در
امور دام و آبزیان شماره ۷۸ بهار ۱۳۸۷
پژوهش و سازندگی

# تعیین الگوی پروتئینی و ایزوآنزیمی سروتیپ‌های 4a و 4b *Listeria monocytogenes* به روش SDS-PAGE و MLEE

• **عبدالرضا نبی‌نژاد**
عضو هیأت علمی تحقیقات دامپزشکی اصفهان
• **وحید نعمان**
عضو هیأت علمی تحقیقات دامپزشکی اصفهان
• **حبیب اله دادرس**
عضو هیأت علمی دانشکده دامپزشکی شیراز
• **سید محمدحسین حسینی**
عضو هیأت علمی‌موسسه رازی، شعبه شیراز
تاریخ دریافت: دی ماه ۱۳۸۴ تاریخ پذیرش: مرداد ماه ۱۳۸۶
Email: nabinejad@yahoo.com

## چکیده

**در مطالعه حاضر دو سروتیپ 4a و 4b *L. monocytogenes* جدا شده از شیر خام به روش SDS-PAGE و PAGE مورد شناسایی قرار گرفت در آزمایش SDS-PAGE پروفیل پروتئینی باکتری‌ها مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از نشانگر مولکولی پروتئینی ارزیابی و معلوم شد که پروفیل پروتئینی دو سروتیپ نزدیک به هم بوده ولی دارای تفاوت‌هایی در مناطق ۱۸ تا ۲۹ کیلو دالتون و منطقه ۶۸ کیلو دالتون بودند. بیشترین تراکم باندهای پروتئینی در منطقه ۱۴ تا ۹۷ کیلو دالتون بود. در آزمایش PAGE به منظور ارزیابی الکتروفورتیکی ایزوآنزیم‌ها(MLEE) ، ۸ سیستم آنزیمی LDH، GLDH، G6PD، GaLDH، 6PGDH، ME، GPI، AP مطالعه شد که در سروتیپ 4a تعداد ۱۵ ایزوآنزیم ودر سروتیپ 4b تعداد ۱۳ ایزوآنزیم فعال بود.بر اساس نتایج بیشترین تفاوت در الکترومورفس‌ها در بین دو سروتیپ در سیستم‌های آنزیمی ME، GaLDH، GLDH و 6PGDH مشاهده شد بنابراین با استفاده از این ۴ سیستم در کنار سایر سیستم‌های آنزیمی می‌توان جدایه‌های مختلف را از هم تفریق نمود.**

**کلمات کلیدی:** *Listeria monocytogenes*، پروتئین، ایزوآنزیم، SDS-PAGE، MLEE

Pajouhesh & Sazandegi No 78 pp: 130-138

**Proteins and isoenzymes patterns evaluation in 4a and 4b serotypes of *Listeria monocytogenes* by SDS-PACE and MLEE**

*By: A.R. Nabinejad, Vet. Dept., Isfahan Research Centre of Agriculture and Natural Resources*
*V. Noaman,Vet. Dept., Isfahan Research Centre of Agriculture and Natural Resources*
*H. Dadras, Avian Medicine Dept., School of Vet. Med., Shiraz University*
*S.M. H. Hoseiny, Immunochemistry Dept., Razi Institute Branch of Fars*

In current study 2 *Isolated serotypes* of *Listeria monocytogenes* included 4a and 4b were studied for protein profiles and Isoenzyme analysis using SDS-PAGE and MLEE. In SDS-PAGE the protein profiles of 2 serotypes mostly were the same to each other but in compersion to standard protein marker, there were much differences in 18 to 29 Kd and zone of 68 Kd. It was obviused that the most concentration of protein bands were distributed between zone of 14 to 97 Kd. In PAGE for MLEE, 8 enzymatic systems included AP,GPI, ME, 6PGDH, GaLDH, G6PD, GLDH, LDH were studied and in 4a serotype 15 isoenzymes and in 4b serotypes 13 isoenzyme were active; Based on the zymograms, it is concluded that the most differences between 2 serotypes were seen in GLDH, GaLDH, ME and 6PGDH systems, therefore using these enzymatic systems can differentiate *L. monocutogenes* isolates.

**Keywords:** *L. monocytogenesis*, SDS-PAGE, MLEE, Protein, Isoenzyme

## مقدمه

لیستریاها از باکتری‌های گرم مثبت، میله‌ای شکل غیرهاگزا بدون کپسول، کاتالاز مثبت، اکسیداز منفی، بیهوازی اختیاری و به قطر ۰/۴ تا ۰/۵ میکرومتر و به طول ۰/۵ تا ۲ میکرو متر با انتهای گرد می‌باشند. در سطح آگار مغذی کلنی دارای قطر ۰/۵ تا ۱/۵ میلیمتر بوده و به شکل گرد، شفاف و قطره اشکی با تحدب اندک با قوام نرم و لبه‌های تو رفته دیده می‌شوند. کلنی در تابش نور مستقیم ظاهر آبی خاکستری داشته و در نور مورب تلالو آبی - سبز نشان می‌دهد.در سطح آگار خوندار نیز همولیز نوع بتا تولید می‌نماید باکتری در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH معادل ۹-۶ به خوبی رشد می‌نماید(۹، ۲۰ ، ۲۸).

مهمترین گونه لیستریا که در انسان و دام بیماری زا بوده گونه *L. monocytogenes* می‌باشد این باکتری سرما دوست بوده و در دمای یخچال به خوبی رشد می‌کند و در دمای ۴ درجه سانتی گراد تا ۴ ماه می‌تواند غلظت ۲/۵ درصد نمک طعام را تحمل کند.لذا این باکتری به راحتی می‌تواند از طریق مواد غذایی به انسان منتقل شده و موجب مسمومیت‌های غذایی شود. مهمترین عوارض بیماری در انسان شامل سپتی سمی، عفونت سیستم عصبی مرکزی، عفونت‌های کانونی و عفونت‌های دستگاه تولید مثل می‌باشد (۸).

*L. monocytogenes* یک ساپروفیت با گستردگی زیاد در طبیعت بوده و خاک مخزن اصلی آن می‌باشد این باکتری در بدن بسیاری از جانوران از جمله حیوانات اهلی و ماکیان وجود دارد و بوسیله آنها به انسان منتقل می‌شود لذا یک باکتری زئونوز هم می‌باشد.در ایران نیز در سال ۱۳۷۱ سروتیپ‌های ۴b ، ۲b ، ۲a ، ۴a و۲c از شیر و دیگر محصولات لبنی جدا شد. بیشترین درصد آلودگی ناشی از سروتیپ‌های ۴a و ۴b بوده است(۱). در مطالعه سرولوژیکی مادران با علائم سقط جنین نیز سروتیپ‌های ۲b، ۲a و ۴a جدا شده است.بر اساس گزارشات بیشترین(۹۰٪) عفونت‌های غذایی در انسان با منشا *L. monocytogenes* ناشی از سروتیپ‌های ۴b، ۴a، ۲a بوده است (۳، ۹).

