

الف

**دانشگاه آزاد اسلامي**



**واحد ساوه**

**دانشکده علوم پایه**

پايان نامه:

**جهت دریافت درجه كارشناسي ارشد میکروبیولوژی(M.Sc)**

عنوان:

**جداسازی، تعیین هویت مولکولی و انگشت نگاری ژنومی مایکوباکتریوم از ماهیان پرورشی**

**فهرست مطالب**

عنوان صفحه

چکیده 1

فصل اول (کلیات و مقدمه ) 3

1-1- تاریخچه بیماری سل 4

**2-1- اپیدمیولوژی**وضعیت بیماری سل در جهان 7

3-1-اپیدمیولوژی مولکولی سل 10

4-1-سل در آبزیان و ماهیان پرورشی 10

5-1-تاریخچه پرورش ماهی 11

6-1- تاریخچه پرورش ماهیدر ایران.........................................................................................13

7-1- تصاویر و نام علمی نمونه ها 14

فصل دوم (بررسی منابع موجود) 17

1-2- مایکو باکتریوم ها 18

2-2- نامگذاری............................................................................................................................19

3-2- طبقه بندی مایکو باکتریوم ها 20

4-2- تست های تعیین هویت براساس جدول بیوشیمیایی 24

5-2- تاریخچه سل در آبزیان 28

6-2- نشانه های عمومی بیماری در آبزیان..................................................................................31

7-2- عفونت حیوانات با مایکوباکتری ها 33

8-2- مرفولوژی وخصوصیات میکروسکوپی 41

9-2- خصوصیات رشد 42

10-2- فاکتورهای ویرولانس 43

11-2- بیماری زایی سل ماهی ها 46

12-2- پروب های اسید نوکلئیک 48

13-2- ریبوتایپینگ 48

14-2- روش های هیبریداسیون DNA-DNA 49

15-2- پروب های هیبریداسیون داخل ژنومی 49

16-2- تعیین توالی اسیدهای هسته ای 49

17-2- ژنتیک مایکو باکتریوم توبرکلوزیس 50

18-2- تکنیک های مولکولی 51

1-18-2- تکنیک های ژنومی که اساس آنها PCR نمی باشد 51

1-1-18-2- آنالیز توسط آنزیم های محدود کننده 52

2-1-18-2- انگشت نگاری یا Finger printing 52

3-1-18-2-RFLPبه کمک قطعات تکراری GC 55

4-1-18-2-DR-RFLP 55

2-18-2- تکنیک های ژنومی که اساس آنها PCR می باشد 56

1-2-18-2- اسپولیگوتایپینگ 56

2-2-18-2- پروتئین های شوک حرارتی (hsp65 ) 57

فصل سوم (مواد و روش ها ) 63

1-3- جمع آوری نمونه..............................................................................................................64

2-3- مراحل کشت 64

3-3- بررسی لوله کشت..............................................................................................................66

4-3- تفسیرنتایج گسترش..........................................................................................................66

5-3- کشت مجدد.......................................................................................................................66

6-3- مواد و تجهیزات مورد نیاز جهت انجام تکنیک های مولکولی 67

7-3- محیط های کشت مصرفی 70

8-3- تعیین هویت بااستفاده از PCR 73

**9-3- پرایمر های ژنHSP65..........................................................................................**77

10-3- مراحل روش تحقیق 78

11-3- استخراج DNA 79

12-3- مراحل استخراج DNA 80

13-3- ملاحظات ضروری در زمان استخراج DNA 82

14-3- شرایط نگهداری DNA 83

15-3- ارزیابی کمیت DNA استخراج شده برای انجام PCR و RFLP 86

1-15-3- تخمین غلظت با استفاده از رنگ آمیزی اتیدیوم بروماید 87

2-15-3- تخمین غلظت DNA با استفاده از اسپکتروفتومتر نانودراپ 87

16-3- تست های بیوشیمیایی تعیین هویت مایکوباکتریوم ها 90

17-3- الكتروفورز محصول PCR 92

18-3- RFLP 93

1-18-3- هضم DNA کروموزمی به وسیله آنزیم Pvu II 93

19-3- جداسازی قطعات به وسیله الکتروفورز 95

20-3- ساترن بلاتینگ 99

21-3- عمل آوری ژل قبل از بلاتینگ 100

22-3- بلاتینگ به روش موئینه 101

23-3- عمل آوری غشا بعد از بلاتینگ 103

24-3- تثبیت DNA برروی غشا 104

25-3- تهیه پروب های هیبریداسیون 104

26-3- شناسایی 105

27-3- پری هیبریداسیون و هیبریداسیون با پروب نشان دار با دیگوکسیژنین 106

1-27-3- مرحله پری هیبریداسیون 106

1-27-3- مرحله هیبیریداسیون 107

فصل چهارم (نتایج ) 109

فصل پنجم (بحث) 117

پیشنهادات 126

منابع 127

پیوست 141

چكيده انگليسي 145

**سپاسگزاري**

تشكر و سپاس بيكران خويش را تقديم استاد بزرگوار و بي همتا، جناب آقاي دكتر نادر مصوري مي‌نمايم

كه به من علم و معرفت زندگي آموخته اند و خداوند را شاكرم كه توفيق شاگرديشان همواره براي من موهبتي

بزرگ است.

با تشكر و قدرداني صميمانه از تمامي‌همكاران در آزمايشگاه سل انيستيتو رازي كه هركدام به نحوي من را در انجام

اين پايان نامه ياري رساندند.

عنوان :

جداسازی، تعیین هویت مولکولی وانگشت نگاری

ژنومی مایکوباکتریوم

از ماهیان پرورشی استان قزوین

**چکیده:**

سل یک بیماری مسری، عفونی و مزمن است که به اندازه تاریخ بشر قدمت داردو در صورت عدم درمان به موقع موجب ناتوانی و مرگ بیمار می‌گردد. سل آبزیان یکی از بیماری های مشترک بین انسان وآبزیان (قابل انتقال به انسان) در دنیا به شمار می آید. گونه هایی از مایکوباکتریوم ها، توبرکلوزیس در ماهی ایجاد می نمایند که کانون این عفونت هاآب بوده و می توانند از طریق زخم های پوستی به بدن انسان وارد شوند و ضایعه گرانولوم استخر شنا یا تانک ماهی را ایجاد نمایند. هدف از انجام این تحقیق جدا سازی مایکوباکتریوم از ماهیان پرورشی وسپس تعیین هویت مولکولی تهیه الگوی ژنومی جدایه ها(انگشت نگاری ژنومی) می باشد. این گونه­ها میتوانند با انتقال به انسان سبب بیماری جدی شوند که تشخیص آن حتی برای پزشکان متخصص مشکل می باشد. لازم به ذکر است از آنجا که این تحقیق بر روی ماهیان پرورشی می باشد، احتمال خطر برای بهداشت عمومی نیز وجود خواهد داشت. از این رو جداسازی مایکوباکتریم و شناسایی گونه های آن و بررسی دقیق در مورد آنها ضروری می باشد. در راستای نیل به اهداف فوق از اردیبهشت 1392تا مردادماه سال 1393 تعداد 127 نمونه ماهی پرورشی که به صورت تصادفی و با توجه به وضایعات، از 5 استخر پرورش مختلف و فروشگاه های عرضه کننده ماهی در مناطق جداگانه شهرستان قزوین جمع آوری گردید. سپس نمونه ها به صورت تازه و یا فریز شده به آزمایشگاه رفرانس ملی سل موسسه رازی منقل شد. همه نمونه ها در شرایط استریل کالبد گشایی و کشت اختصاصی میکروبی گردیدند. سپس طی مدت زمان یک الی دو هفته از کشت و رشد باکتری در محیط های اختصاصی، تهیه اسمیر از آنها و رنگ آمیزی فلئوروکروم و زیل نلسن انجام گردید. در ادامه این مطالعه استخراجDNA کروموزومی باکتری هاصورت گرفت و پس از آن چندین نوبت PCR hsp65، IS6110 ،16SrRNA و ITSجهت تعیین گونه با پرایمر های اختصاصی انجام شد.

جدایه های اسید نوکلئیک های مورد آزمایش برای تائید نهایی با روش تعیین توالی نوکلئوتیدی، به شرکت ماکروژن کشور کره جهت خوانش ارسال شد، ضمنا در مطالعه حاضر تعداد 6 نمونه با روش RFLP به کمک آنزیمPVUII هضم آنزیمی گردید و نیز هیبریداسیون با مارکرهایDR وPGRSوSouthern blotting انجام گرفت. در نتایج حاصل از 127ماهی پرورشی مورد مطالعه 13باکتری اسید فست جدا گردیدو تمام جدایه ها با پرایمر اختصاصی مایکوباکتریوم مثبت بودند. نتایج حاصل از خوانش تعیین توالی نوکلئوتید ها با برنامه Chromas و Clustal x مرتب گردید که جدایه ها با *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و مایکوباکتریوم مارینوم*که اختصاصی آبزیان بوده تائید شد. هضم آنزیمی 6 نمونه منتخب به خوبی با آنزیم PVUII انجام گردید و سپس با دو پروب اختصاصیDR وPGRS تنوع ژنتیکی نسبتا خوبی را ظاهر نمود به طوری که2 ژنوتیپ توسط پروبDR و 5 ژنوتیپ توسط پروب PGRSشناسایی شد.

این بررسی شواهد و دلایل محکمی را فراهم می آورد که در ماهیان پرورشی ایران مایکوباکتریوم وجود دارد و انتقال آن به انسان محتمل بوده و ایجاد ضایعات پوستی حتمی می باشد. یاد آوری می­شود این تحقیق اولین مطالعه مولکولی برروی مایکوباکتریوم در ماهیان پرورشی استان قزوین می باشد، لذا ادامه برنامه هایی مبنی بر شناسایی مایکوباکتریوم ها در سایر استان ها جهت شناسایی و ردیابی مایکوباکتریوم ها در آبزیان و مرتبط بودن با عفونت های پوستی در انسان الزامی می باشد و ازآنجا که ماهیان پرورشی علاوه بر تاثیر در بهداشت عمومی، نقش بسزایی درتغذیه و زنجیره غذایی دارند مطالعات مبتنی برشناسایی مایکوباکتریوم و تعیین هویت آن هادرسایر نقاط کشور ضرروری می باشد.

***کلید واژه ها****: مایکوباکتریوم، مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم فورتوئیتوم، گرانولوم استخر شنا، ماهیان پرورشی، مایکوباکتریوزیس*

فصل اول

کلیات ومقدمه

**1-1-تاريخچه بیماری سل:**

سل از دوران [باستان](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%AA%D8%A7%D8%B1%DB%8C%D8%AE%DA%86%D9%87_%D8%A8%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%A7%D9%86%DB%8C&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) همراه انسان بوده است(129). قدیمی ترین تشخیص بدون ابهام شامل شواهد این بیماری در بقایای گاومیش کوهان دار امریکایی است که به ۱۷٬۰۰۰ سال پیش باز می‌گردد(130). با این حال، مشخص نیست که آیا سل، در گاومیش به وجود آمده و پس از آن به انسان منتقل شده است، یا اینکه از یک جد مشترک انشعاب یافته است (131،132). باقی‌مانده‌های اسکلتی نشان می‌دهد که انسان‌های [ماقبل تاریخ](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D8%A7%D9%82%D8%A8%D9%84_%D8%AA%D8%A7%D8%B1%DB%8C%D8%AE) (۴۰۰۰ سال [قبل از میلاد مسیح](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B9%D8%B5%D8%B1_%D9%85%D8%AA%D8%AF%D8%A7%D9%88%D9%84&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js)) سل داشته‌اند. پژوهشگران پوسیدگی مسلول را در ستون فقرات [مومیایی](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D9%88%D9%85%DB%8C%D8%A7%DB%8C%DB%8C) [مصری](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D8%B5%D8%B1) یافته‌اند که به ۳۰۰۰-۲۴۰۰ سال [قبل از میلاد](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%82%D8%A8%D9%84_%D8%A7%D8%B2_%D9%85%DB%8C%D9%84%D8%A7%D8%AF) باز می‌گردد(133)(تصویر1-1). در سال 1865 ماهیت ميكروبي این بیماری توسط پزشك فرانسوی ویلمین برای اولین بارکشف شد. او ثابت كرد كه اين بيماري، قابل سرایت می باشد و اگر عصاره به دست آمده از سل انسانی به كبك يا خوکچه تزريق شود، در این حيوانات. موجب بیماری می شود. بیماری سل كه اولين بار فساد بافت ناميده شد**.** «Phthisis» یک کلمه یونانی به معنی «مصرف» است که اصطلاح قدیمی برای بیماری سل ریوی می‌باشد(133). در حدود ۴۶۰ سال قبل از میلاد، [بقراط](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%A8%D9%82%D8%B1%D8%A7%D8%B7) سل ریوی را به عنوان گسترده ترین بیماری در آن زمان شناسایی کرد. افراد مبتلا به سل ریوی تب و سرفه خونین داشتند. سل ریوی تقریباً همیشه کشنده بود(135). مطالعات ژنتیکی نشان می‌دهد که سل از حدود سال ۱۰۰ میلادی در میان [آمریکایی‌ها](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%A2%D9%85%D8%B1%DB%8C%DA%A9%D8%A7%DB%8C%DB%8C%E2%80%8C%D9%87%D8%A7) وجود داشته است(136).

نوع ریوی مرتبط با [برآمدگی‌ها](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%A8%D8%B1%D8%A2%D9%85%D8%AF%DA%AF%DB%8C_(%D8%A2%D9%86%D8%A7%D8%AA%D9%88%D9%85%DB%8C)&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) به عنوان یک [آسیب شناسی](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%A2%D8%B3%DB%8C%D8%A8_%D8%B4%D9%86%D8%A7%D8%B3%DB%8C) توسط [دکتر ریچارد مورتون](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%AF%DA%A9%D8%AA%D8%B1_%D8%B1%DB%8C%DA%86%D8%A7%D8%B1%D8%AF_%D9%85%D9%88%D8%B1%D8%AA%D9%88%D9%86&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) در سال ۱۶۸۹ تعیین شد(137،138). با این حال، سل انواع مختلفی از علائم را داراست، از این رو، سل تا دهه ۲۰ [قرن نوزدهم](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%82%D8%B1%D9%86_%D9%86%D9%88%D8%B2%D8%AF%D9%87%D9%85) به عنوان یک بیماری واحد شناسایی نشده بود. این بیماری در سال ۱۸۳۹ توسط [جی. ال. شوئن](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%DB%8C%D9%88%D9%87%D8%A7%D9%86_%D9%84%D9%88%DA%A9%D8%A7%D8%B3_%D8%B4%D9%88%D8%A6%D9%86&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) سل نامیده شد(104). طی سال‌های ۱۸۳۸-۱۸۴۵، دکتر جان کروگان (John Croghan)، صاحب [غار ماموت](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%BA%D8%A7%D8%B1_%D9%85%D8%A7%D9%85%D9%88%D8%AA)، افراد مبتلا به سل را به داخل غار می‌برد به این امید که این بیماری را با [درجه حرارت](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D8%AF%D8%B1%D8%AC%D9%87_%D8%AD%D8%B1%D8%A7%D8%B1%D8%AA) ثابت و خلوص هوای غار درمان کند: آنها ظرف یک سال درگذشتند(139).

در سال ۱۸۱۵، یکی از هر چهار مرگ در انگلستان به دلیل «مصرف» بود. در سال ۱۹۱۸، سل دلیل یکی از هر شش مرگ در فرانسه بود. هنگامی که [شورای تحقیقات پزشکی](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B4%D9%88%D8%B1%D8%A7%DB%8C_%D8%AA%D8%AD%D9%82%DB%8C%D9%82%D8%A7%D8%AA_%D9%BE%D8%B2%D8%B4%DA%A9%DB%8C_(UK)&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) در انگلستان در سال ۱۹۱۳ تشکیل شد، تمرکز اولیه آن تحقیقات سل بود(140).

قرن شانزدهم به عنوان بيماري مسري در بين اقوام مديترانه شناخته شد(100). اگرچه در سال 1720 پزشک انگلیسی بنام بنجامبن مارتین[[1]](#footnote-1) مشکوک به انتقال بیماری از طریق هوا شده بود ولی تا سال 1881 که آستین فلینت[[2]](#footnote-2) با مدرک آنرا اثبات نمود باور کلی بر غیر مسری بودن بیماری بود(93).

بیماری سل درقرن نوزدهم که سبب مرگ ومیر بسیار بالایی در اروپا و امريكا شد به همین دلیل آن را طاعون سفید نامیدند. تلفات ناشی از این بیماری بسيار بالا بود ( 400 نفر از هر 000/100). باسیلی که باعث بیماری سل می‌شود، مایکوباکتریوم توبرکلوسیس، در ۲۴ مارس ۱۸۸۲ توسط [رابرت کخ (Robert Koch)](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D8%A8%D8%B1%D8%AA_%DA%A9%D8%AE_(Robert_Koch)&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) شناخته و توصیف شد و به همين دلیل، آن را باسيل كخ نامیدند(128). او موفق به دریافت [جایزه نوبل در فیزیولوژی یا پزشکی](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%AC%D8%A7%DB%8C%D8%B2%D9%87_%D9%86%D9%88%D8%A8%D9%84_%D8%AF%D8%B1_%D9%81%DB%8C%D8%B2%DB%8C%D9%88%D9%84%D9%88%DA%98%DB%8C_%DB%8C%D8%A7_%D9%BE%D8%B2%D8%B4%DA%A9%DB%8C&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) در سال ۱۹۰۵ برای این کشف شد(141). کخ معتقد نبود که بیماری سل گاومیشی (گاوی) و سل انسانی مشابه باشند. این باور درک اینکه که شیر آلوده هم یک [منبع عفونت](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%85%D9%86%D8%A8%D8%B9_%D8%B9%D9%81%D9%88%D9%86%D8%AA) بود را به تعویق انداخت کخ در سال ۱۸۹۰ یک عصاره [گلیسیرین](http://fa.wikipedia.org/wiki/%DA%AF%D9%84%DB%8C%D8%B3%DB%8C%D8%B1%DB%8C%D9%86) از باسیل سل را به عنوان «درمان» سل اعلام کرد. او آن را «توبرکولین» نامید. اگرچه «توبرکولین» مؤثر نبود اما از آن به عنوان یک تست غربالگری برای وجود سل پیش بالینی استفاده شد(142).

اوموفق شداین باسیل را از جراحات و ضايعات فرد بيمار جداکرده و ودر محیطی که سرم منعقد شده گاو و گوسفند بود كشت دهد وبوسیله رنگ آمیزی مختص به این باسیل موفق به مشاهده آن شد. همچنین کخ با تزریق ضایعات حاصل به حيوانات حساس باعث ایجاد بیماری در این حيوانات شده وتوانست بطور مجدد باكتري اوليه را ازحیوان به دست آورد. امروزه این شیوه به اصول كخ معروف است(69). با شروع قرن 19، پزشكان دو روش اساسی را جهت تشخيص سل رامورداستفاده قراردادند:

1 - تشخيص عامل بيماري زايي به وسيله ميكروسكوپ (رابرت كخ در 1905)

2- اشعه X از سينه (ويليام كونارد در 1901).

با گذشت سالها هم چنان اين دو روش ابزارهاي اساسی تشخيص سل هستند. (21).

باتوجه به تحقیقات مهم وگسترده در زمینه بیماری سل، مشخص شدکه این باکتری واجد ساختاری است که مقاوم به اسید و الکل می‌باشد و با بهره گیری از همین خاصیت ویژهو بااستفاده از رنگ­آمیزی با روش ذیل نلسون میتوان این باکتری را تشخیص دادکه دراین روش پس ازرنگ آمیزی حذف رنگ توسط اسیدو الکل مشکل می باشد. این روش رنگ‌آمیزی که باکمک شخصی بنام ارلیش پایه گذاری شد،روش ذیل و نلسون نام گرفت. تشخیص افتراقی سل مرغی در انسان در سال 1889 توسط ریولتا[[3]](#footnote-3) و درسال 1890 توسط مافوکی[[4]](#footnote-4) به انجام رسید. در سال 1891 کخ توبرکولین را تهیه کرد و باگذشت زمان در سال 1902اسمیت[[5]](#footnote-5) باسیل اسید فست سل گاوی را شرح داد(70).



تصویر1-1:مومیایی یافت شده در کـشور مصر، استخوان سـتون فقرات دارای بدشـکلی Pott، کـه به دلیل بیماری سـل ایـجاد شده است.

سل یک بیماری با انتشارجهانی می باشد. این بیماری یکی از بیماریهای عفونی مشترک بین انسان و دام است که از لحاظ قدمت، سابقه ای به اندازه حیات بشریت داشته و از زمان های بسیار قدیم مورد مطالعه و بررسی قرار گرفته است. اما برخلاف متد های مختلف درمانی هر ساله تلفات بسیاری را در پی دارد وطبق ارزیابی های اخیر یک سوم جهان به مایکوباکتریوم آلوده شده اند وهم اکنون نیز یکی از مشکلات بهداشت عمومی جهانی محسوب می شود.(7).

در طول قرن بیستم انتشار این بیماری در کشورهای صنعتی پیشرفته رو به کاهش بوده ولی متاسفانه در کشورهای در حال توسعه این روند روبه کاهش نمی باشد. با توجه به انتشار دوبارهاین بیماری در دو دهه اخیر می توان نتیجه گرفت که اخیرا اکثر کشورها با مایکوباکتریوم‌ها[[6]](#footnote-6)درگیر بوده اند. با توجه به همه گیر شدن بیماری خطرناک ایدز[[7]](#footnote-7) و پیدایش گونه‌های [مقاوم در برابرچند دارو (MDR:Multi Drug Resistancy](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%88%D9%85_%D8%AF%D8%B1_%D8%A8%D8%B1%D8%A7%D8%A8%D8%B1_%D8%A2%D9%86%D8%AA%DB%8C_%D8%A8%DB%8C%D9%88%D8%AA%DB%8C%DA%A9&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js)) در دهه ۸۰ قرن بیستم حذف سل را غیر محتمل ترکرد. تجدید حیات متعاقب سل موجب اعلام یک وضعیت اضطراری برای بهداشت جهانی توسط WHOدر سال ۱۹۹۳ شد (143).

درعصرحاضر از روی فراوانی آمار داده شده میتوان نتیجه گیری کرد بیماری سل یکی ازبیماری های عفونی مطرح درانسان ودام وطیور می باشد. نزدیک به یک سوم از مردم جهان دچار عفونت سل بوده وجمعیت قابل توجهی از دامها نیز آلوده به باسیل سل می­باشند(92).

درتاریخ ایران باستان هم گزارشاتی مبنی بروجود بیماری سل درآن زمان ها داشته .در کتاب مقدس زرتشتیان، بنام اوستا به این بیماری اشاره شده است(2). ذکریای رازی معتقد بود که معالجه بیماری های مختلف مانند سل، به دلیل پنهان بودن ضایعات ریوی، بهبود بیماران بسیار مشکل است. پزشک معروف ابن سینا، نیزدر کتاب های متعددش درمورد این بیماری مطالبی را بیان نموده است. به نظر او این بیماری یک بیماری عمومی وهمه گیرمی باشد که به شکل موضعی ظاهر می شود. او در کتاب قانون، در مورد موروثی بودن بیماری سل مطالبی را بیان کرده است (5).

درسال 1940آنتي بيوتيك هاي استرپتومايسين و پاراآمينوساليسيك اسيد اولین آنتي بيوتيك هایی بودند که برای درمان بيماري سل استفاده شدند. اين داروها به طور موفقيت آميزي تجويز مي‌شدند ولي بعد از مدت کوتاهي، مقاومت نسبت به اين دو دارو ديده شد. در اواخر دهه 1950، ايزونيازيد را به رژيم درمان سل اضافه كردند. در ادامه اتامبوتول و سپس در اول دهه 1970، ريفامپسين معرفي شد. داروهاي انتخابی نوع دوم دردرمان سل شامل فلوروکينولونها، آميكاسين‌، كانامايسين، كاپرئومايسين، اتيوناميد، پاراآمينوسياليسيك اسيد، سيكلوسرين و تياكتازون مي‌باشند. داروهاي گروه دوم درمان، گران قيمت بوده و كارايي پاييني داشته و سميت بالايي دارند (77).

**2-1-اپیدمیولوژی:**

**وضعیت بیماری سل در جهان:**

بیماری سل یکی ازمعضلات بهداشتی ومورد بحث در اکثر کشورهای جهان است. اما شیوع آن برحسب داده های آماری باتوجه به منطقه های مختلف بسیار متفاوت می باشد، به طور مثال در آمریکا آمار بیماری سل، کمتر از 5 مورد در هر 100000 نفرمی باشد، ولی در آسیا و آفریقا وکشورهای درحال توسعه بیشتراز صدها مورد در هر 100000 نفر رسیده است. برطبق آمار سازمان جهانی بهداشت، یک سوم جمعیت دنیا آلوده به سل هستند یعنی از هر سه نفر جمعیت جهان یک نفر به باسیل سل آلوده می باشد و در هر ثانیه یک نفر به آن افزوده می شود. 5/14 میلیون نفر در دنیا مبتلا به بیماری سل می باشند که بیش از 80 درصد این موارد مربوط به 22 کشور در حال توسعه دنیاست. سالانه 9 میلیون نفر مورد جدید بیماری سل در دنیا گزارش می شود. تقریبا 2 میلیون نفر در اثر بیماری جان خود را از دست می دهند و بیش از 90 درصد موارد مرگ ومیر ناشی از سل در کشورهای در حال توسعه رخ می دهد. این در حالی است که تنها 57 درصد موارد سل تخمینی در سال 2007 شناسایی و به سازمان جهانی بهداشت گزارش شده است (109).

در حال حاضر بروز موارد مقاوم به دارو نیزیکی از معضلات اساسی جهت درمان و کنترل بیماری سل در سراسر دنیاست. شیوع سالانه 440000 مورد جدید MDR (سل مقاوم به دارو) در جهان تخمین زده می شود که مسئول 3/3 درصد موارد جدید سل می باشد و باعث مرگ 150000 نفر در سال می گردد. در برخی کشورها شیوع سل مقاوم به دارو به 20 درصد می رسد. تا پایان سال 2010 ، 69 کشور در دنیا از جمله ایران سل مقاوم به دارو را گزارش کرده اند و تخمین زده می شود که سالانه 25000 مورد سل مقاوم به دارو رخ دهد(122).

در کشور های صنعتی 80 درصد موارد بیماری سل در گروه سنی 50 ساله و بالاتر و در کشورهای در حال توسعه بیش از 75 درصد موارد در افراد 54-15 ساله بروز می کند این امر باعث غیبت از کار حدود 3 یا 4 ماه می شود و 20 تا 30 درصد درآمد خانوار را از بین می برد. علاوه برآن سبب مشکلات سوء دیگری از قبیل طلاق، ترک تحصیل و اختلالات روحی در خانواده ها می گردد(56).

در دنیا طی سال 2008 ، 8/1 میلیون نفر به علت ابتلا به سل جان خود را از دست داده اند (که از این تعداد 500000 نفر بیماری ایدز نیز داشتند)، یعنی 4500 مرگ در روز اتفاق افتاده است. سازمان جهانی سل در بررسی موارد سل گزارش کرده که 27/9 میلیون نفر از جمعیت جهان در سال 2007 مبتلا به سل بودند یعنی بیشتر از 30000 مورد، نسبت به سال 2006 افزایش ابتلا به سل رخ داده است. این میزان در سال 2009 به 4/9 میلیون نفر رسیده است. نتایج بررسی ها نشان می دهد که سل ریوی اغلب بیش از دو سوم موارد بیماری را به خود اختصاص می دهد، در یک مطالعه که به بررسی 253299 مورد بیمار مسلول طی 14 سال در آمریکا پرداخته است، سل ریوی 6/73 درصد و سل خارج ریوی 7/18 درصد موارد را تشکیل می داد(117).

در مطالعه دیگری در آمریکا موارد سل در بین سال های 2007-1994 بررسی شد که از بین 18965 مورد گزارش شده 31 درصد نوجوانان زیر 18 سال بودند این مطالعه نشان داد که بیش از 40 درصد کاهش موارد سل در بین نوجوانان رخ داده است. براساس آمار WHO در کشور های اروپایی، سالیانه 445000 مورد سل یعنی 50 نفر در هر ساعت مبتلا به سل می شوند که 66000 آنها یعنی 8 نفر در ساعت فوت می کنند. 75 درصد موارد سل در شرق اروپا رخ می دهد. بروز سل از 5 نفر به ازای 100000 نفر در نروژ تا 198 نفر در تاجیکستان متفاوت می باشد. کشور روسیه در بین 22 کشور با شیوع بالای سل در رتبه دوازدهم قرار دارد. تخمین زده می شود که 70000 سل مقاوم به دارو سالیانه در اروپا رخ می دهد که 95 درصد موارد در شرق اروپا است. بر اساس آماری که تا سال 2005 اعلام شده است، 14000 مورد بیمار مبتلا به سل و HIV گزارش شده است که مسلما آمار واقعی بسیار بیشتر از این می باشد. در منطقه جنوب شرقی آسیا 88/4 میلیون نفر مبتلا به سل می باشند که میزان بروز سالیانه سل در این منطقه 17/3 میلیون نفر می باشد. 5 کشور در این منطقه جزء 22 کشور دارای میزان بالای ابتلا در جهان می باشند. کشور هند 20 درصد موارد سل جهان را دارا می باشد. بر طبق آمار سال 2008 در این منطقه کمترین میزان بروز سالیانه در 100000 نفر جمعیت کشور مربوط به مالدیو با 47 مورد و بیشترین موارد ابتلا در شبه جزیره کره با 344 مورد می باشد(121).

در منطقه مدیترانه شرقی که ایران نیز در این منطقه قرار دارد، تعداد929166 مورد سل در سال 2008 گزارش شده است. در این میان 7 کشور افغانستان، پاکستان، عراق، مراکش، سومالی، سودان، یمن 92 درصد موارد سل را به خود اختصاص داده اند(122).

