود. اشکال به دست آمده از RFLP مربوط به سویه‌ها را می‌توان به صورت چشمی و یا توسط یک سیستم کامپیوتری به صورت نوری تصویربرداری و با یک مجموعه فرانس مقایسه نمود (Van Embden et al. 1993)

### مواد و روش‌ها

ابتدا سویه مورد نظر *Mycobacterium Bovis strain AN5\_ATCC no.35726, TMC 412* در محیط لوشتین جانسون کشت داده شد سپس طبق روش ون-سولینگن استخراج DNA به عمل آمد. پس از ارزیابی کمیت و کیفیت DNA استخراج شده (DNAهای استخراج شده، توسط دستگاه ژل الکتروفورز ارزیابی کیفی و توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نانودراپ<sup>۴</sup> ارزیابی کمی شدند)، PCR توالی الحاقی<sup>۵</sup> به نام IS6110 انجام شد، ردیف توالی‌های

سل گاوی یک بیماری عفونی با عامل مایکوباکتریوم بویس است و معمولاً با تشکیل ضایعات گرانولومای ندولار که به توبرکول معروف است توصیف می‌شود هرچند بیماری به عنوان یک بیماری مزمن و ضعیف‌کننده تعریف می‌شود اما سل گاوی می‌تواند گاهی شکل حاد سریع و پیشرونده را به خود بگیرد (O.I.E 2000). بیماری تمام گونه‌ها به ویژه مهره‌داران را مبتلا می‌کند. سل گاوی هنوز یک زئونوز مهم در بسیاری از نقاط جهان است. علائم و ضایعات آن عموماً در گونه‌های متفاوت حیوانی به هم شبیه هستند (Susan et al. 2000) در ایران علیرغم به کارگیری برنامه ریشه‌کنی سل گاوی و با این که شیوع این بیماری در گاوداری‌های صنعتی بشدت کاهش پیدا کرده است ولی هنوز سل گاوی در جمعیت‌های گاوی کشور دیده می‌شود (Mosavari et al. 2009) سل دامی از نظر میزان اشاعه، اهمیت اقتصادی و بهداشتی، یکی از اصلی‌ترین انواع بیماری‌های دام، محسوب می‌شود (O.I.E 2000) سه طرح اصلی در کنترل این بیماری شامل: آزمایش و کشتار، آزمایش و جداسازی و شیمی درمانی می‌باشند. سیاست آزمایش و کشتار تنها روش قطعی و با اطمینان ریشه‌کنی بیماری سل است و به کشتار دام‌هایی که به آزمایش توبرکولین پاسخ می‌دهند تکیه دارد (Susan et al. 2000) در واقع کنترل سل گاوی بر پایه تست‌های منظم گاوها توسط PPD (آنتی ژن‌های پروتئینی خاص شده از مایکوباکتریوم) صورت می‌گیرد. در سراسر دنیا برای تولید PPD گاوی از مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 استفاده می‌شود. AN5 یکی از سویه‌های مایکوباکتریوم بویس است (Garcia Pelayo et al. 2009). این سوش برای اولین بار در سال ۱۹۴۸ میلادی در کشور بریتانیا توسط Paterson جداسازی شد (Paterson 1948) و از سال ۱۹۷۵ میلادی به دلیل رشد بالا در محیط گلیسرین دار برای تولید توبرکولین گاوی در سراسر دنیا مورد استفاده قرار می‌گیرد، تا قبل از آن برای تولید توبرکولین گاوی از سویه‌های مایکوباکتریوم توبرکولوزیس DT,C و PN که برای تولید توبرکولین انسانی نیز به کار برده می‌شدند استفاده می‌شد و دلیل آن باروری بیشتر توده سلولی این سویه‌ها در محیط‌های گلیسرین‌دار در مقایسه با سویه‌های مایکوباکتریوم بویس بود (Inwald et al. 2003). AN5 علاوه بر تولید PPD در مطالعات اپیدمیولوژی نیز کاربرد دارد. علیرغم استفاده جهانی از

