تازه‌های بیوتکنولوژی سلولی – ملکولی
دوره پنجم، شماره هفدهم، زمستان ۱۳۹۳

Research Article
مقاله تحقیقی

تشخیص پارامترهای مؤثر در عفونت‌های پوستی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک با روش PCR

کسری بهروزنسب[۱] ، محمد رضا رضوی[۲]، فتح الله فلاحیان[۳]، حسن صیرفی[۴] ، طاهرنژاد ستاری[۵]

۱. *مربی، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*
۲. . استادیار، گروه انگل شناس، انستیتو پاستور ، تهران، ایران
۳. استاد، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۴. . استاد، گروه پوست، بیمارستان فوق تخصصی رازی، تهران، ایران
۵. دانشیار، گروه زیست شناسی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: عفونت‌های پوستی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از یک منشأ محیطی بوده و از طریق زخم‌های پوستی، به داخل پوست تلقیح شده و در صورت ایمونوساپرس بودن فرد به صورت عفونت منتشره در می‌آید. PCR یک روش سریع ودقیق جهت تشخیص است.

مواد و روش‌ها: از ۵۸ نمونه بالینی به‌صورت بلوکه‌های پارافینه پوستی گرانولومایی مایکوباکتریومهای آتیپیک استفاده شد. DNA ژنومی این بلوکه‌ها استخراج و به‌مراه پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مایکوباکتریومی 16srRNAدر واکنش PCR وارد گردید.

یافته‌ها: با مشاهدهٔ ۱۸ باند مثبت PCR از ۵۸ نمونه در محدودهٔ کنترل مثبت مشخص گردید که ٪۳۱ از ضایعات جلدی گرانولومایی مشکوک، ناشی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک بوده که ٪۸۳ در مردان بوده و در ٪۷۲ زمینه‌های شغلی وجود داشته و ٪۶۶ بالای ۴۰ سال بوده‌اند.

نتیجه‌گیری: این روش می‌تواند تعداد کمی مایکوباکتریوم آتیپیک را در نمونه مورد شناسایی قرار دهد که این برتری در مزیت این روش نسبت به روش‌های پاتولوژی مرسوم نظیر رنگ‌آمیزی کشت و آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی است.

کلمات کلیدی : عفونت‌های پوستی گرانولومایی، مایکوباکتریوم‌های آتیپیک، PCR

مقدمه

مایکوباکتریوم های آتیپیک (NTM[1]) باکتری‌های فرصت طلب محیطی هستند که در طبیعت (آب، خاک) و خاک‌های مرطوب وجود دارند اسید فست هستند که طبقه‌بندی آن‌ها براساس سرعت رشد، تولید پیگمان فتوکروموژن، اسکوتوکروموژن و غیر کروموژن صورت می‌گیرد (۲۹ و ۳۱). عفونت‌های مایکوباکتریوم‌های آتیپیک عموماً شامل عفونت‌های ریوی، لنفادنیت، عفونت‌های پوستی گرانولوماتوزی و عفونت‌های منتشره (در افراد دارای نقص سیستم ایمنی) است. عفونت‌های پوستی عموماً به صورت گرانرلومای استخر شناست (۵ و ۲۳). ضایعات جلدی گرانولومایی اغلب به‌صورت پاپول بنفش رنگ، ندول در دست و پا، تاول، پلاک، زخم زیگیلی شکل، ضایعات انتشار اسپوروتریکوئیدی (گره‌ای متوالی) و آب چرکی ظاهر شده و در برخی اوقات اولسراتیو است (۲۳ و ۳).

اکثر ضایعات در طی ۳-۱ سال با بر جای گذاشتن اسکار بر جای می‌مانند. عفونت محدود به پوست است و در صورت ایمونوساپرس بودن فرد (HIV^{+} و افراد پیوندی) به صورت عفونت منتشره لنفاتیک گسترش یافته در می‌آید (۲۶).