در سروتایپینگ *L. monocytogenes* با پادگن‌های تاژکی وپادتن‌های پیکری تاکنون ۱۶ سروتیپ در این گونه شناسایی شده است که مهمترین سروتیپ‌های بیماری زا عبارتند از ۴b، ۴a، ۲a، ۲b، ۲c (۹).

شناسایی بیماری در دام و انسان بر اساس سرولوژی و جداسازی عوامل و تعیین هویت عامل با استفاده از یکی از روش‌های سروتایپینگ، بیوتایپینگ، فاژتایپینگ و یا روش‌های مولکولار مانند بررسی پروفیل پروتیینی با SDS-PAGE[1] ، بررسی الگوهای ایزوآنزیمی(IEE=MLEE)[2] یا بررسی ساختار اسیدهای هسته‌ای با RFLP، PCR، DNA-Probe و PFGE قابل انجام است.هر یک از روش‌های فوق الذکر بسته به سرعت، حساسیت و ویژگی، بودجه و امکانات مورد نیاز دارای نقاط ضعف و قوتی بوده و لازم است بر اساس شرایط و توقعات از یک یا چند روش استفاده نمود (۳، ۷، ۹ ، ۲۰).

MLEE از تکنیک‌های استاندارد شده مولکولی برای بررسی تنوع اپیدمیولوژیکی و مولکولار فیلوژنی باکتری‌ها و ارگانیزم‌ها بوده که بر اساس حرکت الکتروفورزی ایزوزیم‌ها در سطح ژل تفریق می‌گردند. این پروفیل‌های الکترومورفی برای مطالعه سیستم آنزیمی بکار رفته در واقع به طور غیر مستقیم ساختار ژنومی هرجدایه را نشان می‌دهد زیرا آنزیم‌ها دارای ماهیت پروتئینی بوده و بر اساس کدهای مربوطه در سطح ژنوم باکتری تولید شده و فعالیت می‌نمایند (۱۰، ۱۴، ۲۳، ۲۵)؛ در SDS-PAGE نیز پروفیل پروتئینی ارگانیزم در میدان الکتریکی و بر اساس وزن مولکولی از هم تفکیک می‌گردد(۱۰، ۲۸).

درسال‌های اخیر جدایه‌های بالینی و یا آلودگی‌های غذایی با منشا *L. monocytogenes* با استفاده ازتکنیک MLEE مطالعه شده است، در طی ۱۵ سال گذشته روش MLEE در سطح وسیعی برای مطالعه ساختمان ژنتیکی و

تنوع اپیدمیولوژیکی باکتری‌های مختلف استفاده گردیده است، این تکنیک برای مطالعه و تفریق سویه و تحت تیپ‌ها در لاین‌های کشت سلولی جانوری و گیاهی، تک یاخته‌ها، باکتری‌ها، ریکتزیاها، قارچ‌ها و مایکوپلاسماها مورد استفاده قرار گرفته و در مقایسه با سایر روش‌های مولکولی از دقت قابل قبولی برخوردار بوده و در سازمان بهداشت جهانی از روش‌های رفرانس به شمار می‌رود(۱۰، ۱۴، ۲۳، ۲۵، ۲۸).

در MLEE لازم است فعالیت بیولوژیکی پروتئین همچنان حفظ شود و تنها عملی که تحت شرایط کنترل شده اسیدیته و دمایی روی نمونه‌ها انجام می‌شود، PAGE[3] یعنی الکتروفورز نمونه روی ژل پلی آکریل آمید است. در این عمل پروتئین‌ها به همان شکل موجود در سلول تحت تاثیر جریان الکتریسته مستقیم در داخل ژل بر اساس بار الکتریکی، وزن مولکولی و ساختمان فضایی ازیکدیگر تفکیک می‌شوند، بنابر این فعالیت بیولوژیکی پروتئین‌ها (از جمله آنزیم‌ها) همچنان ادامه داشته و بر همین مبنا می‌توان ایزوآنزیم‌های مختلف یک آنزیم را از هم تفریق کرد. ایزوآنزیم‌ها در واقع آلوتیپ‌ها یا اشکال مختلف یک آنزیم بوده که همگی دارای وزن مولکولی و سوبسترای اختصاصی یکسان بوده، ولی در ساختمان فضایی و بار الکتریکی از همدیگر متفاوتند و از آنجا که آنزیم‌ها مانند دیگر پروتئین‌ها از طریق ژنوم کد دهی می‌شوند لذا تشکیل انواع مختلف یک ایزوآنزیم براساس تفاوت‌های ژنتیکی بسیار ظریف بوده و به همین دلیل با استفاده از این روش می‌توان گونه و سویه‌های مختلف یک ارگانیزم را از هم تفکیک نمود.در مطالعات انجام شده روی انواع مختلف ارگانیزم‌های تک سلولی و پر سلولی جانوری و گیاهی با استفاده از MLEE گونه‌ها، تحت گونه‌ها و سویه‌های مختلف با حساسیت بسیار زیاد وگاهی دقیق‌تر از سایر روش‌های مولکولی ژنتیکی از همدیگر تفریق شده‌اند (۳، ۷، ۱۰، ۲۸، ۳۰).

در مطالعه حاضر نیز دو جدایه *L. monocytogenes* جدا شده از مواد غذایی آلوده با سروتیپ 4a و4b با استفاده از روش MLEE و نیز روشSDS-PAGE موردشناسایی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

### سویه‌های باکتری

دو سروتیپ از *L. monocytogenes* جدا شده از شیر و مواد لبنی شامل سروتیپ‌های 4a و 4b انتخاب و به طور جداگانه در مقدار یک لیتر محیط آبگوشت مغذی برای ۴۸ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس توده سلولی را با استفاده از سانتریفوژ یخچال‌دار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با قدرت ۱۰۰۰۰g برای مدت ۲۰ دقیقه ترسیب نموده، در ادامه پلت سلولی را با استفاده از سالین نرمال استریل برای ۳ بار شستشو نموده و سپس با انجام سانتریفیوژ مجدد پلت سلولی را رسوب داده و با افزایش مقدار یک میلی لیتر آب مقطر استریل با استفاده از سونیکاتور مدل MSF ۱۰۰ Watt برای مدت ۹۰-۶۰ ثانیه، در طی ۹-۶ مرحله با قدرت ۶ تا ۹ میکرون در مجاورت پودر یخ پلت سلولی تخریب و سپس با سانتریفیوژ مجدد در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در ۲۰۰۰۰g برای مدت ۱۰ دقیقه شیرابه باکتری را برای انجام آزمایش MLEE و SDS-PAGE در فریزر ۸۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۷، ۲۱، ۲۸).

### انجام SDA-PAGE و MLEE

در مطالعه حاضر از ژل پلی آکریل آمید به عنوان بستر الکتروفورز استفاده گردید. برای انجام SDS-PAGE از دترژنت سدیم دودسیل سولفات در ترکیب ژل، بافر سوبسترا و بافر الکتروفورز استفاده شد، لذا پروتئین‌ها فقط بر اساس وزن مولکولی خود در طول ژل حرکت نموده و سایر صفات پروتئین‌ها مانند بار الکتریکی و شکل فضایی در آن بی اثر می‌باشند به همین علت در SDS-PAGE هیچ فعالیت بیولوژیکی از پروتئین مورد انتظار نیست(۹، ۱۰، ۳۱).