<sup>1</sup> Restriction Fragments Length Polymorphism

<sup>2</sup> Southern Blotting

<sup>3</sup> Chromogen digoxigenin

<sup>4</sup> Nano Drops Spectrophotometer

<sup>5</sup> Insertion Sequence

مثبت و فاقد DNA بود و به جای DNA آب مقطر اضافه می‌شود سپس محصول PCR الکتروفورزگردید. برای هضم آنزیمی از DNAهای کامل و شکسته نشده با غلظت ۷۰۰ الی ۱۴۰۰ نانوگرم بر ماکرولیتر استفاده شد. در حدود ۳ میکروگرم از نمونه‌های DNA، با استفاده از *PvuII* یا *AluI* شرکت رش آلمان (در مراحل جداگانه) در یک ماکروتیوب (اپندورف) به حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر رسانیده شد. سپس نمونه‌ها برای انجام هضم مطلوب در بن ماری ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شب انکوبه شدند. محصول حاصل از برش آنزیم، در دستگاه ژل الکتروفورز در ولتاژ ۴۰ ولت به مدت یک شب قرار گرفت (RFLP). قطعات برش‌خورده در طول ژل آگارز، بر اساس وزن ملکولی از یکدیگر تفکیک شدند. پس از الکتروفورز، ژل آگارز در محلول اتیدیوم بروماید رنگ آمیزی و برای مشاهده باندهای رنگ شده در دستگاه ژل داک قرار گرفت. سپس ژل آگارز با بافرهای دناتوره کننده، دیورینه کننده و نوترالیزه کننده عمل آوری شد و ساترن بلائینگ برای انتقال DNA با بار منفی به غشاء نایلونی دارای مثبت صورت گرفت. غشاءهای حاصله با بافر پری هیبریداسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴-۲ ساعت در دستگاه آن هیبریداسیون قرار گرفتند. سپس برای هیبریداسیون با پروب نشاندار شده PGRS به مدت ۲۴ ساعت در همین دما در دستگاه قرار داده شدند. در مرحله بعد غشاءها با بافرهای شستشوی ۲ برابر و ۰/۱ برابر شسته شدند و شناسایی توسط سوبستراهای NBT و BCIP انجام گرفت. در نهایت تفسیر نتایج غشاء بر اساس ظهور باندهای DNA با اندازه‌های متفاوت امکان پذیر شد.

### نتایج و بحث

تکثیر اینسرشن سکانس IS6110 و الکتروفورز محصول این PCR و مشاهده یک باند ۲۴۵ جفت‌بازی مشخص نمود که سویه مورد استفاده در موسسه سرم‌سازی و واکسن‌سازی رازی متعلق به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس می‌باشد (شکل ۱).

مناسب پیشرو و معکوس جهت PCR از ژن مذکور، به شرح زیر بود:

INS-1 (631-350) 5'(CGT GAG GGC ATC GAG GTG GC) 3'  
INS-2 (856-875) 5'(GCG TAG GCG TCG GTG ACA AA) 3'

طبق پروتوکل موجود از توالی‌های فوق توسط آب مقطر محلول استوک آماده شد و برای نگهداری مناسب در ۴ لوله میکروتیوب ۱/۵ میلی‌لیتر استریل تقسیم گردید و در ۲۰°C نگهداری شد. در این مرحله از پرمیکس‌های آماده تجارتي که حاوی DNA پلیمرز، dNTP، بافر PCR حاوی  $MgCl_2$  و KCl و لودینگ بافر می‌باشد، استفاده شد. به این ترتیب که برای هر نمونه مورد آزمایش یک تیوب از پرمیکس‌های آماده تجارتي در نظر گرفته شد و پس از افزودن ۱۵۰-۱۰۰ نانوگرم از هر DNA استخراج شده و ۲ میکرولیتر از آغازگرهای پیشرو و معکوس، از هر آغازگر یک میکرولیتر اضافه گردید، سپس حجم نهایی توسط آب مقطر استریل به ۵۰  $\mu$ l رسانیده شد. میکروتیوب‌ها پس از افزودن آب مقطر و DNA در یخ قرار داده شدند سپس میکروتیوب‌ها برای مدت یک دقیقه داخل دستگاه ترمومیکسر بدون القاء دما قرار داده شدند تا یک محلول یکنواخت و همگن ایجاد شد. پس از این مرحله توسط دستگاه ترموسایکلر با توجه به برنامه دما و زمان موجود در جدول ۱ واکنش زنجیره‌ای PCR انجام شد.