*نویسنده مسئول : کسری بهروزنسب
پست الکترونیکی: kbehrouznasab@gmail.com
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۱۹
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۰۲

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]

تشخیص اختصاصی، دقیق و با حساسیت بالای عفونت‌های پوستی (جلدی) گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک به کمک روش‌های مولکولی نظیر PCR در مقابل روش‌های سنتی زمانبر مرسوم آزمایشگاهی نظیر رنگ‌آمیزی، کشت و آزمایشات بیوشیمیایی افتراقی و تفکیک و ضایعات جلدی گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از عفونت‌های گرانولومایی پوستی قارچی مشابه نظیر اسپوروتریکوزیس و عفونت‌های گرانولومایی جلدی انگلی نظیر لشمانیازیس، جهت درمان مناسب آنتی-بیوتیکی است (۶). رژیم درمانی مناسب جهت درمان عفونت-های پوستی گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک شامل

ریفامپین، اتامبوتول، مینوسایکلین، کلاریترومایسین، تری متوپریم ضروری است (۱۷ و ۳۰). در بیماری گرانولومای استخر شنا ناشی از م. مارنیوم (پاتوژن ماهی‌ها) ندول‌های متعدد و ضایعات انتشار گره‌ای (اسپوروتریکوزیس) در مسیر غدد لنفاوی داشته و ضایعات تجمع گرانولومایی داشته است (۲۵ و ۱۸).

PCR یک روش سریع، اختصاصی، حساس و دقیق جهت تشخیص پاتوژن‌هاست. این روش می‌تواند تعداد کمی ژنوم مایکوباکتریوم اختصاصی برای ژن‌های مایکوباکتریومی (hsp65-16SrRNA) و تأیید با روش سکانسینگ (توالی‌یابی نوکلئوتیدهای) مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را در نمونه مورد شناسایی قرار دهد (۲۷ و ۲۴ و ۶). تشخیص مولکولی با روش PCR با استفاده از طراحی پرایمرهای آتیپیک و مقایسه با توالی ژنوم ژن‌های hsp65, 16SrRAN مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در Gene Bank است (۱ ، ۱۴ و ۲۲).

روش بررسی

نمونه بلوکه‌های پارافینه بافتی پوست (۵۸ نمونه تثبیت شده با فرمالین و محصور شده در پارافین) مشکوک به عفونت‌های گرانولومایی جلدی مایکوباکتریومهای آتیپیک از مرکز پاتوبیولوژی بیمارستان رازی تهیه شد.

پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مایکوباکتریومی آتیپیک 16SrRNA و سویه استاندارد مایکوباکتریومی آتیپیک (*مایکوباکتریوم اسمگمتیس*[1] PTCC/1307) به عنوان کنترل مثبت PCR و کیت استخراج DNA الگو (ژنومی) از بلوکه‌های پارافینه و اجزاء واکنش PCR و مواد الکتروفورز ژل آگارز (بافر TAE، Loading Buffers ،Ladder Sige Marker و پودر آگارز) تهیه شد.

برنامه PCR

Primer 16srRNA $(F_1-R_1),(F_2-R)$:

Inintial Denaturation	۹۴°	۵MiN
Denaturation	۹۴°c	۴۵sec
Annealing	۶۵°c	۴۵sec
Extension	۷۲°c	۴۵sec
Final Extension	۷۲°c	۵MiN

(Denaturation, Annealing, Extension: ۳۵x)

پس از اتمام واکنش PCR, 5µLit به همراه ۱ µLit از Loading Buffer بر روی ژل آگارز ٪۲ (۲ گرم پودر آگارز در ۱۰۰ سی سی بافر TAE) با ولتاژ ۱۰۰ V به مدت ۲۵ دقیقه الکتروفورز گردیده سپس رنگ‌آمیزی ژل را به مدت ۲۰-۱۵ دقیقه در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت $0.5^{\mu gr}/_{mLit}$ قرار داده و رنگ‌آمیزی نموده و هم‌چنین از سایز مارکر (5µ Lit) ۱۰۰-۱۵۰۰bp جهت تعیین اندازهٔ باندها و کنترل مثبت (DNA استخراج شده از سویه استاندارد مایکوباکتریومی) استفاده شد و توسط دستگاه Gel Documentation بررسی و عکسبرداری می‌شود.

کاپیلری سکانسینگ یا تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات مثبت PCR (باندهای مثبت در ژل آگارز) به همراه پرایمر ها و مقایسه با ژنوم ژن‌های 16SrRNA مایکوباکتریوم‌های آتیپیک موجود در بانک ژنی (Gene Bank) حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه‌های بافتی پوستی شناسایی و تأیید شد.