پس از انجام کشت انبوه سروتیپ‌های 4a و 4b باکتری *L. monocytogenes* و تهیه شیرابه، مقدار پروتئین موجود در آن با استفاده از آزمایش لوری معادل ۱۰۰ mg/ml تعیین شد. نمونه‌ها برای انجام الکتروفورز بر روی ژل‌های ۷/۵٪، ۱۰٪ و ۱۲/۵٪ پلی آکریل آمید و با استفاده از نمونه‌هایی با غلظت‌های ۱۲/۵ µg، ۲۵ µg ۵۰ µg تحت آزمایش قرار گرفت و در نهایت بهترین نتیجه آزمایش در ژل با غلظت ۱۰٪ و نمونه با غلظت ۲۵µg حاصل شد (۷، ۸). در آزمایش SDS-PAGE مقدار ۵ µl از هر یک از نمونه‌ها را با مقدار مساوی بافر نمونه (واجد 2ME) مخلوط نموده، برای مدت ۳-۵ دقیقه در آب جوش قرار داده تا دترژنت SDS سبب ایجاد شارژ منفی یکنواخت در پروتئین دناتوره شده و 2ME نیز سبب شکستن باندهای S-S احتمالی در زنجیره گردد (۹، ۲۸) و چاهک ایجاد شده در ژل با نمونه نهایی پر(غلظت ۲۵ µg ) و همچنین در حفره اول سمت چپ از نشانگر استانداری پروتئینی Gibco- Rpl-۲۶۰۴۱-۰۲۰ با وزن مولکولی ۱۴kd تا ۲۰۰kd استفاده شد.پس از پایان الکتروفورز(برای ۱۲ دقیقه در ۱۷میلی آمپر و ۱۰۵ دقیقه در ۲۰ میلی آمپر جریان الکتریسته مستقیم برقرار شد)، ژل از ستون خارج شده و برای مدت ۳۰ دقیقه ژل را در داخل رنگ کوماسی و سپس برای مدت ۴۸ ساعت در اسید استیک ۱۰٪ قرار داده تا باندهای پروفیل پروتئینی مشخص شود (۸، ۲۸).

برای انجام PAGE در آزمایش MLEE، مقدار ۵ µl از هر یک از نمونه‌ها با مقدار مساوی بافر نمونه (که فاقد SDS و ME[2] است) مخلوط و بلا فاصله در حفرات ژل قرار داده و جریان الکتریسیته مشابه SDS-PAGE برقرار شد.در صورتیکه منظور از الکتروفورز انجام MLEE بود، پس از تهیه بافر حاوی سوبسترا، ژل را در داخل آن قرار داده و برای مدت ۴۵ دقیقه مجموعه را در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری نموده، با توجه به وجود معرف‌های رنگزای PMS[4] و NBT[5] چنانچه واکنش سوبسترا و آنزیم تحت مطالعه مثبت باشد، در محل واکنش باند/باندهای به رنگ بنفش مایل به آبی رویت می‌شود (۲۳، ۲۷).

به طور خلاصه در جدول شماره ۱ سیستم‌های آنزیمی‌تحت مطالعه، سوبسترا‌ها، بافر ، کوآنزیم و کوفاکتور مورد استفاده در آزمایش MLEE بر روی سروتیپ‌های 4a و *L. monocytogenes* 4b ارائه شده است به منظور کنترل فرایند آنزیمی، برای سیستم‌های آنزیمیG6PD و LDH ازکنترل مثبت استفاده شد..

## نتایج و مشاهدات

در آزمایش SDS-PAGE بیشترین تراکم باندهای پروتئینی در منطقه ۹۷ کیلو دالتون تا ۱۴ کیلو دالتون مشاهده شد بر خلاف سروتیپ4b، در سروتیپ4a بین منطقه ۱۸ کیلو دالتون تا ۱۴ کیلو دالتون

جدول شماره ۱:سیستم‌های آنزیمی‌استفاده شده و کوفاکتور و کوآنزیم مربوط به هر آنزیم

| :Enzymes | LDH[1] | GLDH[2] | G۶PD[3] | GaLDH۴ | ۶PGDH۵ | ME۶ | GPI۷ | AP[8] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| :Substrates | Ca.Lactate | D-Glucose | D-Glucose 6- phosphat | D-Galactose | ۶-Phospho-gluconicacid | Malic acid | Glucose ۱phoph | parnitro pheanil phos. |
| Buffer | Tris-* Glycin (TG۹) | T.G | T.G | T.G | T.G | T.G | T.G | T.G |
| Cofactor | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ | $Mg\ cl_2$ |
| Coenzyme | NAD** | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD | NAD |

۱.Lactate dehydrogenase ۲.Glucose dehydrogenase ۳.Glucose- ۶- phosohate dehydrogenase ۵-Galactose dehydrogenase ۵. Phosphogluconate dehydrogenase ۶-Malic enzyme ۷-Glucose phosphate isomerase ۸-Alkaline phosphatase

* Tris-glycerin buffer prepared as: ۳,۰۳ g Tris Hcl (PH=۸,۳)+۱۴,۴ g Glysin + ۱۰۰ ml Distilled water

تراکم پروفیلی قابل مشاهده بود. همچنین در سرو تیپ ۴a در منطقه ۲۹ کیلو دالتون تا ۱۸ کیلو دالتون، تعداد پنج پروفیل پروتئینی متراکم و دو پروفیل پروتئینی ظریف قابل مشاهده بود در حالیکه در سروتیپ ۴b در منطقه مذکور فقط سه پروفیل پروتئینی متراکم و سه پروفیل پروتئینی ظریف قابل رویت بود. در منطقه ۶۸ کیلو دالتون در سروتیپ ۴a دو پروفیل پروتئینی متراکم‌تر از سروتیپ ۴b دیده می‌شد.

در آزمایش MLEE در مجموع در ۸ سیستم آنزیمی‌تحت مطالعه، تعداد ۲۸ ایزوزیم مشاهده شد که تعداد ۱۵ ایزوزیم مربوط به سروتیپ ۴a و تعداد ۱۳ ایزوزیم مربوط به سروتیپ ۴b بود سیستم‌های آنزیمی AP،GPI،ME،۶PGDH،GaLDH،G۶PD،GLDH،LDH به ترتیب درسروتیپ ۴a و۴b تعداد ۱و۱، ۲ و۱، ۲و۲، ۱و۲، ۲و۲، ۴و۲، ۲و۲، ۱و۱ باند ایزوآنزیمی (الکترومورفس) مشاهده شد بنابراین سیستم‌های آنزیمی GaLDH, GLDH و ME در بین دو سروتیپ فعالیت متفاوتی را نشان داد.در سه سیستم آنزیمی‌مذکور علاوه بر تفاوت در تعداد ایزوآنزیم‌ها، در ضخامت باند، حرکت الکتروفورتیکی باند در طول ژل و تراکم باند تفاوت وجود داشت. در سیستم آنزیمی ۶PGDH نیز محل استقرار باند دوم در دو سروتیپ متفاوت بود جدول ۲ به اختصار نتایج آزمایش الکتروفورز ایزوآنزیم‌های مختلف در سطح ژل پلی آکریل آمید را نشان می‌دهد.