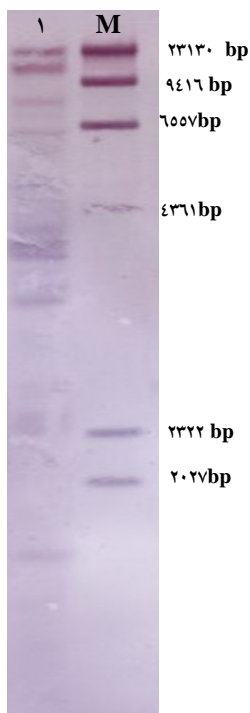
جدول ۱- برنامه دما، زمان و چرخه ترمو سايکلر

مرحله PCR	دما	زمان	تعداد سیکل
دناتوراسیون اولیه	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۳ دقیقه	یک سیکل
دناتوراسیون	۹۴ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
آنیلینگ	۶۵ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
بسط زنجیره	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۱ دقیقه	۲۵ سیکل
بسط نهایی	۷۲ درجه سانتی‌گراد	۴ دقیقه	یک سیکل

جدول ۲- میزان مواد مورد استفاده جهت برش DNA کروموزومی با آنزیم‌های محدود کننده

مواد مورد نیاز	مقدار
10x M buffer	۲ میکرولیتر
آنزیم <i>AluI</i> و <i>Pvu II</i>	۲ میکرولیتر
DNA	۳ میکرولیتر
آب مقطر استریل	۱۳ میکرولیتر
حجم نهایی	۲۰

برای کنترل مثبت از DNA استخراج شده ب.ث.ژ. ۱۱۷۳<sup>P</sup> استفاده گردیده کنترل منفی حاوی تمامی اجزاء میکروتیوب کنترل

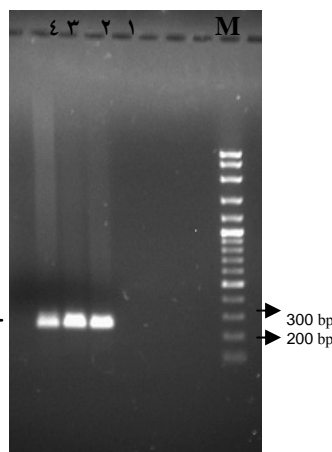


شکل ۲- هضم آنزیمی با *PvuII* و هیبریداسیون با پروب PGRS (M) سایز مارکر ۳ ریش آلمان ستون ۱) نمونه مورد بررسی

۲۳۱۳۰ bp  
۹۴۱۶ bp  
۶۵۵۷ bp  
۴۳۶۱ bp  
۲۳۲۲ bp  
۲۰۲۷ bp



شکل ۳- هضم آنزیمی با *AluI* و هیبریداسیون با پروب PGRS (M) سایز مارکر شماره ۳ ریش آلمان ستون ۱) نمونه مورد بررسی



شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR (IS6110- ستون M) سایز مارکر شماره ۱۰۰، ستون ۱) کنترل منفی، ستون ۲) کنترل مثبت (BCG)، ستون ۳ و ۴) نمونه مورد بررسی

در این تحقیق از تکنیک RFLP برای تهیه الگوی ژنومی مایکوباکتریوم بویس سویه مورد استفاده در تولید توبرکولین گاوی موسسه رازی استفاده گردید. در نهایت بعد از هیبریداسیون، الگوی ژنومی این نمونه به دست آمد. نتایج غشاءهای حاصل از هضم با آنزیمهای *PvuII* و *AluI* و هیبرید شده با پروب PGRS ژنوم مایکوباکتریوم سویه AN5 باندهای متعدد با وزنهای مولکولی متفاوت را نشان می‌داد. شکل ۲- *PvuII*\_PGRS (شکل ۳- *AluI*\_PGRS).