یافته‌ها

پس از استخراج DNA از بلوکه‌های پارافینه بافتی پوست و استخراج DNA از سویه استاندارد مایکوباکتریومی و انجام واکنش PCR به‌همراه پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16SrRNA مایکوباکتریومی آتیپیک نهایتاً محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز گردیده و وجود مایکوباکتری‌های آتیپیک از طریق مشاهدهٔ باند در محدودهٔ کنترل مثبت PCR مشخص گردید. طول قطعهٔ DNA تکثیر شده توسط پرایمرهای اختصاصی سویه استاندارد مایکوباکتریوم اسمگیتس:

$$F_1 - R_1(16srRNA) = 250\ bp$$
$$F_2 - R_1(16srRNA) = 136\ bp$$

نتیجه طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مایکوباکتریومی آتیپیک 16SrRNA

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]

Primer 16srRNA
$(F_1 - R_1)$

F_1 | $CGA/GTG/GCG/AAC/GGG/TGA/GT$
طول $= 20mer / Tm = 61.7^{\circ}C / GC\% = 65.0\% - MW = 6262.9 g/mol$

R_1 | $CCG/TAG/GAG/TCT/GGG/CCG/TAT/CT$
طول $= 23mer / Tm = 61.3^{\circ}C / GC\% = 60.9\% - MW = 7071.5 g/mol$

$Length \quad of \quad amplicon \quad bp = 250$

Primer 16srRNA
$(F_2 - R_1)$

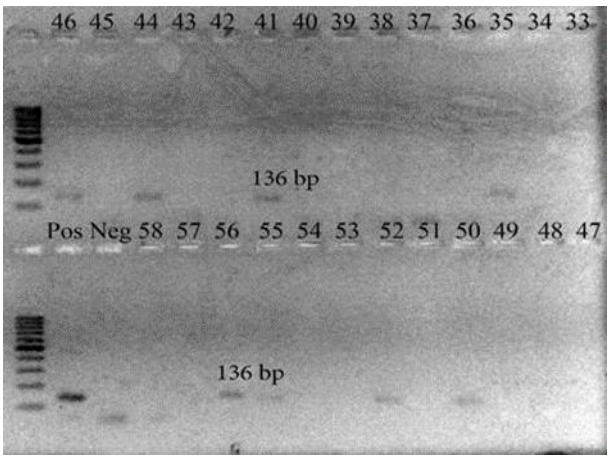
F_2 | $AGC/TTT/TGC/GGT/GTG/GGA/TGG$
طول $= 21mer / Tm = 62.7^{\circ}C / GC\% = 57.1\% - MW = 6564.1 g/mol$

R_1 | $CCG/TAG/GAG/TCT/GGG/CCG/TAT/CT$
طول $= 23mer / Tm = 61.3^{\circ}C / GC\% = 60.9\% - MW = 7071.5 g/mol$

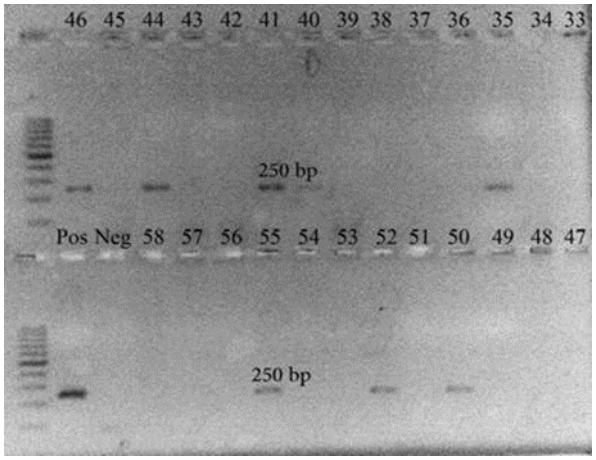
$Length \quad of \quad amplicon \quad bp = 136$

[1] M.Smegmatis

نتیجه بررسی باندهای ژل آگارز الکتروفورز برای ۵۸ نمونه بلوکهٔ پارافینه پوستی گرانولومایی برای دو جفت پرایمر 16SrRNA نشان می‌دهد که از ۵۸ نمونه بلوکه پارافینه بافتی پوست مورد مطالعه، ۱۸ نمونه در محدودهٔ کنترل مثبت باند ایجاد نموده و نتیجه PCR مثبت داشتند ، ۱۸ باند مثبت در محدودهٔ شاهد مثبت PCR دیده شد. نمونه‌های مثبت در محدودهٔ کنترل مثبت PCR در ژل، با پرایمرهای 16SrRNA برای ۱۸ نمونه (بلوکه پارافینه) تأیید حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه‌های بلوکه پارافینه پوستی گرانولومایی و تمایز آن از ضایعات پوستی گرانولومایی مشابه انگلی و قارچی است و باندهای منفی نشان‌دهندهٔ عدم حضور ژنوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه پوستی و احتمال ضایعات جلدی انگلی (لشمانیازیس) و قارچی (اسپوروتریکس) است (شکل ۲و۱).



