

## تشخیص پارامترهای مؤثر در عفونت‌های پوستی مایکروبакتریوم‌های آتیپیک با روش PCR

کسری بهروز نسب<sup>۱</sup>، محمد رضا رضوی<sup>۲</sup>، فتح الله فلاحیان<sup>۳</sup>، حسن صیرفی<sup>۴</sup>، طاهر نژاد ستاری<sup>۵</sup>

۱. مریم، گروه میکروبیولوژی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
۲. استادیار، گروه انگل شناسی، انسیتو 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 مایکروبакتریوم‌های 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 و دقیق جهت تشخیص است.

**مواد و روش‌ها:** از ۵۸ نمونه بالینی به صورت بلوک‌های پارافینه پوستی گرانولومایی مایکروبакتریوم‌های آتیپیک استفاده شد. DNA ژنومی این بلوک‌ها استخراج و به مراه پرایمرهای اختصاصی ژن‌های مایکروبакتریومی 16srRNA در واکنش PCR وارد گردید.

**یافته‌ها:** با مشاهده ۱۸ باند مثبت PCR از ۵۸ نمونه در محدوده کنترل مثبت مشخص گردید که ۳۱٪ از ضایعات جلدی گرانولومایی مشکوک، ناشی از مایکروبакتریوم‌های 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 مایکروبакتریوم 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 بیوشیمیابی افتراقی است.

**کلمات کلیدی:** عفونت‌های پوستی گرانولومایی، مایکروبакتریوم‌های آتیپیک، PCR

مایکروبакتریوم‌های آتیپیک عموماً شامل عفونت‌های ربوی، لنفادنیت، عفونت‌های پوستی گرانولوماتوزی و عفونت‌های منتشره (در افراد دارای نقص سیستم ایمنی) است. عفونت‌های پوستی عموماً به صورت گرانولومایی استخر شناست (۵ و ۲۳). ضایعات جلدی گرانولومایی اغلب به صورت پاپول بنفس رنگ، ندول در دست و پا، تاول، پلاک، زخم زیگیلی شکل، ضایعات انتشار اسپوروترویکوئیدی (گرهای متواالی) و آب چرکی ظاهر شده و در برخی اوقات اولسراتیو است (۲۳ و ۳).

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

### مقدمه

مایکروبакتریوم‌های آتیپیک (NTM<sup>۱</sup>) باکتری‌های فرصت طلب محیطی هستند که در طبیعت (آب، خاک) و خاک‌های مرتبط وجود دارند اسید فست هستند که طبقه‌بندی آن‌ها براساس سرعت رشد، تولید پیگمان فتوکروموزن، اسکوتوكروموزن و غیر کروموزن صورت می‌گیرد (۲۹ و ۳۱). عفونت‌های

\*نویسنده مسئول: کسری بهروز نسب  
پست الکترونیکی: kbehrouznaab@gmail.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۲/۰۷/۱۹

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۲/۰۹/۰۲

Primer	16srRNA	$(F_1 - R_1), (F_2 - R)$ :
		In initial Denaturation ۹۴° ۵ MiN
	Denaturation	۹۴°c ۴۵sec
	Annealing	۶۵°c ۴۵sec
	Extension	۷۲°c ۴۵sec
		Final Extension ۷۲°c ۵ MiN

پس از اتمام واکنش PCR به همراه  $1\mu\text{Lit}$  Loading Buffer بر روی ژل آگارز  $2\%$  (۲۰ گرم پودر آگارز در  $100\text{ mL}$  سی بافر TAE) با ولتاژ  $7\text{ V}$   $100\text{ mL}$  به مدت  $25\text{ min}$  دقتیه الکتروفورز گردیده سپس رنگ آمیزی ژل را به مدت  $20\text{ min}$   $0.5\mu\text{g}/\text{mLit}$  دقتیه در محلول اتیدیوم بروماید با غلظت  $5\mu\text{Lit}$  قرار داده و رنگ آمیزی نموده و همچنین از سایز مارکر ( $100-1500\text{ bp}$ ) جهت تعیین اندازه باندها و کنترل مثبت (DNA استخراج شده از سویه استاندارد مایکوباکتریومی) استفاده شد و توسط دستگاه Gel Documentation Gel Documentation بررسی و عکسبرداری می‌شود.