**تراکم باند:** به شدت رنگ باند پس از انجام واکنش سوبسترا با آنزیم/ ایزوآنزیم در حضور معرف‌های رنگ زای الکترون گیرنده گفته می‌شود، شدت رنگ از کم به زیاد به صورت بسیار کمرنگ (VF=Very faint)، کمرنگ(F=Fient)، متوسط(M=Moderate) ، متراکم(D=Dens) و بسیار متراکم(VD=Very dens) تقسیم بندی شده است.

**حرکت الکتروفورتیکی باند:** به طول حرکت باند یا الکترومورفس در ژل نسبت به کل طول ژل گفته می‌شود. در تمام موارد طول ژل ۷۵ میلی متر بوده است.

## بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس نتایج این تحقیق با استفاده از SDS-PAGE می‌توان جدایه‌های مختلف *L. monocytogenes* را در حد گونه و تحت تیپ از یکدیگر جدا نمود، زیرا SDS-PAGE وضعیت پراکندگی و تراکم پروتئین‌های سازنده لیستریا تحت مطالعه را به خوبی و با وضوح بالا نشان می‌دهد و چون پادگن‌های باکتری عمدتاً دارای ماهیت پروتئینی هستند، لذا براساس آنالیز پروتئین‌ها و بسته به کیفیت پروفیل پروتئینی قدرت آنتی ژنسیتی ارگانیزم قابل بررسی است و با جدا سازی قطعات ژل مربوطه می‌توان پروتئین مورد نظر را شناسایی و بر علیه آن پادتن اختصاصی تهیه کرد (۲۰، ۲۸). با بررسی پروفیل پروتئینی لیستریاها می‌توان انواع سروتیپ را از یکدیگر تفریق نمود. در مطالعه حاضر نیز مناطق ۲۹، ۱۸ و ۶۸ کیلو دالتون دارای بیشترین ارزش برای تفریق سروتیپ ۴a و ۴b بود.

در یک مطالعه جدایه‌های مختلف *L. monocytogenes* با استفاده از PCR و SDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت که در نتیجه هر دو روش جدایه‌های مختلف را در دو گروه مجزا و مشابه تفریق نموده و در عین حال روش SDS-PAGE برای بررسی تحت تیپ‌ها توصیه گردیددر این روش مشخص شد که پروفیل پروتئینی *L. monocytogenes* در مقایسه با سایر گونه‌های لیستریا متفاوت است ودر بین سرووارهای مختلف این گونه بیشترین تفاوت در بین سروتیپ‌های ۲a/۱ و۴b بود البته پروتئین‌های پادگن‌های سطحی در تمام سروتیپ‌ها ی *L. monocytogenes* مشابه بود که تماما در منطقه ۶۸-۶۴ کیلو دالتون واقع بود و در ادامه با کمک روش‌های ایمیونوشیمی مشخص شد که باندهای منطقه ۹۸-۶۸ کیلو دالتون نماینده پروتئین‌های مسئول ویرولانس این باکتری *L. monocytogenes* است (۲۸).

جدول ۲: به طور خلاصه نتایج آزمایش MLEE نشان داده شده است.

| سیستم آنزیمی کیفیت | تعداد باند | | صخامت باند | | * حرکت الکتروفورتیکی باند | | * تراکم باند | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Enzymes inL. m | ۴a | ۴b | ۴a | ۴b | ۴a | ۴b | ۴a | ۴b |
| LDH | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱/۷۵ | ۱/۷۵ | M | M |
| GLDH | ۲ | ۱ | ۱,۲ | ۱ | ۲/۷۵،۶۷/۷۵ | ۱/۷۵ | M,D | F |
| G۶PD | ۲ | ۲ | ۱,۲ | ۱,۲/۵ | ۱/۷۵،۷۳/۷۵ | ۱/۷۵،۷۳/۷۵ | M,VD | M,VD |
| GaLDH | ۱ | ۲ | ۱ | ۱,۴ | ۱/۷۵ | ۱/۷۵،۶۸/۷۵ | D | D,M |
| ۶PGDH | ۲ | ۲ | ۱,۱ | ۱,۱ | ۱/۷۵،۶/۷۵ | ۱/۷۵،۳/۷۵ | VD,F | VD,F |
| ME | ۴ | ۲ | ۱,۲,۲,۱,۵ | ۱,۲ | ۱/۷۵،۲/۷۵ ۴۹/۷۵،۷۰/۷۵ | ۱/۷۵،۴۵/۷۵ | VD,F,VD,M | F,M |
| GPI | ۲ | ۲ | ۱,۱,۵ | ۱,۱/۵ | ۱/۷۵،۴/۷۵ | ۱/۷۵،۴/۷۵ | D,M | D,M |
| AP | ۱ | ۱ | ۱ | ۱ | ۱/۷۵ | ۱/۷۵ | VF | VF |

* تراکم باند: به شدت رنگ باند پس از انجام واکنش سوبسترا با آنزیم/ایزوآنزیم در حضور معرف‌های رنگ زای الکترون گیرنده گفته می‌شود، شدت رنگ از کم به زیاد به صورت بسیار کمرنگ(VF=Very faint)، کمرنگ(F=Faint)، متوسط(M=Moderate) ، متراکم(D=Dens) و بسیار متراکم(VD=Very dens) تقسیم بندی شده است.
حرکت الکتروفورتیکی باند:به طول حرکت باند یا الکترومورفس در ژل نسبت به کل طول ژل گفته می‌شود.در تمام موارد طول ژل ۷۵ میلی متر بوده است.

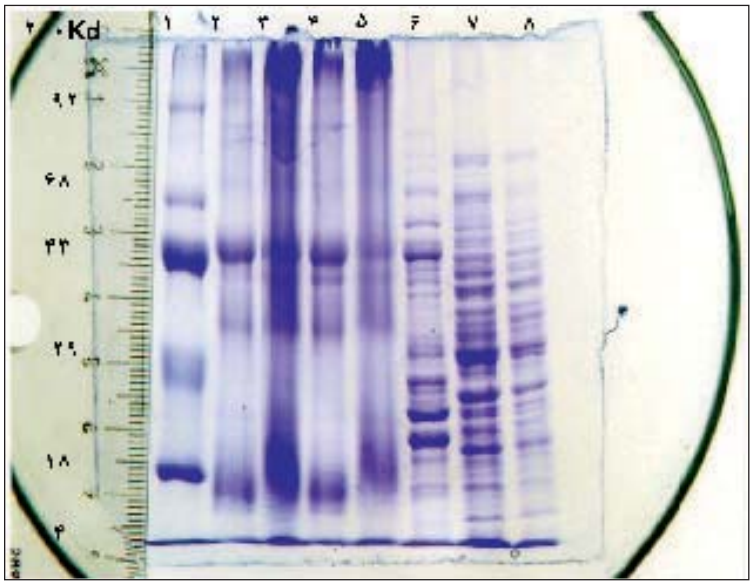
Pierre در SDS-PAGE بهتریـن نتایج بررسـی *L. monocytogenes* را روی ژل ۱۰٪ بـه دسـت آوردنـد(۲۰). در مطالعه دیگری بـرای تعیین هویت عامل ایجاد عفونت منتقله توسـط شـیر پاسـتوریزه در کره جنوبی از ۵۰ نمونه شـیر لیستریا مونوسیتو ژنز جدا شد که ۹۰٪ آلودگی‌ها توسط سروارهای ۴a و ۲b به دست آمد (۳).