شکل ۱. طول قطعه تکثیر شده در محدوده کنترل مثبت برای پرایمر اول srRNA۱۶

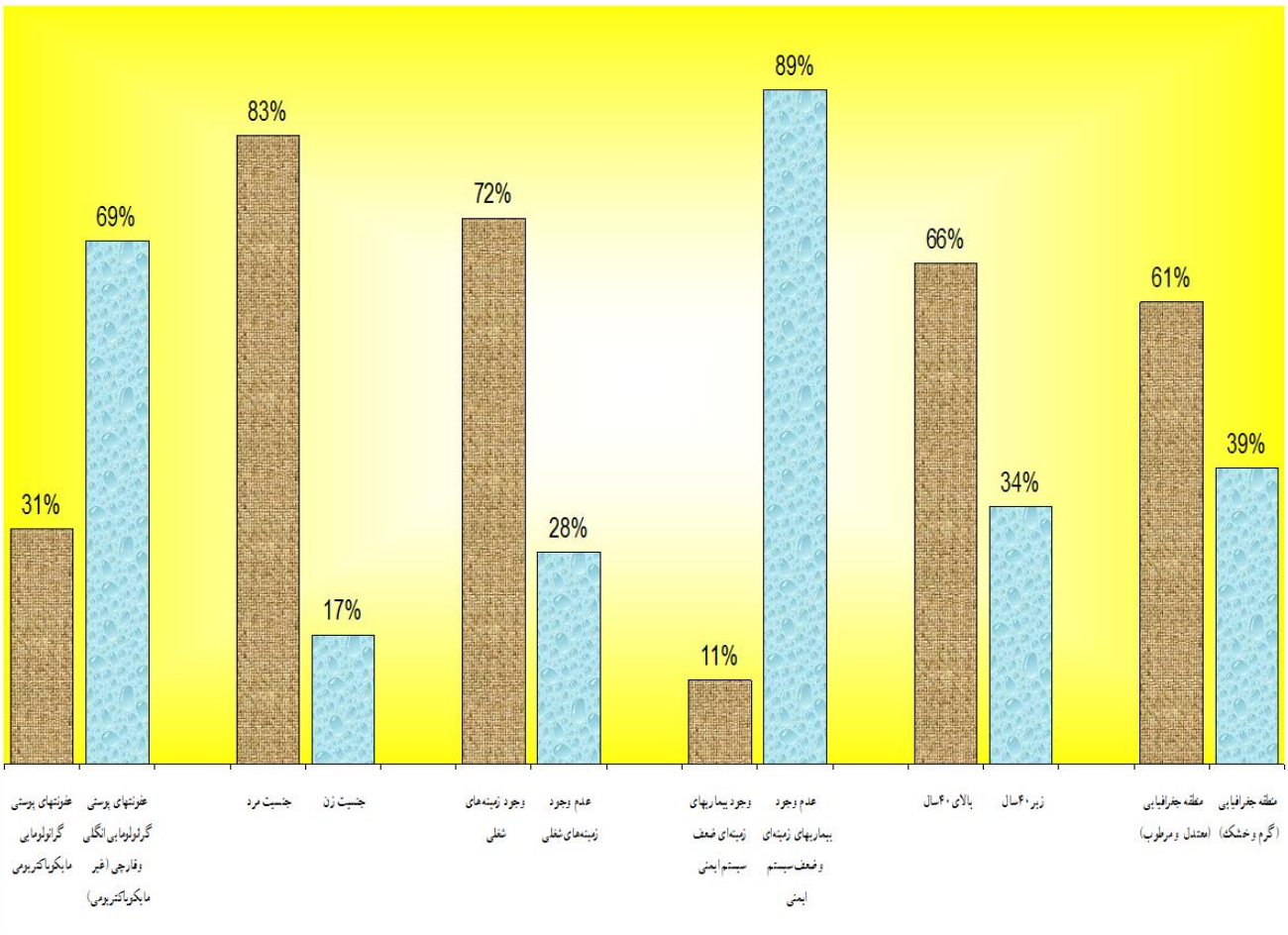


شکل۲. طول قطعه تکثیر شده در محدوده کنترل مثبت برای پرایمر دوم srRNA۱۶

در این تحقیق ٪۳۱ از ضایعات جلدی گرانولومایی مشکوک ناشی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک و ٪۶۹ از عفونت‌های پوستی گرانولومایی منشأ غیر مایکوباکتریومی انگلی – قارچی داشت. (طی ۶ سال جمع‌آوری نمونه‌های بلوکه پارافینه پوستی). از این ۱۸ نمونه مثبت ضایعات پوستی گرانولومایی مایکوباکتریومی، ۱۵ مورد (٪۸۳) مرد و ۳ مورد (٪۱۷) زن بودند. از این ۱۸ نمونه مثبت در ۱۳ مورد (٪۷۲) زمینه‌های شغلی (تماس با آب، کارکنان شیلات، کار در مزارع و باتلاق‌ها، شنا در استخرها) وجود داشته است و در ۵ مورد (٪۲۸) عدم وجود زمینه‌های شغلی است. از این ۱۸ مورد مثبت ۱۲ مورد (٪۶۶) بالای ۴۰ سال و ۶ مورد (٪۳۴) زیر سن ۴۰ سال بوده‌اند. از این ۱۸ مورد، ۲مورد (٪۱۱) مبتلا به ضعف سیستم ایمنی (پیوند عضو – سرطان) و بیماری‌های زمینه‌ای (مصرف داروهای ایمونوساپرس) و ٪۶۱ موارد (۱۱ مورد) در منطقه جغرافیایی معتدل و مرطوب و ٪۳۹ (۷ مورد) در منطقه گرم و خشک بوده‌اند. تجزیه و تحلیل اطلاعات حاصل از تعیین توالی نوکلئوتیدهای نمونه‌های مثبت و مقایسه با سکانس ژنهای 16SrRNAژنوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک موجود در بانک ژنی همولوژی داشت و حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه‌های مثبت تأیید شد (نمودار ۱).

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]



نمودار ۱.درصد پارامترهای مؤثر در عفونت‌های گرانولومایی پوستی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (NTM)

بحث