طبق آمارهای انجام شده در سراسر جهان در هرثانیه یک نفر به بیماری سل مبتلا می شوند و درهر 10ثانیه یک نفر جان خود را در اثر این بیماری از دست می دهد. درسال 1993 سازمان بهداشت جهانی سل را به عنوان فوریت جهانی اعلام داشت.

طی 45 سال گذشته روند نزولی بروز بیماری در ایران نیز مشهود است، به طوری که از 142 مورد در100 هزار نفردر1342 تا 4/13 در، صد هزار نفر در سال 87 کاهش بروز مشاهده می شود(بیش از 10 برابر کاهش). بر طبق آخرین آمارWHO از جمعیت 74 میلیون نفری جمعیت ایران در سال 2009 ، 9763 مورد سل جدید ثبت شده است که از این میزان 52 درصد زن و 14 درصد غیر ایرانی بوده و بیشترین میزان شیوع سل در گروه سنی 65 سال به بالا بوده است. میزان بروز سل در ایران ، در مناطق حاشیه ای کشور از قبیل سیستان و بلوچستان، خراسان، مازندران، گیلان، آذربایجان شرقی و غربی، اردبیل، کردستان، خوزستان و برعکس در قسمت های مرکزی کشور پایین است(109).

3-1- اپيدميولوژي مولکولي سل :

اپيدميولوژي در تعيين بروز و ميزان شيوع بيماري هاي عفوني نقش به سزايي دارد. اپيدميولوژي در بيماري هاي عفوني که به راحتي قابل انتقال است، از ارزش خاصي بر خوردار می باشد. به همين علت در دهه هاي اخير اپيدميولوژي اهميت ويژه اي را در مطالعات کنترلي بيماري هاي عفوني پيدا کرده است. از روي اطلاعات اپيدميولوژي، پيدايش همه گيري در بيماري هاي عفوني مشخص شده و نتايج و پي آمدهاي ناشي از آن قابل پيش بيني است(75,83). علاوه بر آن، براي پيدا کردن ارتباط بين بيماري و ساير فاکتورهاي دخيل در آن، منشاء عفونت و انتشار بايد رديابي شود.

انتشار بيماري سل بر دو فاکتور اصلي استوار است:

1) سرعت انتشار در مکانهاي گروهي و تماس هاي ناشی از برخورد افراد با یکدیگر که معمولا در محل کار مي‌باشد، بالا است و الگوي ژنوتيپي نمونه هايي که از مکانهاي محدود جدا شده است يکسان مي‌باشد.

2) در اغلب موارد انتشار احتمالا در درمانهاي ناقص ضد سلي رخ مي‌دهد .

مشاهدات به طور مستقيم نشان مي‌دهند 3/1 موارد انتشار بيماري سل، چندين سال بعد از درمان صورت مي‌گيرد. بيماراني که مبتلا به بيماري سل هستند و علائم بيماري در آنها توسعه يافته است در انتشار بيماري نقش دارند.

در اپيدميولوژي مولکولي، پراکندگي و انتشار بيماري در جمعيت هاي انساني با استفاده از تکنيک هاي مولکولي مورد ارزيابي قرار مي‌گيرد. نتايج بدست آمده از اپيدميولوژي مولکولي در تعيين برنامه ها و راهبردهاي موجود در کنترل و پيشگيري از انتشار بيماري هاي عفوني تاثير به سزايي دارد (75).

**4-1-سل درآبزیان و ماهیان پرورشی**:

سل یکی ازبیماری های عفونی باکتریای خطرناک است که هم قدرت واگیری بالا دارد وهم مرگ ومیر زیادی به همراه دارد و اغلب در نتيجه ضعف و ناتواني و عدم سلامت، شرايط نامطلوب زندگي و كمبود ويتامين به وجود مي آيد. ماهي ها در استخرهای شلوغ اغب در معرض خطر قرار دارند. در بازرسی پس از  مرگ  ندولهای (دانه‌های) کوچک سفید در اندامهای داخلی مشاهده میشود. عامل ایجاد این بیماری مانند سایر حیوانات مایکوباکتریوم است. گونه های مختلفی از مایکوباکتریوم ها عامل سل هستند. برخی سویه ها انسانی وباعث ابتلا انسان می شوند مانند مایکوباکتریوم توبرکلوزیس وبرخی مانند مایکوباکتریوم بوویس سویه گاوی می باشند. در ماهیان نیز سل یکی از بیماری های بوده که به وسیله گونه های دیگری از مایکوباکتریوم ها ایجاد می شود که به آنها آتیپک می گویند. گونه هایی که باعث ایجاد مایکوباکتریوزیس در ماهی می شود،جزء گونه هایNTM- non tuberculosis (غیر سلی)بوده و به آنها سویه سلی آبزیان گفته می شود که در موجود سالم ایجاد کننده بیماری مشابه سل انسانی نیست. سل در ماهیان مایکوباکتریوزیس نامیده می شود. کانون استقرار این باکتری ها در آب می باشد و این باکتری ها با محیط زندگی خود رابطه ی گسترده ای دارندیعنی قادر هستند در محیط آبی زندگی کنند بدون اینکه به میزبان احتیاج داشته باشند. وجودماهی یا بافت آسیب دیده به عنوان میزبان برای ادامه زندگی آنها ضروری نیست. تا به حال این باکتری هارا از استخرهای شنا، آبهای ساحلی، منبع های آب آشامیدنی، آکواریوم ها، تاسیسات پرورش آبزیان و استخر ماهیان پرورشی جدا کرده اند. باتوجه به اینکه سل ماهی یک بیماری باشیوع نگران کننده می باشد وباعث همه گیرشدن ماهیان درون یک استخرشده وباتوجه به مزمن بودن این بیماری در نهایت باعث کم وزن شدن و مرگ ماهیان شده وخسارت های زیادی را برصنعت پرورش ماهی وارد می نماید. بادرنظرگرفتن اینکه در انسان ایجاد بیماری های پوستی می نماید وبامبتلا شدن انسان احتیاج به درمان طولانی وهزینه بردار دارد (124).

**5-1-تاریخچه پرورش ماهی:ت:ار**

بیش از چهارهزار سال از شروع نگهداری ماهی توسط انسان می گذرد و بی شک آبزی پروری برای اولین بار در خاور دور آغاز شده است، همچنین در اروپای مرکزی ومصر قدیم هم تاریخچه طولانی را به خود تعلق میدهد.

اولین نوشته ها در زمینه پرورش ماهی در سال 475 قبل از میلاد، در کتاب فن لی چینی آمده است. نگارش این کتاب باقدمت حدود 2500 سال قبل نشان می دهد که در آن زمان پرورش ماهی در چین رواج داشت و مشاغل پر درآمد بوده است(129).   
بسیاری از مورخین بر این باورند که پرورش ماهی تیلاپیا در مصر قبل تر از پرورش ماهی کپور در چینصورت گرفته است(130).چینی ها کم کم ماهی کپور را به چند کشور دیگر آسیایی از جمله آسیای دور، و در قرون وسطی آن را به کشورهای اروپایی بردند و در استخر های صومعه ها پرورش دادند. این ماهی بعدا از اروپا به سایر مناطق برده شد(135). از قرن ششم میلادی به بعد، ماهی کپور اهمیت پرورشی خود را از دست داد. گفته می شود که این امر به علت همنام بودن این ماهی با امپراتور لی از سلسله تنگ بود ( در زبان چینی به ماهی کپور لی گفته می شود ). مردم نام این امپراتور را مقدس می دانستند و جایز نبود که امپراتور را در استخر پرورش دهند. برای جبران عدم پرورش ماهی کپور، چینی ها اجبارا به گونه های دیگر قابل پرورش روی آوردند و به همین دلیل بود که کم کم پرورش انواع گونه های کپور چینی شامل: ماهی علف خوار(آمور)، ماهی کپور نقره ای ( فیتوفاگ )، ماهی سرگنده (بیگ هد ) و ماهی کپور معمولی رایج شد در سال 1958 مولدین، کپور نقره ای و سرگنده پرورش یافته دراستخرهای خاکی را با تزریق عصاره غده هیپوفیز کپور ماده معمولی به صورت مصنوعی تکثیر کردند. در حال حاضر مولدین ماهیان مختلف، با استفاده از هورمون مصنوعی و غده هیپوفیز ماهیان در سطح وسیع مورد تکثیر قرار می گیرند(138،139).

سومریان نیز از حدود دو هزار و پانصد سال قبل از میلاد سابقه نگه داری ماهی در استخر را داشته و از آنها به عنوان غذا استفاده می کردند. پس از آنها مصریان، رومیان و بسیاری از فرهنگ های باستانی دیگر مجذوب زیبایی، سرعت و چابکی ماهیها شدند و گاهی آنها را مقدس می دانستند. به عنوان مثال مصریان باستان، گونه های خاصی از ماهی های زیبا را تکثیر می کردند. تصاویری از این ماهی ها در نقاشی های دیواری مقبره های مصری یافت شده اند که آنها را به عنوان یک شیء مقدس نشان می‌دهد. تجار روم نیز در تکثیر ماهی های آب شیرین جهت استفاده غذایی در مخازن پرورش ماهی معروف بودند(20).

بعد از قرن ششم میلادی ماهی کپور اهمیت پرورشی را از دست داد و به همین دلیل بود که کم کم پرورش انواع گونه های کپور چینی شامل: ماهی علف خوار(آمور)، ماهی کپور نقره ای ( فیتوفاگ )، ماهی سرگنده (بیگ هد ) و ماهی کپور معمولی رایج شد(137).   
هنگامی که چینی ها مشغول معرفی گونه های مختلف کپور چینی به کشورهای مختلف بودند، هندی ها درقرن 11 میلادی در شرق هندوستان به کار پرورش انواع کپور پرداختند.   
اولین پرورش ماهی آبشور در اندونزی ، در قرن 15 میلادی انجام گرفت. در قرن 18 میلادی در این کشور حدود 3000 هکتار، زیر کشت ماهیان آب شور بود. (133).   
در قرن چهاردهم میلادی پرورش ماهی قزل آلا توسط کشیش فرانسوی به نام دون پین شو آغازگردید. رشد جمعیت در اکثر کشورهای جهان مخصوصادر حال توسعه، افزایش تولید محصولات پرورشی را برای کشورهایی که دارای منابع آبی و امکانات کافی هستند، الزامی نموده است.   
اولین گام در لقاح مصنوعی بوسیله دانشمند آلمانی لوتویک یاکوبی برداشته شد. او از ماهی ماده و نر قزل آلای آماده بصورت جداگانه تخم و اسپرم بدست آورد و آنها را با هم مخلوط کرد که این اولین لقاح مصنوعی تخم ماهی بود. در مورد ماهی های گرمابی در سال 1930، مولدین آماده، از محل های تخم ریزی طبیعی صید و لقاح مصنوعی داده شدند، ولی القاء تخم ریزی به مولدین با روش تزریق در سال 1934 بوسیله ریست شناسان برزیلی آغاز شد و بعد در آسیا و اروپا و آمریکای شمالی توسعه یافت(126).

مطالعات رسمی در زمینه ماهی را اولین بار ارسطو (384-322 قبل از میلاد) ثبت نمود. او در مورد ماهیها و عادات ماهی ها نوشت و علم ماهی (آبزی شناسی)را تعریف نمود. ارسطو با تحقیق در مورد ساختار فیزیکی 115 گونه ماهی دریای اژه، هم عصر خود به جمع آوری نخستین اسناد علمی آبزی شناسی پرداخت. در حال حاضر اطلاعات بیش از بیست هزار گونه ماهی ها در سراسر دنیا را طبقه بندی شده است (88، 47).

در سال 1856 ، دولت آمریکا موزه ملی تاریخ طبیعی موسسه اسمیتسونین را تاسیس نمود. اولین ثبت نام ماهی در اسناد دولتی آمریکا با نام ماهی مکنده (Catostomus hudsonius)در تاریخ 15 دسامبر سال 1856 ثبت شد. در ادامه نهادهای معروفی مثل موسسه اقیانوس شناسی wood holes در سال 1885 و موسسه اقیانوس شناسی Scripps در سال1903 تأسیس شد. درمخازن با کیفیت، فیلتر های بهبود یافته و پمپ های اکسیژن و رژیم غذایی متعادل از مواد غذایی مغذی امکان رشد و بقای ماهی بیشتراست(72،20).

هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی فراوانی مایکوباکتریوم در ماهیان پرورشی ایران وتعیین گونه جدایه های حاضر از نمونه های جمع آوری شده و تهیه الگوی ژنومی آنها می باشد. در همین راستا برروی 127 نمونه ماهی پرورشی مختلف کالبد گشایی و کشت اختصاصی میکروبی انجام گردید.

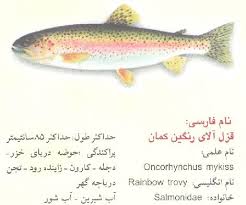
**6-1-تاریخچه پرورش آبزیان در ایران**

علی رغم داشتن بیش از 2700کیلومتر مرز آبی در شمال و جنوب و وجود منابع آبی فراوان در قسمتهای مختلف کشور، پرورش آبزیان در ایران تاریخچه ای بسیار کوتاه دارد. اگر چه اقداماتی در دهه دوم قرن اخیر برای تکثیر ماهیان خاویاری به صورت ابتدایی و توسط کارشناسان روسی انجام گرفته است، باوجود این احداث یک کارگاه مستقل تکثیر و پرورش ماهی، به سال 1341 بر می گردد. این کارگاه در کرج احداث شد واز همان ابتدا، به کار پرورش ماهی قزل آلای رنگین کمان پرداخت. اولین کارگاه تکثیر و پرورش ماهیان گرم آبی ( شامل انواع ماهیان کپور، علف خوار، کپور نقره ای و کپور سر گنده ) در سال 1351 در جنوب رشت تاسیس شد. در حال حاضر بزرگترین واحد تکثیر و پرورش ماهی کشور است و بالغ بر 1000 هکتار استخر پرورش ماهی دارد. احداث کارگاه های تکثیر و پرورش ماهی هر ساله رو به ازدیاد است. به هر حال تا کنون تمامی کار روی انواع کپور ماهیان چینی و ماهی قزل آلای پرورشی بوده و علی رغم وجود شرایط و امکانات فراوان، بر خلاف سایر کشورها، کار چشمگیری روی تکثیر و پرورش انواع ماهی های دریایی، میگوها ( سخت پوستان ) و صدف صورت نگرفته است(143).

7-1- اسامی علمی برخی از ماهیان پرورشیدر تصاویر زیر نشان داده شده است.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | [ANd9GcQeZ9au5FlS_7YE_cYVWyaXsX6oSRvz8veGfF-Pu_9fLTcAJ9jd](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://aharfishing.blogfa.com/cat-3.aspx&ei=hPPwU-bRDeSo0AX65ICoCQ&psig=AFQjCNE1-aIiP90kqYgDbRs0PH-G7WTvJA&ust=1408386292199159)  [ANd9GcSm63AhwF_jfO7NSyY4kARitMWNAMB8PhR-_cH7zzIM-5hwWEZ9](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://www.onlypet.ir/forum/variety/%D8%A7%D9%86%D9%88%D8%A7%D8%B9-%D9%85%D8%A7%D9%87%DB%8C-%D8%A7%DB%8C%D8%B1%D8%A7%D9%86%DB%8C%D8%A2%D8%A8-%D8%B4%D9%88%D8%B1-%D8%B4%DB%8C%D8%B1%DB%8C%D9%86-%D9%86%DB%8C%D9%85%D9%87-%D8%B4%D9%88%D8%B1/&ei=evTwU6DnEuKx0QWqg4DIBw&psig=AFQjCNE1-aIiP90kqYgDbRs0PH-G7WTvJA&ust=1408386292199159) | [ANd9GcRG4LMqDt5Jth04pGsHgcL_4CkTLQzlbFW80zMAHNcbMYd4yfIr](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://campo.ir/article/amoozesh/amoozeshemahigiri/id-68-htm/&ei=IvTwU_WQLYqb0QXS9YCYBQ&psig=AFQjCNE1-aIiP90kqYgDbRs0PH-G7WTvJA&ust=1408386292199159)  ANd9GcTO-vM5Z_WUNGZugBSJlRED8ot9nsUjVm1GOCopxvTzu-bz_15Suw |

[](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://aharfishing.blogfa.com/cat-3.aspx&ei=A_XwU4DRH6jY0QWtnoDAAg&psig=AFQjCNE1-aIiP90kqYgDbRs0PH-G7WTvJA&ust=1408386292199159)[](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://samansabzine.ir/%D9%BE%D8%B1%D9%88%D8%B1%D8%B4-%D9%85%D8%A7%D9%87%DB%8C/%D8%AE%D8%B1%DB%8C%D8%AF-%D8%A8%DA%86%D9%87-%D9%85%D8%A7%D9%87%DB%8C/%D8%B3%D8%B1%D8%AF-%D8%A2%D8%A8%DB%8C/&ei=s_LwU-6SLNKX0QXjkICoAw&psig=AFQjCNFrmoQ4v9aJ1sGjXhF3V99CNl4iVA&ust=1408386062974212)

**را**[](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=&url=http://www.esfahanfishing.ir/%D9%85%D8%A7%D9%87%D9%8A%20%D8%B4%D9%86%D8%A7%D8%B3%D9%8A.html&ei=jvLwU-7HJpCf7AbalIGoAg&psig=AFQjCNFrmoQ4v9aJ1sGjXhF3V99CNl4iVA&ust=1408386062974212)

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
|  | |  |  | |
| [ANd9GcRwrHZoAb69B4TFzfIEgA7WmIzrY02NHsjUM9PAq5pOul_KJiRN](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=cxxazVmay_G6uM&tbnid=DH48ygFJCHE4jM:&ved=0CAUQjRw&url=http://campo.ir/article/amoozesh/amoozeshemahigiri/id-68-htm/&ei=LPXwU8n6LePS0QWss4GgCg&psig=AFQjCNE1-aIiP90kqYgDbRs0PH-G7WTvJA&ust=1408386292199159) | ANd9GcTF05XIUAfj1nd64VaV7ZlRLA6XEFNDXHiFLW2GWxrYNl0sIHnd | | |



تصویر1-2 : اسامی چند نوع ماهی پرورشی و خوراکی

**فصل دوم**

**بررسی منابع موجود**

**ون**

**وپس**

**1-2-مايکو باکتريوم**

مايکوباکتريومهاجنسی ازشاخه اکتینوباکتریا است که در خانواده خود به نام مايکوباکترياسه قرار می گیرد، باکتری ها ميله اي، صاف یا کمی خمیده و دراز و بدون اسپوروحرکت (غیراز مایکوباکتریوم مارینوم که در داخل ماکروفاژها متحرک است) و هوازی اجباری می باشند. آنها کپسول تولید نمی کنند. در رده اکتينوميستال ها و راسته اکتينومايسه قرار دارند(90). تا کنون تا ژانویه سال 2010 ،158گونه متفاوت از جنس مايکوباکتريوم شناسايي ومعرفی شده است (78). گونه های شناسایی شده می توانند باعث بیماری های وسیعی ازعفونت موضعي تا بيماري های منتشر و پوستی را در انسان و حيوان شوند. برخی از گونه ها فقط در انسان گونه ها و گونه های دیگری هم در حيوانات ايجاد بیماری مي‌کنندو گونه هاي بسیاری نیز در آب و خاک ومنابع طبیعی موجود می باشند. مايکوباکتريوم ها توبرکلوزیس در انسان ایجاد سل ریوی می نماید. مايکوباکتريوم ها بر اساس تولید پیگمان کارتنوئیدی درحضور یا عدم حضور نور میتوان آنها را طبقه بندی کرد:

1. فتوکروموژن ها:هنگامی که درمعرض نور رشد می کنند، کلنی های غیر پیگمان تولید می کند مانند *مایکوباکتریوم کانزاسی، مایکوباکتریوم مارینوم و مایکوباکتریوم سیمیه*.
2. اسکوتوکروموژن ها: کلنی های نارنجی و زرد چه درحضور چه عدم حضور نور، تولید می نمایند *مانند مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم،مایکوباکتریوم گوردونه، مایکوباکتریوم گزنوپی و مایکوباکتریوم سژولگای*.
3. غیر کروموژن ها :همواره بدون پیگمان می باشند مانند *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم بوویس و مایکوباکتریوم آویوم.*

وهمچنین مايکوباکتريوم ها از لحاظ تفاوتهاي بنيادي دربيماريزایی و اپيدميولوژي به دو دسته اصلي تقسیم می شوند:

1- کمپلکس *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس (مايکوباکتريوم توبرکلوزيس*، *مايکوباکتريوم بويس، مایکوباکتریوم بویس*BCG، *مايکوباکتريوم آفريکانوم*، *مایکوباکتریوم پینی پدی، مایکوباکتریوم کاپره*، *مايکوباکتريوم ميکروتي* و *مايکوباکتريوم کانتي*) پرگنه های فاقد پيگمان تولید می کنند و رشد کندی دارند.

2- مايکوباکتريوم هاي غير توبرکلوزيس(NTM).**ی با رنگ های مختلف دیده می شود. دم شمشیریها بصورت نیم تنه مشکی**

جدول 2-1 نامگذاری مایکوباکتریوم ها

[, جججm,mماه

MTC: Mycobacterium tuberculosis complex

MTC

ی **دج ن مم شمشیری نر دارای زائده ایی بلند در انتهای دم به شکل شمشیر دارد و طو**

2-2-نامگذاری:

جنس مایکوباکتریوم یکی از قدیمی‌ترین جنسهایی است که مورد تعریف قرار گرفته است. نام ژنریک مایکوباکتریوم برای اولین بار به گروهی از میکروارگانیسم ها که بر روی محیط‌های مایع به صورت لایه‌ای نازک شبیه کپک می‌روئیدند، اطلاق می‌گردید (82). در شروع قرن اخیر خصوصیاتی را که برای مایکوباکتریها تعریف می­کردند شامل نداشتن حرکت، مورفولوژی باسیلی شکل (کمی خمیده و میله­ای شکل) و خصوصیت مقاومت به اسید و الکل متعاقب رنگ­آمیزی با فوشین فنیکه (رنگ­آمیزی ذیل نلسون) بود(105). در راسته اکتینومایستالز، مایکوباکتریوم متعلق به جنس مایکوباکتریوم بوده که تنها جنس خانواده مایکوباکتریاسه می­باشد. مایکوباکتریاها، به عنوان اکتینومایست­های هوازی، مقاوم در برابر اسید و الکل، میله­ای شکل و گاهاً با توانائی ایجاد شاخه بدون ایجاد هیفه هوائی، تعریف می­شوند. این باکتریها غیر متحرک و بدون هاگ بوده و در دیواره سلولی دارای آرابینوز، گالاکتوز و مزو دی آمینو پیمیلیک می­باشند و نسبت درصد بازهای گوانین و سیتوزین در اسید هسته­ایشان (DNA)، در حدود 62 تا 70 مول درصد می­باشد (بجز *مایکوباکتریوم لپره* که درصد بازهای GC آن 58% است). مایکولیک اسیدشان دارای وزن مولکولی بالا (60 تا 90 کربن) بدون ترکیبات با بیش از دو پیوند دوگانه غیر اشباع می­باشد (67). از قدیم این ارگانیسمها را فاقد کپسول قلمداد می‌کردند لیکن در حال حاضر مایکوباکتریاها را همراه با ساختمان کپسولی شکلی می­شناسند (94). این ارگانیسمها را به طور اولیه به عنوان هوازی‌های اجباری قلمداد می‌نمودند، ولی برخی از گونه‌ها و سویه‌ها، میکروائروفیلیک بوده و به صورت نوار باریکی در زیر سطح محیط های نیمه جامد رشد می­نمایند. اکتینومایست‌ها از نقطه نظر خصوصیات اکولوژیکیو مورفولوژیکی شامل میکروارگانیسمهای متفاوتی می­باشند(50). تمامی مایکوباکتریها و میکروارگانیسمهای وابسته (مثل اعضای کورینه باکتریوم، مایکوباکتریوم و نوکاردیا و گروهی که شامل جنسهای *رودوکوکوس، گوردونه و تسوکامورلا* می­باشد) بر اساس توانائی تولید مایکولیک اسید دارای وزن مولکولی بالای اسید چرب β هیدروکسی با زنجیره بلند جانبی α متمایز می­شوند (54).

مایکولیک اسید مایکوباکتریومها معمولا به صورت مخلوط کمپلکسی از ترکیبات که دارای وظایف اکسیژنی مثل گروههای کربوکسی، کتو یا متوکسی هستند، دیده می‌شوند، همراه با سیستم 3- هیدروکسی اسید و ترکیباتی از باندهای دوگانه سیس یا ترانس یا حلقه سیکلوسپورین، که دارای شاخه‌های متیل نیز می­باشد (54).

اعضای گروه کورینه باکتریوم، مایکوباکتریوم و نوکاردیا [CMN] تنها میکرارگانیسمهایی هستند که قادر به سنتز مایکولیک اسید می‌باشند. اگرچه بر اساس تعداد اتمهای کربن و استرهای پیرولیز مایکولیک اسیدها (مانند میزان GC اسید هسته‌ای) احتمال تمایز بین اعضای گروه مختلف CMN وجود دارد. متعاقباً جنس مایکوباکتریوم به وسیله میزان کربن مایکولیک اسید، تعداد باندهای غیر اشباع، حضور گروه‌های فعال اکسیژنی متصل و تولید پیرولیز تعریف شده است(54).

**3-2-طبقه بندي مايکو باکتريوم­ها**

با ظهور تکنولوژي تعيين توالي اسيد­هاي نوکلئيک و ژنوتايپينگ اين امکان به وجود آمده­است که ارتباط بهتري در توصيف مجدد ژنوتايپينگ و فنوتايپينگ موجود، فراهم شود. اين موضوع در تشخيص گونه­هاي جديد هم موثر بوده­است. نام گذاري باکتري­ها به وسيله کد بين المللي صورت گرفته ونام صحيح مربوط به طبقه باکتري بر اساس درج باکتري در منابع معتبر علمي‌که داراي نشر طولاني و اعتبار قانوني در مجامع علمي‌هستند صورت مي­گيرد. از اوايل ژانويه 1980 نام باکتري­هاي قبلي بر اساس ليست تائيد شده نامگذاري باکتري انجام گرفت و هر باکتري که نام آن در ليست موجود نبود در نام گذاري قرار نمي­گرفت. برپایه علائم مهم کلينيکي، مايکوباکتريوم‌ها به 3 گروه اصلي دسته بندی مي‌شوند:

1. شديداً پاتوژن، از قبیل پاتوژن‌هاي انساني شامل *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* و *مايکوباکتريوم لپره*[[8]](#footnote-8)(بیماری جذام) و پاتوژن‌هاي حيواني شامل *مايکوباکتريوم بويس*.
2. پاتوژن­هاي بالقوه یا فرصت طلب ازجمله *مايکوباکتريوم سيميه*[[9]](#footnote-9)، *مايکوباکتريوم آويوم* و *مايکوباکتريوم گزنوپي*[[10]](#footnote-10).
3. ساپروفيتهايي که به ندرت پاتوژن اندازجمله *مايکوباکتريوم اسمگماتيس*[[11]](#footnote-11)و*مايکوباکتريوم فله‌اي*[[12]](#footnote-12)

کمپلکس *مايکوباکتريوم آويوم* را MAI یا (MAC)نامیده اند. قبل تر واژه [[13]](#footnote-13) (MAIS)در مایکوباکتریوم ها به دسته ای ازمایکوباکتریوم های کند رشد گفته می شد که کمپلکس *مايکوباکتريوم آويوم*، *مايکوباکتريوم اينتراسلولار*- *مايکوباکتريوم اسکوروفولاسئوم* را دربر می گیرد می شود، این گروه ازلحاظ خصوصيات ظاهري بسیار به هم نزدیک بوده و گاهی اوقات تشخیص آنها از يکديگر سخت بود. حرارت مناسب رشد این گروه ازباکتری ها حدود 41 درجه سانتیگراد است وکلنی های آنها صاف،نرم وبدون پیگمان می باشد.(101). در حال حاضرعبارتMAISکاربرد زیادی نداشته و برای افتراق این گونه ها از تکنيک‌هائي مثل آناليز آنتي ژني و قدرت هيدروليز اورهدرباکتری، هيبريديزاسيون اسيد هسته‌اي[[14]](#footnote-14)استفاده گردید به طوریکه *مايکوباکتريوم اسکوروفولاسئوم* به راحتي از *مايکوباکتريوم آويوم* و *مايکوباکتريوم اينتراسلولار* قابل تفکيک می باشد. عبارت کمپلکس *مايکوباکتريوم آويوم* (MAC)کاربردی تربوده وشامل دو گونه *مايکوباکتريوم آويوم* و *مايکوباکتريوم اينتراسلولار* مي‌باشد که قبلا از سه زیرگونه جدا، که *مايکوباکتريوم آويوم*زیرگونه آويوم، *مايکوباکتريوم آويوم*زیرگونه پاراتوبرکلوزيس و *مايکوباکتريوم آويوم* زیر گونه سيلواتيکم شامل می شد (22). *مايکوباکتريوم پاراتوبرکلوزيس* به مايکوباکتين در محيط کشت نیاز دارد و باتوجه به این ویژگی از بقيه اعضای گروه *مايکوباکتريوم آويوم*، قابل تفريق می باشد.

اغلب مايکوباکتريوم­ها در2گروه طبقه بندی می شوند، گروه اول به نام کمپلکس *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس(مايکوباکتريوم توبرکلوزيس، مايکوباکتريوم بويس، مایکوباکتریومبویس BCG، مايکوباکتريوم آفريکانوم، مايکوباکتريوم ميکروتي* و گونه­اي جديد با نام *مايکوباکتريوم کانتي، مایکوباکتریوم پینی پدی*) شناخته می شود. گروه بعدی، مايکوباکتريوم های غيرکمپلکس *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس*می باشند و نام های مايکوباکتريوم های "آتيپيک" یا "غير سلي"با [[15]](#footnote-15)(MOTT)هم ترادف می باشند (80).