کاپیلری سکانسینگ یا تعیین توالی نوکلئوتیدهای محصولات مثبت PCR (باندهای مثبت در ژل آگارز) به همراه پرایمرها 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 بلوکهای پارافینه بافتی پوست و استخراج DNA از سویه استاندارد مایکوباکتریومی و انجام واکنش PCR به همراه پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16SrRNA مایکوباکتریومی آتیپیک نهایتاً محصول PCR در ژل آگارز الکتروفورز گردیده وجود مایکوباکتری‌های آتیپیک از طریق مشاهده باند در محدوده کنترل مثبت PCR مشخص گردید. طول قطعه DNA تکثیر شده توسط پرایمرهای اختصاصی سویه استاندارد مایکوباکتریوم اسمگیتس:

$$\begin{aligned} F_1 - R_1 (16srRNA) &= 250 \text{ bp} \\ F_2 - R_1 (16srRNA) &= 136 \text{ bp} \end{aligned}$$

نتیجه طراحی پرایمرهای اختصاصی ژن‌های 16SrRNA مایکوباکتریومی آتیپیک

تشخیص اختصاصی، دقیق و با حساسیت بالای عفونت‌های پوستی (جلدی) گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک به کمک روش‌های مولکولی نظری PCR در مقابل روش‌های سنتی زمانبند مرسوم آزمایشگاهی نظری رنگ آمیزی، کشت و آزمایشات بیوشیمیابی افتراقی و تفکیک و ضایعات جلدی گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک از عفونت‌های گرانولومایی پوستی فارچی مشابه نظری اسپوروترویکوزیس و عفونت‌های گرانولومایی جلدی انگلی نظری لشمایزیس، جهت درمان مناسب آنتی-بیوتیکی است (۶). رژیم درمانی مناسب جهت درمان عفونت‌های پوستی گرانولومایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک شامل ریفارمپین، اتمیبوتوول، مینوسایکلین، کلاریترومایسین، تری متیپریم ضروری است (۱۷ و ۳۰). در بیماری گرانولومای استخر شنا ناشی از مارنیوم (پاتوژن ماهی‌ها) ندول‌های متعدد و ضایعات انتشار گرهای (اسپوروترویکوزیس) در مسیر غدد لنفاوی داشته و ضایعات تجمع گرانولومایی داشته است (۲۵ و ۱۸).

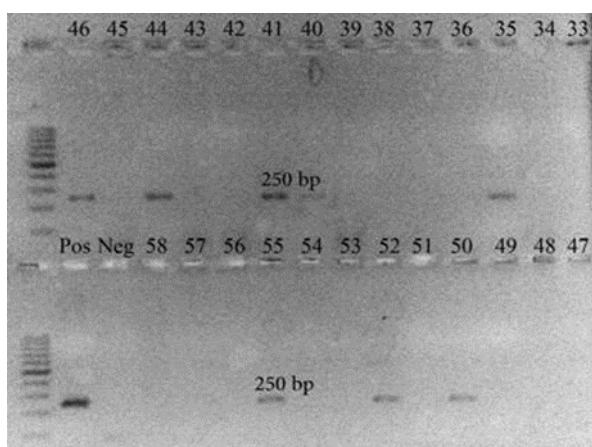
PCR یک روش سریع، اختصاصی، حساس و دقیق جهت تشخیص پاتوژن‌های است. این روش می‌تواند تعداد کمی ژنوم مایکوباکتریوم اختصاصی برای ژن‌های مایکوباکتریومی (hsp65-16SrRNA) و تأیید با روش سکانسینگ (توالی با نوکلئوتیدهای مایکوباکتریوم‌های آتیپیک را در نمونه مورد شناسایی قرار دهد (۲۷ و ۲۴). تشخیص مولکولی با روش PCR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

## روش بررسی

نمونه بلوکهای پارافینه بافتی پوست (۵۸ نمونه ثبت 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 اسمگممتیس<sup>۱</sup> PTCC/1307) به عنوان کنترل مثبت PCR و کیت استخراج DNA الگو (ژنومی) از بلوکهای پارافینه و اجزاء واکنش PCR و مواد الکتروفورز ژل آگارز (باfer Ladder Sige Marker, Loading Buffers, TAE و پودر آگارز) تهیه شد.