یکی از اهداف ما در این تحقیق شناسایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک عامل عفونت‌های گرانولومایی پوستی از نمونه‌های کلینیکی مشکوک (بلوکه‌های پارافینه پوست) و تفکیک آن از ضایعات جلدی گرانولومایی مشابه لشمانیازیس و اسپوروتریکوزیس جهت درمان به موقع و مناسب آنتی بیوتیکی با به‌کار بردن پرایمرهای اختصاصی ژن‌های (*hsp65*, 16SrRNA) و روش PCR در نمونه‌های بالینی ارزش روش PCR با کشت مقایسه شده است و نتیجه این بود که حتی در افرادی که آنتی‌بیوتیک مصرف کرده‌اند و کشت پاسخ مثبت ندارد و یا در مواردی‌که تعداد باسیل کم باشد کاربرد تکنیک PCR و برتری آن کاملاً واضح است (۶ و ۱۹) می‌توان عفونت‌های پوستی ناشی از مایکوباکتریوم‌های غیر سلی را در کوتاه‌ترین زمان و با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی نمود (۲۲، ۶ و ۲۴). از ۵۸ نمونه (بلوک پارافینه بافتی) مورد مطالعه، ۱۸ نمونه نتیجه PCR مثبت داشتند، ۱۸ نمونه مثبت (۳۱٪) نشان‌دهنده عفونت‌های پوستی گرانولومایی ناشی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک است. نمونه منفی (۴۰ مورد) مؤید ضایعات جلدی گرانولومایی غیر مایکوباکتریومی آتیپیک (انگلی و قارچی) است. در این تحقیق ۱۸ باند مثبت در محدودهٔ کنترل مثبت PCR (مایکوباکتریوم اسمگمتیس) بیانگر عفونت‌های پوستی مایکوباکتریومی (NTM) و تمایز آن از ضایعات پوستی گرانولومایی انگلی و قارچی است. در تحقیقاتی که در سایر نقاط دنیا به عمل آمده رابطه معنی‌داری بین جنس و عفونت مایکوباکتریوم وجود دارد (۱۹ و ۱۵) این عفونت‌های گرانولومایی در مردان بیش از زنان گزارش شده و نسبت مرد به زن بین سه به یک و پنج به یک متغیر است (۱۹ و ۱۶) در تحقیق ما این نسبت پنج به یک است. عفونت‌های پوستی گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های (NTM) عموماً به‌صورت بیماری گرانولومای استخر شنا با تلقیح م. مارینوم از طریق خراش‌های پوستی انسان در تماس با استخرهای شنا و با مخازن پرورش ماهی‌ها ایجاد شده و