دمای رشد مناسب برای گونه های مختلف متفاوت می باشد واز20 تا بیشتر از50 درجه سانتی گراد متغیراست. کشت برخی ازگونه ها بسیار مشکل است(گونه های مشکل پسند) وبرخی دیگر زمان تقسیم بسیارطولانی دارند مانند مایکوباکتریوم لپره، که هر بار تقسیم آن 20 روز طول می کشد. همچنین می توان مایکوباکتریوم ها را بر اساس سرعت رشد تقسیم بندی کرد. آن هایی که در مدت 7روز، کلنی هایی قابل مشاهده باچشم غیرمسلح تولید می کنند سریع الرشد و سایرین کند رشد نامیده می شوند. اغلب مايکوباکتريوم‌هاي فرصت طلب، بیماریزای با سرعت تقسيم 12-24 ساعت وکند رشد می باشند و معمولا سرعت رشد آنها در محيط کشت اختصاصي 15 تا 28 روز می باشد. البته در این مورد *مايکوباکتريوم لپره*مستثنا مي‌باشدبه دلیل اینکه این باکتری دارای توانائي رشد بر روي محيط کشت آزمایشگاهی(in vitro( نمی باشد و تکثير آن در حيوانات آزمايشگاهي صورت می گیرد که بين 7 تا 14 روز طول می کشد. برخلاف گونه های کند رشد گونه‌هاي ديگر مايکوباکتريوم‌هاي هستند که ساپروفيت می باشند وسریع تکثیر پیدا می کنند ودر گروه سريع الرشد جای می گیرند و میانگین تقسيم در آن‌ها 2 تا 6 ساعت و زمان مورد نیاز رشد بر روي محيط کشت، در این باکتري‌هاي 1 تا 7 روز مشخص گردیده است (99).

رانیون[[16]](#footnote-16) مایکوباکتریهای آتیپیک را بر اساس خصوصیات فنوتیپی مثل داشتن رنگدانه و سرعت رشد به چهار گروه تقسیم‌بندی نمود. گروههای یک، دووسه تنها شامل مایکوباکتریهای کندرشد بودند، مثل ارگانیسمهایی که به بیش از یک هفته زمان برای رشد نیاز دارند، در حالیکه گروه چهار شامل گونه‌های سریع رشد بوده که به یک هفته یا کمتر زمان برای رشد نیاز دارند. گروه یک رانیون شامل گونه‌های فتو کروموژن می­باشد که کلنی­هایشان تنها در حضور نور قابلیت ایجاد رنگدانه را دارند (گونه‌های مهم آن از نقطه نظر پزشکی شامل *مایکوباکتریوم کانزاسی* و *مایکوباکتریوم مارینوم* می‌باشد). گروه دوم شامل گونه‌های اسکوتوکروموژن بوده (کلنی­های آنها در حضور و یا در غیاب نور تولید رنگدانه می­نماید) که می‌توان از *مایکوباکتریوم گوردونه* و *مایکوباکتریوم اسکوروفولاسئوم* نام برد. گروه سوم شامل گونه­های غیر کروموژن می­باشند (کلنی­های بدون رنگ ایجاد می­کنند) شامل *مایکوباکتریوم ایویوم، مایکوباکتریوم اینتراسلولار* و *مایکوباکتریوم گزنوپی* و نهایتاً گروه چهارم رانیون شامل مایکوباکتریوم­های سریع الرشد(گونه­های مهم از

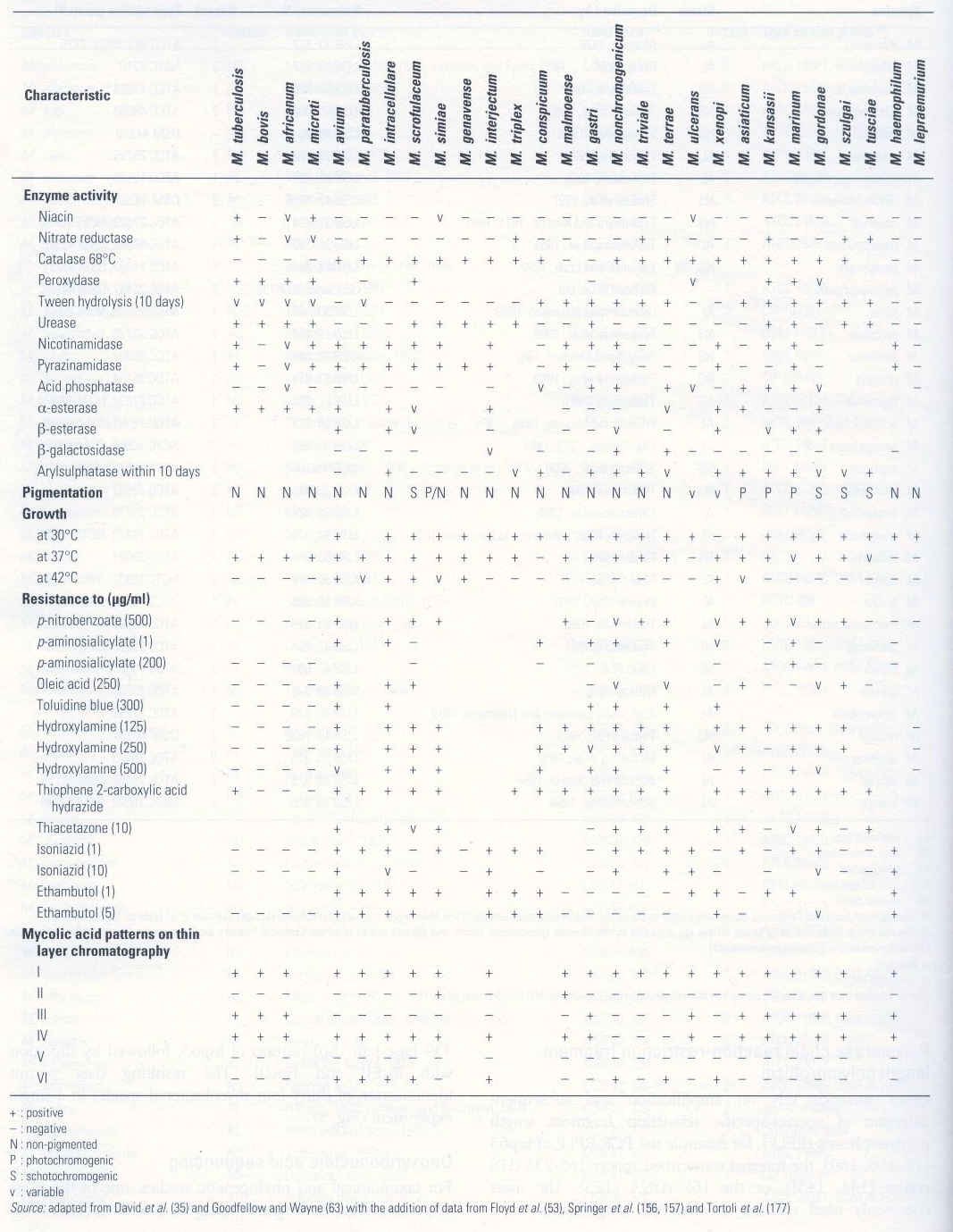
نظر پزشکی شامل *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و مایکوباکتریوم شلونئی* است (99).

نمودار(2-2): وضعیت اتصال فیلوژنی مایکوباکتریهای تند رشد و کند رشد بر اساس**rRNA16S**(3)

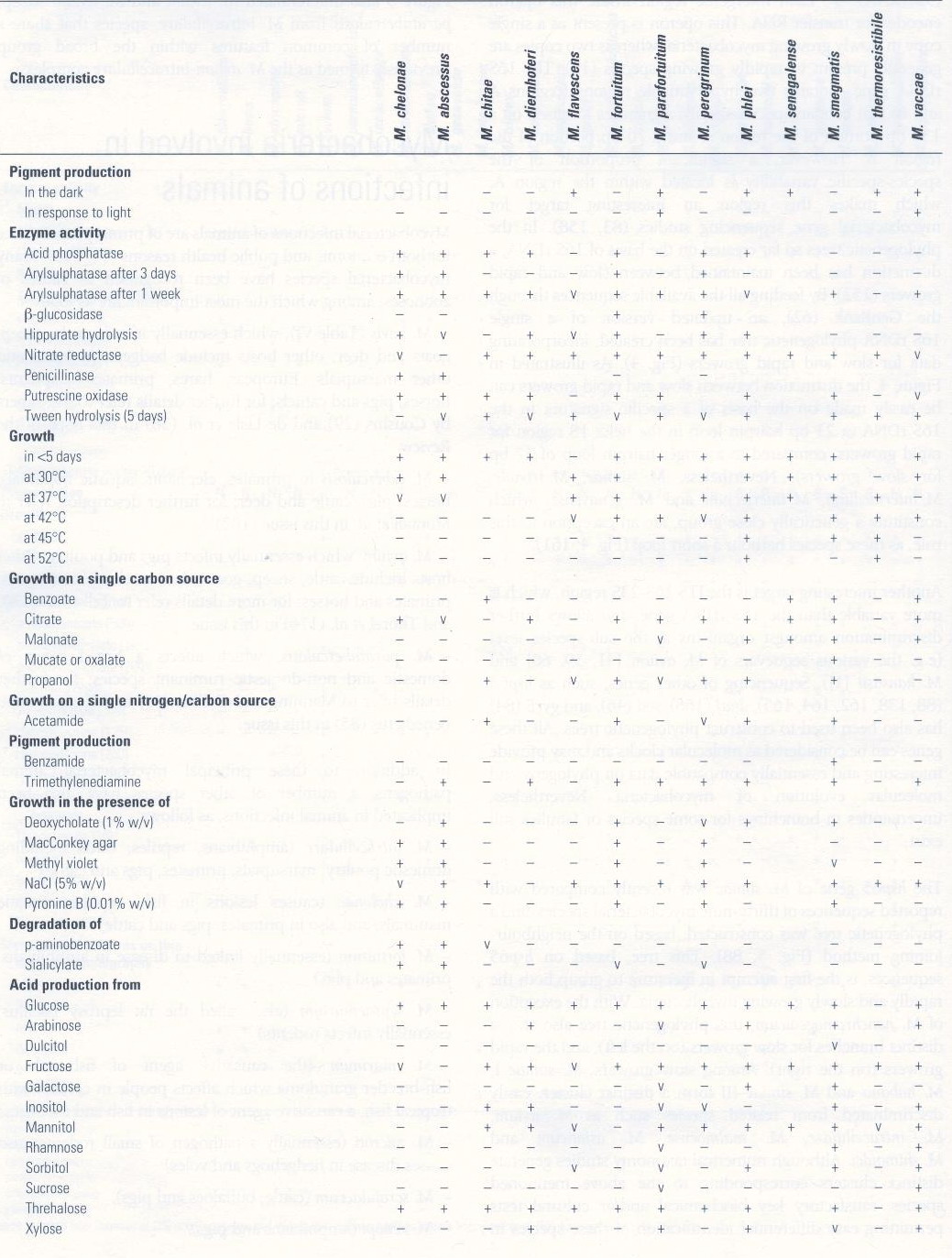


**4-2-تست های تعیین هویت مایکوباکتریوم ها :**

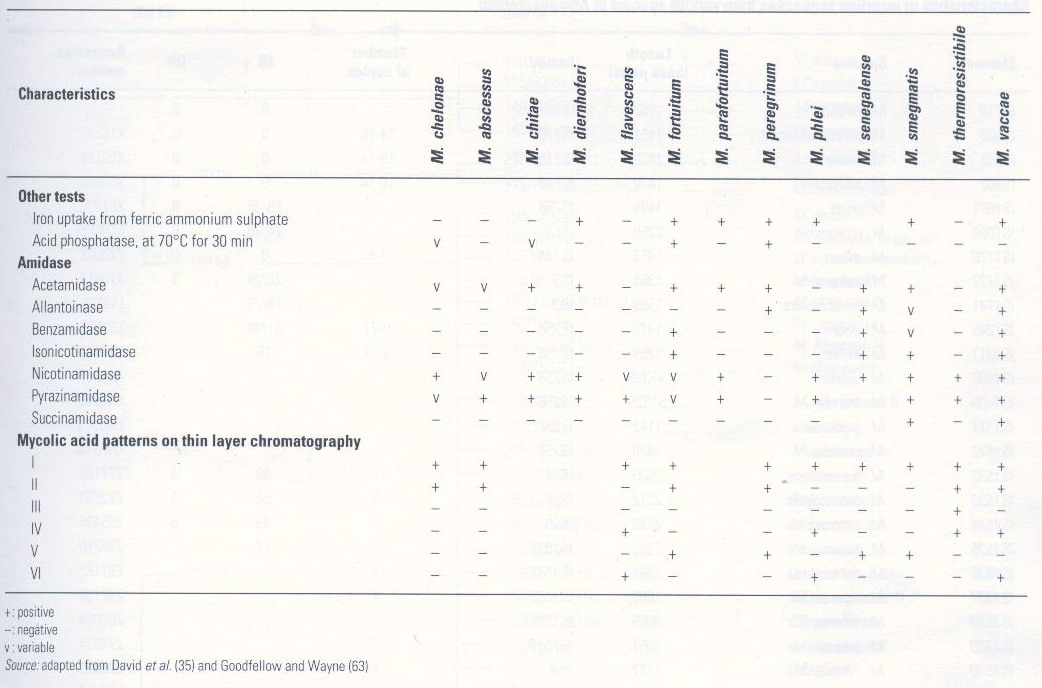
**جد**.**ول 2-3 : لیست جدید تستهای رایج شیمیائی برای تمایز گونه­های مختلف کند رشدمایکوباکتریایی (3)**



**ادامه جدول 2-3**

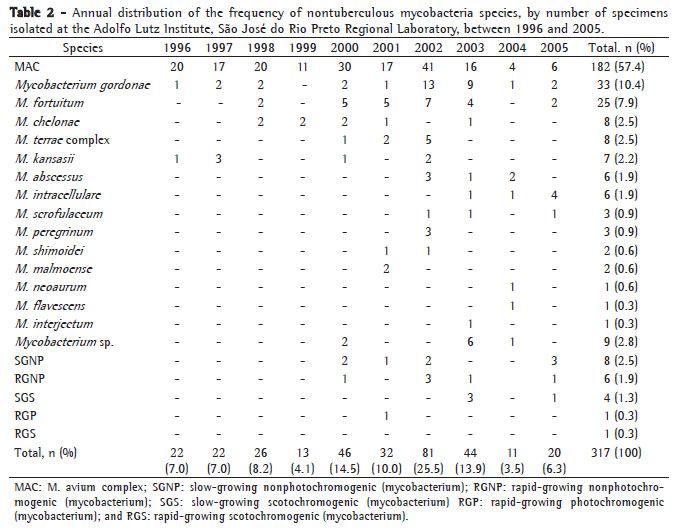


**جدول 2-4: لیست جدید تستهای رایج شیمیائی برای تمایز گونه­های مختلف سریع الرشد مایکوباکتریایی(3)**



در جدول 2-4به طور خلاصه نتایجی که از انتخاب مایکوباکتریهای سریع‌الرشد به دست آمده، آورده شده است. تا سال 1980 ابزاریکه برای طبقه بندی گونه‌های متفاوت مایکوباکتریایی استفاده می شد فقط ویژگی های فنوتیپی مذکور بود و ازآنجا که شناسایی گونه های مایکوباکتریومی توسط تست های بیوشیمیایی و فنوتیپی دشوار و وقت گیر است.(1 برگه)، شناسایی که از ویژگی های فنوتیپیبه دست می آید در زیر گونه‌ها بسیار متغیر بوده و باعث به وجود آمدن مشکلات تشخیصی در برخی گونه ها می شوند وبه دست آمدن نتیجه کاملاً متفاوت درگونه­های کاملاً مختلف می باشد واحتمال اشتباهات در تعیین هویت درآزمایشگاه‌های کلینیکی میکروبیولوژی وجود دارد. بنابر این خصوصیات فنوتیپی قادر نیستندگونه‌هارا دقیقاتعیین هویت کنند، متد هاینوین طبقه‌بندی مولکولی مانند هضم آنزیمی واستفاده از پروب های اختصاصی فرصتی را جهت تجدید نظر در طبقه‌بندی فیلوژنی مایکوباکتریوم هابه وجود آورده است. در عصر حاضر اطلاعات با ارزشی در زمینه طبقه بندی میکروارگانیسم ها ازجمله طبقه‌بندی شیمیائی، ترکیبات بازهای هسته‌ای و هیبریدیزاسیون DNA-DNA) در دسترس می باشد که ویژگی های نا متشابه را که در گذشته قابل شناسایی نبود و تمایز دقیق میان میکروارگانیسمها را آشکار می نماید (39).

در کل، امروزه وابستگی‌های جدید تکامل نژادی به خصوصا در مایکوباکتریها بسیار مورد توجه قرار گرفته و در طبقه‌بندی و نامگذاری اکتینومیستها اساسی ومهم می باشد. به عنوان مثال تعیین توالی s16 ریبوزومی اسید ریبونوکلئیک (RNA) و با استفاده از آن درخت تکامل نژادی برای اکتینومایستولوژیستها تهیه گردید که فرصت بررسی سیر تکاملی و نیز اساس طبقه بندی اکتینومیستها را به وجود آورده است. با این حال توزیع برخی از خصوصیات مورفولوژیک و کموتاکسونومیک مثل نوع پپتیدوگلایکن، فسفولیپیدهای مناکینون، قندها و اسیدهای چرب دیواره سلولی، به میزان زیادی طرح فنوتیپیک جنس را در هر شاخه تسهیل نموده و ترکیب خصوصیات فنوتیپیک، اجازه پیشگوئی این که آیا یک ارگانیسم جدید مشابه اعضای ثبت شده قبلی بوده و یا یک طبقه جدید است را می‌دهد. خصوصیات فنوتیپیک زیادی در نژادهای مختلف یافت می­شوند (بجز مایکولیک اسید) و به این دلیل یک شاخص غیر قابل اعتماد در ارتباطات تکامل نژادی هستند که پیشگوئی در سطح بالای طبقه بندی را غیر ممکن و غیر محافظه کارانه می‌سازند (87).

**جدول 2- 5 :بررسی میزان شیوع مایکوبکتریوم های NTM از سال 1996تا 2005 در آزمایشگاه رفرنس آدولف لاتس**

**5-2-تاریخچه سل در آبزیان׃**

اولین گزارش عفونت مایکوباکتریوم ماهی به باتیلون در سال 1897 نسبت داده شده است،آنها باکتری را از جراحات توبرکولوزی ماهی کپور جدا کردند.(13).

سل شیوع جهانی دارد وتمامی ماهیان آب شیرین وگرمسیر نسبت به آن حساس می باشند. درمناطق معتدل واستوایی، سل آبزیان جزء بیماری های مزمن باشیوع بالا در ماهیان آب شیرین به محسوب می گردد(73،85،95).

اخیرا مایکوباکتریوم در ماهیان خسارت های اقتصادی زیادی را در زمینه پرورش ماهی وارد نموده است. عفونت های مزمن ایجاد شده توسط مایکوباکتری درماهیان دریای مدیترانه (Sparus aurata), (Mugil cure ma)­(Dicentrarchus labrax) , (Seriola dumerili)مشاهده شددر دریایی ژاپن نیز این بیماری مزمن خسارت های بسیار اقتصادی وارد نموده است(76) .

در ماهیZebra با مشخصات بالینی مثل لاغری، تحلیل رفتن پولک و پوست، جراحات در باله شکمی، آبشش های مملو ازخون، باد کردن شکم، احتقان در کبد، نکروز کبدی وملتهب شدن کبد و طحال، ماکوباکتریوم جداسازی شده است. در ونزوئلا باسیل هایی از کلیه ها، مزانتر، کبد و طحال ماهی گوپی جدا سازی شد که با علائم بالینی از قبیل بی اشتهایی، لاغری، انحنای ستون فقرات، چشم های گودرفته ،ضعف ولاغری و از بین رفتن رنگ بدن گزارش داده شده بود. (8،12). عفونت با مایکوباکتریوم در ساحل دریای سرخ نیزگزارش داده شده است(45). تعداد زیادی از گونه های مختلف مایکوباکتریوم های تند رشد و کند رشد از ماهی جدا شده است. از مایکوباکتریوم های پاتوژن مهم در ماهی ها گونه های *مارینوم، فورتوئیتوم، چلونئی و ایویوم*را میتوان نام برد(115). در ایتالیا مایکوباکتریوم در ماهیان پرورشی از ژوئن سال 2002 تا می 2005 مالعه شد و شیوع آن در ماهیان پرورشی تائید شد. تمامی گونه های مایکوباکتریوم ها با اختصاصات بیوشیمیایی از یکدیگر جداسازی شدند.

شخیص بیماری مایکوباکتریومی در ماهی ممکن است بر اساس کشف گرانولوم در کالبد شکافی یا در طول آزمایشات هیستوپاتولوژیک با رنگ آمیزی لام به روش زیل نلسن و مشاهده باکتری های اسید فست میله ای یا تکی و یا خوشه ای تائید گردد(34،38). تعداد زیادی از این مایکو باکتریوم ها از بافت ماهی جدا شده است که شامل گونه های *م. مارینوم، فورتوئیتوم، گوردونه، ایویوم وشلونئی*می شود(120).

مایکوباکتریایوزیس ماهی می تواند در اشخاصی که دارای نقص ایمنی می باشند و یا در تماس مستقیم باحوضچه پرورش ماهی هستندگرانولوم استخر شنا ایجاد کند (87).بر اساس تحقیقی که که از اردیبهشت تابهمن 1382، از113 نمونه آبشش ماهیان خاویاری انجام شداز 11 نمونه مشکوک فقط2 مورد *مارینوم* و9مورد دیگرسایر مایکوباکتریوم جداسازی شد(9). عفونت های غیر سلی که توسط مایکوباکتریوم ایجاد می شود می تواند در همه جا به مخصوصا در خاک، آب، حیوانات وحتی آبزیان وانسان به شکل عفونت های شناخته نشده بروز نماید (58،102). گونه های جدا شده مایکوباکتریومی از ماهی: *مارینوم،فورتوئیتوم، فلاوسنس، شلونئی، گوردونه، ترائه، شلاتم، کانزاسی، اینتراسلولار، هموفیلوم، لنتی فلاووم، زولگائی و سیمیه* هستند و باتوجه به همین مطالب، نتیجه می گیریم بیماری سل به عنوان خطری آبزیان را نیز تهدید می نماید (51).

فاکتورهایی مانند رژیم غذایی، آلودگی محیط زیست، فشاراسترس، ازدحام بیش از حد جمعیت، تغذیه و بیشتر درمواردی که تغذیه کمتر از حد مطلوب میباشدو پائین بودن کیفیت آب باعث مستعد شدن ماهی به عفونت با مایکوباکتریوم می شوند(103).

مایکوباکتریوم مارینوم عامل سل در ماهیان می باشد و انتشارزیست محیطی بالایی دارد. مایکوباکتریایوزیس ماهی درانسان ایجاد عفونت غیرسلی به نام گرانولوم پوستی می نماید وبیشتردر افرادی که با حیوانات، اندام وضمایم آنها و یا فراورده های آنها در ارتباط می باشند رخ می دهد. این بیماری می تواند درکودکان در اثر لمس کردن ماهی ویا خانوم های خانه دار از طریق تمیزکردن ماهی نیز ایجاد بیماری کند(150)این بیماری در ابتدا در ناحیه های خاصی از بدن از قبیل پشت دستها یا پاها، لای انگشتان، اطراف انگشتان ناحیه اطراف ناخنها و حتی در مخاط دهان به شکل برجستگیهای زگیل مانند که سخت و خشک و شاخی مشاهده می‌شود. این برجستگیهای زگیل مانند و اطرافشان به صورت تاولی شکل قرمز و متورم می شود که پس از مدتی به تدریج بنفش رنگ می‌شود. این بیماری پس از مراجعه به پزشک متخصص، با سوزاندن با سوزن الکتروآگولاسیون و درمان عمومی مختص سل درمان می‌شود. نخستین مورد گزارش شده بیماری گرانولوم استخر ماهی در سال 1926 توسط سویفت و کهن ثبت شد(103). اولین بار ارنسوندر سال 1926 *مایکوباکتریوم مارینوم* را از کبد و طحال ماهیان پرورشی گرمسیری در فیلادلفیا جدا نمود(11). در استرالیا سال 1951 لینل و نوردن شیوع عفونت های خارجی در دست وپای انسان توسط مایکوباکتریوم را اثبات کردند و این بیماری گرانولوم استخر شنا یا تانک ماهی نامگذاری گردید. کشف این موضوع باعث پیشرفت هایی در زمینه ساخت ونگهداری استخر های شنا و بهبود در این راستاگردید تا این عفونت ها نابود گردند(35) .

عفونت های مایکوباکتریوم می تواند به عنوان بیماری شغلی درنظر گرفته شود. افرادی ازقبیل صیادان ماهی یا کارکنان شیلات یاکسانی که با دست ماهی صید می کنند در معرض خطر می باشند. این بیماری در محل نگهداری حیوانات وحتی حیوانات خانگی و کارکنان شیلات وکارکنان مراکز صید ماهی و اشخاصی که آکواریوم در منزل دارند(64). هرچندگرانولوم استخر شنا اغلب در اثر تمیز کردن حوضچه ها واستخر ها یا تعویض آب آنها ناشی می گردد ولی گاهی نیز می تواند از طریق تماس مستقیم یاگاز گرفتن ماهی ناشی گردد. آلودگی غیر مستقیم با مایکوباکتریوم نیز می تواند ناشی از شنا کردن انسان در محل نگهداری ماهیان و یا شتشوی لوازم مرتبط با تمیز کردن ماهی یا استخر آنها در محل حمام کردن کودکان گزارش ده است. طبق افزایش هشدارهای بیماری، پیشرفت روش های تشخیص موارد زیادی در سطح جهان گزارش شده است (64).

عفونت معمولا محدود به پوست می باشد ولی در افراد بانقص ایمنی می تواند بافت های زیر جلدی و استخوان را نیز درگیر کند(200،201 ). گاهی اوقات ضایعات می تواند در افراد طبیعی و چه افراد دارای نقص ایمنی متفاوت باشد(206). جراحت های پوستی که در اثر عفونت با  *مایکوباکتریوم مارینوم* به وجود می آید ممکن به صورت تکیو اغلب چند تایی باشد که متداولا به صورت ندول های خوشه ای و پلاک های اریتماتوزی گزارش شده است. این جراحت ها می تواند درد ناک، بدون درد یا متغییر باشد زخم ها عموما در آرنج، زانوها، پاها، لای انگشتان دست و انگشتان پای صاحبان آکواریوم و کارکنان استخرها رخ می دهد. رشد آن در دمای 37 درجه سانتی گراد انجام می شود. زخم ها در بین 2 تا 4 هفته ظاهر می شوند و در بین 3تا 5 هفته 5/2- 1 سانتی متر قطر می یابد و این بیماری به سرعت پیشرفت می کند ولی اکثرا محدود به پوست باقی می ماند و ندرتا به بافت های عمقی نفوذ می کند. در بیست درصد موارد به غدد لنفاوی همان ناحیه گسترش می یابد و از طریق مجاری لنفاوی گسترش یافته و به صورت عفونت منتشره دیده می شود (116) .

تشخیص غالبا به تاخیر می افتد که به علت کم یابی عفونت و عدم دانستن تاریخ تماس آبزیان با بیمار است و تشخیص آن معمولا با عفونت های قارچی و انگلی و همچنین سلولیت، توبرکلوزیس پوستی و آرتریت روماتوئید و سالک اشتباه می شود. تاخیر طولانی در تشخیص میتواند منجر به عفونت های مخرب و شدید تر شود. در جداسازی های اولیه این مایکوباکتریوم به مدت 7 تا 21 روز در دمای 30 تا 33 درجه رشد می کند (28). کلنی های آن هنگامی که در معرض نور قرار می گیرند به رنگ کرم شده و به زرد تبدیل می شوند و فتو کروموژنیک هستند (74). این باکتری نسبتا سریع در عرض 1 تا 2 هفته رشد می کند و توسط داروهای آنتی مایکو باکتریال درمان می شود . تکنیک های مختلف کشت باکتری برای تشخیص، مورد استفاده قرار گرفته است ولی زمانی که کشت باکتری منفی شود بر اساس یافته های هیستولوژِیک و آثار فیزیکی می توان آن را تشخیص داد (97). تشابه زیادی بین *مایکوباکتریوم مارینوم* و*اولسرانس* وجود دارد (142).

درمان استاندارد و مشخصي براي بيماري هاي مايكوباكتريومی که از طریق آبزیان و گونه هايي كه از طريق محيط پيراموني انتشار مي‌يابند وجود ندارد به دليل اينكه بعضي از داروهايي كه به صورت آنتي بيوتيك كاربرد دارند به صورت تصادفي در بيماران جواب مي‌دهد و درمان به خصوصيات فردي و سيستم ايمني بيمار و شدت عفونت بستگي دارد ولي با این وجود كلاريترومايسين از بقيه داروها اثر بخش تر است(49**).**

درمان این عفونت ها در بعضی موارد بستگی به شدت عفونت دارد. یک دوره طولانی از درمان با آنتی بیوتیک در اکثر موارد سطحی لازم است اما گاهی عفونت های عمقی و بسیار شدید جراحی های بافت آسیب دیده را می طلبد. استفاده از مینوسیکلین، کلاریترومایسین و اتامبوتول رایج می باشد(23).

يك راه مهم براي تشخيص عفونت هاي مايكو باكتريال تهيه كشت از بافت هاي نرم آسيب ديده با استفاده از بيوپسي مي‌باشد.