در آزمایش MLEe روی لیسـتریا مونو سـیتوژنز، سیستم‌های LDH, G۶PD,۶PGDH و PGI(GPI) در مطالعات قبلی نیز استفاده شده بود (۱۰) ولی سیستم‌های آنزیمی AP، GaLDH، GLDH و ۶PGDH برای اولین بار در این مطالعه تحت بررسـی قرار گرفت و فعالیت سیسـتم‌های آنزیمی‌در ایـن تحقیق با مطالعـات قبلی همخوانی داشـت. همچنیـن در مطالعات قبلی بیشـتر از ژل نشاسته یا سـلوژل یا ژل تیتان استفاده شده بود (۱۰) حـال آنکه دراین مطالعه ژل پلی آکریل آمید۱۰٪ که دارای منافذ بسـیار ریزتری می‌باشد بکار رفت. سیستم بافری TG نیز در مطالعات قبلی روی *L. monocytogenes* تجربـه نشـده بـود. بـر اسـاس نتایـج با اسـتفاده از آزمایـش MLEE می‌تـوان سـروتیپ‌ها و سـویه‌های مختلـف *L. monocytogenes* را (و نیـز گونه‌های مختلف جنس لیسـتریا) را از هم تفریـق نمود این تفریق با حساسـیت و ویژگی بالایی بـوده و کوچکترین تفـاوت در ژنوم را معرفی می‌نماید. در مطالعه حاضـر نیز تفریق دو جدایه (سروتیپ) 4a و4b با این روش انجام گرفت (۱۰، ۲۳)

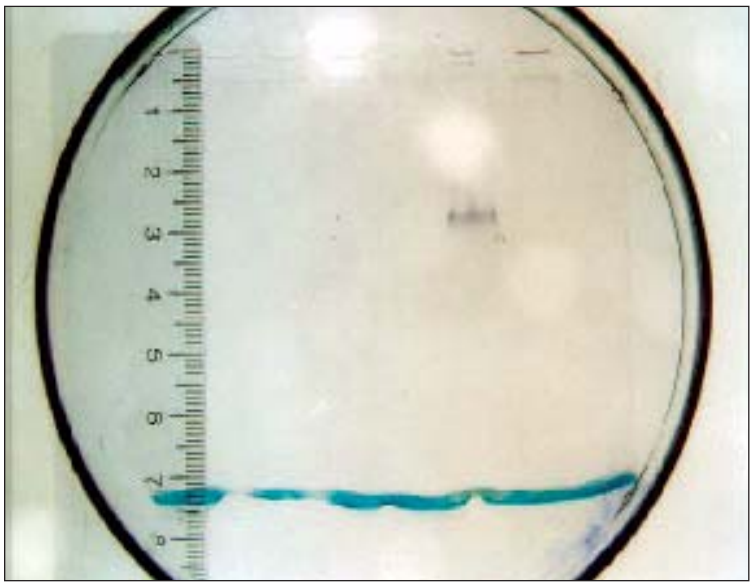
Dominique و همـکاران از MLEE بـرای شناسـائی انـواع *L. monocytogenes* بیماریـزا قابـل انتقال توسـط غـذا از روش MLEE اسـتفاده نمود. در این مطالعه ۸۰ سـویه بررسـی شد و با اسـتفاده از ۸ تا ۲۳ سیسـتم آنزیمی‌تعداد ۱۴ تا ۱۵ الکترومورفس مشـاهده شـد. ایشان خاطرنشان نمودند که در ۱۵ سال گذشته برای مطالعات ساختمان ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی گونه‌های باکتری‌ها اسـتفاده شده است.و با توجه به اینکه در MLEE ژنوتیپ‌های مولتی لوکوس مورد اسـتناد واقع می‌شوند در واقع ژنوم کروموزمی تمام جدایه‌ها بررسـی می‌شوند.همچنین با استفاده از این روش ۴۵ الکتروتیپ، در۱۷۵ جدایه *L. monocytogenes* مشـخص شـده اسـت که در نهایت معلوم شـد ۲/۳ موارد بیماری در انسان و دام ناشی از دو کلون مشابه و نزدیک به هم گونه *L. monocytogenes* بوده است ایشان قدرت تفریق MLEE را ۰/۹۲۵ تا ۰/۸۲۵ ارزیابی نموده و نشان دادند که حرکت آنزیم در ژل یا کیفیت الکتروموفرسی آن تابع شرایط کشت باکتری تحت مطالعه نمی‌باشد(۱۰).با روشMLEE می‌توان رابطه آنتی ژنیکی بین گونه‌ها و سـویه‌های مختلـف را معرفی و طبقه‌بندی ارگانیزم‌هـا را انجام داد(۱۰و۲۸).

مکانیزم‌هـای بیوشـیمیایی متعددی تشـکیل ایزوآنزیم‌هـا را توجیه می‌کنـد، از آن جملـه تغییرات پـس از ترجمه[۶]، آنزیم‌هـای هترومولتی مریک[۷]، ژنهای چند سـاختمانی با فعالیت مشـابه[۸]، ایزوآنزیم‌های فضائی[۹] و تفاوت در واکنش و فعالیت کوفاکتورها هسـتند؛ به علاوه ممکن اسـت یـک آنزیم در شـرایطی در یک باکتری فعال و درشـرایطی دیگر غیرفعال باشـد که دلایل اصلی آن عبارتسـت از تفاوت در تعداد ارگانیزم رشد کرده در آبگوشـت، پایدار ماندن آنزیم در طی مراحل استخراج و میزان فعالیت آنزیم در شرایط تحت مطالعه می‌باشد (۱۷).