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]
[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]

عفونت‌های انسانی بواسطه درگیری انسان با آکواریوم‌ها، استخرها، و ممکن است از ماهی‌ها و سخت‌پوستان به انسان منتقل شود (۱۸ و ۱۱) عفونت بیشتر محدود به بافت‌های سطحی بدن می‌باشد در افراد دارای سطح ایمنی کم ممکن است منتشر شده و حالت گسترده عفونت ممکن است به‌وجود آید. (۲۵ و ۴ ،۳). م.کلونه‌ای از طریق تزریقات، زخم‌های سطحی به داخل پوست تلقیح شده و بیماری زخم بزولی (Buruli) در اثر ورود م. اولسرانس به پوست از طریق خراشیدگی با علف‌های باتلاق به‌وجود می‌آید. (۵ ، ۲۵ و ۲۱). در سال ۱۹۵۴ Orebro یک همه‌گیری را از سوئد گزارش نمود از ۸۰ نفر افراد بررسی شده ۷۵ نفر کودکانی بودند که در یک استخر شنا کرده بودند و ۱۹ نفر از آنها دارای خراش جلدی بودند (۱۸و ۱۵ ،۸).

مایکوباکتریوم مارینوم و چندین ارگانیسم دیگر به خصوص اسپوروتریکس شانکی‌ئی و لشمانیا برزیلنسیس از عوامل شایع عفونت‌های جلدی لنفاوی گرانولوماتوزی (اسپوروتریکوئیدی) می‌باشند (۱۳ و ۲۶). در آلمان از ژانویه ۱۹۹۱ تا فوریه ۱۶۱۹۵۵ مورد (۱۱ مورد مرد، ۵ مورد زن در محدودهٔ سنی ۷۳-۳۵ سال) عفونت با م. مارینوم به اثبات رسده است که عفونت محدود به پوست بود. (۱۸ ، ۴ و ۳) چندین مرکز در اسپانیا از ۱۹۹۲-۱۹۹۸، ۳۹ مورد (۲۲ مورد مرد و ۱۷ مورد زن) که از نظر باکتریولوژیکی عفونت م. مارینوم تایید شده بود در اکثر موارد (۳۵ مورد) در ارتباط با ماهی بود و این ضایعات پوستی اکثر (۳۲ مورد) روی دست بوده و تظاهرات بالینی اسپوروتریکوئیدی را پیشنهاد می‌کردند (۴ و ۳ و ۲۶).

در تحقیقات اخیر بهترین و مفیدترین پرایمر که همولوگ باشد را طراحی کردند که بدین منظور ژن‌های مختلفی مثل srRNA۱۶ را با استفاده از PCR تکثیر نمودند که برای دسته بندی ژنوتیپی مایکوباکتریوم‌ها مفید است (۲۸ و ۲۲ و ۱۲). روش‌های بیولوژی مولکولی جهت تشخیص مایکوباکتریوم‌ها شامل استفاده از ژن‌های ترانسپوزون‌ها ,B, 16 srRNA, hsp65 rpo β Insertion sequence (Is) می‌باشد (۲۲). در سال ۲۰۰۰ از تکنیک PCR-RFLP و تعیین توالی ژن‌های، ITS 23srRNA, 16srRNA, hsp65 برای تفکیک گونه‌های مختلف استفاده کردند (۱۳). در سال ۱۹۹۵ Bollet و همکارانش از تکنیک PCR و هیبرایداسیون دو ژن srRNA۱۶ و ۲۳ srRNA استفاده کردند و حدود ۱۱ گونه از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (NTM) را شناسایی کردند (۱). جهت تعیین گونه‌های مایکوباکتریومی از ژن‌های مختلفی از قبیل ,β B, IS6110 ITS, rpo 23srRNA, 16srRNA, hsp65 استفاده شده است (۲۷و۲۲) تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از ژن IS6110 از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است (۲۷ و۲۴ و ۶). در تشخیص و شناسایی ژنوم مایکوباکتریوم اولسرانس از مارینوم در نمونه‌های کلینیکی از سکانس‌های IS2606, IS2404 استفاده می‌شود (۲۲ و۱۲ و ۲). در تحقیقی جهت شناسایی MAP (مایکوباکتریوم آویوم تحت گونه پاراتوبرکلوزیس از پرایمر IS900 استفاده گردید (۱۰ و ۷). رژیم درمانی آنتی‌بیوتیکی جهت درمان عفونت‌های پوستی گرانولومایی ناشی از مایکوباکتریوم مارینوم شامل ۱۰۰ mgr میلی‌گرم مینوسایکلین دوباره در روز، تری متوپریم – سولفامتوک زول ۱۶۰ mgr-۸۰۰ mgr دوبار در روز، ریفامپین ۶۰۰mgr دوبار در روز و کلاریترومایسین ۵۰۰mgr دوبار در روز می‌باشد (۳۰ و ۱۷). عفونت‌های پوستی گرانولومایی ناشی از مایکوباکتریوم‌های آتیپیک (م. مارینوم) از عفونت‌های پوستی کمیاب است و تشخیص و درمان آن می‌تواند برای پزشکان مشکل ساز باشد ولی گرفتن شرح حال مناسب بیمار (زمینه‌های شغلی و بیماری‌های زمینه‌ای نظیر پیوند عضو، سرطان‌ها و ضعف سیستم ایمنی) و توجه دقیق به علائم بیماری می‌تواند در تشخیص و درمان به موقع این بیماری مفید باشد و در صورت عدم درمان به موقع می‌تواند باعث عفونت‌های منتشره شود. (۳۰ و ۲۰ و ۱۷).