## برنامه PCR



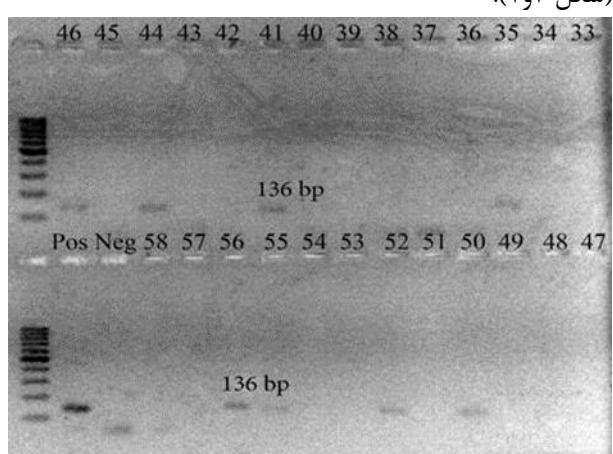
شکل ۲. طول قطعه تکثیر شده در محدوده کنترل مثبت برای پرایمر دوم srRNA<sub>16</sub>

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 با تلاق‌ها، 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، ۲ مورد (۱۱٪) مبتلا به ضعف سیستم ایمنی (پیوند عضو - سرطان) و بیماری‌های زمینه‌ای (صرف 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 زنهای ۱۶S rRNA ژنوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک موجود در بانک ژنی همولوژی داشت و حضور مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه‌های مثبت تأیید شد (نمودار ۱).

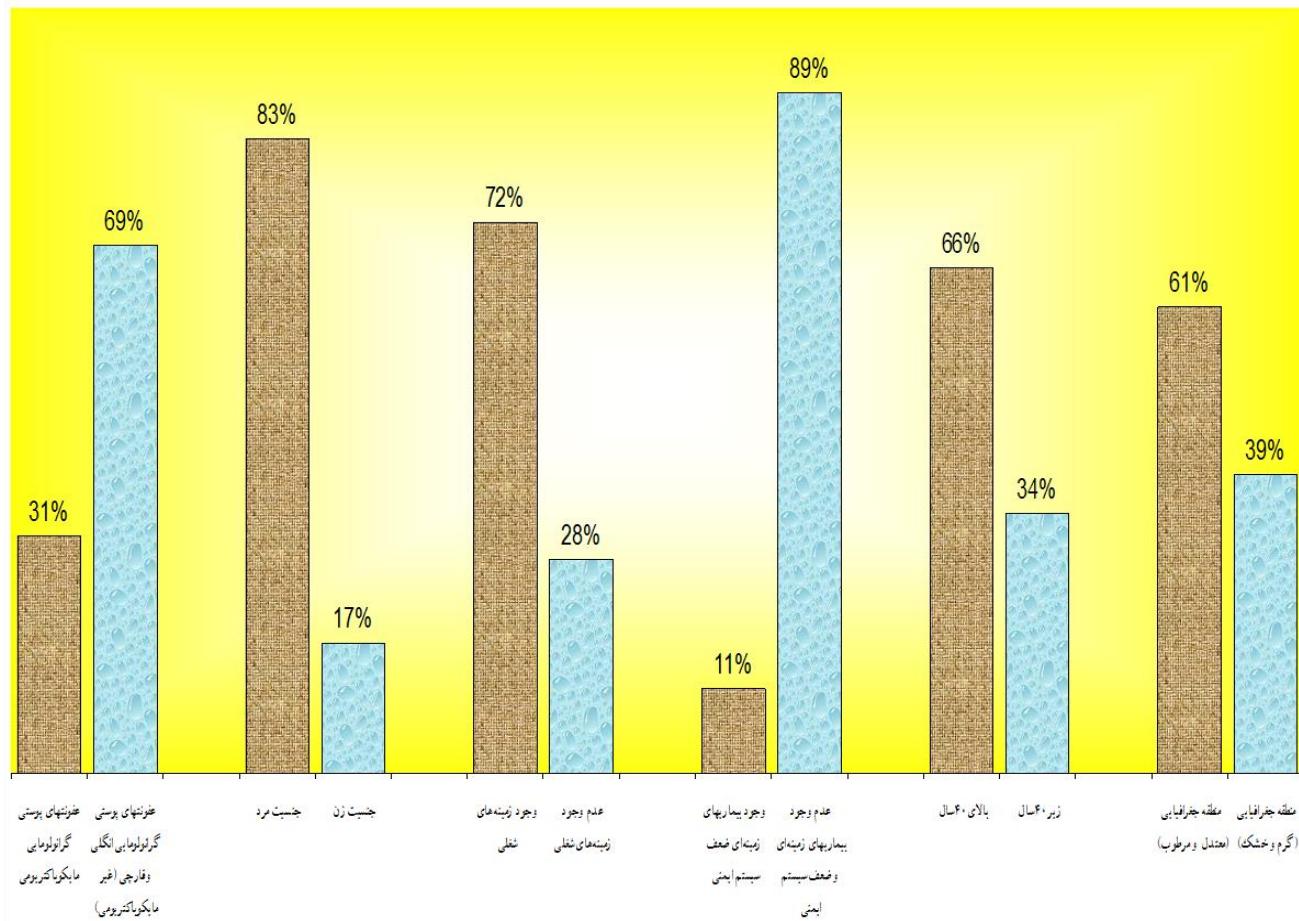
Primer 16srRNA (F <sub>1</sub> - R <sub>1</sub> )	
<i>F<sub>1</sub></i>	<chem>CGA/GTG/GCG/AAC/GGG/TGA/GT</chem>
	= طول = 20mer / Tm = 61.7 °C / GC% = 65.0% - MW = 6262.9 g/mol
<i>R<sub>1</sub></i>	<chem>CCG/TAG/GAG/TCT/GGG/CCG/TAT/CT</chem>
	= طول = 23mer / Tm = 61.3 °C / GC% = 60.9% - MW = 7071.5 g/mol
<i>Length of amplicon bp = 250</i>	
Primer 16srRNA (F <sub>2</sub> - R <sub>1</sub> )	
<i>F<sub>2</sub></i>	<chem>AGC/TTT/TGC/GGT/GTG/GGA/TGG</chem>
	= طول = 21mer / Tm = 62.7 °C / GC% = 57.1% - MW = 6564.1 g/mol
<i>R<sub>1</sub></i>	<chem>CCG/TAG/GAG/TCT/GGG/CCG/TAT/CT</chem>
	= طول = 23mer / Tm = 61.3 °C / GC% = 60.9% - MW = 7071.5 g/mol
<i>Length of amplicon bp = 136</i>	