در ایران نیز تعداد معدودی از این مایکوباکتریوم ها در آبزیان گزارش شده است به طور مثال پیش زمینه ای از تورم و ضایعات اریتماتوزی وپوستول بر روی بازوی سمت راست یک مرد 27 ساله که کارگر فروشگاه آکواریوم بود گزارش شد.در محل ضایعات نکروتیک باسیل های اسید فستی مشاهده گردید که مربوط به مایکوباکتریوم بود، به دلیل اینکه دمای مناسب برای رشد این میکروارگانیسم 37 -30 درجه سانتی گراد می باشد،عفونت به سطح پوست و قسمت هایی از بدن که دمای پایین دارند مثل دست ها محدود می شود و جراحت ها در طی یک الی دو سال به صورت اسکارهای پوستی برجسته دیده می شود.

سه سال بعد از درمان بيمار هيچگونه نشانه اي از عفونت را ندارد و فقط ضايعات اسكار بروي محل آسيب، ديده مي‌شود (104).

جراحت های پوستی بر روی دست و بازوی بیمارانيکه با محیط های آبی کار می کنند به وضوح دیده می شود که در اغلب اوقات توسط پزشکان تشخیص اشتباه داده می شود(108).

**6-2-نشانه هاي عمومي‌بيماريهاي ایجاد شده توسط مایکوباکتریوم ها در ماهيان پرورشی‌**

نشانه های بیماری سل درماهیان عبارتند از: کاهش واکنش وكم تحركي، پريدگيرنگ، تخریب باله های شکمی و جانبی، باد کردن بدن،ظهور تيرگي در چشمها، انزوا وگوشه گیری، وجود رگه های قرمز در امتداد بدن، ملتهب وقرمزشدن پوست، ملتهب شدن باله ها یا اندامهای داخلی، التهاب کبدو طحال ومشکلات تنفسی.

از آنجا که این بیماری به طور معمول روند آهسته ای دارد در ماهیان جوان کمتر مشاهده می شود. در ماهیان سن بالاتری دارند وتحت استرس وشرایط بد محیطی قرار دارندبا فراوانی بالاتری مشاهده می شود(13، 43).

مایکوباکتریوم در آبزیان مانند ماهی ها یا دوزیستان مانند قورباغه هاوحیوانات خونسرد بیماری باشباهت توبرکلوزیس انسانی ایجاد نموده و گرانولوما را به وجود می آورد (16، 51).

عفونت گرانولوماهای ابتدا به صورت اگزما یا ترومای پوستی ظهور می کندو سپس به صورت گرانولوم موضعی یا لنفانژیتی ظاهر می شود(16).

هرساله عفونت گرانولوم استخر ماهی 27/0 در هر 100000 نفرمی باشد. باتوجه به آمار به دست آمده در اسپانیا 2/29 – 64/0 درصداز تمام مشکلات غیر سلی، عفونت های ایجاد شده توسط مایکوباکتریوم هاهستند. بیماری به این صورت است که بعد از ورود میکروارگانیسم 14-21روز طول می کشد که در محل زخمیک پاپول یا تاول به رنگ بنفش وارغوانیبه وجود می اید. گرانولوم استخر شناامکان دارد در محل آسیب دیده با یک شکل زگیل مانند یا ندول ویا به شکل لکه های پسوریازیس آغاز گردد. واین ضایعات پوستی به طور معمول منفرد هستند ولی می توانند ضایعات اسپروتریکوئیدی داشته باشند(16، 51).

عفونت بامايكوباكتريوم آبزیان بعد از تماس با استخرنگهداری ماهی پرورشی یاآكواريوم، آبشورياجانوران دريايي مانند ماهي يا لاكپشت بوجود مي‌آيد. رشدآن در دمای32 بهتر صورت می گیرد. اندامهاي يكه سردترهستند بيش ازمكانهاي مركزي درگيرمي‌گردند. عفونت سيستم يك معمولاًدر شرايط ضعف سيستم ايمني گزارشگرديده، كه نشانگرآن است كه ارگانيسم مي‌توانددرشرايط نزديك به37درجه سانتيگرادنيزسازگارييابد. بعداز ورود به بافتهاي ميزبان ازطريق خراشيدگي يازخم، مايكوباكتريوم توسط ماكروفاژها، فاگوسيتوزمي‌شود. دردرون ماكروفاژها، آنها ساخت فاگوليزوزومها راكه قادر به كشتن ارگانيسم هستند مختل مي‌كنند و مايكوباكتريوم ها پس از ليزوزومها فرارنموده ومي‌تواننددرمحيط درون سلولي وبرونسلولي از طريق حركت وابسته به اكتين، به جلوحركت نموده وازاين طريق، سلول به سلول، پخش شوند(6).

گزارشات بدست آمده بین سال های 1966-1996 که توسطJernigan در مورد 652عفونت جلدی در انسان که به وسیله *مایکوباکتریوم مارینوم* ایجاد شده بود نشان می دهد که مشاهده بیماری در انسان وجداسازی باکتری بیماریزا نیاز به مطالعات طولانی و زمانبر می باشد(151).

7-2-عفونت حیوانات با مایکوباکتریها

توجه اولیه در رابطه باایجاد عفونت درحیوانات توسط مایکوباکتریوم از نظر اقتصادی و بهداشتی، مورد اهمیت قرارمی گیرد(89).

تعداد زیادی از گونه‌های مایکوباکتریوم ها از بیماری های مشترک بین انسان و حیوان (زئونوز ) به شمار می آید که به مهمترین آنها شامل :

- *مایکوباکتریوم بویس*، عامل بیماریزایی در گاو، گوسفند، آهو و بز می باشند. دیگر میزبانان آن گورکن، صاریغ (یک نوع جانور کیسه‌دار) و جانوران کیسه­­دار از جمله صاریغ که نوعی جانور کیسه‌دار است ونیز خرگوش صحرائی اروپائی، پریماتها، فیل‌ها، خوکچه های هندی، اسبها و شترها می‌باشد(4)..

رشددر اين گونه فقط در دمای 38-34 صورت می پذیرد. سويه‌هاي این گونه کاتالاز و نيتراتاز منفي، ميكروآئروفيل، نياسين منفي یعنی برخلاف توبرکلوزیس تولیدکننده قوی نیاسین نمی باشند، حساس به TCH و سيكلوسرين می باشند. ومقاوم به پيرازين آميد و ایزونیازید هستند(4).

*مايكوباكتريوم بوويس تمایل* كمتري به توليد رشته‌هاي طولاني مارپيچ دارند. معموماً باسيل‌های گونه بوویس كوتاه‌تر و ضخيم‌تر از باسيل‌هاي گونه *توبركلوزيس*می باشند وعمدتاً آرايش خوشه ای دارند(4).

با گذشت سال‌ها پس از آن مورد قبول قرار گرفت. معمولاً گونه بوویس بر روي محيط‌ گليسرول دار نسبت به محيط كشت پيرووات دار رشدکمتری دارد. كشت مجدد در محيط تخم‌مرغ‌دار، نشان می دهد کلنی پس از 18 روز انكوبه کردن با قطر حدود يك ميلي‌متر رشد کرده و امکان اینکه کلنی های کهن تر يك برآمدگي در قسمت وسط داشته باشند وجود دارد. وکلنی های گونه ی بوویس پهن تر و صاف‌تر از کلنی های گونه انساني می باشند (4).قدرت بیماریزایی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* و*مايكوباكتريوم بوويس* درانسان یکسان است.

- *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در پستانداران، انسان، پریمات­ها، فیل­ها، پستانداران دریائی، اسبها، خوکها، شتر و آهو ایجاد بیماری می کند(29).گونه اصلي اين باکتری در سال 1896 توسط لهمن و نيومن و به طور مجدد در سال 1967 به وسیله رانيون و در سال 1972 به وسط كوبيكا شناسایی ومعرفی شد. واريته‌هاي آسيايي وكلاسيك *توبركلوزيس* به گونه اصلي اين باکتری متعلق می باشند(4).

با كشت دوباره، روي محيط‌ کشت تخم مرغ‌دار، پس از گذشت 18 روز در روز هیجدهم 2-1 ميلي‌متر قطر داشته، خشن و به صورت فشرده و متراكم مي‌باشند و شبيه به خرده‌ نان يا گل كلم به نظر مي‌رسند. از نظر رشد در اين ارگانيزم ارجحيتي براي محيط‌هاي داراي گليسرول يا پيروات ديده نمي‌شود .

باسيل‌هاي اين گونه به ابعاد (4-2)×(5/0-3/0) ميكرومتر هستند اما گهگاه باسيل‌هاي كوتاه‌تر يا بلندتر نيز ديده مي‌شوند. در گسترش‌هايي كه با دقت از كشت‌هاي جوان تهيه شده باشند، باسيل‌ها شبيه به رشته‌هاي مارپيچ به نظر مي‌رسند(4).

در اين گونه، رشد فقط در 38-34 انجام مي‌شود. هر دو واريته نيترات از مثبت، هوازي و حساس به پيرازين آميد و سيكلوسرين هستند. واريته كلاسيك انساني نسبت به 2- تيوفن كربوكسيليك اسيد هيدرازيد[[17]](#footnote-17)(TCH) مقاوم است اما واريته آسيايي نسبت به آن حساس مي‌باشد. برخلاف برخي نظرات موجود، برخی معتقدند كه اين تفاوت در ارتباط با مقاومت نسبت به ايزونيازيد به صورت مستقل عمل مي‌نمايد. با وجود موارد نادر استثنايي معمولاً هر دو واريته نياسين مثبت هستند. واكنش كاتالاز در سويه‌هاي حساس به ايزونيازيد مثبت قوي بوده اما سويه‌هاي مقاوم به ايزونيازيد در اغلب موارد واكنش‌هاي كاتالاز ضعيف يا منفي از خود نشاننمي‌دهند(4).

[](http://commons.wikimedia.org/wiki/File:TB_Culture.jpg?uselang=fa)

تصویر2-2 کلنی‌های باکتری مایکوباکتریوم توبرکلوزیس

- *مایکوباکتریوم ایویوم* که اساساً موجب آلودگی خوکها و طیور می­گردد. دیگر میزبانان آن شامل گاوها، گوسفندان، بزها، آهو و آنتولوپ، جانوران کیسه دار، پریماتها و اسبها می­باشند.

كمپلكس*مایکوباکتریوم ایویوم* شامل گونه‌هاي *مايكوباكتريوم ايويوم، مايكوباكتريوم اينتراسلولار، مايكوباكتريوم پاراتوبركلوزيس، مايكوباكتريوم سيلواتيكوم* و *مايكوباكتريوم لپره موريوم* مي‌باشد. دو گونه نخست اين مجموعه از انسان جدا شده‌اند. *مايكوباكتريوم ايويوم* از نظر منشاء، باسيل سل پرندگان ناميده مي‌شود با اين حال اين گونه علاوه بر طيور در برخي از پستانداران از جمله گوزن و خوك نيز بيماري‌زا مي‌باشد. *مايكوباكتريوم اينتراسلولار* در برخي مقالات علمي‌قديمي‌تر «باسيل باتي[[18]](#footnote-18)» ناميده شده است زيرا اين گونه براي نخستين بار در بيمارستاني به همين نام در آمريكا به عنوان عامل بيماري‌زاي انسان شناسايي گرديد. در مايكوباكتريولوژي پزشكي معمولاً از اصطلاح كمپلكس *مايكوباكتريوم ايويوم*(MAC) براي دو گونه ايويوم و اينتراسلولار استفاده مي‌شود و *مايكوباكتريوم پاراتوبركلوزيس* سبب آنتريت هايپرتروفيك مزمن (بيماري يون) در گاو و ساير نشخواركنندگان مي‌شود و *مايكوباكتريوم لپره موريوم* كه در سال 1912 توسط ماركاكس و سورل معرفي گرديد، سبب بروز يك بيماري پوستي شبيه به جذام در گربه و موش مي‌گردد. *مايكوباكتريوم سيلواتيكوم* جنبه‌هاي مشتركي با هر دو گونه ايويوم و پاراتوبركلوزيس دارد و عمدتاً از كبوترهاي جنگلي جدا شده است. *مايكوباكتريوم پاراتوبركلوزيس* و *مايكوباكتريوم سيلواتيكوم* براي رشد به وجود محيط‌هاي كشت غني شده با مايكوباكتين نياز دارند كه يك نوع چربي متصل به آهن مي‌باشد و به غير از اين دو گونه در ديواره‌هاي سلولي اکثر مايكوباكتريوم‌ها يافت مي‌شود، علاوه بر اين افزودن اين تركيب به محيط‌هاي كشت سبب مي‌شود كه تعداد موارد جداسازي برخي از سويه‌هاي *مايكوباكتريوم ايويوم* به ويژه زماني كه تعداد كمي‌باسيل در ماده تلقيحي وجود داشته باشد افزايش يابد(4).

تمايز ميان گونه‌هاي ايويوم و اينتراسلولار جز با استفاده از تكنيك‌هايي كه معمولاً تنها در آزمايشگاههاي رفرانس قابل دسترسي مي‌باشند، مشكل است و به همين دليل غالباً اين گونه‌ها فقط به صورت كمپلكس مايكوباكتريوم ايويوم (MAC) گزارش مي‌شوند.

پرگنه‌ها در كشت مجدد *مايكوباكتريوم ايويوم* و *مايكوباكتريوم اينتراسلولار* روي محيط كشت تخم‌مرغ‌دار طي 21-14 روز حدود يك ميلي‌ليتر قطر داشته و صاف، سفيد و گنبدي شكل هستند اما ممكن است توده رشد حالت ريزشي از خود نشان دهد. برخي سويه‌ها رنگ‌دانه‌اي به رنگ زرد كم‌رنگ توليد مي‌كنند. اين باسيل‌ها كوچك و به ابعاد 1/0×5/0 ميكرومتر مي‌باشند و در اغلب موارد تقريباً به شكل كوكسي به نظر مي‌رسند.

روي محيط تخم‌مرغ‌دار در25 تمام سويه‌ها و در42 اكثر آن‌ها رشد مي‌كنند و برخي از آن‌ها به ويژه سويه‌هاي بيماري‌زاي پرندگان در44 نيز رشد مي‌نمايند. اين ارگانيزم‌ها نيتراتاز منفي بوده و آزمايش كاتالاز آن‌ها منفي يا مثبت ضعيف مي‌باشد، تلوريت را احياء اما توئين 80 را هيدوليز نمي‌نمايند. واكنش سولفاتاز در آن‌ها متفاوت و متغير است. در تعدادي از آن‌ها وجود مقاومت نسبت به تمام داروهاي ضد سل معمول بوده اما برخي سويه‌ها نسبت به اتيوناميد و اتامبوتول حساس هستند.

در انسان اين گونه‌ها جزء عوامل بيماري‌زاي فرصت طلب مي‌باشند و سبب بروز تورم عقده لنفاوي گردن (اسكروفولا[[19]](#footnote-19)) به ويژه در اطفال و نيز سبب ايجاد عفونت‌هاي ريوي در افراد مسن‌تر مي‌گردند. اين گونه‌ها علت شايع بيماري مايكوباكتريايي فرصت‌طلب وابسته به ايدز كه در 50-30% مبتلايان به ايدز در آمريكا و اروپا رخ مي‌دهد، مي‌باشند اين عارضه در آفريقا از شيوع كم‌تري برخوردار است. تقريباً تمام موارد مربوط به ايدز ناشي از سويه‌هايي هستند كه از نظر ژنتيكي در قالب *مايكوباكتريوم ايويوم* طبقه‌بندي مي‌شوند. در اغلب موارد اين بيماري به طور گسترده در بدن بيمار منتشر مي‌گردد و در اين گونه بيماران ارگانيزم عامل بيماري را مي‌توان از خون، مغز استخوان و مدفوع بيمار جدا نمود (4، 32).

- *مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس* که طیف وسیعی از گونه­های نشخوار کنندگان اهلی و غیر­اهلی را تحت تاثیر قرار می­دهد.

علاوه بر پاتوژنهای اصلی حیوانات فوق، تعدادی از گونه­های دیگر نیز موجب عفونی کردن حیوانات   
می­گردند، به طور مثال:

* مایکوباکتریوم*اینتراسلولار*(که در ­­­­­دوزیستان، خزندگان، پرنده­ها منجمله طیور اهلی، جانوران کیسه­دار، پریماتها، خوک­ها و شترها ایجاد عفونت می­نماید).
* *مایکوباکتریوم شلونئی* (عامل ضایعه در ماهی، خزندگان، پستانداران دریائی و همچنین عامل عفونت در پریماتها، خوکها و گاوها می­باشد).

*در* سال 1950عفونت هایمایکوباکتریومی هنگام افزودن غذای ماهی به آب در دریای آتلانتیک مشاهده گردید. در سال 1998 *مایکوباکتریوم شلونئی* برای اولین بار از ماهی سالمون در دریای آتلانتیک جدا شد که در همان سال با دادن غذاهای استاندارد به ماهی ها از تعداد زیادی از باکتری ها کاسته شد. ارتباط وسیعی بین عفونت با *مایکوباکتریوم شلونئی* و عفونت های ویروسی وجود دارد ولی تحقیقات نشان داده که مرگ ومیر در ماهی سالمون ناشی از مایکوباکتریوم بوده است. *مایکوباکتریوم شلونئی* در ماهی و همچنین انسان به وفور گزارش شده است (119).

*مایکوباکتریوم شلونئی* در انسان سبب عفونت بافت های نرم می شود(68).

*مایکوباکتریوم شلونئی* از دسته مایکوباکتریوم های غیر سلی می باشد که به شدت در برابر آنتی بیوتیک ها، آنتی سپتیک ها و ضد عفونی کننده ها مقاوم بوده و یک عفونت بیمارستانی هم تلقی می شود. این باکتری باعث عفونت های ریوی، تاندون ها، استخوان ها،مفاصل می گردد و عمل های جراحی، تزریق های تصادفی به عنوان عوامل خطر برای این گروه از مایکوباکتریوم های غیر سلی در نظر گرفته می شود. انتقال بیماری از انسان به انسان نیز گزارش شده است (43).

* *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم*[[20]](#footnote-20) (اساساً با بیماریهای دوزیستان، پریماتها، و خوکها مرتبط است)

*مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* از گروه مایکوباکتریوم های تند رشد می باشد که در دماهای 25، 37 و حتی 42 درجه در کمتر از 7روز به سرعت رشد می کند. *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* باعث عفونت های عمومی پوستی، استئومیلیت، تورم استخوان، عفونت های مفصلی و عفونت های چشمی می شود که بسیار شایع می باشند. عفونت ریوی *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* هم به ندرت دیده می شود. *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* انتشار جهانی داشته و در آب، خاک، رسوبات و مناطق آلوده وجود دارد. این باکتری گرم مثبت، تک سلولی، بی حرکت، اسید فست و میله ای شکل بوده وکلنی های آن کروی شکل، معمولا سفید یا کرم رنگاست. کلنی ها به شکل شاخی، مومی و دسته های روزت مانند نمایان شود. کلنی ها در محیط مک گانکی و لوون اشتاین رشد می کنند (57).



تصویر 2-3 کلنی*م. فورتوئیتوم* در محیط مک گانکی آگار(57)

همچنین *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* از غدد لنفاوی گاو وسیستم ندولار قورباغه جدا شده است. *مایکوباکتریومپری گرینیوم، فورتوئیتوم، شلونئی، آبسسوز و موکوژنیکم* از دسته مایکوباکتریوم های غیر سلی است و جزء کپملکس فورتوئیتوم طبقه بندی می شود که در بیماران دارای نقص ایمنی و دارای مشکل ژنتیکی به وفوردیده شده است. *مایکو باکتریوم فورتوئیتوم* علاوه بر وجود داشتن در ماهی، در بافت سینه زنانی که دارای ایمپلنت و جراحی ترمیمی بوده اند وجود داشته در ضمن موارد نادری از آبسه های خود به خودی و عفونت ثانویه با این نوع مایکوباکتریوم گزارش شده استکه معمولا درمان دراز مدت با آنتی بیوتیک ها و در موارد پیشرفته نیاز به جراحی می باشد(24).

|  |  |
| --- | --- |
|  | cover2 |

تصویر 2-4 :ساختار کریستالی *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم*(57)

در سال 2000 *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* در کالیفرنیااز یک سالن آرایشی و زیبایی بانوان جدا گردید. تمامی افراد مصدوم از یک استخر آب مشترک استفاده کرده بودند. به دلیل اهمیت بیماری در5 شهر مختلف کالیفرنیا، از 30 حمام مخصوص پای مشتریان که برای پدیکور ناخن در 18 سالن آرایشی مختلف طراحی شده بود، نمونه گیری انجام شد. این تحقیقات 97 درصد وجود *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* را تائید کرد. بیش از 100 نفر از خانم ها که برای کاشت ناخن به این سالن ها مراجعت کرده بودند، ضایعات پوستی در انگشتان دست و ساق پا داشتند که با بررسی های طولانی مدت و تشخیص مولکولی، بیماری گرانولوم استخر شنا تائیدگردید. *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* زمانی که در محیط به تعداد خیلی کم حضور داشته باشد، نسبتا بی ضرر است. رشد این باکتری بسته به درجه حرارت و میزان مواد مغذی است، از این رو می توان نتیجه گرفت که غلظت بالایی از مواد غذایی برای توسعه *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* ضروری است. این باکتری اساسا در همه جا برروی زمین وجود دارد و زمانی که مواد غذایی در محیط فراهم باشد، سریعا تکثیر می یابد. موادآلی مورد نیاز رشد باکتری در خاک به وفور دیده می شود. در چند دهه اخیر عفونت های شدیدی از *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* در انسان نشان داده شده است. در سال 1936 اولین بار *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* از آبسه فردی جدا گردید. زمانی که به فرد آسیب دیده ویتامین تزریق کردند، باعث عود شدید بیماری گردید و این باکتری قابل انتقال به دیگران می باشد. انتقال از طریق تماس ناخواسته با آب آلوده، از طریق جراحی، آب آلوده بیمارستان ها، تروما یا عمل جراحی وایمپلنت های مصنوعی به انسان ها منتقل شود. میزان زیادی از این عفونت در کالیفرنیا توسط یک متخصص پوست ومو گزارش شد. تحقیقات بعدی نشان داد که منبع اصلی عفونت آب بوده وباکتری از آب وارد سالن آرایشی شده است. حداقل دوآنتی بیوتیک برای درمان نیاز است. داروهای اصلی برای درمان کلاریترومایسین، آمیکاسین، سیپروفلوکساسین و سفوکستین می باشد که باعث مهار رشد باکتری می شود ولی در موارد شدید که آنتی بیوتیک ها پاسخ نمی دهند، جراحی بافت آسیب دیده و برداشتن محل صدمه دیده را می طلبد (118).



تصویر 2-5 : بخشی از ضایعات فردی که با *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* در گیر شده است(118).

[](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=0wB1t89MXyo30M&tbnid=zTlfYiGR_01NhM:&ved=0CAUQjRw&url=http://khabaronline.ir/detail/206472/science/medical&ei=D230U-rQF8nPOfaDgYgC&bvm=bv.73231344,d.bGQ&psig=AFQjCNFoKXHAkW0_hh_fxd1P-gHsZRqn0w&ust=1408611385141093)

تصویر2-6 : *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* که با میکروسکوپ الکترونی تهیه گردیده است.

* *مایکوباکتریوم لپره موریوم*[[21]](#footnote-21) (از آن به عنوان باسیل جذام موش رات نام برده می­شود و اساساً موجب آلودگی جوندگان می­گردد).
* *مایکوباکتریوم مارینوم*[[22]](#footnote-22) (عامل مسبب گرانولومای تنه ماهی یا پرورش دهندگان ماهی، که انسانهائی را که با ماهیهای نواحی گرمسیری تماس دارند درگیر می‌نماید و عامل ضایعه در ماهیان و نرم­­­تنان می‌باشد).

عامل بیماری سل در آبزیان است که زیستگاه طبیعی آن آب بوده و قادر است از طریق خراش پوستی در بدن انسان وارد شده و گرانولوم استخر شنا را ایجاد کند .

گرانولوم استخر شنا یا همان گرانولوم ماهیگیران معمولا یک بیماری شغلی تصور می شود و در افرادی که باآبزیان سرو کار دارند، از شیوع بالاتری برخوردار است.

این معضل بزرگ ندول ماهیگیران هم نامیده می شود. مایکوباکتریوم های آتپیک ایجاد برجستگی های سطحی تا عمقی قرمز به رنگ بنفش تیره وسفتی کرده و ندول ها به تدریج بزرگ شده و تبدیل به تاول میشود وشروع به ترکیدن می کند که با خارش و سوزش شدیدی همراه می باشد (12).

|  |  |
| --- | --- |
| استخر و مشکلات پوستی | 59 |
| تصویر 2-7 : ضایعات در دست فردی که در استخر آلوده شده است. | تصویر 2-8 : بیماری را به طور درگیر دردست فرد آلوده نشان می دهد. |

* *مایکوباکتریوم میکروتی* (اساساً یک پاتوژن جوندگان کوچک بوده و همچنین در خارپشت و موش صحرائی ایجاد بیماری می­نماید).
* *مایکوباکتریوم اسکوروفولاسئوم*[[23]](#footnote-23) (ایجاد عفونت در گاوها، گاومیشها و خوکها می­نماید).
* *مایکوباکتریوم گزنوپی* (ایجاد عفونت در دوزیستان و خوکها می­نماید).
* *مایکوباکتریوم سیلواتیکم*[[24]](#footnote-24) (که از آن به عنوان باسیل کبوتر جنگلی نام برده می­شود و اساساً یک پاتوژن پرندگان است) (4).

8-2-مورفولوژي و خصوصیات میکروسکوپی:

مایکوباکتریوم بیماریزا در انسان، دربافت به شکل باسیل های دراز، باريک، ميله اي، صاف یاکمي‌خميده به طول 2 تا 5 ميکرون و قطر 2/0 تا 5/0 ميکرون می باشند. این باکتری ها درمحیط کشت به صورت اشکال فیلامنتی یارشته مانند وکوکوسیهم مشاهده می شود. معمولا قطر دراین باکتری ها درتمام طول آنها یکسان می باشد (تصویر1-2). مشاهدات میکروسکوپی نشان می دهد باسیل سل واجد دانه ها یی می باشد که به شدت قدرت رنگ پذیری دارند و واکوئل ها در این باسیل ها بدون رنگ می باشند و باسیل بیشتر به شکل دانه دار که در فاصله های نا منظم نسبت به یکدیگر قرار دارند دیده می شوند (3).

|  |  |
| --- | --- |
| [ANd9GcTnU2dlvT5UhFHfe2FUtjt-X-h-AWcIe6Nkkp82ZXt5y1MMfGyc](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&docid=yXHg5Vhm1-2nHM&tbnid=spDfEuho9z5z1M:&ved=0CAUQjRw&url=http://www.e-jafarpoor.com/1391/06/%D8%A7%D9%81%D8%B2%D8%A7%DB%8C%D8%B4-%D8%A7%D8%B4%D8%AA%D9%87%D8%A7-%D8%A8%D8%A7-%D9%BE%D8%B1%D9%88%D8%A8%DB%8C%D9%88%D8%AA%DB%8C%DA%A9-%D9%87%D8%A7/&ei=uZ7rU5L3LMmXO4LXgKAP&psig=AFQjCNFIYS_E7Hv0riE84ocbzblpeIEOkQ&ust=1408036588445324) | [ANd9GcRn8sGHvem0uGxfpUu2U2uDBJmbTp0OaJeqbcHIvkaGyudufiTEGG4tiJNr](http://www.google.com/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0CAQQjRw&url=http://www.elmi-az90.blogfa.com/&ei=bJ3rU6XlDoLT7AaC6IGQCg&psig=AFQjCNG9ra8qHMFs8YguRPEoonTf-x6O-w&ust=1408036588397201) |

تصویر2-9:عکس برداری توسط میکروسکوپ الکترونی از مایکوباکتریوم توبرکلوزیس(91)

بررسی توسط ميکروسکوپ الکتروني نشان دهنده اینست هسته و مواد هسته ای مثل RNA یاDNA توسط غشا هسته از سيتوپلاسم جدانشده اند ومیتوان نتیجه گرفت مايکوباکتريوم ها جزء پروکاريوت می باشند. (94)ديواره ضخيم و محکمی باعث حفظ شکل ظاهری باسیل می شود، ساختمان دیواره خود شامل دو لايه حاجب - الکترون که به وسيله لايه کم تراکم ديگري از يکديگر جدا می شوند. ديواره سلوليرا میتوان به کمک مواد شيميايي منحل نمود که در صورت حذف دیواره، شکل آنها را ازميله اي به ساختمان کروي تغییرمیدهدکه به این حالت اسفروپلاست میگویند.(87).

نقش اساسی تنظیم رشد در داخل سلول میزبان در مایکوباکتریها به عهده دیواره سلولی می باشد. مثلاسبب شروع چسبندگی مایکوباکتریها به ماکروفاژهای میزبان و به دست آوردن مواد غذایی ضروری، درون سلول­های میزبان شده و همچنین باعث مهار شدن فرآورده‌های ضد میکروبی میزبان و به احتمال زیاد فرمان مرگ سلولی می­شود. ديواره سلولي حدود 150 تا 200 آنگستروم ضخامت داردو محتویات آن در مایکوباکتریها موجب ازدیاد حساسیت تاخیری ومقاومت در مقابل عفونت می باشد. به علاوه این مواد میتوانند جایگزین سلول کامل مایکوباکتریوم گردند. غشاي سيتوپلاسمي ‌بعد از ديواره سلولي قرار دارد که شامل دو لايه به قطر 30 آنگستروم و لايه نازکی به اندازه 3 آنگستروم بین دولایه مذکور قرار دارد فسفولیپیدها و پروتئین ها که بعنوان لنگری برای مانوفسفواینوزیتیدها و لیپوآرابینومانان عمل می کنند.

با رشد دیواره سلولی به سمت داخل و ایجاد فرورفتگی از دو طرف سلول تقسیم سلولی در سلول در حال تقسيم انجام می شود. بررسی در مراحل متفاوت رشد مايکوباکتريوم ها، بیانگروجود ریبوزم ها باابعاد 120×80 آنگستروم می باشدو تعداد آنها از ابتدای مرحله لگاريتمي‌رشد تا مراحل آخر لگاريتمي روبه افزایش می باشد. این ریبوزوم ها با رشته هايي به قطر حدود 7 آنگستروم به يکديگر متصل شده و پلي ريبوزوم را تشکيل مي‌دهند (87).