نتیجه‌گیری

روش PCR یک روش سریع، حساس، اختصاصی و دقیق جهت تشخیص عفونت‌های باکتریال و پاتوژن‌ها در کوتاه‌ترین زمان است این برتری در مزیت این روش نسبت به روش‌های پاتولوژی و آزمایش‌های بیوشیمیایی افتراقی است. پیشنهاد می‌گردد عفونت‌های پوستی گرانولومایی غیر مایکوباکتریومی آتیپیک (انگلی و قارچی) را به کمک روش‌های مولکولی تعیین و یا حساسیت آنتی‌بیوتیکی سویه‌های مختلف مایکوباکتریوم‌های آتیپیک عامل عفونت‌های پوستی به داروهای کینولونی، تری متوپریم، سولفامتوکسازول، تتراسایکلین و داکسی سایکلین با استفاده از روش E-test شناسایی و مقاومت دارویی را تعیین نمود.

سپاسگزاری

از استادان ارجمند جناب آقای دکتر رضوی و جناب آقای دکتر صیرفی کمال تشکر را دارم و هم‌چنین از معاونت تحقیقات و فن‌آوری دانشگاه آزاد اسلامی واحد پرند تشکر و قدردانی می‌شود.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]

منابع

1. Abed y, Bollet C, MiccoHopitial s. identification and strain differentiation of mycobacterium species on the basis of DNA 162-23 S Spacer region polymorphism. 1995; 146: 405-413.
2. Adalgiza R, Cassiana L, Helio M, Miranda A, Pires Lopes MQ. use of PCR- restriction fragment length polymorphism analy sis of the hsp65 genes for rapid identification of mycobacteria in Brazil, j Microbiol Method s. 1999;37:223-229.
3. Ang P, Rattana-Apiromyakij N, Goh cl. Retrospective study of Mycobacterium marinum skin infections. Int J Dermatol 2000; 39: 343-7.
4. Barrow Gl, Hewitt M. Skin infection with M.Marinum from a tropical fish tank- British Medical Journal. 1971; 2: 505-6.
5. Bartralot R, Garcia-Patos V, SitJas D, Rodegouez-Cano, Molletj, Martin- Casabona N, et al. Clinical Pattern of Cutaneous nontuberclusis mycobacterial infection. Br. J. Dermatol. 2005; 152 (4):727-34.
6. Bascunana CR, Belak k, Detection and Identification of mycobacteria in formalin- fixed, Paraffin-embedded tissues by nested PCR and restriction enzyme analysis. J clinMicrobiol. 1996; 34: 2351-5.
7. Bhide M, chakurkar E, Ludmila T, Barbuddhe S, Novak M, Mikula I. IS 900-PCR-based detection and characterization of Mycobacterium avium sub sp. Para-tuberculosis from buffy coat of cattle and sheep, Veterinary Microbiology. 2005; 112:33-41.
8. Boris Boddinghaus BT, Rogall T, Flohr H, Blocker EC, Bottge. Detection and identification of mycobacteria by amplification of rRNA. J. clin. Microbiol. 1990; (28) :1751-1759.
9. Brunello F, Ligozzi M, Cristelli E. identification of 54 Mycobacterial species by PCR-Restriction Fragment Length polymorphism Analysis of the hsp65 Gene, J.Clin. Microbiology. 2001; P:2799-2806.
10. Bull T, Pavlik I, Hermon J, Tizard M. Study of IS900 Loci in MAP by multiplex PCR screening. Proc. 6 th. 1999.
11. Cassetty C, Tsanehez M. Mycobacterium marinum infection. Dermatology online J. 2004; 10 (3):21.
12. Devallois A, Goh K S, Rastogi N. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment Length polymorphism analysis of the hsp65 genes and proposition of an algorithm to differentiate 34 Mycobacterial Species. J. Clin. Microbiol. 1997; 35: 2969-2973.
13. Edelstein H. Mycobacterium marinum skin infections: Report of 31 cases and review of literature Arch Intern Med. 1994; 154 (12):1359-64.
14. Ena P, Sechi LA. Rapid identification of Cutaneous infections by nontubercular mycobacteria by polymerase chain reaction-restriction analysis length polymorphism of the hsp65 gene- Int-J-Dermatol-2001; Aug: 40(8):495-9.
15. Falkinham JO. Epidemiology of infection by nontuberCulous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9: 1996;177-215.77
16. Gruft H, Falkinham JO, Parker BC. Recent experience in the epidemiology of disease by atypical mycobacteria, Rev. infect, Dis, 1981;3: 990-996.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]