به دلایلی که پیش تر ذکر شد بررسی های ژنومی و تعیین هویت مولکولی سویه مورد استفاده در تولید توبرکولین گاوی انسیتو رازی ضروری می نماید. یک تعیین هویت قابل اطمینان، ممکن است به وسیله تعیین توالی های DNA اختصاصی گونه ای، به وسیله PCR یا هیبریدیزاسیون به دست بیاید ( Del Portillo et al. 1991). گونه های مختلف مایکوباکتریایی، دارای تعدادی سکانسهای داخل شونده IS یا الحاقی در ژنوم کامل می باشند. سکانسهای الحاقی یا IS متعلق به خانواده های مجزا بوده و مطالعات مایکوباکتریایی تقریباً تعداد ۱۵ سکانس الحاقی را که مربوط به ده خانواده اصلی می باشند، آشکار نموده است. تعداد کپی های متعددی از سکانسهای الحاقی در ژنوم مایکوباکتریها وجود دارد و از نظر گونه بسیار اختصاصی است که می توان از آنها برای شناسایی انواع مایکوباکتریوم ها استفاده نمود ( Roiz et al. 1995).

ژنومی مایکوباکتریومها بود (Stahl et al. 1990) به دلیل ژنوم بزرگ ۴/۴ میلیون جفت‌بازی مایکوباکتریومها، تفسیر الگوی RFLP به تنهایی و بدون هیبریداسیون مشکل است بنابراین انتقال DNA به غشاء نایلونی و هیبریداسیون با پروب، آشکارسازی و تفسیر نتایج را ممکن می‌سازد که در این بین توالی‌های غنی از CG مارکری سودمند برای انواع سویه‌های کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس است (Tweedle 1994; Cousins et al. 1998). دلیل انتخاب RFLP و هیبریداسیون با پروب نشاندار ارجحیتی است که این تکنیک بر سایر روش‌های ملکولی در متمایز نمودن سویه‌های مایکوباکتریایی داراست این امر توسط دو تحقیقی که در سال ۱۹۹۹ توسط کرمر و همکاران (Kremer et al. 1999) و گوپال (Goyal et al. 1999) و همکاران به‌طور جداگانه انجام گرفت به اثبات رسیده است. در طی تحقیقاتی که در طی سال‌های ۱۹۹۴ تا کنون در بررسی‌های ملکولار اپیدمیولوژیک سل گاوی در کشورهای مختلف توسط محققین مختلف انجام شد استفاده از تکنیک RFLP و هضم آنزیمی با آنزیم‌های *AluI* و *PvuII* و هیبریداسیون با پروب PGRS، جهت انگشت‌نگاری ژنومی سویه‌های مایکوباکتریوم بویس توصیه شده است (Gutierrez et al. 1995; Fisanotti et al. 1998; Roring et al. 1999; Costello et al. 1998). با استفاده از تکنیک ملکولی فوق‌الگوی ژنومی سویه مورد بررسی ما به دست آمد که در مقایسه با الگوی ژنومی سویه فوق در سایر کشورها (کشورهایی که الگوی ژنومی سویه AN5 آنها قابل دسترسی می‌باشد) مطابقت داشته که این امر اثبات‌کننده AN5 بودن سویه مورد بررسی ما بوده که با توجه به دشواری‌های تهیه سویه‌های تولیدی در کشور ایران اهمیت این موضوع مهم می‌نماید.

#### نتیجه‌گیری

گرچه یافته‌های این تحقیق که با استفاده از تکنیک ملکولی RFLP و توسط آنزیم‌های محدود کننده *AluI* و *PvuII* و شناساگر PGRS انجام شد مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 بودن باکتری مورد استفاده در تولید توبرکلین گاوی موسسه رازی را اثبات نمود و همچنین ثبات ژنومی این سویه توسط تحقیق دیگر همین تیم تحقیقاتی به تأیید رسید (Heidarzadeh et al. 2010) ولی