هسته احتمالادارای رشته هایی می باشد که يک مولکول DNA مارپيچي درازبه طول 30 آنگستروم مي‌باشند. بنابراین مايکوباکتري ها، ارگانيسم هاي تک هسته اي هستند. بررسي هاي بيوشيمیايي نشان مي‌دهد که DNA مايکوباکتريوم ها شامل يک مولکول دو رشته اي حاوي مقادير زياد گوانين و سيتوزين است و وزن مولکولي آن در حدود 109× 6/4-5/2 دالتون بر آورد شده است(87).

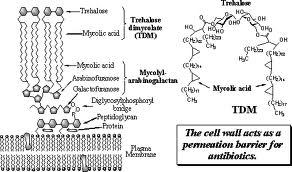
9-2-**خصوصیات رشد:**

بیشتر باکتري هاي بيماري زا بي هوازي يا هوازي اختياري هستند، اما باسيل سل هوازي مطلق می باشد وانرژی موردنیازخودرا ازاکسیداسیون موادکربن دارساده بدست می آورند. بنابراین می توانند در محيطهاي کشت آزمایشگاهی ساده حاوي گليسرين به عنوان منبع کربن و املاح آمونيوم به عنوان منبع ازت رشد کند. معمولابه این محیط های کشت مخلوطي از اسيدهاي آمينه و آسپاراژين اضافه مي‌شود تا شروع رشد و سرعت آن را بهبود بخشند. افزایش فشار CO2 باعث افزایش رشد آنها می شود. کند رشد هستند (18 ساعت زمان دو برابر شدن باسیل است).

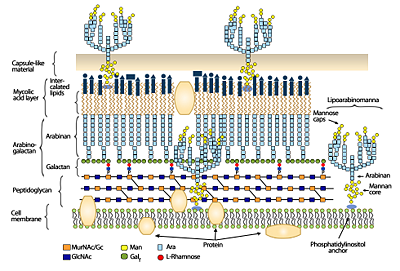
اگرچه مايکوباکتريوم ها به اثر مهار کننده مواد چربي در محيط کشت خيلي حساسند ولي مقادير اندک اسيدهاي چرب با زنجير طويل موجب تحريک آنها مي‌شوند.pH مناسب جهت رشد *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* حدود 6 تا 8 وpH متوسطآن6- 5/6 است. رشد اختصاصی مایکوبکتریوم ها براساس سويه باسيل اسیدفست، محيط وتغذیه وحرارت و غيره متغیرمی باشد. رشد باسيل در محيط هاي کشت جامد، مانند محيط تخم مرغ سفت شده، بسیار و فراوان است و کلنی ها برآمده، ظاهري گل کلمي شکل ‌يا مخروطي نا منظم، زبر و شکننده مي‌باشد(تصویر 1-3). باسيل سل هم دربدن حيوانات هم درمحیط کشت آزمایشگاهی کند رشد می باشد. مايکوباکتريوم هاي ساپروفيت رشد بیشتری داشته ودرحرارت22تا23درجه سانتی گرادهم تکثیرمی یابند. خاصیت تولید پیگمان درانواع ساپروفیت بیشترازانواع بیماریزا است وخاصیت اسیدفست بودن آنهاکمتراست. ولی بطور کل سرعت رشد مايکوباکتريوم ها خيلي آهسته تر از باکتري های دیگرمی باشد(29).

10-2-فاکتورهای ویرولانس

مايكوباكتريوم‌ها ديواره سلولي ضخیمی دارند. مقاومت غیر معمول آنها ناشی از پوشش کمپلکسسلولیاست (موم، گلیکوپپتید و گلیکوپروتئین). دیواره سلولی در آن ها آبگریز (هیدروفوربیک)، مومی وغنی از اسید مایکولیک می باشند. ديواره سلولي دارای لایه مایکولات ویک لایه پپتید و گلیکان است که توسط یک نوع پلی ساکارید ویژه به نام ارابینوگالاکتان در کنار هم قرار گرفته اند. ساختمان ديواره سلوليراسه لایه تشکیل داده است. واجد يك قسمت ليپيدي که 30 تا 40 درصد وزن كل سلول را تشکیل داده است. و یک قسمت حاوی باندهاي سستمی باشد كه آنها را با حلالهاي آلي میتوان جدا کرد. سومین قسمت حاوی لایه­ای است که چربیهای سختي به آن اتصال یافته اند و که جدا شدن این چربیها فقط ازطریق صابوني‌ شدن لاية قبل از آن ،امکان پذیر می باشد. ليپيدهاي گونه‌هاي متفاوت مايكوباكتريوم‌، به وسیله فردی به نام کافری کاملا شرح داده شد (29).بيشترین فعاليتهای ليپیدي این باكتري ها با قسمتیکه دارای باند سست است، در ارتباط است. قسمتی که داراي باند محكم است مشمول بقایا ی استريفيه شده اسید مايكوليك را در بقایای آرابينوز در آرابينوگالاكتاناست که این تشکیلات ساختار اسكلت اصلي ديواره سلولي را تشكيل داده است. جداسازی شيميايي، ديواره سلولي بدون چربي آرابينوز، گالاكتوز، موراميك اسيد، گلوكز آمين، آلانين، D- آمينوپيميليك اسيد و گلوتاميك­اسيد را مشخص نمود. تعدادی از تحقیق کنندگان، در سال 1968سعی کردند محل جایگزینی ليپیدهاي باند سست را در ساختمان اسكلت ديواره شرح دهند. در يك مدل 3 لايه ای که برای دیواره سلولي پیشنهاد شده این لایه ها به شکل مجزا ازهم قرار دارند: يك لاية ليپوپلي­ساكاريد[[25]](#footnote-25) (LPS)، يك لاية بينابيني که مخلوطی از لیپيد- پروتئين‌- LPSمی باشد و يك لايه در داخل LPS- موكوپيتيد شرح داده شد(تصویر 2-10).



تصویر2-10 :نمای شماتیک ازساختمان دیواره مایکوباکتریوم توبرکلوزیس



تصویر 2-11:نمای شماتیک از ساختمان دیواره مایکوباکتریوم های اسید فست

بعدها محققین دیگری مدل شرح داده شده را کمی تغيير دادنداما همچنان نظریه چند لايه‌اي بودن این ساختار با لايه‌هاي مجزاي L1،L2و L3حفظ شد و همچنین لايه‌هاي جدید مورين مياني بیشتری مطرح شد. هرچندبه دلیل ضعف درمشاهده با ميكروسكوپهای الكتروني قديمي، لايه‌هاي خارجي مايكوباكترياها باز هم مورد بحث باقي ماند. لاية بيروني با رنگ‌آميزي سيتو شيميايي روتنیوم رد[[26]](#footnote-26)به شکل ساختمان ده تا دوازده نانومتری منظم شرح داده شد که پلي‌ساكاريد‌هاي اسيدي در *مايكوباكتريوم ایويوم* وتمام 18 گونة ایکه مورد بحث قرار گرفته بود شرح داده شد. با اینکه ساختار لاية بيروني در مايكوباكترياها تك لايه‌اي می باشد، مي‌توانند با دفع بعضی از مواد و داروها، خاصیت دو لایه­‌اي را خود بروز دهند. مهار اختصاصي سطح ليفي آن، اين لايه را تشكيل مي‌دهد مثل مهار سطح گليكوليپدي[[27]](#footnote-27) در *مايكوباكتريوم ایويوم* به وسيلة ام- فلئورو- فنیل الانین[[28]](#footnote-28) كه سبب آزاد سازي لاية بيروني و شكل‌گيري مجدد دو لاية آن در محيط اطراف شده و متعاقباً باعث فعاليت‌هاي ضد ميكروبي باكتري مي‌گردد(جدول1-1).

**جدول 2-6: فعاليت­هاي بيولوژيکي ترکيبات با منشاءمايکوباکتريايي (106)**

|  |  |
| --- | --- |
| ترکیبات | فعالیت­های بیولوژیکی |
| گلیکولیپید حاوی مایکولیک اسید | محرک تشکیل گرانولوما (نوع "جسم خارجی") |
| فسفو لیپید حاوی مانوز | ایمونوژن ،فعالیت یاوری (ادجوانی) |
| مایکوزیدهای  نوع گلیکوپپتیدولیپید | آنتی ژن های وابسته به سروتایپینگ کمپلکس *مایکوباکتریوم ایویوم-اینتراسلولار*؛ که  در شکل گیری "موادکپسولی"در اطراف باکتریهای فاگوسیته شده نقش دارد |
| مایکوزیدهای  نوع فنوگلیکولیپید | آنتی ژن های اختصاصی *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس، مایکوباکتریوم لپره* و *مایکوباکتریوم*  کانزاسی که در شکل گیری مواد کپسولی در باکتری های فاگوسیته نقش د ارد |
| موم D | فعالیت یاوری (ادجوانی)؛ محرک آرتیت در موش­های سوری و رت­؛ محرک تشکیل  گرانولوما (نوع "جسم خارجی") |
| کورد فاکتور (TDM) | توکسیتی در موش (پریتونیت، خونریزی حاد)؛ عامل حدت؛ مهار مهاجرت پلی مورفونوکلئر،  افت آنزیم های میکروزومال متصل شده به NAD؛ افت سنتز گلیکوژن کبدی و عضلات؛ موثر بر متابولیسم - پیرووات؛ ایمونوژن؛ فعالیت یاوری؛ محرک تشکیل گرانولوما (نوع "عفونی") |
| سولفاتیدها | عامل حدت؛ توکسیسیتی در موش؛ مهار اتصال فاگوزوم ولیزوزوم در ماکروفاژ عفونی، ؛ فعالیت فعالیت یاوری؛ تعدیل کننده ایمنی |
| مورامیل-دی پپتید (MDP) | فعالیت یاوری ؛ تعدیل کننده ایمنی |
| اسکلت دیواره سلولی | فعالیت یاوری ؛ محرک تشکیل گرانولوما (نوع "جسم خارجی")؛ تعدیل کننده ایمنی |
| مایکوباکتین و اگزوشلین­ها | شلاته کننده آهن؛ عامل پاتوژنیسیته |

NAD: نیکوتین آمید اسید دی نوکلئوتید

PMN: پلی مورفونوکلئر نوتروفیل

TDM: ترهالوز 6 -6`- دی مایکولات

**11-2-بیماری زایی سل ماهي ها :**

مایکوباکتریوزیس ماهي یک عفونت باکتریایی خطرناک می باشد که در ماهیان هم مانند انسان توسط مایكو باكتريوم ها تحت شرایط نامساعد محیط زندگی، ناتوانيو ضعف، كمبود ويتامين ایجاد می شود. مایکوباکتریوم ها میتوانند طیف وسیعی ازماهیان وحشی، پرورشی وآکواریومی راآلوده نمایند(10). ماهيانی بیشتر درمعرض ابتلا قرار دارند که در حوضچه ها پرورش ماهی یا در آكواريوم هاي شلوغ زندگی می کنند. سه گونه متداول مایکوباکتریوم بیماریزا درماهیان، *مایکوباکتریوم مارینوم، مایکوباکتریوم فورتویتوم* و*مایکوباکتریوم چلونئی* می باشند(10).

مایكو باكتريوم هایی که سل در ماهیان را ایجاد می کنند در همه جا وجوددارند اما بیشتر زير خاک، زباله ها، پسماند غذا هاو لاشه ماهي هاي مرده يافت مي‌شوند. شیوع اين بيماري بیشتر توسط ماهیان مرده ای رخ می دهد که لاشه آنها مدت زیادی پس از مرگ شاندر حوزه محیط زندگیشان باقی می ماند.

مایکوباکتریوزیس در مدت کمی در ماهیان یک حوضچه مشترک همه گیر شده و با طی زمان چند هفته تمام جمعیت حاضر درون استخر را از بین خواهد برد. علائم خارجي سل ماهی با توجه به گونه هاي مختلف متفاوت می باشد و تفاوت این علائمبا مقاومت ماهیرابطه معکوس دارد. نشانه های این بيماري در کالبد گشایی ماهی ها علامت خطری برای انسان محسوب می شود(68).

علائم کلینیکی ماهیان مبتلا به اين بيماري شامل بی اشتهایی، بی توجهی به اطراف، ناهنجاری های اسکلتی، آسیت، تورم بدن به دليل حجم مايعات در حفره بدن، لاغري، نازکی درتیغه عقبی ماهی و شكم فرو رفته، تحلیل رفتن فلس ها، كشيدگیفلس هاي، جراحات پوستي باز، باد كردن چشم ها و از حدقه در آمدن آن ها، خميدگي ستون فقرات، رنگ پريدگي، ضعف و بی حالی، شنا كردن نا هموار و پر تكان، جابه جايي اندام هاي شكمي، كاهش واكنش ها، جدا ماندن از بقيه ماهي ها (ماندن در يك گوشه )، بزرگ شدن طحال وکبد وهمچنین ظاهر شدن ندول های سفید وخاکستری رنگ در اندام های داخلی می باشد. اين علائم مي‌تواند مجزا و يا همزمان مشاهده شود(10،11). در عفونتهای بسیار شديد، در معاينه و آزمايش دستي، غده هايی بارنگ سفيد و خاكستري در كبد و طحال ماهی دیده می شود كه مركز عفونت باكتريايي را نشان می دهدو میتوان بافت سالم را از ناسالم تشخیص داد. كپسول در بافتهای پيوندي سالم بي رنگ و نيمه شفاف می باشد. در مشاهدات با ميكروسكوپ، كيست هاي قهوه ايرنگ و زرد متمایل به کرمی که از ايكتيو فونوس قابل تشخیص نمی باشند، دیده می شود(97).

با مشاهدات مقایسه ای که درمورد این کیست ها در ماهیان مبتلا، انجام شد این نتیجه به دست آمد که كيست هايیکه در مایکوباکتریوزیس ایجاد می شود همواره گرد نيستند. در این نوع عفونت ها، كيست هاي گرد، دراز و شاخه دار را نیز میتوان مشاهده کرد. تشخیص اشتباه كيست های ناشی ازسل ماهی با ايكتيوفونوس مشكل ساز نمی باشد، زیرا هيچ کدام از این شرايط را نمي‌توان برطرف کرد. در لاشه اندام هايی از ماهيان آلوده به مایکوباکتریوم میتوان كيست هاي سطحي را نیز مشاهده نمود(97).

كيست های ناشی از بیماری در شرايط نامساعد محيط يا با افزايش ناشی از فشار مي‌تركند و مایكو باكتري ها در تمام نقاط بدن ماهي منتشر می شوند و می تواند به عضوهای دیگر بدن ماهی حمله کنند. باتوجه به مسری بودن بیماری سل نباید اجازه داد ماهی های مسلول در استخرهای پروشی چان خود رااز دست بدهند بلکه باید به سرعت از از حوضچه ها ویا تانک ها خارج کرده و نابود شوند، زیرا دیگر ساکنین را نیز مبتلا خواهند کرد. دیگرماهی هایی که در معرض سرایت قرار دارند هم باید درمان شوند. برای جلوگیری ازابتلا این ماهیان باید آنها را به مخزن درمان منتقل کرد و حوضچه اصلی را مرد درمان قرار داد. از ماهی های وارد شده به مخزن درمان هرکدام که مشکوک به بیماری بودند، هیچ کدام را نباید وارد حوضچه اصلی نمود جز اینکه تمام موارد مبتلا نابود شده باشند. پس از آن مخزن را کاملا تمیز و ضدعفونی کرده و ماهی ها را دباره به حوضچه اصلی منتقل نمود(72).

از اقدامات پيشگيرانه موثر مي‌توان به فراهم كردن بهترين شرايط كيفي ( غذا، آب، دما،غيره) اشاره كرد. این بیماری باکتریایی، نسبتا عفونی است که به طور روزافزونی معمول و متداول می گردد. ماهی دچار توبرکلوز معمولاً بهطور نرمال تغذیه میکند اما با آسیب ارگان های درونی، وزنش را نیز از دست میدهد. برخی ماهی ها جوش های ریز زیرپوستی را که عاقبت زخم میشوند به همراه دارند. در دیگر ماهی ها، این جوش های رز در پشت چشم همراه با اگزوفتالمی توسعه می یابند. توبرکلوزیس ماهی میتواند معمولا به شکل یک جوش ریز عفونی بر پوست انسان سرایت کند، اما به ندرت سبب یک عفونت درونی خطرناک نیز میگردد. شناسایی صریح و آشکار فقط توسط کالبدشکافی می تواند صورت پذیرد. از علائم مهم عفونت های مایکوباکتریایی در ماهی می توان به رنگ پریدگی، جمع شدگی باله، کاهش وزن، آسیب های پوستی همراه با زخم اشاره کرد (97).

|  |  |
| --- | --- |
| ANd9GcQpR7KVrm2K0g7KTpH1c81Ll28QKgwWJ9tgqHqujKRZxDwZBsKU | photo of herring with VHS |
| تصویر 2-12: این تصویر ماهی سالم را نشان می دهد(97). | تصویر 2-13: ماهی بیمار را نشان می دهد(97). |

**12-2-پروب هاي اسيدنوکلئيک**

پروب های مذکورنخستین بار بار در دهه 70 ميلادي مورد استفاده واقع گرديد ماهيت این پروب ها بر پایه توانايي به هم پيوستن زنجيره هاي منفرد DNA (يا RNA) ومتصل شدن به شکل يک مارپيچ مضاعف بوده و ايجاد سکانس های بازی آن به صورت مکمل يکديگر موجب خواهد شد و (3). در اين مطالعات DNA به عنوان ژنوم کامل باکتري به يک غشا متصل بوده و درجه اتصال DNA نشاندار راديواکتيو در مورد گونه هاي همولوگ و هترولوگ تعيين مي‌گردد. اين تکنيک با پيچيدگي هاي بالاي خود به طور گسترده استفاده نگرديد(60).

**13-2-ريبوتايپینگ**

RNAريبوزومي‌(rRNA) که مي‌تواند هم در تست هاي تشخيصي متکي بر آمپلي فيکاسيون اسيدنوکلئيک استفاده شده و هم براي شناسايي گونه مورد استفاده واقع شود. با وجود پايداري شديد rRNA ، تفاوتهاي کوچکي درسکانس بازهاي آن دربين گونه هاي مختلف مايکو باکتريوم ديده مي‌شود و از روش تعيين سکانس بازهاي rRNA مانند S16و S23 مي‌توان تمايز گونه اي بين اعضاي مايکوباکتريوم را مشخص نمود(3).

**14-2-روش هيبريديزاسيونDNA - DNA**

اين تکنيک در تعيين هويت گونه ها روشي رفرانس است و آينه ي تمام ژنوم مي‌باشد. نتايج بر اساس درصد هيبريداسيونيا (اختلاف درجه حرارت بين هتروهومودوپلکس) بيان مي‌شود. استاندارد کردن نتايج نيازمند  براي ارزيابي دقيق پايداري حرارت هيبريدهاي به دست آمده از آزمايشات است که مي‌بايست از 6 درجه سانتيگراد براي سويه هاي مشابه کمتر باشد. در عين حال درصد هيبريديزاسيون بين تجربيات يا روش هاي مختلف فرق دارد(3).

**15-2-پروب هاي هيبريديزاسيون داخل ژنومي‌تجاري**

اين سيستم ارزشمند و پر استفاده مي‌باشد و جهت پلي مورفيسم S rRNA16 )اسيد ريبونوکلئيک ريبوزومي( است. پروب هاي اختصاصي تجارتي جهت *م. توبرکلوزيس، م. ايويوم، م اينتراسلولار م . کانزاسي* اي تهيه شده است(22).

**16-2-تعيين توالي اسيدهاي هسته اي**

در بررسي هاي تکاملي، يکي از اهداف ژن 16S rRNA است. در مايکو باکتريها ژنهاي ريبوزومي‌متصل به يک اپرون به صورت(16S rRNA)- rrL (23S rRNA)-rrf(St rRNA) S rrs است(30). هر ناحيه داخل ژني داخل اين اپرون tRNA را کد مي‌نمايد. تنها يک کپي از اين اپرون در مايکو باکتريهاي کند رشد وجود دارد ولي در گونه هاي تند رشد دو کپي از اين اپرون موجود است. از موارد کاربرد روشهاي مولکولي مي‌توان در شناسايي سريع مقاومت نسبت به دارو اشاره نمود. پديد آمدن مقاومت نسبت به دارو به علت بروز موتاسيون در ژن هايي است که بر اهداف يا محل هاي اثر دارو تاثير مي‌گذارند. با شناسايي چنين موتاسيون در ژنهاي مذکور مي‌توان به مساله علت مقاومت دارويي پي برد (23). از مشخصه هاي ژنوم *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* کمپلکس مي‌توان به مواردي از جمله مقاديري بالايG + C ( حدود 65%) و نيز عدم تنوع و تغييرپذيري آن که دليلش ناشناخته است اشاره نمود(62).

17-2-ژنتيک *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس*

طول توالي کامل ژنومH37RV(اولين *مايکوباکتريوم توبرکلوزيسي* است که جهش و موتاسيوني روي آن رخ نداده است و معمولا به عنوان سوش استاندارد از آن استفاده مي‌کنند) که به عنوان يک سوش استاندارد با استفاده از روش Shot gun، 4411532 جفت باز تعيين توالي شده است که 5/65 % آن غني از G+C است. ژنوم حاوي تقريبا 4000 ژن است که بيشتر از 91% آن ظرفيت کد کردن رادارد. ژنها در 11 گروه عملکردي تقسيم بندي شده اند. نقش عملکردي به 52% از آنها نسبت داده مي‌شود و 48% فعاليت آنها هنوز شناخته نشده است (29).

تعداد بسياري از موتاسيون ها در طول ژنوم رخ مي‌دهد که باعث ايجاد مقاومت دارويي مي‌شود. به نظر مي‌رسد که بيشتر نوترکيبي ها از طريق ترانسپوزون هاي متفاوت صورت مي‌گيرد که اجزايي بسيار ناپايدارند و قادر به ايجاد انواع مختلفي از باز آرايي ها مانند جايگزيني، حذف، معکوس شدن و دو برابر شدن مي‌باشند (29).

4/3 ژنوم ترکيبي از ترانسپوزون ها، توالي الحاقي [[29]](#footnote-29)(IS) و پروفاژهاي (phiRV1 ,phiRV2) است. 56 کپي از IS متعلق به IS*259* ,IS*110* ,IS*30* ,IS*21* IS*5* ,IS*3* ,ISL*3* بوده و خانواده جديدي از عناصر تداخلي IS*1535* نيز شناسايي شده است.IS*6110*، يک عضو IS*3* است که فراوان ترين عضو بوده و مهمترين نقش در ژنوم را دارد. اطلاعات به دست آمده از توالي ژنومی، نگرشي جديد در مورد بيولوژي باسيل ارائه مي‌دهد. 8% از ژنهاي شناسايي شده در متابوليسم ليپيد که در شيوه عملکرد آن مهم است دخيل هستند، اين در حالي است که مقدار قابل ملاحظه اي از غشاء *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* حاوي ليپيد، گليکوليپيد، ليپوگليگان مي‌باشد و ژنهاي دخيل در آنها نيز شناسايي شده است. در *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* سيکل بتا-اکسيداسيون براي کاتابوليسم چربيها فوق العاده مهم است و اين عمل بوسيله عملکرد پروتئين fadA و fad B تسهيل مي‌شود. مشخص شده است که بيش از 100 آنزيم آنها پتانسيل اکسيداسيون ليپيدهاي اگزوژن میزبان را دارند. چنين تعداد زيادي از عملکرد تجزيه ليپيد در باکتري هاي ديگر گزارش نشده است در حالي که در اين باسیل پديده تجزيه ليپيد به عنوان يک روش کاتابوليکي اصلي محسوب می شود ولي باعث نشده که به پديده آنابوليکي آسيب برسد(41،47،51).

ماركرهاي مخصوص، براي تمايز سويه هاي *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* كمپلكس، ابزارهاي قابل قبول براي تشخيص سويه ها و مطالعات اپيدميولوژي سل مي‌باشند. انواع مایکوباکتریهارا مي‌توان به راحتي بوسيله تعداد زيادي از روشهاي انگشت نگاري DNA تشخيص داد. اين روشها به چند دسته تقسيم   
مي‌شوند(3):

1- روش هايي که پروفايل انگشت نگاري توليد مي‌کنند مانند RFLP - IS6110

2- روش هايي که اساس آن PCRمي‌باشند مانند اسپوليگوتايپينگ[[30]](#footnote-30)و VNTR[[31]](#footnote-31)

3- PCR ترکيبي[[32]](#footnote-32) و...(3)

**18-2تکنیک های مولکولی انگشت نگاری ژنومی**

**1-18-2- تكنيك‌هاي ژنومي‌كه اساس و پاية آنها PCR نمي‌باشد**

تعدادی از این تكنيك‌ها، براساس وجود مناطق ويژه برروي ژنوم مايكوباكتريومها طراحی شده است. یكي از جديدترين اين تكنيك‌ها RFLP [[33]](#footnote-33)است كه در حقیقت اصلاح شدة تكنيك REA مي‌باشد. RFLP دارای دستورالعملی مشابه براي هضم آنزيمي‌DNA(كه از II*Pvu* يا I*Alu* استفاده مي‌شود)، می­باشد. و اين قطعات تولیدی توسط ژل آگارز در ميدان الكتريكي قابل تفكيك هستند. تنها وجه تمایز آن، اضافه شدن یک مرحله ساترن بلات[[34]](#footnote-34) برای جدا کردن DNA در روي غشاء نيتروسلولز يا فيلتر نايلون است و در ادامه اضافه كردن پروب‌ها جهت متصل شدن به مناطق مزبور، مي‌باشد و اين پروب‌ها صرفاً جهت چسبیدن به قسمتي از DNAی شكسته شده انتخاب شده‌اند. بنابراين بعد از هيبريداسيون، تنها تعدادی از قطعات هیبرید شده قابل مشاهده خواهند بود(46).

در گذشته پروب‌هاي لیبل شده با32P با خاصيت راديواكتيو، مورد استفاده قرار مي‌گرفت و توسط در معرض قرار دادن در فيلم‌هاي مخصوص رادیوگرافی با اشعه ایکس قابل مشاهده بودند ولي به علت خطرات ناشی از آن براي سلامتي افراد، از متدهاي غير راديواكتيو و عمدتا از روشهاي شيميايي استفاده مي‌شود(36).

اولين مرحله در اين تكنيك، انتخاب پروب می­باشد،‌ تا پلي­مورفيسم و تمايز خوب بين سويه‌ها را آشكار سازد. پروب‌ها بر اساس سکانس تكرار شونده، انتخاب می­گردند زيرا اينها با تعداد بيشتري از قطعات باند شده و اين مي‌تواند میزان آشكارسازي را براي پلي‌مورفيسم افزايش دهد. اين عناصر تكراري كه براي RFLP استفاده مي‌شوند، شامل IS، قطعات تكراری GCیا (RGRS) و قطعات DR مي‌باشد(46).

**1-1-18-2-آنالیز توسط آنزیم­های محدود کننده[[35]](#footnote-35)**

تكنيك REA اولين تكنيكي بود كه براي تفکیک گروه خاصی از *مايكوباكتريوم بويس* ارائه داده شد در اين تكنيك، بعد از استخراج DNA از سلولژنوم باکتری به طور کامل با 3 آنزيم محدود کننده BstE12 و Pvu II و Bc22 مورد هضم آنزیمی قرار مي‌گيرد.این آنزیم­ها سکانسهای خاصی را با ویژگی بالا برش داده و قطعات کوچکی را از DNA ایجاد ­کرده، كه اين قطعات توسط ژل آگارز در ميدان الكتروفورز از يكديگر جدا مي‌شوند. بر حسب وزن مولکولی، كوچكترين قطعات در فاصله دورتر قرار مي‌گيرند و سپس سویه­ها بر اساس قطعات الگوی رنگ شده با اتیدیوم بروماید، تعیین هویت شده و به وسیله دستگاه ترانس لومیناتور از آنها عکس تهیه می­گردد. در اواخر دهه 1980 و اوايل دهه 1990، تكنيك REA تنها تکنیک مورد استفاده برای تایپینگ، بوده است كه براي مطالعات مولكولار اپيدميولوژيك در نيوزيلند و ايرلند مورد استفاده قرار گرفت(3). اجرای این روش بسیار سخت و تفسیر الگوهای کمپلکس در آن مشکل می­باشد. علاوه بر این هيچ روشي براي مقايسه تيپ‌هاي به دست آمده از اين طریق وجود ندارد، لذا از اين تكنيك به ندرت استفاده مي‌گرددبه جز کشور نیوزلند که این روش همچنان به عنوان یک روش انتخابی مورد استفاده قرار می­گیرد(3).

**2-1-18-2-انگشت‌نگاري DNA به روش RFLP**

تكنيك انگشت‌نگاري DNA يا اصلاح درست‌تر آن آناليز به روش RFLP رايج‌ترين روش براي تقسيم‌بندي مايكوباكتريوم از نظر اپيدميولوژي مي‌باشد. از اين روش عمدتاً براي تايپينگ اعضاي كمپلكس *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* استفاده مي‌شود اما ضمناً از آن براي تايپينگ اعضاي *مايكوباكتريرم ايويوم* نيز استفاده شده است. اساس تكنيك RFLP به این صورت است كه تمام رشته‌هاي DNA از هر منبعي كه باشند محتوي سكانس‌هاي كوتاهي از چندين باز هستند كه معمولاً تعداد آ‌نها 6-4 مورد در طول رشته مي‌‌باشد، اين رشته‌ها توسط آنزيم‌هايي به نام رستريكشن اندونوكلئاز[[36]](#footnote-36) هضم مي‌گردند و بدين ترتيب به قطعاتي با طول‌هاي مختلف تبديل مي‌گردند كه مي‌توان اين قطعات را بر مبناي ميزان تحرك وابسته به اندازه آنها در يك ژل الكتروفورز تفكيك نمود(32).