### ۱ M.Smegmatis

نتیجه بررسی باندهای ژل آگارز الکتروفورز برای نمونه بلوکه پارافینه پوستی گرانولومایی برای دو جفت پرایمر 16SrRNA ۱۸ نشان می‌دهد که از ۵۸ نمونه بلوکه پارافینه بافتی پوست مورد مطالعه، ۱۸ نمونه در محدوده کنترل مثبت باند ایجاد نموده و نتیجه PCR مثبت داشتند، ۱۸ باند مثبت در محدوده شاهد مثبت PCR در ژل، با پرایمرهای ۱6SrRNA 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 نشان دهنده عدم حضور ژنوم مایکوباکتریوم‌های آتیپیک در نمونه پوستی و احتمال ضایعات جلدی انگلی (لشمانيازيس) و قارچی (اسپوروتريكس) است (شکل ۱ و ۲).



شکل ۱. طول قطعه تکثیر شده در محدوده کنترل مثبت برای پرایمر اول srRNA<sub>16</sub>



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

## بحث

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 محدوده 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 به صورت بیماری گرانولومای استخراشنا با تلقیح مارینوم از طریق خراش‌های پوستی انسان در تماس با استخراش‌های شنا و با مخازن پرورش ماهی‌ها ایجاد شده و

یکی از اهداف ما در این تحقیق شناسایی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک عامل عفونت‌های گرانولومایی پوستی از نمونه‌های کلینیکی مشکوک (بلوک‌های پارافینه پوست) و تفکیک آن از ضایعات جلدی گرانولومایی مشابه لشمانيازيس و اسپوروتیکوزیس جهت درمان به موقع و مناسب آنتی‌بیوتیکی با به کار بردن پرایمرهای اختصاصی ژن‌های (*hsp65*, ۱۶S rRNA) 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 مواردی که تعداد باسیل کم باشد کاربرد تکنیک PCR و برتری آن کاملاً واضح است (۱۹ و ۱۶) می‌توان عفونت‌های پوستی ناشی از مایکوباکتریوم‌های غیر سلی را در کوتاه‌ترین زمان و با حساسیت و اختصاصیت بالا شناسایی نمود (۲۲، ۲۴ و ۲۶). از ۵۸ نمونه (بلوک پارافینه بافتی) مورد

(۲۷ و ۲۲) تشخیص مایکوباکتریوم توبرکلوزیس با استفاده از IS6110 از حساسیت و دقت بالایی برخوردار است (۲۷ و ۲۴ و ۶). در تشخیص و شناسایی ژنوم مایکوباکتریوم اولسرانس از مارینوم در نمونه‌های کلینیکی از سکانس‌های IS2606، IS2404 استفاده می‌شود (۲۲ و ۱۲ 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 mgm گرانولومایی ناشی از مایکوباکتریوم مارینوم ۱۰۰ mgm می‌گرم مینوسایکلین دوباره در روز، تری متوفپریم - سولفامتوک زول ۸۰۰ mgm-۱۶۰ دوبار در روز، ریفامپین ۵۰۰ mgm دوبار در روز و کلاریترومایسین ۶ 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 متوفپریم، سولفامتوکسازول، E-test تراسایکلین و داکسی سایکلین با استفاده از روش شناسایی و مقاومت دارویی را تعیین نمود.

## سپاسگزاری

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

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 گستردگی عفونت ممکن است به وجود آید. (۲۵ و ۳، ۴). م. کلونه‌ای از طریق تزریقات، زخم‌های سطحی به داخل پوست تلقیح شده و بیماری زخم برولی (Buruli) در اثر ورود م. اولسرانس به پوست از طریق خراشیدگی با علف‌های باتلاق به وجود می‌آید. (۵، ۴ 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 (۱۸ و ۱۵).

مایکوباکتریوم مارینوم و چندین ارگانیسم دیگر به خصوص اسپوروتیریکس شانکیئی و لشمانیا برزیلنسیس از عوامل شایع عفونت‌های جلدی لنفاوی گرانولوماتوزی (اسپوروتیریکوئیدی) می‌باشند (۲۶ و ۱۳). در آلمان از ۱۹۹۱ تا فوریه ۱۹۹۵ مورد (۱۱) مورد مرد، ۵ مورد زن در محدوده سنی ۳۵-۷۳ سال) عفونت با م. مارینوم به اثبات رسیده است که عفونت محدود به پوست بود. (۱۸، ۴ و ۳) چندین مرکز در اسپانیا از ۱۹۹۲-۱۹۹۸، ۳۹ 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 اسپوروتیریکوئیدی 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 srRNA16 را با استفاده از PCR تکثیر نمودند که برای دسته بندي ژنوتیپی مایکوباکتریوم‌ها مفید است (۲۲ و ۲۸ و ۱۲). روش‌های بیولوژی مولکولی جهت تشخیص مایکوباکتریوم‌ها شامل استفاده از ژن‌های ترانسپوزون‌ها (۲۲). در سال ۲۰۰۰  $\beta$  Insertion sequence (Is) rpo ITS از تکنیک PCR-RFLP و تعیین توالی ژن‌های، 23srRNA، 16srRNA، hsp65 برای تفکیک گونه‌های مختلف استفاده کردند (۱۳). در سال ۱۹۹۵ Bollet و همکارانش از تکنیک PCR و هیبرایداسیون دو ژن srRNA16 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  $\beta$  B, IS6110, ITS, rpo 23srRNA, 16srRNA, hsp65 استفاده شده است

## منابع

1. Abed y, Bollet C, MiccoHopital s. identification and strain differentiation of mycobacterium species on the basis of DNA 16S-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 analysis 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 nontuberculosis 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 Boddinhaus 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.

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 nontuberculous 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, Gengvinij 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. Avaiable from: [http://www.emedicine.com/derm/topic\\_281.htm](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 infection<sup>۷۰-۳۲:۲۵۷؛ ۲۰۰۴</sup> ..
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.