تاکنـون مطالعات زیادی براسـاس آنالیز الکتروفـورزی ایزوآنزیم‌ها یا مولتـی لوکـوس آنزیـم الکتروفـورز (MLEE) انجام پذیرفته اسـت، این تکنیک را می‌توان با انتخاب سیستم‌های آنزیمی‌اختصاصی در ارگانیزم، در بافت آلوده شده با ارگانیزم تحت مطالعه انجام و ماهیت پاتوژن را مشخص کرد (۷، ۱۷). براسـاس بررسـی منابع مطالعه الکتروفورزی ایزوآنزیم‌ها در




**تصویر۱: نتایج SDS-PAGE، در ستون اول نشانگر پروتئینی استاندارد Gibco از بالا به پایین به ترتیب مقادیر ۲۰۰، ۹۲، ۶۸، ۴۳، ۲۹، ۱۸ و ۱۴ کیلو دالتون را نشان می‌دهد. ستون‌های ۲ الی ۶ مربوط به این مقاله نبوده و ستون ۷ پروفیل پروتئینی سروتیپ 4a و ستون ۸ پروفیل پروتئینی سروتیپ *L. monocytogenes* 4b را نشان می‌دهد.**



**تصویر ۲: حرکت ایزوآنزیم‌ها در سیستم آنزیمی GPI با رنگ قرمز مایل به بنفش در ژل مشخص است**

ابتدا روی مایکوپلاسماها و آکلوپلاسماها انجام پذیرفته است، پس از آنها، این روش برای مطالعه تفاوت‌های ژنتیکی، ژنتیک پلی مورفیسم و نیز تفریق بین گونه‌ای و داخل گونه‌ای (تیپ، تحت تیپ‌ها) و نیز وقوع تنوع اپیدمیولوژیکی در انواع باکتری‌ها، اسپیروکت‌ها، تک یاخته‌ها، قارچ‌ها، انگل‌های کرمی، کشت‌های سلولی و تیره‌های سلولی گیاهی و جانوری و حتی شناسائی واریته‌های مختلف گیاهی و حیوانات آزمایشگاهی استفاده شده است، این روش در حال حاضر از روش‌های معتبر در شناسائی تک یاخته‌ها و باکتری‌ها نزدWHO به حساب می‌آیدو به عنوان روش رفرانس معرفی می‌گردد (۷، ۱۴، ۱۷، ۲۴، ۲۷، ۲۸)، همچنین در مطالعات مولکولار اپیدمیولوژی و تعیین منبع آلودگی در موارد زیادی روش MLEE، نتایج مشابه یا اختصاصی تر از سایر روش‌های مولکولی مانند RAPD، PFGE، PCR، RFLP، REA، ریبوتایپینگ، ایمنوبلات و انواع روش‌های سروتایپینگ، الیزا، فاژ تایپینگ داشته است (۷، ۸، ۱۷، ۱۸).

Schultz در سال ۱۹۸۹، با استفاده ازIEE به راحتی تفاوت‌های بین انواع هیبریدهای *E. coli*، شیگلا و سالمونلا که برای واکسن سازی تهیه شده بود را با سرعت و ویژگی بالائی نشان داد و گزارش کرد که انواع باکتری پاتوژن را می‌توان ازانواع غیر پاتوژن آن بصورت جدا گانه طبقه‌بندی نمود، وی استفاده از این روش را در شناسائی انواع کریپتوکوکوس، بوردوتلا، سالمونلا، هموفیلوس و آمیب‌ها را اشاره می‌نماید (۲۴).

Yarkus و همکاران با استفاده از الکتروفورز ایزوآنزیم‌ها توانستند جدایه‌های مختلفی از *Mycobacterium avium* (عامل سل مرغی) را در افراد مبتلا به ایدز جداسازی کنند (۳۲).

Patton و همکاران ۱۰ روش از جمله MEE (IEE) را برای تشخیص اپیدمیولوژیکی سویه‌های کمپیلوباکتر استفاده کردند و در نهایت از میان REA، سروتایپینگ، سوترن بلات[۱۰]، ریبوتایپینگ، بیوتایپینگ، فاژتایپینگ، آنالیز پلاسمید حساسترین و بهترین نتایج مربوط به REA، MEE بود (۲۰).

Whitham و همکاران شباهت‌های بین سویه‌های مختلف *E. coli* عامل اسهال نوزادان را بوسیله آنالیز ایزوآنزیم‌ها و سرولوژی بررسی نمودند که در نتیجه بیشترین سویه را ۰۵۵: H۷ معرفی نمودند (۳۱).

Helmuth و Schoeter انواع جدایه‌های *Salmonella entritiolis* را به روش‌های MLEE، RFLP، آنالیز پلاسمید و LPS و بررسی DNA مطالعه نمودند (۱۱).

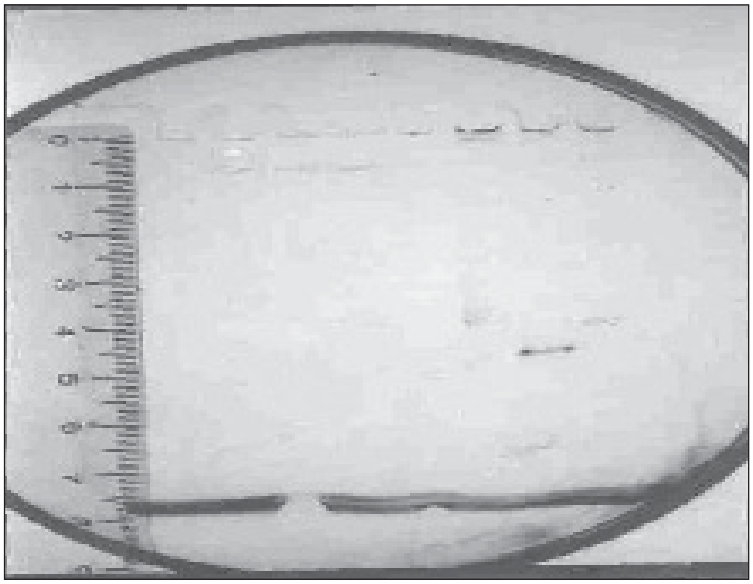
Maslow و همکاران (۱۹۹۵) ۱۸۷ کلنی سویه‌های مختلف *E. coli* جدا شده از گردش خون بیماران را با روش‌های MLEE، ریبوتایپینگ بررسی و نتایج مشابهی در این دو روش به دست آوردند (۱۵).

Pearce و همکاران در تفریق انواع *Prevotella nigrescense* بوسیله MLEE، Rea و ریبوتایپینگ بهترین نتیجه را از MLEE به دست آوردند (۱۹).

Tomayko و Murray جدایه‌های مختلف *Entrococcus faecalis* را توسط MLEE و PFGE تحت مطالعه قرار دادند که در نهایت MLEE تعداد جدایه‌های متنوع تری را نسبت به PFGE معرفی کرد (۲۹).

Leaves و همکاران با کمک MLEe مطالعه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی انواع *Haemophilus influenza* را انجام

تصویر ۳: وضعیت ایزوآنزیم‌ها در سیستم آنزیمی G۶PD را در تصویر برداری با ژل داکیومنتور نشان می‌دهد.ستون‌های۱ تا ۵ مربوط به این مقاله نبوده و ستون‌های ۶، ۷ و۸ به ترتیب مربوط سروتیپ ۴a و ۴b و *L. monocytogenes* کنترل مثبت می‌باشد



تصویر ۴: وضعیت ایزوآنزیم‌ها در سیستم آنزیمی ME را در تصویر برداری با ژل داکیومنتور نشان می‌دهد. ستون‌های ۱ تا ۵ مربوط به این مقاله نبوده و ستون‌های ۶ و ۷ به ترتیب مربوط سروتیپ ۴a و۴b و *L. monocytogenes* می‌باشند.