درروش‌هاي تايپينگ اوليه، هضم يك ژنوم مايكوباكتريايي توسط اندونوكلئازها، سبب توليد هزاران قطعه مي‌گرديد كه ژل‌هاي حاصله به سختي و به زحمت قابل خواندن بودند. اين مشكل را به دو روش مي‌توان حل نمود. اولين راه، هضم DNA و جدا كردن قطعات حاصله بر روي يك ژل مي‌باشد و سپس از يك پروب DNA نشاندار استفاده مي‌‌گردد، اين پروب تنها سكانس‌هاي خاصي از بازها را شناسايي و آشكار مي‌نمايد كه چندين بار در ژنوم ميكروب‌ تكرار شده‌اند، اين امر سبب مي‌گردد تعداد خطوط قابل رؤيت به ميزان قابل توجهي كاهش يابد. اين سكانس‌هاي تكراري شامل ترانس پوزون‌ها[[37]](#footnote-37) و اينسرشن سكانس‌ها[[38]](#footnote-38)و يا ژن‌هاي پرنده[[39]](#footnote-39) مي‌باشند. تقريباً در ميان تمام سويه‌هاي كمپلكس *مايكوباكتريومتوبركلوزيس* بين 1 تا بيش از 20 نسخه از يك اينسرشن سكانس به نام IS*6110* يافت شده است. موقعيت و تعداد اين اينسرشن سكانس‌ها در بين سويه‌هاي مختلف تا حد زيادي متفاوت است و در عين حال در يك سويه واحد نسبتاً پايدار و ثابت مي‌باشد با اين وجود گاهي اوقات وجود تغييرات جزيي نيز درميان نمونه‌هاي جدا شده متوالي از يك بيمار مشخص و يا در ميان نمونه‌هاي جدا شده از اپيدمي‌هاي محدود سل ديده شده است كه اين موضوع به خصوص در سويه‌هاي داراي نسخه‌هاي متعدد اينسرشن سكانس‌ها، مشاهده مي‌شود. از طرف ديگر تيپ‌هاي به دست آمده توسط RFLP از سويه‌هاي دختري واكسن BCG با وجود كشت‌هاي مجدد فراوان در شرايط مختلف و در آزمايشگاههاي متعدد سرتاسر جهان، به صورت مشخص ثابت و بدون تغيير باقي مانده‌اند(63).

براي انگشت‌ نگاري، به ويژه در شرايطي كه يك و يا تعداد محدودي اينسرشن سكانس وجود دارد و همچنين درشرايطي كه هيچ سكانسي وجود ندارد از انواع ديگر DNA چند نسخه‌‌‌اي استفاده مي‌‌شود. ون‌سولينگن[[40]](#footnote-40) در سال 1994 به شرح اين گروه ماركرها شامل سكانس‌هاي تكراري مستقيم[[41]](#footnote-41)، اليگوتيدهاي واقع در فضاي بين اين سكانس‌ها (از اين اليگوتيدها به صورت فزاينده در تكنيك تايپينگ با كمك اليگوتيد يا به اصلاح اسپوليگوتايپينگ[[42]](#footnote-42) استفاده مي‌شود) و سكانس‌هاي مكرر چند شكلي غني از GC[[43]](#footnote-43)، پرداخت(112).

جزئيات فني تكنيك تايپينگ به روش RFLP كمپلكس *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* توسط ون امبدن[[44]](#footnote-44) در سال 1993 ارائه شده است. به طور كلي در اين تكنيك DNA از كشت‌هاي تهيه شده از نمونه‌هاي باليني استخراج مي‌شود و پس از هضم توسط يك آنزيم اندونوكلئاز رستريكشن به كمك ژل الكتروفورز تفكيك مي‌گردد. پس از اين مرحله قطعات DNA جدا شده توسط تكنيك ساترن بلاتينگ[[45]](#footnote-45) به يك غشاء نايلون انتقال داده مي‌‌شوند و پروب‌هاي DNA كه با استفاده از تركيب كروموژن‌ ديگوكسي ژنين[[46]](#footnote-46) نشان‌دار شده‌اند براي سكانس‌ IS*6110* به كار گرفته مي‌شوند. وضعيت تحرك باندهاي مشاهده شده با اثرات نشانگر چندگانه در مجاورت اثرات مربوط به نمونه مقايسه مي‌شود. اشكال به دست آمده از RFLP مربوط به سويه‌‌ها را مي‌توان به صورت چشمي‌و يا توسط يك سيستم كامپيوتري به صورت نوري تصويربرداري و با يك مجموعه رفرانس مقايسه نمود (113).

از آن‌ جايي كه روش انگشت‌نگاري مذكور داراي يك پروب DNA مي‌باشد لذا فقط در مورد سويه‌هايي قابل استفاده است كه حاوي يك اينسرشن سكانس هستند. روش جايگزين كه براي تمام سويه‌هاي مايكوباكتريايي استفاده می شود روشی است كه DNA را تنها در تعداد بسيار محدودي از نقاط آن قطع مي‌نمايد. اين امر سبب مي‌گردد تعداد كمي‌از قطعات بسيار بزرگ DNA پديد آيد. با وجود آن كه اين گونه قطعات در يك سيستم الكتروفورز استاندارد به سادگي حركت و مهاجرت نمي‌نمايند اما با استفاده از تغييرات متوالي جريان الكتريكي در جهات مختلف اين قطعات غول‌پيكر به آهستگي در درون ژل بر روي يكديگر لغزيده وبدين ترتيب از يكديگر جدا مي‌شوند. از اين روش براي تمايز سويه‌هاي *مايكوباكتريوم توبركلوزيس*، كمپلس *مايكوباكتريوم ايويوم* و *مايكوباكتريوم شلونئی* استفاده شده است. تاكنون چندين تكنيك جهت انگشت‌نگاري محصولات PCR شرح داده شده است كه از اين تكنيك‌ها مي‌توان به عنوان تست‌هاي غربالي جهت دسته‌بندي‌هاي احتمالي از نظر اپيدميولوژي استفاده نمود (56).

از تكنيك انگشت‌نگاري DNA براي مطالعه پراكندگي با سيل‌هاي سل در اپيدمي‌هاي كوچك اين بيماري واز جمله موارد ناشي از مواجهه افراد HIV مثبت با بيماران مسلول عفوني در بيمارستان‌ها استفاده شده است تا اهميت نسبي فعاليت مجدد بيماري سل با منشاء داخلي و عفونت مجدد با منشاء خارجي در اپيدمي‌هاي سل تعيين گردد و همچنين از اين تكنيك‌ براي آشكار نمودن گستردگي باسيل‌هاي سل مقاوم به دارو در يك جامعه به صورت غيرمستقيم نيز استفاده شده است (3).

**3-1-18-2RFLP-به كمك قطعات تكراري GC(PGRS)[[47]](#footnote-47)**

مايكوباكتريوم­ها شامل مقدار زيادي از G+C مي‌باشد تا جایی که تقریبا 66درصد ژنوم *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* را G+Cتشكيل مي‌دهد.GCبه شکل قطعات تکراری بيش از 80 درصد داخل ژنوم مایکوباکتریوم­ها، وجود دارد. در بيشترمایکوباکتریوم ها اين قطعات(PGRS) به شکل پراكنده در سراسر ژنوم موجود می باشند. (99).

مطالعات نشان داده در بعضی از پلاسميدها قطعات PGRS وجود دارد. و بعد از اینكه پلاسميد PTBN12 براي بهره برداری بهتر پروب رونوشت استفاده شد مورد توجه بیشتری قرار گرفت(95). در اين ميان، توصيه و پيشنهاد شد كه این پروب شامل مجموعه‌اي از الیگونوكلئوتيدهاي سويه و شامل تعدادي از قطعات PGRS مي‌باشد. تحقيقات براي نشان دادن ظرفيت PGRS-RFLP براي *مايكوباكتريوم بويس* مشخص كرد كه وقتي از آنزیم *Alu* I براي DNA هضم شده *مايكوباكتريوم بويس* استفاده شود درجه خوبي از افتراق و تمايز گونه­ای و نژادی با موفقيت به دست مي‌آيد(3).

**4-1-18-2-پلی مورفیسم قطعات جدا شده سکانس های مستقیم تکرارشونده[[48]](#footnote-48)(DR-RFLP)**

يك گروه بی نظیر براي گونه‌ها با نژادهاي *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* كمپلكس، گروه و دسته DR مي‌باشد كه شامل تعدادی سکانس 36 جفت باز و بدون فاصله­های تکراری از 35 تا 41 جفت باز در طول آن می­باشد. گونه‌ها و نژادها به دليل حضور و يا عدم حضور DRها و نیز تعداد آنها به ویژه در مناطق فاصله‌گذار متنوع و گوناگون هستند. عملكرد مناطق DRها به طور کامل شناخته نشده، اما ممكن است در اتصال پروتئين­ها نقش داشته باشند(3).

**2-18-2-تكنيك‌هاي ژنومي‌كه اساس و پاية آنها PCR مي‌باشد**

1-2-18-2-اسپوليگوتايپينگ[[49]](#footnote-49)

يکي از روشهاي مولکولي که بر اساس واکنش زنجيره اي پليمراز[[50]](#footnote-50) است به نام اسپوليگوتايپينگ معرفي شد که بيشتر براي جداسازي سويه هاي *مايکو باکتريوم توبر کلوزيس* کمپلکس به کار مي‌رود. اسپوليگوتايپينگ به عنوان روش جايگزين تايپينگ به ويژه براي پي بردن سريع تر نتايج اهميت دارد. همچنين اين روش براي تمايز سويه هاي كمپلكس مايکوباکتريوم و براي مطالعات اپيدميولوژيكي وتمايز رده ها در بين كمپلكس *مايكوباكتريوم توبركلوزيس* شامل: *مايکوباکتريوم آفريکانوم، مايکوباکتريوم توبرکلوزيس، مايکوباکتريوم بويس و مایکوباکتریوم بویس BCG، مايکوباکتريوم ميکروتي، مايکوباکتريوم کانتي، مایکوباکتریوم پنی پدی* استفاده مي‌گردد. اين روش ساده، آسان، تكرارپذير و داراي حساسيت بالا مي‌باشد، همچنین از اين روش مي‌توان براي نمونه هاي كشت منفي استفاده كرد (64). روش اسپوليگوتايپينگ بر اساس پلي مورفيسم لوکوس کروموزومي‌ DR[[51]](#footnote-51)(توالي تکراري مستقيم) مي‌باشد. يک قطعه DR به همراه يک توالي فاصله انداز مجاورش را توالي تکراري متنوع مستقيم يا DVR [[52]](#footnote-52)مي‌نامند. اين لوکوس ابتدا توسط Hermans و همکارانش شناسايي شد (96،67). سپس اولين بار Groenen در سال 1993، روشي بر اساس پلي مورفيسم موجود در مناطق DR در *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* به نام اسپوليگوتايپينگ ابداع کرد که با استفاده از اين روش، سويه هاي *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* را شناسايي کردند.

بدين صورت که وقتي مناطق DR چندين سويه با يکديگر مقايسه شدند، به اين نتيجه رسيدند که ترتيب توالي هاي فاصله انداز تقريبا يکسان است اما حذف و اضافه شدن توالي فاصله انداز و DR نيز ممکن است رخ دهد. در *مايکوباکتريومبوويس*BCG هر کدام از DVR هاي حاوي يک توالي تکراري مستقيم 36 جفت بازي و يک توالي کوتاه غير تکرار شونده با اندازه مشابه 35-41 جفت باز( توالي فاصله انداز) مي‌باشد. 94 توالي فاصله انداز مختلف در بين DRها شناسايي شده است، اما تنها 43 توالي فاصله انداز به صورت معمول مورد استفاده قرار مي‌گيرد. بيشترين دليل براي فقدان توالي هاي فاصله انداز، حذف آنها مي‌باشد که ممکن است در يک يا چند توالي فاصله اندازصورت بگيرد که اين امر در اثر مکانيسم هاي مختلف ژنتيکي از جمله نوترکيبی، همولوگ و جابجايي انجام مي‌شود. تعداد کپي DRدر *مايکوباکتريوم بوويس*49 عدد مي‌باشد .در ساير سويه هاي کمپلکس *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس*، تعداد لوکوس DR به صورت قابل ملاحظه اي متفاوت مي‌باشد. اکثريت سويه هاي *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* حاوي 1 يا تعداد بيشتري توالي IS6110در ناحيه DRخود مي‌باشند.

اين روش بخصوص قادر است سويه هاي کمپلکس *مايکوباکتريوم توبرکلوزيس* را در نمونه هاي کلينيکي رديابي و تيپ بندي کند. اين روش، افتراق بيشتري نسبت به روشهايي مانندIS6110 - RFLPدرسويه هايي كه تعداد نسخه هاي IS6110 آنها كمتر يا مساوي 5 كپي را دارد.پس مي‌توان گفتيک روش برتر براي تيپ بندي سويه هاي *مايکوباکتريوم بوويس*مي‌باشد، زيرا اين سويه ها اغلب حاوي يک يا دو کپي از IS6110مي‌باشد. بر اساس تحقيقات تکاملي انجام شده، سه گروه اصلي از *مايکوباکتريومتوبرکلوزيس* بر پايه پلي مورفيسم مشاهده شده در نوکلئوتيدهاي katG465 و gyrA codon شناسايي شده است. باکتريهاي متعلق به گروه 2و 3 قادر به هيبريداسيون با نوکلئوتيدهاي فاصله انداز 33تا 36 نيستند (82).

**2-2-18-2-پروتئین های شوک حرارتی׃**

متدهاي جديد بر اساس PCR يكي از مهمترين و كاربردي‎ترين، در عين حال ساده‎ترين روش‎هاي مولكولار براي تعيين هويت مايكوباكتريوم‎ها هستند. وجود پلي‎مورفيسم در نواحي خاصي از چندين ژن با توالي محافظت شده جنس مايكوباكتريومي‌مانند ژن كدكننده پروتئين 32 كيلودالتوني، ژن *dnaJ* ، ژن *sod*، ژن *rpo*B ، ژن *hsp*65 وژن (16SrDNA) *rrs،* امكان تعيين هويت سريع و آسان‎تر گونه‏هاي مايكوباكتريومي‌را از همديگر فراهم آورده است. از كاربردي‎ترين توالي‎هاي فوق براي اين مقصود، استفاده از وجود پلي‎مورفيسم در توالي ژن‎هاي *rrs* و *hsp*65 است. پروتئين شوك حرارتي 65 كيلو دالتوني يكي از مهمترين آنتي‎ژن‎هايي است كه در همه گونه‏هاي مايكوباكتريومي‌وجود دارد و ژن مسئوول آن *hsp*65 می باشد که به صورت كامل، تعيين توالي شده است (66).

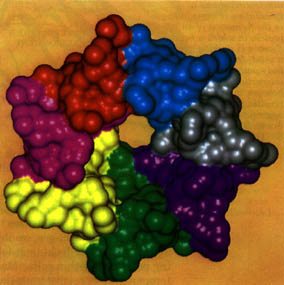
**: (Heat shock protein 65) HSP 65**

پروتئين‌هايي كه تا شدن پروتئين‌هاي ديگر را تسهيل مي‌كنند Chaperoneناميده مي‌شوند. اين واژه اولين بار توسط ران لاسكي (Ron Laskey) و همكاران مطرح شد. آن‌ها اين واژه را براي يك نوع پروتئين (نوكلئوپلاسمين) كه براي تجمع هيستون‌ها و DNA لازم بود به كار بردند. بسياري ازChaprone‌ها به عنوان يك پروتئين شوك حرارتي (Heatsock proteinh) **شناخته سلولهاي آسيب ديده پروتئينهايي توليد مي كنند كه از آنها در مقابل آسيب محافظت  مي كند.** برای شناسایی گونه های مختلف مایکوباکتریوم اولین بار روشی بر مبنای بازهای DNA توسط تالنتیوهمکارانش نشان داده شد که در این روش بخشی از ژن رمز گذاری شده 65 کیلو دالتونی پروتئین شوک حرارتی توسط PCR تکثیر یافت وسپس توسط آنزیم های هضمی تکثیر گردید (104). روش فوق با تجهیزات معمولی PCR وژل آگارز و الکتروفورز در عرض چند ساعت پایان می یابد بسیارراحت است. در طی دهه گذشته شیوع عفونت های فردی وبروز عفونت های NTM و بیماریهای مربوط به آن که به عنوان پاتوژن مهم انسانی به شمار می آید افزایش چشمگیر یافته است. باتوجه به اینکه روش های رایج قدیمی شناسایی مایکوباکتریوم ها به سه تا شش هفته زمان نیاز دارد که احتمال نتایج گمراه کننده آنها زیاد می باشد، اما اخیرا شناسایی گونه های جدید مایکوباکتریومی ونیز مایکوباکتریوم های غیر سلی توسط پروتئین های شوک حرارتی به آسانی انجام می گیرد. پروتئین های شوک حرارتی در سلول ها در شرایط معمولی وجود دارند ولی زمانی که تحت شرایط استرس و در دمای بالا قرار گیرند در سطوح بالا بیان می شوند. پروتئین های شوک حرارتی مسئوول نگهداری پروتئین ها هستند و نقش مهمی در پیچش و دناتوره شدن سلول ها دارند (111).

**يكي از پاسخهاي حمايتي در بيولوژي، ايجاد پروتئين هاي استرس توسط محركهاي آسيب رسان است كه تحت عنوان پروتئين شوك حرارتي(Heat-Shock protein ; HSP) ناميده مي شدند، چرا كه اول بار در لارو مگس ميوه پس از افزايش ملايم حرارت ديده شد، اين مولكولها بظاهر براي بقاء سلول در همه گونه هايي كه در معرض آسيب قرار مي گيرند ضروري هستند. در سلولهاي پستانداران اين مولكولها در پاسخ به بعضي محركهاي پاتولوژيك، سلولها يك سري تغييرات متابوليك، تحت عنوان پاسخ استرس سلول، از خود نشان مي دهند كه يك مكانيسم سلولي اساسي و مهم بوده و سلولها را قادر مي سازد تا در مقابل آسيب هاي محيطي زنده بمانند. سلولهايي كه تحت استرس قرار گرفته اند ژنهائي را كه مسئول كد كردن پروتئين هاي ساختماني نرمال(Housekeeping genes) هستند خاموش مي كنند و بيان ژنهايي كه مسئول كد كردن پروتئين هايي هستند كه داراي عملكرد هاي سازمان دهي سلولي و حفاظت سلولي(Cell Stress genes) مي باشند را در سطح بالائي نشان مي دهند. واژه هاي عمومي ″پروتئين شوك حرارتي″و ″پروتئين استرس سلول ″ مترادف هستند.**

**این پروتئين ها در مقادير كم در سلولهاي نرمال، بيان مي شوند،‌ ولي بدنبال قرار گرفتن در معرض محركهاي آسيب رسان اين مقادير افزايش مي يابد. از نظر تجربي،‌ پروتئين هاي استرس سلول مي توانند در پاسخ به طيف وسيعي از محركها از قبيل گرما، هيپوكسي، ‌فلزات سنگين، تشعشعات و عفونتهاي ويروسي بوجود آيند. پروتئين هاي شوك حرارتي در سلولهاي نرمال، جايي كه در آن نقش مهمي در متابوليسم سلول نرمال بازي مي كنند، وجود دارند.**

پروتئینهای شوک حرارتی به مجموع پروتئین هایی گفته می‌شوند که در شرایط استرسی در سلول بیان می‌گردند. نقش این سلول‌ها جلوگیری از تغییر کونفورماسیون پروتئین‌ها تحت عوامل استرس زا می‌باشند. این پروتئین‌ها در همه سلول‌های زنده در وضعیت متصل یا غیر متصل به پروتئین‌ها وجود دارند. مکان این پروتئین‌ها در هسته و سیتوپلاسم سلول می‌باشد. پروتئین‌های HSPبه عنوان چاپرون‌های مولکولی در فرایندهای متعددی همچون فولدینگ پروتئین ها، تجمع و انتقال آنها، عبور و مرور پپتیدها و پردازش آنتی ژن تحت شرایط فیزیولوژیک و استرسی نقش دارند. بیان پروتئین‌های HSP به واسطه چندین نوع از عوامل استرس زا همچون تب، مصرف الکل، التهاب، استرس‌های اکسیداتیو، تجمع فلزات سنگین و همچنین شرایطی که موجب جراحت و نکروزیس می‌گردد، القاء می‌گردند. پروتئین‌های HSP به جایگاههای هیدروفوبیک روی پلی پپتیدها متصل می‌گردند و سبب بروز تغییرات کونفورماسیونی در آنها می‌گردند و از سوی دیگر سبب جلوگیری از ایجاد پپتید هایی با فولدینگ اشتباه می‌گردند. پروتئین‌های مرتبط با گلوکز (GRPs)مجموعه ثانویه‌ای از پروتئین‌های استرسی می‌باشند که به سادگی تحت شرایط شوک گرمایی یا استرس‌های اکسیداتیو القاء نمی‌شوند، این پروتئین‌ها در شبکه اندوپلاسمیک وجود دارند(111).



تصویر 2-14:ساختار مولکولی hsp65 (109)

**(Heat shock proteindnaj)DNAJ:** این پروتئین های شوک حرارتی از خانواده بزرگی از پروتئین ها مشتق می شوند که در عمل به محافظت از پروتئین ها می پردازد و از تجمع غیر قابل برگشت پروتئین در طول سنتز واسترس سلولی جلوگیری می کنند. چاپرون های مولکولی باکتریایی از خانواده بزرگی از پروتئین ها مشتق شده اند که عملکرد آن محافظت از تغییرات غیرقابل برگشت وسیع پروتئین ها در هنگام سنتز سلولی ودر زمان استرس و شوک های حرارتی می باشد. معمولا دومین J از dna j با پروتئین شوک حرارتی HSP 70 هم واکنش می دهد (45). پروتئین های شوک حرارتی که در این خانواده قرار می گیرند شامل سه دومین می باشند، یکی قطعهN-terminal و یک قطعه مرکزی غنی از سیستئین که شامل چهار موتیف CCGG می باشد و هرکدام از این بخش ها یک بخش اتصال با زینک دارند (76). این پیچش های پروتئینی اتصالات پیچیدهای در ساختار خودشان دارند. دومن C-terminal نیزوجود دارد که تاکنون عملکرد آن شناخته نشده است(تصویر 2-14).

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |

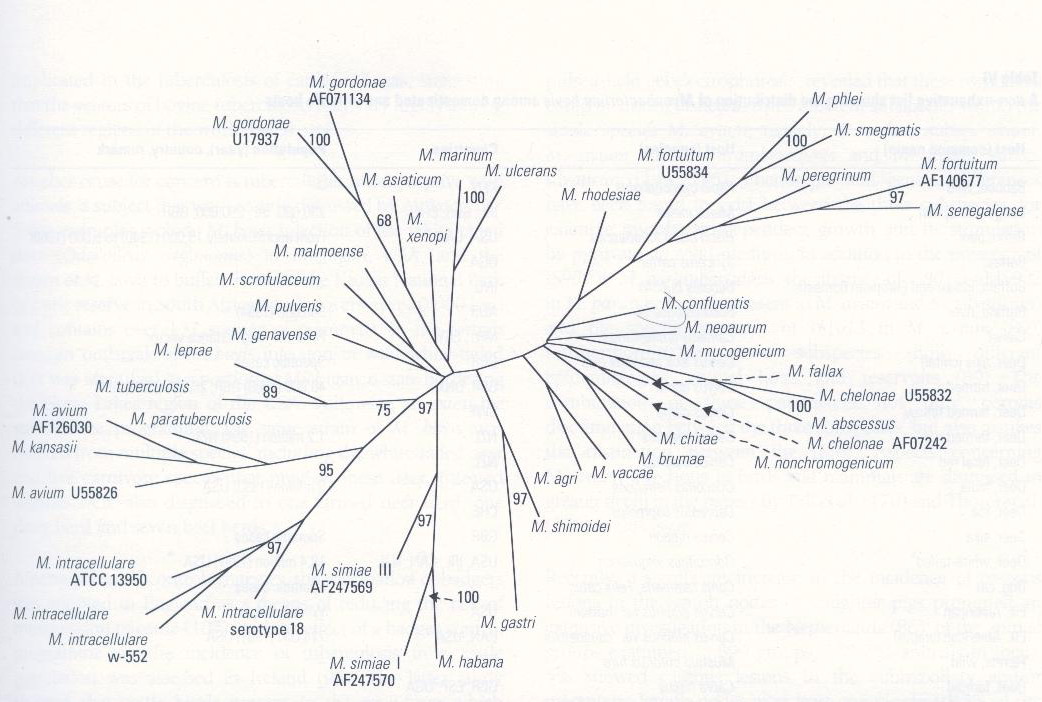
N-terminal Segment of DnaJ systeine rich Domain of Dnaj

**تصویر** 2-15**:دومین های** dna j(80)

در واقع توالی ژنهای دیگر مانند hsp 65، dnaj، sod، gvrB، برای ساختن درخت تکاملی، مورد استفاده قرار می­گیرد. تمام این ژنها می­توانند به عنوان شاخص مولکولی مورد توجه قرار بگیرند و ممکن است که اطلاعات یکسان جالب و ضروری براساس تکامل و تحول مولکولی مایکوباکتریها ارائه دهد. معذالک هنوز برخی از گونه­ها یا خانواده­ها به صورت نامشخصی در شاخه­های درخت تکاملی قرار دارند.

اخیراً ژن hsp 65*مایکوباکتریوم سیمیه* در مقایسه با سکانسهای 39 گونه مایکوباکتریایی گزارش شده، با یکدیگر مقایسه شده­اند و یک درخت تکاملی بر اساس متد اتصال قسمتهای مجاور ساخته شده است (76). اولین بار این درخت تکاملی بر اساس تعیین توالی hsp 65 در هر دو گروه مایکوباکتریوم­های سریع الرشد و کند رشد مورد استفاده قرار گرفت. با در نظر گرفتن یک استثناء برای *مایکوباکتریوم نانکروموژنیکم*[[53]](#footnote-53)، این درخت تکاملی همچنین گونه‌های کند رشد (درسمت چپ) و تند رشد (در سمت راست) را به صورت تفکیک شده از هم، نشان می‌دهد. در میان گونه‌های کند رشد، *مایکوباکتریوم سیمیه*یک، *مایکوباکتریوم هابانا*[[54]](#footnote-54) و *مایکوباکتریوم سیمیه* سه در شاخه‌ای مجزا قرار گرفته­اند و به راحتی از گونه‌های وابسته، مانند *مایکوباکتریوم ایویوم، مایکوباکتریوم اینتراسلولار، مایکوباکتریوم مالموئنس[[55]](#footnote-55)، مایکوباکتریوم آسیاتیکوم*[[56]](#footnote-56)*و مایکوباکتریوم شیموئیدی*[[57]](#footnote-57) قابل تمایز هستند. اگر چه مطالعات طبقه‌بندی عددی، شاخه­های مجزایی را برای گونه‌ها، بر اساس موارد ذکر شده بالا و مطابق تستهای بیوشیمیایی و کشت ایجاد کرده است که به راحتی اجازه تمایز و تعیین هویت گونه‌ها را می‌دهد ولی در آزمایشگاه کلینیکی به دلیل متغیر بودن خصوصیات تستها، ممکن است برخی مواقع ایجاد اشکال نماید. در شکل 2-7، درخت تکاملی همچنین تمایز بین گونه‌های مایکوباکتریوم ایویوم و مایکوباکتریوم ایویوم تحت گونه *پاراتوبرکلوزیس* را از *مایکوباکتریوم اینتراسلولار* نشان می‌دهد، گونه‌هایی که از نظر خصوصیات کلی مشابه، در قدیم به عنوان گروه بزرگ کمپلکس *مایکوباکتریوم ایویوم اینتراسلولار* قرار می‌گرفتند.

**نمودار2-7 : وضعیت اتصال فیلوژنی مایکوباکتریهای تند رشد و کند رشد بر اساس hsp65**



**فصل سوم**

**موادوروش ها**

**1-3-جمع آوری نمونه ها׃**

در این مطالعه که از اردیبهشت ماه 1392الی مرداد ماه1393به طول انجامید،127 نمونه ماهي پرورشی که از 5استخرپرورش ماهی و چندین فروشگاه عرضه کننده ماهی پرورشی درنقاط مختلف استان قزوین انتخاب شده بود مورد بررسی قرار گرفت. این نمونه ها کاملا تصادفي، وبیشتر از جمعیت تلفات انتخاب گردیدندو به شکل تازه و فریز شده به آزمایشگاه رفرانس ملی سل موسسه رازی انتقال یافتندو برروي همه آنها به صورت مجزا و در طول چند مرحله به صورت استريل كالبدگشايي وکشت انجام شد .

**2-3-مراحل كشت:**

الف – صلايه کردن: در شرایط استریل نمونه ماهی مورد مطالعه را داخل یک سینی قرار داده و به وسیله تیغ اسکالپل استریل قسمت احشاء، سر و دم نمونه مورد نظر از هم جدا و با دقت ریز ریز گردید. تمام سرو دم و احشاء نمونه ها ی ریز شده را داخل هاون چینی استریل بصورت جداگانه منتقل شد و به وسیله دسته هاون استریل به طور کامل صلایه(له) گردید.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| C:\Users\Administrator\Desktop\New folder (4)\IMAG0040.jpg | **C:\Users\Administrator\Desktop\New folder (4)\IMAG0036.jpg** | **C:\Users\Administrator\Desktop\New folder (4)\IMAG0055.jpg** |

تصویر 3-1**:**مراحل کشت نمونه های جمع آوری شده

ب – آلودگي زدائي: به هاون حاوی نمونه سرودم وهمچنین هاون حاوی احشاء به مقدار مساوی یا3/2حجم نمونه، سود نرمال اضافه و پس از هموژن کردن20 تا 30 دقيقه در دماي آزمايشگاه بدون هم زدن نگهداري گردید.