یکی از مهم‌ترین سکانس‌های الحاقی شناخته شده در کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس قطعه IS6110 می‌باشد که یک قطعه ۱۳۶۱ جفت‌بازی می‌باشد (Fomukong et al. 1992; Poulet et al. 1995). همان‌طور که ذکر شد در این تحقیق از توالی الحاقی فوق جهت اثبات متعلق بودن نمونه مورد نظر به کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس استفاده شد و ظهور باند نشانگر وجود این توالی در ژنوم مورد مطالعه بوده و هدف این مطالعه را تأمین نمود. در دو تحقیق دیگر در موسسه رازی توسط تکنیک ملکولی PCR\_RFLP با استفاده از قطعه ژنومی *OxyR*، مایکوباکتریوم بویس بودن سویه فوق مورد اثبات و تأیید قرار گرفت (Alavi et al. 2008; Heidarzadeh et al. 2010). علیرغم کاربردهای جهانی مایکوباکتریوم بویس سویه AN5 در تولید توبرکلین گاوی و همچنین کاربردهای این سویه در مطالعات اپیدمیولوژی سل گاوی اطلاعات ژنومی ناچیزی از این سویه در دسترس است. بیشتر مطالعاتی که تاکنون بر روی این سویه انجام گرفته، بر مبنای بهبود روش‌های خالص‌سازی و جداسازی لیپوآرابینومانان برای تهیه توبرکلین مطلوب‌تر، بوده است (Heidarzadeh et al. 2010). Cousins et al. 1998. جهت بررسی ۲۷۳ مایکوباکتریوم بویس جدا شده از کشورهای استرالیا، کانادا، جمهوری ایرلند، بریتانیا، نیوزلند و ایران از روش RFLP با استفاده از پروب‌های IS6110، PGRS و DR و سویه مایکوباکتریوم بویس AN5 به عنوان یک سویه استاندارد انجام پذیرفت. در تحقیق حاضر ما از کشت در محیط لونشتاین جانسون استفاده کردیم که در روش استاندارد جداسازی مایکوباکتریومها به‌عنوان بهترین محیط‌ها معرفی شده است (O.I.E 2000). جهت انگشت‌نگاری ژنومی این سویه از تکنیک ملکولی RFLP استفاده کردیم که طبق تحقیقاتی که تاکنون انجام شده، بهره‌مندی از تکنیک‌های تاپینگ مولکولی مانند پلی‌مورفیسم قطعات به وسیله آنزیم‌های محدود کننده (RFLP) برای تهیه الگوی ژنومی کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس بسیار مفید می‌باشد (Epizooties 2004). جهت هضم آنزیمی از آنزیم‌های *AluI* و *PvuII* استفاده کردیم. دلیل انتخاب آنزیم *PvuII*، توصیه در روش استاندارد ون-سولینگن در دستورالعمل WHO (Van Soolingen et al. 1997) و انتخاب آنزیم *AluI* توصیه دیگر محققین برای انگشت‌نگاری

راستای تحقق اهداف این پروژه از هیچ کوششی دریغ نکردند و همچنین سرکار خانم مهندس فهیمدخت مختاری سرپرست محترم گروه پژوهشی بیولوژی پژوهشگاه سازمان استاندارد ایران، نهایت تشکر و قدردانی به عمل آید.

جهت بررسی‌های بیشتر و حصول اطمینان بالاتر تکنیک‌های ملکولی دیگری جهت مقایسه ضروری می‌نماید.

سپاسگزاری

جا دارد از تمامی کارکنان محترم موسسه واکسن‌سازی و سرم سازی رازی به خصوص پرسنل فداکار بخش توبرکولین که در