دادند (۱۲ ).

Pupo و همکاران با کمک MLEE مشاهده نمودند که از نظر ژنتیکی اساساً انواع سویه‌های پاتوژن و غیرپاتوژن *E. coli* با همدیگر متفاوت بوده و در دو گروه مجزا قرار دارند (۲۱ ).

Amonsim و همکاران مطالعه مولکولار اپیدمیولوژی ۵۵ جدایه *Omithobacteriumr hinotracheale* جدا شده از طیور را به روش MLEE و PCR بررسی نمودند که هر دو روش ۶ سویه از باکتری را معرفی کردند (۲).

Lecointre و همکاران مولکولار فیلوژنی جدایه‌های *E. coli* را توسط روش‌های MLEE، PAPD و RNA RFLP r مطالعه نمودند (۱۳).

Blackale و همکاران روش‌های MLEE و ریبوتایپینگ تنوع ژنتیکی سویه‌های مختلف *Pasteurella multocida* جدا شده از طیور را بررسی کردند و در هر دو روش نتایج مشابهی به دست آوردند (۶).

Sikorski و همکاران سویه‌های مختلف پزودموناز جدا شده از دریا، فاضلاب، خاک و نمونه‌های بالینی را بوسیله MLEE و PCR برای تعیین تفاوت‌های ژنوتیپی بین فنوتیپ‌های مختلف باکتری بررسی کردند (۲۲).

Beltran و همکاران تنوع ژنتیکی انواع جدایه *Vibrio cholerae* را بوسیله MLEE تحت مطالعه قرار دادند و ۲۷۹ تیپ الکتروفورتیکی تشخیص دادند که قابل تفکیک به دو گروه بزرگ I و II بودند (۴).

استفاده از MLEE برای شناسائی ژنتیکی قارچها نیز توسط Bertout و همکاران و Rodriguez و همکاران انجام پذیرفته است. این محققان به ترتیب مولکولار اپیدمیولوژی انواع *Cryptococcus neoformans* (۵) و *Aspergillus fumigatus* را مورد مطالعه قرار دادند (۲۲).

Shah و همکاران استفاده از روش MLEE را برای مطالعه پلی مورفیسم آنزیم‌ها در تنوع ژنتیکی باکتری‌های بی هوازی مطرح نموده اند و یادآوری نموده اند که فعالیت آنزیم در واقع مدت نحوه فعالیت متابولیکی و شاخص ژنوم باکتری است. لذا MLEE روش مناسبی برای تشخیص گونه، تحت گونه و سویه باکتری‌هاست و نحوه انجام MLEE و نمونه‌هائی از الکترومورفس یا زیموگرام‌های به دست آمده از کار روی باکتریوایدس، پری وتلا، فوزباکتریا و پپتواستریتوکوکوس را نشان داده اند (۲۳).

Silveria و همکاران با استفاده از آنالیز ایزوآنزیم‌ها و ریبوتایپینگ انواع سویه‌های *E. coli* جدا شده از طیور با علائم تورم سر[۱۱](SHS) و التهاب بند ناف و نیز پرندگان سالم را تحت مطالعه مولکولی قرار دادند و در نهایت مشخص شد که نتیجه MLEE در تشخیص انواع *E. coli* بهتر از r-RNA-RFLP می‌باشد و آنالیز ایزوآنزیم‌ها در جدایه‌های مختلف توانست تفاوت را بین آنها نشان دهد، همچنین از مقایسه نتایج MLEE در بین انواع *E. coli* پاتوژن و غیر پاتوژن (جدا شده از پرندگان سالم) معلوم شد که بین پیشینه ژنتیکی و اپیدمیولوژیکی باکتری و بیماریزایی آن رابطه مستقیم وجود دارد و لذا می‌توان حتی در یک سویه انواع پاتوژن را از انواع غیرپاتوژن جدا طبقه‌بندی نمود (۲۴، ۲۶ ).

Nabinejad و همکاران با استفاده از این روش مایکو

پلاســماهای پاتوژن طیور را از هم تفریق و سویه‌های مختلف را شناسایی نمودند(۱۶).

مولتی لوکوس آنزیم الکتروفورز، روش مناسب و مقرون به صرفه ای برای پــی بردن به ماهیت آنزیمی و ایزوآنزیمی باکتری‌ها و ارگانیزم‌های واجد انواع آنزیم دخیل در متابولیزم یا تکثیر و... می‌باشد(۱۶)، انتخاب نوع آنزیم بر اساس نوع متابولیزم ارگانیزم نقش و تاثیر زیادی در تفریق تحت تیپ‌ها داشته و حتی با این روش می‌توان اعضاء یک کلون از باکتری که فقط در شــرایط نگهداری و نوع تغذیه از هم متفاوتند( به دلیل توسعه سیستم‌های آنزیمی‌مختلف برای اســتفاده از مواد مغذی و شــرایط مختلف)، را از یکدیگر تفریــق نمود که این پتانسیل را در دیگر تکنیکها کمتر می‌توان یافت، به هر حال تکنیک MLEE به دلیل دارا بودن بخش زیادی از محاســنی که لازمه یک تکنیک تشخیصی خوب است، نیاز به معرفی بیشتر دارد که هدف اصلی این مقاله و کارهای مشابه عــلاوه بر گزارش کاربردهای علمی‌و تحقیقی این تکنیک، معرفی و ترویج آن در قیاس با سایر روش‌های مطرح می‌باشد (۷، ۱۶، ۱۷، ۲۳) چنانکه مشاهده شــد در این مطالعه نیــز تفاوت‌های پروتیینــی و آیزوآنزیمی دردو ســروتیپ *L. monocytogenes* جدا شــده از مواد لبنی آلوده به روش SDS-PAGE و MLEE (در کنار کنترل آنزیمی‌و نشانگر) معرفی گردید.

## پاورقی‌ها

1 -Sodium dodecyl sulfate poly acrylamid gel electrophoresis

2 -Isoenzyme electrophoresis=Multi locusenzyme electrophoresis

3 -Polyacrilamid gel electrophoresis

4- Phenazine methasulfate

5-Nitroblue tetrazolium

6-Posttranslational enzyme modification

7-Heteromultimeric enzymes

8 - Multiple structural genes for enzymes with the same activities

9 -Conformatinal isoenzyme

10-Southern blot

11- Swellen head syndrom

## منابع مورد استفاده


۱- وند یوسفی، ج.، ؛ مرادی بیدهندی، س،۱۳۷۱؛ بررسی *L. monocytogenes* در شیر خام و پاستوریزه در ایران، پژوهش و سازندگی، شماره ۱۷؛ص:۶۵-۵۷.

2- Amonsin, A; Wellhan, JF; Li LL; Vanamme, P; Lindemn, C; Edmano, M; Robinson RA and Kapur, V, 1997; Molecular epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale*; J. Clin. Microbiol. 35: 2894-98.