ج – خنثي سازي: در شرايط استريل و درزیر هود لامینار بادقت و به آرامي‌ 5 تا 10 سی سی از مايع روئي هاون حاوی سر ودم و نیز ازهاون حاوی احشاء برداشته(به دلیل احتمال آلودگی در دیواره هاون سعی می کنیم برداشت از کناره ها انجام نشود)و به لوله فالكون استریل منتقل شد. سپس معرف صورتی رنگ(1 تا 2 قطره معرف برموتیمول بلو در 5 سی سی اسید کلریدریک نرمال) به آرامی وبه صورت قطره قطره اضافه شد، تا زمانیکه محلول به رنگ كهربايي یا زرد کدرتغيير رنگ دادو pH محلول خنثي گردید .با استفاده از کاغذ pHمتر خنثي بودن محلول ثابت شد(کاغذ pHمتر به رنگ سبز لجنی مشاهده شد).

د – سانتريفوژ کردن: برای جدا کردن احتمالی باكتري از مايع به دست آمده در هاون ها، لوله ها ی فالکون را مدت زمان 20 دقيقه در rpm3000 سانتريفوژ قرار دادیم.

ه – کشت و كنترل محتویات ماهی و قرائت منظم كشت ها**:** بعد از سانتريفوژ کردن محتویات سرو دم واحشاء، مایه رویی درون لوله های فالکون را بیرون ریختیم و رسوب باقیمانده ته هرلوله را در محيطهای كشت اختصاصي (لون اشتاين جانسون گليسرول دار LJG)، (لون اشتاين جانسون پيروات د دار LJP)،(هرولداگ مايكوباكتين دارHM)، (هرولداگ بدون مايكوباكتين H)،کشت دادیم(هرکدام ازمحیط ها 2تا لازم داریم یکی 25 و دیگری 37 درجه سانتی گراد)و نمونه هاي كشت داده شده در محیط های اختصاصی به مدت 2 هفته و بیشتر در 25 درجه سانتي گراد و 37 درجه سانتي گراد انكوبه نمودیم و در مدت زمان7-14 روز ، دائما مورد كنترل و بررسي قرار دادیم.



تصویر3-2:ادامه مراحل کشت ماهیان پرورشی

3-3- بررسي كشت لوله هاي لونشتاين- جانسون (LJ) ومحیط هرولداگ( (H

پس از طی زمان یک هفته از انکوبه کردن نمونه ها، از قسمت سطحی لوله­های کشت لونشتاین- جانسون و هرولداگ کشت داده شده، از هر نمونه دو گسترش تهیه و سپس به روش ذیل نلسون رنگ آمیزی گردید و با میکروسکوپ نوری مشاهده شد. وجود داشتن باسیل های بنفش رنگ که اسیدفست می باشند نشان دهنده پاسخ مثبت بود. وهمچنین با رنگ­آمیزی فلئوروکروم و توسط میکروسکوپ فلورسنت مورد مشاهده قرار داده شدکه در صورت مثبت بودن نمونه، باسیل های اسیدفست به رنگ سبز روشن در زمینه تاریک مشاهده گردیدند.

4-3-تفسیر نتایج گسترش

اگر در سراسرهر یک لام، یک تا دو تا باسیل مشاهده می گردید، آزمایش را مجدد تکرار می نمودیم. و زمانی که باسیل ها با تعداد 9 – 3 عدد در هر لام مشاهده شد، نتیجه (+) اعلام گردید و چنانچه بیشتر از 10 تا باسیل در هر کدام از لام ها مشاهده مي­شد، نتیجه (++) اعلام می گردید. به طور کلی، اگربیشتر از یک باسیل اسید فست در هر شان میکروسکوپی دیده شود، نتیجه (+++) در نظر گرفته می شود.

5-3-کشت مجدد در لوله های لونشتین جانسون (LJ)

از آنجا که برای انجام آزمایشات بعدی به مقدار کافی DNA احتیاج خواهیم داشت، باید تعداد قابل توجهی باسیل اسید فست بدون آلودگی در اختیار داشته باشیم به همین خاطر از كشت اولیه محيط لونشتین جانسون وهرولداگ هر کدام ازنمونه ها، بر روی چندتا محيط كشت استریل لونشتین جانسون کشت مجدد انجام گردید که در مطالعه حاضر روی ده محیط کشت لونشتین جانسون تلقیح صورت گرفت ( شامل 5 محیط لونشتین جانسون گلیسرین دار و 5 محیط لونشتاین جانسون پیروات دار). پرگنه های باکتری به طورآرام و يكنواخت در سطح محيط كشت با حركت ملايم بادقت کشت داده شدندو حدود2-1 هفته در دمای C° 25 در انکوباتورقرار داده شدند. در مطالعه حاضرکشت مجدد به دفعات بیشتر از 900 بار انجام پذیرفت.



تصویر3-5 :باکتری های کشت داده شده در لوله های مجدد

**6-3-وسايل لازم و مواد مورد استفاده**

وسایل، مواد و محیط های کشت اختصاصی که در تحقیق حاضر استفاده شدند به شرح ذیل می باشد.

**مواد و تجهیزات لازمبرای انجام تکنیک های مولکولی:**

وسایل و مواد مورد نیاز جهت استخراج DNA، PCR،RFLP و ساترن بلاتینگ جدایه های مایکو باکتریومی از ماهیان پرورشی در این تحقیق، جدال زیر شرح داده شده است.

**جدول (3-1): ليست مواد مصرفي**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **كشور سازنده** | | **نام شركت** | | **نام مواد** | | **رديف** | |
| آلمان | | سيگما | | آنزيم پروتئيناز K | | 1 | |
| آلمان | | مرك | | آنزيم ليزوزيم | | 2 | |
| آلمان | | رش | | آنزيم Taq DNA Polymerase | | 3 | |
| آلمان | | رش | | MgCl 2 Stock Solution | | 4 | |
| آلمان | | رش | | بافر PCR بدون كلريد منيزيم | | 5 | |
| آلمان | | رش | | كيت نشاندار اليگونوكلئوتيد | | 6 | |
| آلمان | | رش | | Anti Digoxigenin | | 7 | |
| آلمان | | رش | | سوبسترا BCIP[[58]](#footnote-58) | | 8 | |
| آلمان | | رش | | سوبسترا NBT[[59]](#footnote-59) | | 9 | |
| آلمان | | رش | | سايز ماركر DNA | | 10 | |
| آلمان | | رش | | سايز ماركر DNA نشاندار | | 11 | |
| آلمان | | رش | | آنزيم *Pvu* –II | | 12 | |
| آلمان | | رش | | اگارز MP | | 13 | |
| آلمان | | مرك | | پودرSDS | | 14 | |
| آلمان | | رش | | Tris Base | | 15 | |
| آلمان | | رش | | Tris –HCl | | 16 | |
| دانمارك | | تکنولوژی | | پرايمرIS6110 | | 17 | |
| دانمارك | | تکنولوژی | | پرايمرDR | | 18 | |
| آلمان | | رش | | Blocking Reagent | | 19 | |
| آلمان | | رش | | Deoxy Nucleoside Tri Phosphate Set | | 20 | |
| آلمان | | سيگما | | پودر EDTA | | 21 | |
| آلمان | | سيكما | | اسيد بوريك | | 22 | |
| آلمان | | مرك | | مالئيك اسيد | | 23 | |
| آلمان | | مرك | | نمك NACl مولكولار | | 24 | |
| آلمان | | سيگما | | پودر CTAB[[60]](#footnote-60) | | 25 | |
| آلمان | | مرك | | سيترات سديم | | 26 | |
| دانمارك | | تکنولوژی | | پرايمرPGRS | | 27 | |
| المان | | مي‌تسوبيوشي | | كاغذ پرينت ژل داك | | 28 | |
| آلمان | | مرك | | ايزواميل الكل مولكولار | | 29 | |
| آلمان | | مرك | | كلروفرم مولكولار | | 30 | |
| آلمان | | رش | | بافر هيبريداسيون | | 31 | |
| آلمان | | رش | | Dig Wash and Block Buffer Set | | 32 | |
| آلمان | | رش | | Hybridization Buffer | | 33 | |
| آلمان | | رش | | كاغذ نايلون ممبرن مولكولار | | 34 | |
| امريكا | | BBL | | غنی کننده او – ای – دی – سی[[61]](#footnote-61) | | 35 | |
| امريكا | | BBL | | پنتا[[62]](#footnote-62) | | 36 | |
|  | | دکونکس | | محلول دکونکس[[63]](#footnote-63) | | 37 | |
|  | |  | |  | | 38 | |

**جدول)3 -2:( تجهیزات مورد نیاز در تکنیک های مولکولی**

|  |
| --- |
| هود ایمنی میکروبیولوژی **مدل SDS-156 شرکت بعثت ساخت ایران** |
| سانتریفوژ مدل 16-2، شرکت سیگما[[64]](#footnote-64)، آلمان |
| میکروسکوپ فلورسنت مدل PP-15، شرکت سارتوریوس[[65]](#footnote-65)، ساخت آلمان |
| سانتریفوژ شرکت سیگما، ساخت آلمان |
| ورتکس مدل TTS-2، شرکت یلو لاین[[66]](#footnote-66) ، ساخت آمریکا |
| میکسر مدل HBT-2-133، شرکت اپندورف، ساخت آلمان |
| ترموسایکلر مدل HLN2-GMBH، شرکت اپندورف[[67]](#footnote-67)، ساخت آلمان |
| بن ماری شرکت ممرت[[68]](#footnote-68)، ساخت آمریکا |
| PCR Work Station شرکت کیاژن[[69]](#footnote-69)، ساخت ایران |
| ژل الکتروفورز شرکت بیو رد[[70]](#footnote-70)، ساخت آمریکا |
| منبع تغذیه مدل EPS-600، شرکت پایا پژوهش، ساخت ایران |
| ترانس لومیناتور UV شرکت بیو رد، ساخت آمریکا |
| تصویر برداری با نرمافزارژل پرو شرکت بیورد، ساخت آمریکا |
| هات پلیت و استریر مدل HCR2، شرکت گرهارت[[71]](#footnote-71)، ساخت آلمان |
| فور برای تثبیت DNA روی غشاء شرکت ممرت آمریکا |
| آون هیبریداسیون مدل Shaken Stack شرکت ترمو هیبید[[72]](#footnote-72)، ساخت انگلستان |
| سینی شیکر دار شرکت جی-اف- ال[[73]](#footnote-73) ، ساخت آلمان |
| صفحه متحرک شرکت تی-تی-ال[[74]](#footnote-74)، ساخت آلمان |
| نانودراپ با دستگاه کامپیوتر برنامه ریزی شده، شرکت نانودراپ، ساخت آمریکا |

7-3-محيط های اختصاصی کشت مصرفی

برای جداسازی اولیه باکتری های تحت بررسی و نیز کشت مجدد آنهامحیط کشت های اختصاصی لونشتاین- جانسون، هرولداگ مورد استفاده قرار گرفتند که این محیط ها به ترتیب زیر شرح داده شده است.

الف- لون اشتاین- جانسون[[75]](#footnote-75) گلیسرین دار و پیروات دار

محيط کشت های مذکور از موادی که جدول) 3-3( آمده است تهيه گردید.

جدول (3-3): مواد تشکیل دهنده محیط کشت لون اشتاین- جانسون

|  |  |
| --- | --- |
| مواد موردمصرف | مقدار |
| **فسفات دي هيدروژن پتاسيم** | 4/2 گرم |
| سولفات منيزيم | 24/0 گرم |
| سيترات منيزيم | 6/0 گرم |
| آسپاراژين | 6/3 گرم |
| آب مقطر | 600 میلی لیتر |
| تخم مرغ | 20 عدد |
| گليسيرين (لوناشتاین گلیسیرین دار) | 12 میلی لیتر |
| پيروات سديم(لون اشتاين جانسون پيروات دار) | 6/10 گرم |
| مالاشيت گرين 5 درصد | 8 میلی لیتر |
| نشاسته سيب زميني | 30 گرم |

روش تهيه:

مواد ذکر شده در جدول رابا دقت با هم مخلوط کرده و سپس در دماي 121درجه سانتيگراد 20 دقيقه اتوکلاو گردید. در مرحله بعد این مخلوط به مقدار معین داخل لوله هاي در پيچ دار (هر لوله حدود7 میلی لیتر) تقسیم گردید و سپس لوله ها در دستگاه فور با دمای 85 درجه سانتیگراد به مدت زمان یک ساعت به صورت مورب قرار دادیم تا اینکه کمی از آب محیط در حال ساخت تبخیر شده ودر نهایت محیط به حالت جامد در آید.

ب- هرولداگ[[76]](#footnote-76)مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین

**جدول (3-4) : مواد تشکیل دهنده 1 لیتر محیط کشت هرولداگ**

|  |  |
| --- | --- |
| مواد مصرفی | مقدار |
| پپتون | 9 گرم |
| سدیم کلراید | 4/5 گرم |
| عصاره گوشت | 7/2 گرم |
| گلیسرول | 27 میلی لیتر |
| پیروات سدیم | 1/4 گرم |
| آگار | 3/15 گرم |
| مایکو باکتین | 2 میلی گرم |
| آب مقطر | 870 میلی لیتر |
| زرده تخم مرغ | 6 عدد(120 میلی لیتر) |
| محلول ما لاشیت گرین (2 در صد) | 1/5 گرم |

**روش تهیه :**

6ماده اول نامبرده درجدول)پپتون،سدیم کلراید،عصاره گوشت،گلیسرول، پیروات سدیم، آگار ) را به آب مقطر افزوده و توسط حرارت حل می نماییم.pH محیط باید در 2/7 تنظیم شود. برای تهیه محیط کشت هرولداگ مایکوباکتین دار، باید مایکو باکتینیکه در4 میلی لیتر اتانول حل شده است، افزوده شود. محلول تهیه شده رابه مدت 25 دقیقه در دمای 121 درجه سانتیگراد اتوکلاونمودیم. پس از سرد شدن محلول هنگامی که دمای آن تا 56 درجه سانتیگراد کاهش پیدا کرد، مالاشیت گرین استریل شده و همچنین6 عدد زرده تخم مرغ را اضافه شد و آرام آرام با محیط مخلوط گردید. و در آخر در لوله های درپیچ دار تقسیم شد.

لازم به ذکر است که تخم مرغ های مورد استفاده در محیط حتما باید تازه باشند و از مرغ هایی که آنتی بیوتیک دریافت نکرده اند گرفته شوند. این تخم مرغ ها در محلول آب و دترجنت، خوب با برس شسته شدند و به مدت 30 دقیقه در الکل- اتانل 70 درصد ضدعفونی شدند. و سپس با حوله های استریل خشک گردیدند، و در نهایت جهت جدا نمودن سفیده و زرده سوراخی به اندازه 110میلی متر به وسیله انبر استریل درتخم مرغ ها ایجاد گردید.

8-3-تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم ها با استفاده از تکنیک PCR

برای تعیین هویت مولکولی جدایه ها در مطالعه حاضرتکنیک PCR مورد استفاده قرار گرفت.در این تکنیک چند جفت پرایمر با انواع مختلف که در جدول(3-5) ذکر شده است،استفاده گردید.

**جدول(3-5 ):پرایمرهای استفاده شده جهت تعیین هویت مایکوباکتریوم های جدا شده از ماهيانپرورشی**

|  |  |
| --- | --- |
| Nucleotide sequence | LOCUS |
| F: 5'(ACGGTG GGTACTAGG TGTGGG TTTC) 3' | 16S rRNA |
| R: 5'( TCTGCGATTACTAGCGACTCCGACTTCA) 3' |
| INS-F 5’(CGTGAGGGCATCGAGGTGGC) 3’ | IS6110 |
| INS-R5’ (GCGTAGGCGTCG GTGACAAA) 3’ |
| F: 5' (GCCAAGAAGACCGAYGACGT)3' | HSP65 |
| R: 5' (GGTGATGACGCCCTCGTTGT)3' |
| F: 5' (GCTGGATCACCTCCTTCT)3' | ITS |
| R: 5' (CTGGTGCCAAGGCATCCA)3' |

**غلظت موادلازم جهت انجام یک واکنش** PCR **با حجم 25 میکرولیتر محاسبه گردید و در جدول(3-6)آورده شد.**

جدول(3-6):غلظت مواد لازم جهت انجام واکنش **PCR**با استفاده از جفت پرایمر**16S rRNAوIS6110**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| مواد | | غلظت |
| بافر 10x PCR | | 5/2 میکرولیتر |
| محلول MgCl2 | | 1 میکرولیتر |
| مخلوط Dntp(هر dNTP ؛ 5/2 میلی مول) | | 5/0 میکرولیتر |
| پرایمرجلو برنده(50 نانوگرم در میکرولیتر) | | 4/0 میکرولیتر |
| پرایمر پس ران(50 نانوگرم در میکرولیتر) | | 4/0 میکرولیتر |
| اب مقطر استریل | | 17 میکرولیتر |
| Taq DNA پلیمراز | | 125/0 میکرولیتر |
| DNA | 3 میکرولیتر | |

جدول(3-7): برنامه زمان ، دما و چرخه ترموسایکلر(دستگاه جهت**(PCR** با استفاده از جفت پرایمر**16S rRNAو6110IS**(62)

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| PCR مراحل | دما | زمان | تعداد سیکل |
| دناتوراسیون اولیه | 94 درجه سانتیگراد | 5 دقیقه | یک سیکل |
| دناتوراسیون | 94 درجه سانتیگراد | 1 دقیقه | 25 سیکل |
| آنیلینگ | 60 درجه سانتیگراد | 1 دقیقه |
| بسط زنجیره | 72 درجه سانتیگراد | 1 دقیقه |
| بسط نهائی | 72 درجه سانتیگراد | 10 دقیقه | یک سیکل |

جدول(3-8): غلظت مواد مورد نیاز برای انجام یک واکنش PCR با حجم 16 میکرولیتر جفت پرایمر PGP3/PGP4 ( پرایمر اختصاصی *مایکوباکتریوم مارینوم* )

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| مواد | | غلظت |
| بافر 10x PCR | | 5/2 میکرولیتر |
| محلول MgCl2 | | 1میکرولیتر |
| مخلوط dNTP | | 5/0 میکرولیتر |
| پرایمرجلو برنده(50 نانوگرم در میکرولیتر) | | 1میکرولیتر |
| پرایمر پس ران(50 نانوگرم در میکرولیتر) | | 1میکرولیتر |
| آب مقطر استریل | | 3میکرولیتر |
| Taq DNAپلیمراز | | میکرولیتر |
| DNA | 3 میکرولیتر | |

جدول(3-9): برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر با استفاده از جفت پرایمر PGP3 /PGP4

(پرایمر اختصاصی *مایکوباکتریوم مارینوم*(

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| PCR مراحل | دما | زمان | تعداد سیکل |
| دناتوراسیون اولیه | 94 درجه سانتیگراد | 5 دقیقه | یک سیکل |
| دناتوراسیون | 94 درجه سانتیگراد | 45 ثانیه | 30سیکل |
| آنیلینگ | 64 درجه سانتیگراد | 45 ثانیه |
| بسط زنجیره | 72 درجه سانتیگراد | 45 ثانیه |
| بسط نهائی | 72 درجه سانتیگراد | 7دقیقه | یک سیکل |

الکتروفورز محصول PCR این جفت پرایمر، بروی ژل باندی به اندازه 764جفت بازی را نشان می دهد.

**9-3-پرایمر های ژنHSP65** :

الکتروفورز برروی ژل محصولPCRاین جفت پرایمر، باندی به اندازه 294 جفت بازی را نشان میدهد. غلظت مواد و برنامه PCR بکار رفته، در جدول زیر آمده است :

**جدول3-10:غلظت مواد لازمجهت انجام یک واکنش PCR با حجم 25 میکرولیتر**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| ***مواد*** | | ***غلظت*** |
| بافر 10x PCR | | 5/2 میکرولیتر |
| محلول MgCl2 | | 1 میکرولیتر |
| مخلوط dNTP  Mm )10( | | 1میکرولیتر |
| پرایمرجلو برنده (10 pmol) | | 1 ميكروليتر |
| پرایمر پس ران(10 pmol) | | 1 ميكروليتر |
| آب مقطر استریل | | 17 میکرولیتر |
| Taq DNA پلیمراز | | 5/0 ميکروليتر |
| DNA | 2 میکرولیتر | |

**جدول3-11: برنامه دما، زمان و چرخه ترموسایکلر**(دستگاه جهت**(PCR با استفاده از جفت پرایمر** ژن **HSP65**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **زمان** | **دما** | **مرحله** |
| 2دقیقه | 94 | دناتوراسیون اولیه |
| 30 ثانیه | 94 | دناتوراسیون |
| 30ثانیه | 62 | آنیلینگ |
| 1دقیقه | 72 | بسط زنجیره |
| - | 40 | سیکل |
| 6دقیقه | 72 | بسط نهائی |
| - | 4 | نگهداری |

**10-3-مراحل روش تحقيق ׃**

1**-**جمع آوری نمونه های ماهیان پرورشی از 5 استخر پرورش ماهی مختلف و فروشگاه های عرضه کننده مختلف ماهی در استان قزوین

2-کشت نمونه ها روی محیط های جامد اختصاصی لونشتاین جانسون( گلیسرول دار و پیروات دار)، ومحیط هرولداگ( مایکوباکتین دار و بدون مایکوباکتین )

3-کنترل لوله های کشت و تهیه گسترش از کلنی های رشد یافته و رنگ آمیزی توسط روش فلئوروکروم و ذیل نلسن

4-کشت مجدد در لونشتاین جانسون و هرولداگ

5-استخراج DNA

6-ارزیابی کمیت وکیفیت DNA استخراج شده با استفاده از دستگاه نانودراپ

7-PCR روی نمونه های DNA استخراج شده و تائید مایکوباکتریوم بودن نمونه ها

8- چندین نوبت PCR مجدد برای تعیین هویت مولکولی مایکوباکتریوم ها

9-هضم آنزیمی DNA (RFLP)

10-الکتروفورز قطعات برش خورده

11-ساترن بلاتینگ(انتقال DNA از ژل به غشاء نایلونی یا ممبران با شارژ مثبت)

12-تثبیت DNA بر روی غشا

13–تهیه پروب های هیبریداسیون

14- پری هیبریداسیون، هیبریداسیون با پروب نشاندار دیگوکسی ژنین و شناسایی

15-خالص سازی محصول PCR برای تعیین توالی نوکلئوتیدی

16-ارسال نمونه های تخلیص شده به شرکت ماکروژن کشور کره برای خوانش نوکلئوتید ها

17- Alignment توالی های نوکلئوتیدها با استفاده از برنامه نرم افزاری

**نرم افزار های مورد استفاده برای تعیین توالی نوکلئوتید ها׃**

1-Chromas 2-Clustal x 3-Clustalw 4-Gene Runner 5 –Blast.N

**11-3-استخراج DNA**

**بررسی و جمع آوري باكتري های رشد يافته**

بعد از انكوبه کردن لوله­هاي دارای كشت باكتري، آنها را در فاصله زمانی 24-72 ساعت از لحاظ احتمال آلودگي با ساير میکروارگانیسم هاکنترل کردیم و سپس هفته­اي يكبار تا 2هفته بررسی می کنیم. تقریبا2الی 4هفته پس از انكوبه کردن، مشاهده شد که پرگنه ها به اندازه كافي رشد كردند. در مرحله بعدی در شرایط استریل و زیر هود لامینارتوسط آنس پلاستيكي استريل از قسمت سطحی محيط كشت مورد نظر به اندازه یک لوپ کامل از پرگنه باسیل برداشته شد و با دقت درون يك میکروتیوب حاوي 400 میکرولیتر بافر [[77]](#footnote-77)TE منتقل گردید وچندبار آنس را درون میکروتیوپ چرخانده تامحتویات متصل به آنس کاملا درون آن تخلیه گردد. برای جلوگيري از آلودگي احتمالی درب و سطح خارجي لوله­ها، بایدموارد ايمني به طور کامل رعايت گردد. سپس میکروتیوپ حاوی سوسپانسيون به دست آمده را مدت زمان 30 دقيقه در درجه حرارت C° 80 در فور قرار دادیم تاسلول­های باکتری غیر فعال گردد. بعد ازاین مرحله اگر بخواهیم ادامه مراحل استخراج را روز دیگری انجام دهیم میتوانیم سلولهای باکتری را برای مدت کوتاهی در یخچال و طولانی در دمای C° 20- نگهداری نماییم.

**12-3-مراحل استخراج DNA**

دستورالعملی که در این تحقیق برای استخراج DNA مورد استفاده قرار گرفت پروتکلی است که به وسیله ون سولینگن و همکاران او در سال 1997 طرح ریزی شد و مورد توصیه سازمان بهداشت جهانی جهت استخراج DNA مایکوباکتریوم ها قرار گرفت(110). دراین تحقیق نیزهمه نمونه­ها باهمین پروتکل استخراج گردیدند.

مراحل استخراج DNA به ترتیب:

1- به هر کدام از میکروتیوب­های محتوی سلولهای کشته شده باکتری وTE، لیزوزیم 10 mg/mlبه میزان 50 میکرولیتر افزوده و ورتکس گردید، سپس یک ساعت و ترجیحا یک شبانه روز در Cº 37 درون انکوباتور شیکر­دار(ترمومیکسر)قرار دادیم.

2- 75 میکرولیتر مخلوط پروتئین از K و SDS 10% [[78]](#footnote-78) به هر میکروتیوب افزوده و خیلی کوتاه ورتکس می نماییم و 10 دقیقه در Cº 65 انکوباسیون شد. در دو مرحله قبل با استفاده از آنزيمهاي ليزوزيم، پروتئيناز K و SDSپيكره باكتري­ها متلاشی گردید وDNA آن رهاشد.

3- به میکروتیوب­ها 100 میکرولیتر NaCl 5 مولار افزوده گردید.

4- به هر میکروتیوب 100 میکرولیتر محلول[[79]](#footnote-79)CTAB/NaCl که قبلا در فور Cº­65 به مدت 15 دقیقه قرار داده شده بود (تا سیال گردد)، افزوده گردید و پس ورتکس کردن محلول سفید شیری رنگ مشاهده شدپس از آن به مدت 10 دقیقه در انکوباتور Cº 65 قرار گرفت.

CTAB برای جداسازی بقایای سلولی و دناتوره شدن پروتئینها و همچنین برای ترکیب شدن پلی­ساکاریدها با CTAB در محلول حاوی اسید نوکلئیک استفاده می­گردد.

5- حدود 750 میکرولیتر ایزوآمیل الکل– کلروفرم (نسبت 1 به 24) به هر میکروتیوب افزوده و حداقل به مدت 10 ثانیه ورتکس شده و در دمای اتاق به مدت 5 دقیقه در g 12000 سانتریفیوژ گردید.

ترکیبات ذکر شده باعث جداسازی ترکیب CTAB- پروتئین/پلی­ساکارید می­گردد و سه فاز آبی می شود. به این تربیت لایه حاوی DNA در بالا، تركيبات آلي در فاز پائینی و فاز پروتئينی به صورت يك لايه سفيد رنگ در حد واسط فاز آبي و فاز پائینی بوجود می­آورد. به علت عوارض و بیماریزای فنل، در روش­های جدید استخراج DNA از فنل استفاده نمی­شود (110).

6- با دقت و با کمک سمپلر200 به تدریج و به آهستگی فاز آبي را كه حاوي DNA بود و در قسمت فوقاني دو فاز ديگر قرار داشت (در هر بار حدود 180 میکرولیتر)، برداشته و به یک میکروتیوب دیگر منتقل گردید. در حين انتقال ممكن بود مقداري پروتئين به همراه محلول حاوي DNA وارد میکروتیوب شود كه برای تخلیص بیشتر DNA مراحل 5 و 6 مجدداً تكرار شد. نکته­ای که از این مرحله به بعد باید رعایت می­گردید این بود که به علت بزرگ و شکننده بودن DNA ژنومی نمونه­های استخراج شده، بعد از لیز سلول­ها، میکروتیوب­ها به آرامی تکان داده می­شد و از ورتکس شدید استفاده اجتناب می گردید.

7- حدود450 میکرولیتر ایزوپروپانول به فاز آبی حاوی اسید نوکلئیک اضافه و به مدت 30 دقیقه در Cº 20- نگهداری گردید.

8- میکروتیوبهای حاوی DNA به مدت 15 دقیقه در دمای اتاق در g 12000 سانتریفیوژ و مایع رویی تا حد امکان دور ریخته شد و حدود 20 میکرولیتر مایع در انتهای لوله برروی رسوب باقی ماند.

9- مقدار 1 میلی­لیتر اتانول 70% سرد اضافه و میکروتیوب­ها چند بار سروته گردید.

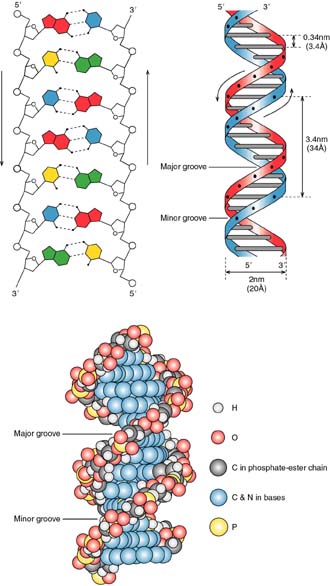
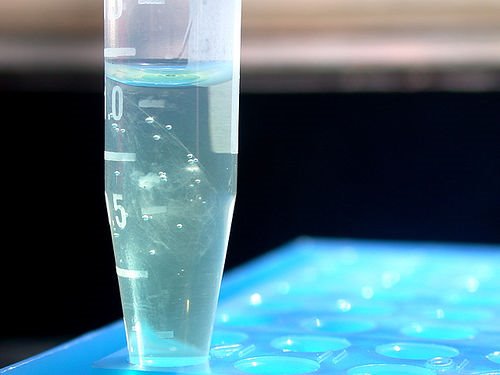
10- محلول فوق 5 دقیقه در دمای اتاق سانتریفیوژ و سپس مایع رویی دور ریخته شده و حدود 20 میکرولیتر مایع بالای رسوب باقی ماند.