17. Hisamichi k, et al. Efficacy of oral minocycline and hyperthermic treatment in a case of atypical mycobacterial skin infection by Mycobacterium marinum.J. Dermatol. 2002; 29: 810-1.
18. Johnson JM, Tzumi AK. Cutaneous Mycobacterium marinum infection (swimming pool granull ma). Clin-Dermatol. 1987;5:68-75.
19. Jucker M, Falkinham J. Epidemiology of infection by nontub- erculous mycobacteria. Am-Rev-Respir-Dis. 1990;142:858-862.
20. Leuenberger R, Bodmer T. Clinical presentation and therapy of M.Marinum infection as seen in 12 Cases.DisCh-Med-Nochenschr. 2000; Jan 7:125 (1-2):7-10.
21. Mahaisavariya P, chaiprasert A, Khemngern S, Manonukul J, Gengviniij N, ubol PN, Pinitugsorn S, Nontuberculous mycobacterial Skin infections: clinieal and bacteriological studies. J Med Assoc Thai 2003;86: 52-60.
22. Marie-Claude L, Haddad N, Richard Moreau C, Marie-Francoise T. Molecular characterization of environmental mycobacterium strains by PCR-restriction fragment length polymorphism of hsp65 and by Sequencing of hsp65, and of 16 s and ITS1 r DNA. 2000
23. Palenque E. Skin disease and Nontuberculous mycobacterium Int J. Dermatol. 2000;39:659.
24. Schulz s, Cabras AD, Kremer M, Weirich, G, MiethkeT. Species identification of mycobacteria in paraffin-embedded tissues: frequent detection of nontuberculous mycobacteria. Mod Pathol. 2005;18:274-82.
25. Sciacca- Kirby J. Mycobacterium marinum infection of the skin. 2006. Avaible from: http:/www.emedicine. com/derm/topic 281/htm.
26. Tan HH, Chan RK, Atypical mycobacterium infection with sporotrichoid spread in a patient with human immunodeficiency virus- Ann-Acad-Med-Sing-apore.1999; Nov: 28(6):846-8.
27. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger E. C, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. J. clin. Microbiol, 1993;31: 175-178.
28. Vaneechoutte M, De Beenhouwer H, Claeys G, Verschraegen A, De Rouck N, Paepe A. Identification of Mycobacterium Species by using amplified ribosomal RNA restriction analysis J. clin- Microbiol, 1993; (31): 2061-2065.
29. Wagner D, Youngls.Nontuberculous infections: a clinical review infection۷۰-۳۲:۲۵۷;۲۰۰۴ ..
30. Wallace JR, Glassroth J, Griffith E, Kenneth N, Cook J, L, Gordin F. Diagnosis and Treatment of Disease Caused by Non Tuberculous Mycobacteria. In Press 1997.
31. Wolinsky E. state of the Art: Nontuberculousmycoboeteria and associated diseases, Am, Rev, Respir, Dis. 1979; 119: 107-159.

[Downloaded from ncmbjpiau.ir on 2026-05-31]

[DOR: 20.1001.1.22285458.1393.5.17.11.5]