3- Ha,K-s,Park S-J,Seo SJ,Park J-H,Chung D-H,. 2002: Incidence and polymerase chian reaction assay of *Listeria monocytogenes* from raw milk in Gyeognam province in Korea., Vol. 65, No. 1 PP: 111-118.

4- Beltron, P; Delgado, G; Navorro, A; Trujillo, F; Selander, RK. and Cravioto A; 1999; Genetic diversity and population structure of *Vibro cholerae*. J. Clin. Microbiol. 37(3): 581-90.

5- Bertout S. Renaud F. Swinne D. Mallie M. Bastide JM. 1999; Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: Taxonomy and gentic structure, J. Clin. Microbiol. 37 (3): 715-20.

6- Blackall, PJ; Fegan, N; Chew, GT. and Hampson, DJ. 1998; Population structure and diversity of avian isolates of *Pasteurella multocida* from Australia. Microbiol. 144(pt2): 279-89.

7- Boerlin P.1997; Applications of mutilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology J. Microbiol. Methods. 28 (3): 221-231.

8- Bollag D.M.,Edelstein S.J.1991; Protein methods, Wily-liss publication, Newyork,pp:150-197.

9-Cliver, D.O, 1990; Food borne disease, Academic press, INC., Harcourt Braco jovano vich,publishers;pp:248-256.

10-Dominque A.,C. Fraser E.,Ashton,. William F.B,mPatrick B.,William DS.,Christopher L.,Arthur G.,Joseph H.,Birig N., 1996; Mullti locus enzyme electrophoresis for characterization of *Listeria monocytogenes* isolates: Results of an international comparative study.;Internationmal Journal of Food Microbiology, 32,301-311.

11- Helmuth R. Schroeter A. 1994; Molecular typing methods for *S. enteritidis* Internation. LJ. Food Microbiol. 21 (1/2) 69-77.

12- Leaves N. Sisson PR. Freeman R. Jordens JZ. 1997; Pyrolysis mass spectrometry in epideniological and population genetic studies of *Haemophilus influenzae*. J. Med. Microbiol. 46(3): 204-207.

13- Lecointre G. Rachdi L. Darlu P. Denamur E. 1998; *Escherchia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol. Biol. Evol. 15 (12): 1685-1695.

14- Leon AJ. Lee M. Ruferier CK. Berry ST. Mowers RP. 1997; Genetic mapping of a locus (hyp) affecting seed hypodermis color in sunflower (1997); Crop. Science. 36(6): 1666-1668.

15- Maslow JN. Whittam TS. Gilks CF. Wilson RA. Mulligan ME. Adams KS. Arbeit FD. 1995; Clonal relationships among blood stream isolates of *Escherchia coli*. Infect. Immun 63 (7) 2409-2417.

16- Nabinejad,A.R.,Dadras,H.,Hoseini S.M.S., 2003; Evaluation of isoenzyme patterns for identification of pathogenic poultry mycoplasmas, Iranian Journal of Veterinary Research(IJVR),No3, Serial 13.pp:31-39.

17-O'Brien, SJ; Simonson, JM; Grabowski, MW, Marino, W and Barile, MF, 1981; Analysis of multiple isoenzyme expression among twenty two species of Mycoplasma and Acholeplasma. J.bacteriol. 146: 222-232.

18-Patton, CM; Wachsmuth, IK; Evins GM; Kiehlbauch, JA; Plikaytis, BD; Troup, N; Tompkins, L and Lior H, 1991; Evaluation of 10 methods to distinguish epidemic associated

campylobacter strains. J.Clin. Microbiol. 29(4): 680-88.

19- Pearce MA. Dixon RA. Gharbia SE. Shah HN. Devine DA. 1996; Characterization of *Preuoteza intermedia* and *prevotella nigrescens* by enzyme production, restriction endonuclease and ribosomal RNA gene restriction analysis. Oral. Microbiol Immunol. Vol. 11(3): p: 135-141.

20-Pierres Steffen,Dorothy A. S,Violaine D.,Edith G.,John A.C. And Pacale C. 2000; *Listeria monocytogenes* ActA protein interacts with phosphate *in vitro*. Cell motility and the cytoskeleton 45:58-66.

21- Pupo, GM; Karaolis, DK; Lan, R and Reeves, PR. 1997; Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and mdh sequence studies. Infect. Immun. 65(7): 2685-92.

22- Rodriguez E. Symoens F. Mondon P. Mallie M. Piens MA. Lebeau B. Tortorano AM. Chalib F. Caylotti A. Villard J. Viviani M. Chapuis F. Nolard N. Grillot R. Bastide JM. 1999; Combination of three methods for the molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* infection. J. Med. Microbiol. 48, (2): 181-194.

23- Shah NH. Gharbia SE. Rajendram D. Ulger TN. 2000; Multilocus enzyme electrophoresis as a tool for studies of enzyme polymorphism and genetic diversity of anaerobic bacteria; Anaerobe (6) 117-19.

24- Schultz C. 1989; Isoenzyme analysis of typhoid shigella and escherchia- shigella hybrid vaccines and their paretal strains, J. Clin. Microbiol. Dec. p: 2838-2841.

25- Sikorski, J; Rossell, MR and Lorenz, MG. 1999; Analysis of genotypic diversity and relationships among *Pseudomonas stutzeri* strains by RCR- based genomic fingerprinting and multilocus enzyme electrophoresis. Systemic & Appl. Microbiol. 22(3): 393-402.

26- Silveria WD. Lancelloffi M. Ferreira A. Solferini VN. 2003; Determination of the clonol structure of avian *Escherchia coli* strains by isoenzyme and Ribotyping. Analysis, J. Vet. Med. B, 50 (2): 63-73.

27- Smith AA. Vanderbank HF. 2001; Isozyme and allozyme markers distinguishing two morphologically similar, medically important mastomys species (*Rodentia muridae*). BMC Genetics,2:15,1-10.

28-Tabouret M.,Rycke deJ., and Dubray G. 2003; Analysis of surface proteins of listeria in relation to soecies, serovar and pathogencity, Journal of General Microbiology, 138(4) 743-753.

29- Tomayko, JF and Murray BE; 1990; Analysis of *Enterococcus faecalis* isolates from intercontinent sources by multilocus enzyme electrophoresis and pulsed field- gel electrophoresis. J.Clin.Microbiol. 33(11): 2903-7

30- Uphoff CC. Giganc SM. Drexler HG. 1992; Mycoplasma contamination in human leukema cell liness. Comparsion of various detection methods. J. Immunol. Methods 149: 49-53.

31-Whittam TS. Wolfe ML. Wachsmuth LK. Orskovi, Wilson RA.1993; Clonal relationships among *Escherchia coli* strains infantil diarrhea. Infect. Immun. 6(5): 1619-1629.

32-Yarkus,M.,Reeves M. 1990; Characterization of *Mycobacterium avium* complex isolates from AIDS patients by multilocus enzyme electrophoresis; Abst. Annu.meet. am. Soc. Microbiol.,13-17,90-145.