### منابع

- Alavi MN M (2008) Molecular Identification of bovine Tuberculosis from human Tuberculosis with 5 standard starin by PCR\_RFLP Teqnique. *Journal of Medical Microbiology of IRAN* 2: 1-7. (In Farsi)
- Costello E, O'Grady D, Flynn O, et al. (1999) Study of restriction fragment length polymorphism analysis and spoligotyping for epidemiological investigation of Mycobacterium bovis infection. *J Clin Microbiol* 37: 3217-3222.
- Cousins D, Williams S, Liebana E, Aranaz A, Bunschoten A, Van Embden J Ellis T (1998) Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovine tuberculosis. *J Clin Microbiol* 36: 168-178.
- Cousins DV, Skuce RA, Kazwala RR van Embden JD (1998) Towards a standardized approach to DNA fingerprinting of Mycobacterium bovis. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease, Tuberculosis in Animals Subsection. *Int J Tuberc Lung Dis* 2: 471-478.
- Del Portillo P, Murillo LA Patarroyo ME (1991) Amplification of a species-specific DNA fragment of Mycobacterium tuberculosis and its possible use in diagnosis. *J Clin Microbiol* 29: 2163-2168.
- Epizooties OID (2004) Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccine."
- Fisanotti JC, Alito A, Bigi F, et al. (1998) Molecular epidemiology of Mycobacterium bovis isolates from South America. *Vet Microbiol* 60: 251-257.
- Fomukong NG, Dale JW, Osborn TW Grange JM (1992) Use of gene probes based on the insertion sequence IS986 to differentiate between BCG vaccine strains. *J Appl Bacteriol* 72: 126-133.
- Garcia Pelayo MC, Garcia JN, Golby P, et al. (2009) Gene expression profiling and antigen mining of the tuberculin production strain Mycobacterium bovis AN5. *Vet Microbiol* 133: 272-277.
- Goyal M, Lawn S, Afful B, Acheampong JW, Griffin G, Shaw R (1999) Spoligotyping in molecular epidemiology of tuberculosis in Ghana. *J Infect* 38: 171-175.
- Gutierrez M, Samper S, Gavigan JA, Garcia Marin JF Martin C (1995) Differentiation by molecular typing of Mycobacterium bovis strains causing tuberculosis in cattle and goats. *J Clin Microbiol* 33: 2953-2956.
- Heidarzadeh M, Salehy M, Arefpajouhi R, Bolfion M, Soleimani KN M (2010) DNA Finferprinting Of Mycobacterium Bovis AN5 strain by RFLP Tecnique. *Journal of Microbiology Knowledge* 4: 37-50. (In Farsi)
- Hooper LC, Johnson MM, Khera VR Barrow WW (1986) Macrophage uptake and retention of radiolabeled glycopeptidolipid antigens associated with the superficial L1 layer of Mycobacterium intracellulare serovar 20. *Infect Immun* 54: 133-141.
- Inwald J, Hinds J, Palmer S, Dale J, Butcher PD, Hewinson RG Gordon SV (2003) Genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis complex strains used for production of purified protein derivative. *J Clin Microbiol* 41: 3929-3932.
- Kremer K, van Soolingen D, Frothingham R, et al. (1999) Comparison of methods based on different molecular epidemiological markers for typing of Mycobacterium tuberculosis complex strains: interlaboratory study of discriminatory power and reproducibility. *J Clin Microbiol* 37: 2607-2618.
- Mosavari N, Jamshidian M (2009) Molecular genotyping and epidemiology the most frequent Mycobacterium bovis strains obtained from cattle, Iran. ed.^eds.), p.^pp. Wellington, New Zealand.
- OIE (2000) Manual of standards diagnostic Test and Vaccine Bovine Tuberculosis.
- Paterson AB (1948) The production of bovine tuberculoprotein. *J Comp Pathol Ther* 58: 302-313.
- Poulet S Cole ST (1995) Characterization of the highly abundant polymorphic GC-rich-repetitive sequence (PGRS) present in Mycobacterium tuberculosis. *Arch Microbiol* 163: 87-95.
- Roiz MP, Palenque E, Guerrero C Garcia MJ (1995) Use of restriction fragment length polymorphism as a genetic marker for typing Mycobacterium avium strains. *J Clin Microbiol* 33: 1389-1391.
- Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, Van Embden JD, Neill SD (1998) Spacer oligotyping of Mycobacterium bovis isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. *Vet Microbiol* 61: 111-120.
- Stahl DA, Urbance JW (1990) The division between fast- and slow-growing species corresponds to natural nal isolate from Africa. *Int J Syst Bacteriol* 47(4): 1236-1245.relationships among the mycobacteria. *J Bacteriol* 172: 116-124.23.
- Susan E, Aiello A (2000) Merck veterinary manual. 8th ed. PP: 489\_493.
- Tweedle NE LP (1994) Bovine tuberculosis control and eradication programs in Australia and NewZealand." *Veterinary Microbiology* 40: 23-39.

Van Embden JD, Cave MD, Crawford JT, et al. (1993) Strain identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA fingerprinting: recommendations for a standardized methodology. *J Clin Microbiol* 31: 406-409.

Van Soolingen DT, Hoogenboezem et al. (1997) A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, Canetti: characterization of an exceptio