11- میکروتیوبها به مدت 1 دقیقه مجدداً سانتریفیوژ ­شده و با استفاده از سمپلر 20 با احتیاط آخرین 20 میکرولیتر بالای رسوب دور ریخته شد تا اطمینان حاصل ­شود که تمام اتانول خارج شده است. طی مراحل 7 الی 11 املاح اضافی نیز حذف گردید.

12- میکروتیوب حاوی رسوب DNA در دمای اتاق به مدت چندساعت قرار گرفت تا خشک شود(ترجیحا یک شبانه روز).

13- مجدد روی رسوب DNA، 20 میکرولیتر بافر1xTE، ریخته شد تا کاملا حل شود. DNA استخراچ شده برای بررسی اولیه به وسیله الکتروفورز و تخمین میزان DNA در دمای Cº 4 نگهداریشد و پس از آن در دمای Cº 20- ذخیره گردید.

14- برای بررسی اولیه DNA حاصل شده، فورا الکتروفورز انجام پذیرفت تا با مشاهده یک باند مشخص و واضح، وجودDNA و عدم شکستگی در آن اثبات گردد. در مرحله بعدی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر نانودراپ میزان و خلوصDNA به طور دقیق مشخصگردید.



تصویر3-7 :رشته های DNAدر میکروتیوپ

**13-3-ملاحظات ضروری در زمان استخراج DNA**

1- غلظت پایین نمک (حدودا پائین­تر از 5/0 مولار) موجب ترسیب مخلوط CTAB و اسید نوکلئیک در دمای اتاق می­گردد، به همین علت مرحله ششم بسیار مهم می­باشد.

2- استفاده از CTAB برای جدا سازی بقایای سلولی، دناتوره شدن پروتئینها و ترکیب پلی ساکارید­­ها با CTAB در محلول حاوی اسید نوکلئیک می­باشد.

3- کلروفرم/ ایزوآمیل الکل سبب جدا سازی ترکیب CTAB– پروتئین/ پلی­ساکارید می­گردد و در این مرحله بعد از سانتریفوژ، باید لایه سفید رنگ مشاهده گردد.

4- با استفاده از سمپلر 200 میکرولیتری انتقال به حجم 180 میکرولیتری، به علت دقت بیشتر آن در مقایسه با سمپلر 1000 می­باشد.

5 از آنجا که غلظت نمک قبلاً به حد کافی رسیده است، دیگر نیازی به افزودن نمک نمی باشد.

6- چنانچه در زمان ترسیب اسید نوکلئیک، رسوب DNAمشاهده نشد، در مرحله آخر به رسوب حاوی DNA مقدار کمتری از 20 میکرولیتر بافر TEمی افزاییم و در صورتیکه اگر مقدار DNAدیده شده زیاد بود، آنرا با مقدار بیشتری TE مخلوط می نماییم.

7-از آنجاکهDNAی موجود دارای وزن مولکولی بالا می­باشد، ممکنست تهیه محلول نهائی DNAوقت گیر باشد (تا یک ساعت).

**14-3-شرايط نگهداري DNA**

جهت نگهداري طولاني مدت DNA از فريزر Cº20- استفاده گردید. در صورت لزوم می­توان برای نگهداري دراز مدت DNA، آن را در اتانول مطلق يا ايزوپروپانول در فريزر Cº20- نگهداري نمود (در تحقیق حاضر استفاده نگردید).

- ارزيابي كيفيت و کمیت DNA استخراج شده

- ارزيابي كيفيت DNA استخراج شده

كيفيت DNAحاصل با روش فوق اغلب جهت آزمايش PCR و RFLP مطلوب می باشد. در بعضی موارد طی روند استخراج، DNA ممکن است با ناخالصي­هائي داشته باشد كه که باعث اختلال در روشهاي مولكولي گردیده و دراين آزمايشها مشكلاتی را به وجود آورد. همچنین ممکن است در DNAحاصل شده شکستگی به وجود آمده باشد. باتوجه به اندازه بزرگDNA ژنومي و همچنینبی دقتی در طی روند استخراج مي­تواند باعث شکستگی DNA و ظهوراسمير بلندي در روي ژل گردد.DNA مطلوب و مناسب باندی واضح و مشخص(شارپ)، كمي‌پایين­تر از چاهك در روي ژل ایجاد می نماید. البته بررسي کمیت DNA با اين روش نياز به تجربه كافي دارد. بنابراین جهت مشاهده خلوص و عدم شکستگی در DNA استخراج شده، کیفیت تمام نمونه­های موردنظر با استفاده از الکتروفورز بر روی ژل آگارز بررسی گردید.

آگارز از یک نوع جلبک دریائی استخراج می­شود ، یک پلیمر خطی د- گالاکتوز و 3 و 6- آن هیدروز ال- گالاکتوز است. برای تهیه ژل آگارز ابتدا آن را ذوب کرده و سپس داخل یک قالب(کست)ریخته و اجازه میدهیم ژل در دمای اتاق سرد شده وبه اصطلاح ببندد. دانسیته آن بستگی به غلظت آگارز دارد و به محض بستن ژل، آگارز شکل قالب را به خود می­گیرد. وقتیکه یک جریان الکتریکی در سرتاسر ژل برقرار می­شود، در pH خنثی DNA که دارای بار منفی است به طرف قطب آند (مثبت) مهاجرت می­کند. سرعت مهاجرت به عوامل گوناکونی بستگی دارد ازجمله: سایز مولکولی DNA، غلظت آگارز و شکل و ترکیب DNA .

حین از انجام کار با اتیدیوم بروماید و ترانس لومیناتور باید به نکته توجه می­شد که اتیدیوم بروماید جهش­زا ی قوی می باشدو به همین دلیل در همه موارد کار با آن از دستکش و همچنین جهت مصونیت از اثرات مضر اشعه فرابنفش بر چشم، هنگام کار با آن از نقاب روکش صورت استفاده شد و جهت اجتناب از شوک الکتریکی، درپوش دستگاه ژل الکتروفورز، همیشه گذاشته شد.

در مطالعه حاضر كيفيت DNA با روش الكتروفورز در ژل آگارز ارزیابی شد، که به ترتیب زير انجام گردید.

1- انتقال مقدار1 گرم آگارز با درجه مولكولار بيولوژي وزن و داخل ارلن 250 ميلي­ليتري انجام شد.

2- روي آگارز منتقل شده در ارلن 100 ميلي ليتر TBE ريخته و بر روي حرارت شعله قرار گرفت تا اگارز كاملاً حل شده و كاملاً شفاف گردد. (درحین حل شدن باید درب ارلن توسط فویل جهت جلوگیری از الودگی محیط کاملا پوشیده شود).

3- سپس محلول فوق را از روي شعله برداشته و در فضاي آزمايشگاه قرار دادیم تا خنک شود و دماي آن به Cº 60-50 برسد.

4- مقدار 20 ميكروليتر اتيديوم برومايد رقيق شده (5/0 ميكروگرم در ميلي­ليتر) به محلول آگارز اضافه شد، به طوریکه رنگ آن تغییر کرده وبه رنگ پوست پيازي درآید.

5-با دقت توسط چسب نواري كاغذي دو سمت باز سيني مخصوص تانك الكتروفورز مسدود گردید.

6-قبل از ريختن آگارز در سيني، شانه ژل با تعداد چاهك موردنظر در درون محفظه ژل قرار داده شد. هنگام قرار دادن شانه، فاصله مناسب شانه از طرفين و پائين، سینی ژل رعايت گردید.

7-. آگارز در حرارت Cº60-50 به آرامي‌درون محفظه ژل ريخته شد. باید به دمای مناسب برای ریختن آگارز توجه نمودچنانچه دماي آن بالا بود باعث باز شدن چسب­ها و نشت آگارز می گردید و اگر دماي ژل آگارز پائين باشد باعث غير يكنواختی در هنگام بستن ژل مي­گردید

8- پس از بستن ژل، شانه ‌و با دقت و آرام از درون ژل خارج گردید. (خارج کردن شانه باید طوری انجام شود که سبب بريدگي ژل و به هم ریختگی چاهك­ها، نگردد).

9- جهت برقراری جريان برق هنگام قرار گرفتن ژل در تانك الكترفورز، نوار چسب انتهاي سيني آرامي جدا گردید.

10- سيني حاوی ژل آگارز درون تانك الكترفورز به طوری قرار داده شد که جهت چاهك ژل در طرف كاتد (الكترود منفي یا سياه) تانك الكترفورز قرار میگرفت.

11- درون تانك الكترفورز بافر [[80]](#footnote-80)TBE ريخته شد. لازم به ذکر است که همواره غلظت و نوع بافر مورد استفاده در تهيه ژل و تانك الكترفورز يكسان بود. (اگردرب تانک روی آن قرار نگرفته بود ومقداری ازTBEدرون تانک تبخیر شده بود مقداری از این محلول به تانک افزوده گردید).

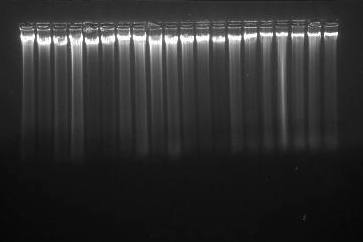
12- مقدار 25 ميكروليتر از مخلوط DNA و بافر نمونه[[81]](#footnote-81) به آرامي‌درون چاهك­های ژل ريخته شد (نسبت DNA به بافر نمونه 1 به 5 بود).

13- درب تانك الكترفورز گذاشته و تانك الكترفورز به منبع الكتريكي متصل و دستگاه با ولتاژ 85 روشن شد.

14- پس از گذشت زمان كافي (تقريباً 5/0-1 ساعت) كه رنگ بروموفنل بلو نزديك به انتهاي ژل رسيد، دستگاه الكترفورز خاموش شد.

15- به آرامي‌ژل را از سيني تانك الكترفورز جدا و بر روي دستگاه ترانس لوميناتور قرار داده و DNA را از نظر ميزان و كيفيت، بررسي نمودیم.

16- در صورت مناسب بودن كيفيت DNA از ژل عكس برداری و مشخصات آن در كامپيوتر ثبت و ذخیره شد. مي­توان از سايز ماركر مناسب جهت تخمين ميزان DNA استفاده نمود و با توجه به الگوي نمونه­هاي استاندارد DNA مایکوباکتریوم، غلظت تقریبی DNA را تخمين زد. در این تحقیق به دلیل موجود بودن دستگاه نانودراپ و تعیین بسیار دقیق غلظت DNA از تخمین آن به این روش صرف نظر گردید. در تصویر(3-8) ، DNA استخراج شده از چند نمونه را نشان می دهد.



تصویر(3-8): DNA مناسب بر روي ژل به صورت یک باند واضح و كمي‌پایين­تر از چاهك مشاهده شد (چاهك شماره 1 تا 8 نمونه ماهی موردنظر)

**15-3-اندازه گیری کمیت DNA استخراج شده جهت *انجام تکنیک* PCR*وهضم آنزیمی*(RFLP)**

*قبل از انجام* PCR*و* **RFLP***ارزیابی غلظت* DNA *استخراج شده لازم و ضروری می باشد. معمولا غلظت هر* نمونه DNA *به سه روش متفاوت که در زیر شرح داده شده است ،تخمین زده می شود :*

*1- به روش رنگ آمیزی* DNA*با اتیدیوم بروماید پس از انجام الکتروفورزی کوتاه بر روی ژل آگارز*

*2-با استفاده از اسپکتروفوتومتر معمولی (در تحقیق حاضر استفاده نگردید).*

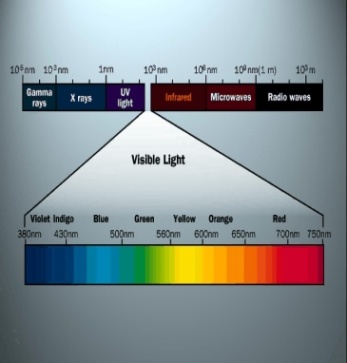
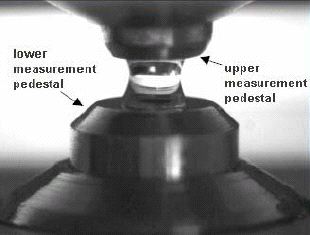
*3- با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ (در تحقیق حاضر از این روش و دستگاه استفاده گردید).*

***1-15-3-ارزیابی غلظت*DNA*با استفاده از رنگ آمیزی* DNA*با اتیدیوم بروماید***

*این روش مشابه تعیین کیفیت* DNA*استخراج شده می­باشد که شرح آن درمطالب فوق ارائه شد.*

***2-15-3-ارزیابی غلظت* DNA *با استفاده از اسپکتروفوتومتر نانودراپ***

*دستگاه نانودراپ از یک بدنه و دو بازو تشکیل شده است. روی هر کدام از بازوهای دستگاه محلی جهت قرار گرفتن مایع، برای اندازه گیری قراردارد. یکی از بازوها روی بدنه آن ثابت و دیگری حول محوری حدود 90 درجه قابلیت جابجائی و حرکت دارد که به وسیله یک فیبر نوری به بدنه متصل شده است. این دستگاه بر اساس سنجش طول موج به دست آمده از نمونه مورد ارزیابی کار می­کند (تصاویر 3-9 الی 3-11).*

*[](http://www.nanodrop.com/nd-1000-specifications.shtml)*

*تصویر3-9: دستگاه نانودراپ تصویر3-10: پایه­های مخصوص قرار گرفتن نمونه تصویر3-11: طول موج*

*مراحل تعیین کمیت* DNA*با استفاده از این دستگاه به صورت زیر انجام پذیرفت.*

1. *دستگاه کامپیوتر و نانودراپ روشن گردید و برنامه اسید نوکلئیک اجرا شد.*

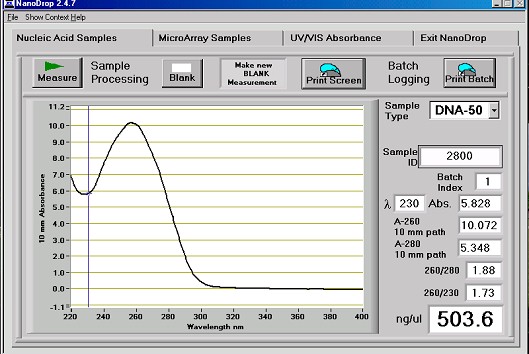
*2- پایه مخصوص قرار گرفتن محلول نمونه با 1-2 میکرولیتر آب مقطر شستشو گردید. برای اینکار ابتدا بازوی متحرک به سمت بالا و عقب دستگاه حرکت داده شد تا به میله عقب تکیه کند. سپس 2 میکرولیتر آب مقطر روی پایه پائینی در بازوی ثابت قرار گرفت و بازوی متحرک به سمت پائین و جلو به آرامی حرکت داده شد تا با آب مقطر تماس حاصل نماید. به آرامی بازوی متحرک چند بار فشرده شد تا آب مقطر کاملا پایه مخصوص قرار گرفتن نمونه را شستشو دهد و سپس پایه­ها با کاغذ صافی خشک گردید (تصاویر 3-11 و 3-12)*

|  |  |
| --- | --- |
|  |  |
| *شکل 3-12 :مراحل ششتشوی پایه* | *شکل 3-13:مراحل فشردن بازوی متحرک وخشک کردن* |

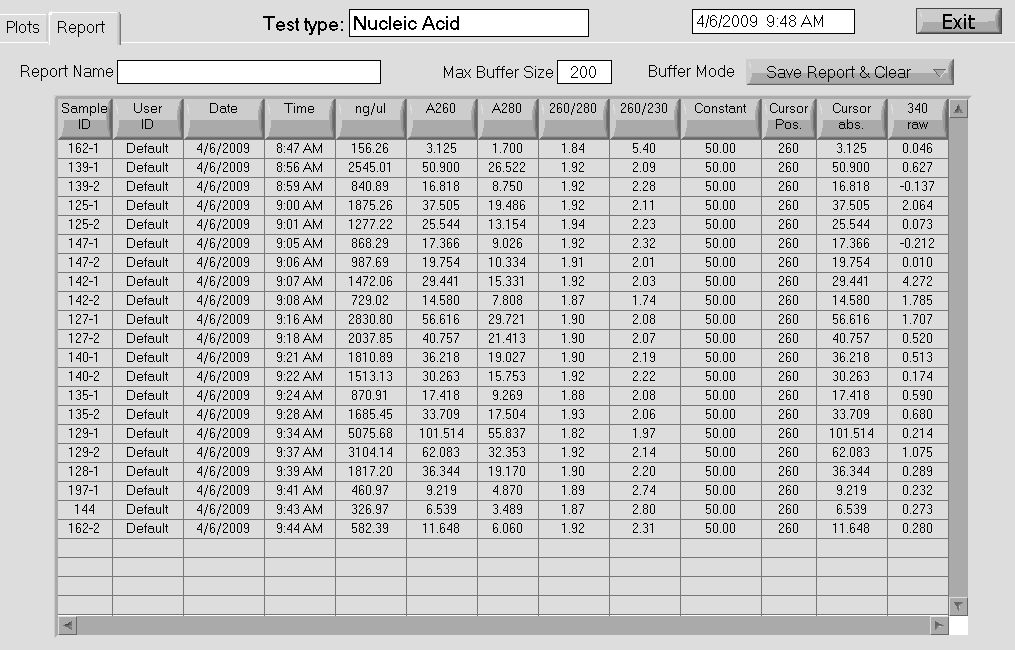
*3- یک قطره آب مقطر در حدود 1-2 میکرولیتر بین دو پایه مخصوص نمونه قرار گرفت و گزینه* OK *انتخاب گردید. سپس دستگاه عملیات لازم را انجام داده و نموداری که متشکل از دو محور عمود بر هم (محور افقی میزان طول موج و محور عمودی مقدار جذب) و یک خط عمودی برای مشخص نمودن پیک منحنی است، نشان می­دهد. خط عمودی پیک منحنی با درگ کردن بر روی 260 نانومتر(تعیین میزان اسید­نوکلئیک دراین طول موج است)تنظیم گردید.*

*4- جهت بلانک نمودن دستگاه، پایه مخصوص نمونه با کاغذ صافی یا دستمال کاغذی تمیز خشک ­شده و سپس مقدار 1-2 میکرولیتر محلولی که* DNA*در آن رقیق شده(دراین تحقیق این محلول TEمی باشد) بر روی این پایه قرار داده شد و گزینه بلانک انتخاب گردید.*

*5- جهت ارزیابی نمونه، پایه مخصوص خشک گردید و مقدار2 میکرولیتر محلول نمونه روی پایه مخصوص قرار و مشخصات آن در محل ثبت مشخصات ذخیره شدو روی گزینه اندازه گیری (*Measurement*) کلیک ­شد. دستگاه عملیات قرائت و اندازه گیری نمونه را به به پایان رسانده و تخمین میزان* DNA*را نشان ­داد (حدود 10 ثانیه). پس از تخمین میزان* DNA*، منحنی مشخصات نمونه موردنظر، در محورهای مذکورمشاهده شد و میزان دقیق* DNA*بر حسب نانوگرم بر میکرولیتر در کادر مستطیل شکل پائین و سمت راست کادر نوشته می­شد. همچنین در کادرهای دیگر صفحه کلیه جذب­های ضروری مورد نیاز برای عملیات مولکولی که توسط این دستگاه محاسبه شد، ارائه ­گردید. به عنوان مثال برای انجام عملیات* RFLP*میزان جذب در 260 نانومتر (مقدار اسیدنوکلئیک) بر 280 نانومتر (مقدار پروتئین)، باید نسبت بین 2/2-8/1 باشد.*

**

*تصوير3-14:نمودارطول موج*DNA*نمونه و محاسبات ضروری برای کارهای مولکولی*



**تصویر(3-15):اطلاعات مربوط به کمیت** DNA

***16-3-تست های بیوشیمیایی تعیین هویت مایکوباکتریوم ها(1):***

تست اوره آز :

**الف: کشت *: برخلاف مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و مایکوباکتریوم اسکوروفولاسئوم*که اوره آز مثبتمی باشند،*مایکوباکتریوم .مارینوم* و کمپلکس**م ***.ایویوم*و*م. گزنوپی و م. گوردونه*اوره آز منفی هستند.**

**ب:1 -یک بخش غلیظ از پایه آگار اوره، با 9 قسمت از آب مقطر استریل مخلوط شد.**

2-**مقدار 3 میلی لیتر از مخلوط فوق درداخل لوله های سر پیچ دار استریل 13× 100 میلی متری یا مقدار 4 میلی لیتر در لوله های سر پیچ دار 16×125میلی متری توزیع گردید.**

**ج: کنترل ها: ماده اولیه تلقیح نشده (منفی )وماده اولیه تلقیح شده با *مایکوباکتریوم اسکوروفولاسئوم*، *م. فورتوئیتوم* یا *م. گاستری*(مثبت)**

1. **ماده اولیه مایع که پر از باسیل های رشد کرده از یک کشت فعال در حال رشد بود راروی محیط جامد تلقیح کردیم.**

**2-در انکوباتور با حرارت 37-25درجه سانتی گراد قرارگرفت.**

**3- بعد از گذشت مدت زمان لازم تغییر رنگ به صورتی یا قرمز مشاهده گردید وپس از 3 روز بررسی مداوم، لوله ها دور ریخته شدند.**

نتایج **:تغییر به رنگ صورتی یا قرمز نشان دهنده مثبت بودن آزمایش وعدم تغییر رنگ نشان دهنده منفی بودن واکنش می باشد.**

تست كاتالاز:

جهت انجام تست كاتالاز دو تامپون فسفاته A و Bمورد استفاده ‌قرار گرفت (براي تهيه محلول A، gr4/9 فسفات دي سديک در يك ليتر آب مقطر و براي تهيه محلول B، gr07/9 فسفات منوپتاسيك در همان مقدار آب مقطر حل ­گردید). از محلول A به ميزان ml1/61 و از محلول B به ميزان ml­ 9/38 با هم مخلوط شد. pH محلول فوق معادل 7 بود. ml5/0 از مخلوط تامپون فسفاته برداشته در دو لوله جداگانه ریخته و یکی از لوله ها را به مدت 20 دقيقه در بن‌ماري C°68 و لوله ديگر به همين مدت در بن‌ ماري با دماي C° 22 قرار داده شد. سپس به محتويات هر دو لوله ml5/0 از مخلوط مساوي توئين­80 و آب اكسيژنه 30 حجمي‌اضافه ­شد. توئين­80 سبب افزايش كشش سطحي مايع مي‌گردد و در صورت توليد حباب حین انجام تست كاتالاز، اين حبابها در سطح مايع باقي مانده و توليد آنها بهتر مشخص مي‌‌گردد. بنابراین اگر حباب مشاهده شود پاسخ تست مثبت و در غير اين صورت منفي درنظر گرفته می شود.

**موارد مورد توجه و مهم در پروسه PCR**

1- برای جلوگیری از آلوده شدن منبع اصلی بافر، در حین کار باید مقدار بافر مورد نیاز ( ونه بیشتر) در یک میکروتیوب یکبار مصرف ریخته و بعد از پایان کار دور انداخته شود.

2- هرگز چیزی با انگشتان لمس نشود (به دلیل DNase ها) و آلودگی.

3-در محیط آزمایشگاه برای جلوگیری کراس دادن نمونه ها تمام پنجره ها باید بسته شد.

4- همواره بافر PCR، dNTP ها و پرایمرها و آنزیم ها باید در فریزر نگهداری شود.

5- DNAهر کدام از نمونه های مورد بررسی متفاوت می باشد و مخلوط واکنش غیر از DNAبرای تمام آزمایش ها در یک میکروتیوب مشترک مخلوط و سپس تقسیم گردید.

5- اولین مرحله در پروسهPCR، دناتوره کردن کامل DNAمی باشد. در این مرحله برنامه کنترل حرارت، قرار دادن در دمای 94 درجه سانتیگراد به مدت 3 دقیقه می باشد.

6- آخرین مرحله در واکنش PCRحصول اطمینان از کامل شدن قطعات محصول PCRمی باشد. در این مرحله برنامه کنترل حرارت ، دمای 72 درجه سانتیگراد به مدت 4 یا 5 دقیقه می باشد.

**مراحل انجامPCR:**

ابتدا به تعداد نمونه ها ی مورد نظر میکروتیوپدر معرض UV به مدت نیم ساعت قرار گرفت. در این تحقیق PCR16 میکرولیترانجام شد. (البته نمونه ایی که برای خوانش جهت تعیین توالی به ماکروژن کره ارسال گردید باحجم 50 میکرولیتر انجام شد).پس از طی زمان مورد نظر ابتدا به میزان مساوی master mix داخل همه میکروتیوپ ها ریختیم لازم به ذکر است چون master mix آماده2x می باشد حجم آن باید نصف حجم PCR یعنی 8 میکرولیتر باشد.درمرحله بعد پرایمرهای F,R رااضافه می نماییم وپس از آن با توجه به حجم نهایی واحتساب آن در این آزمایش 4میکرولیتر آب مقطر استریل به همه میکروتیوپ ها اضافه می نماییم و در نهایت DNA ژنومی استخرج شده و ارزیابی شده هر کدام از نمونه را به میکروتیوپ های نامگذاری شده افزودیم.در این آزمون DNA یک سوش استاندارد به عنوان کنترل مثبت (حتما باید در الکتروفورز ژل باند بدهد)و یکی از میکروتیوپ ها با تمام ترکیبات ذکر شده بدون DNA، کنرل منفی در نظر گرفته شد. ( کنترل منفی چون DNA ندارد نباید باند بدهد). در نهایت تمامی این میکروتیوپ ها داخل دستگاه PCR قرار گرفت وطی پروتکل داده شده به دستگاه، واکنش مورد نظر انجام گرفت.

**17-3-الكتروفورز محصول ‍PCR**

نتایج واكنشPCR های انجام گرفته جهت بررسی الكتروفورز گرديد. مراحل این کار به صورت زير اجراء گردید.

1- آگارز 1% دربافر TBE همراه با اتيديوم برومايد تهیه و پس از سرد شدن در سيني ژل ريخته و بعد ازبسته شدن، ژل درون تانك الكتروفورز حاویTBE قرار داده شد.

2- مقدار 25 ميكروليتر از هر نمونه محصول PCR همراه با بافر نمونه، درچاهک های موجود در ژل قرار داده شد (يك سهم محصول PCR و چهار سهم بافر نمونه).

3- جهت تعيین اندازه قطعه PCRاز سايز ماركر، استفاده گرديد.

4- درب تانك الكتروفورز گذاشته و به منبع برق متصل شد. سپس ژل با ولتاژ 80 به مدت یک تا یک ونیم ساعت الكتروفورز گردید.

5- مشاهده ژل توسط دستگاه ژل داک و عكس گرفته شده در كامپيوتر متصل به دستگاه ذخيره شد.

پس از انجام تمام این مراحل چنانچه باند های ظاهر شده روشن و واضح ودر منطقه مورد نظر قرار گرفته بودند، نمونه ها به شرکت ماکروژن کشور کره جهت خوانش و تعیین توالی نوکلئوتیدی ارسال شد.

18-3-**RFLP**

**1-18-3-هضم آنزیمیDNAکروموزومی توسط آنزیم­Pvu II (RFLP**)

اندونوکلئازهای محدودکننده، آنزیم‌هایی هستند که به طور اختصاصی، توالی خاصی را شناسایی کرده و آن را برش می‌دهند. آنزیم محدود کننده آندونوکلئاز توالی های کوتاه DNA را شناسایی نموده و در مکانهای خاصی داخل و یا در مجاورت سکانس شناسایی شده DNA دو رشته ای برش ایجاد می نماید. این برش موجب شکل گیـری گسستـگی در قطعات DNA می­گـردد. آنزیـم II*Pvu*برش هایی را*در سکانسـهای* CAG|CTG ایجاد می نماید. در این تحقیق جدایه­های *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس*،با انزیمII*Pvu*مورد هضم قرار گرفته و سپس کلیه مراحل الکتروفورز، انتقال به غشاء (ساترن بلاتینگ)، هیبریداسیون با پروب­های PGRS و DR به طور مجزا ازهم صورت گرفت و آشکارسازی بر روی آنها انجام می­پذیرفت. (تصویر 3-16).

*تصوير3-16: :* مراحل اجرائی الکتروفورز DNA هضم شده، ساترن بلات، هیبریداسیون و آشکارسازی

روش کار هضم DNA کروموزومی با آنزیم­ محدود کننده *Pvu* II به این صورت است که *در ابتدای کار مقدار 2 میکروگرم از نمونه­های* DNA*که با استفاده از دستگاه نانودراپ کیفیت آن ارزیابی شد. قبل از انجام هضم آنزیمی، میزان دقیق DNA تعیین گردید و حدود 2 میکروگرم از* DNA *ژنومی* مایکوباکتریوم بویس*AN5 با استفاده از Pvu* II *در یک میکروتیوب به حجم نهائی 20 میکرولیتر رسانیده و عمل هضم انجام گردید.*

A μl DNA (2 μg)

2 μl 10 x M buffer

B μl (Water to adjust final volume on 20 μl)

1 μl*Pvu* II (10 U/μl ) or *Alu* I (10 U/ μl )

-----------------------------------

*20 μl*

*در فرمول بالا* A *بیانگر میزان حجمی*DNA *استفاده شده و*B *بیانگر میزان آب مقطر مورد استفاده می­باشد*

*در این تحقیق* این مواد به مدت *5 ثانیه در یک میکروسانتریفیوژ در دور g 12000 سانتریفیوژ شد و به مدت یک شب در بن ماری* C*º37 انکوبه گردید(حتی المکان چند ساعت اول دمای بن ماری جهت جلوگیری از تغییر دمای احتمالی کنترل شد).*

*نکات ضروری و مورد توجه در هضم آنزیمی* DNA :

**1-***میکروتیوپهای که برای انجام عمل هضم درنظر گرفته اند باید حداقل نیم ساعت درمجاورت اشعه UV قرار گیرند.*

2- *هر گاه غلظت* DNA *یک نمونه از 1800میکرو­گرم در میلی­لیتر بیشتر بود، مقدارلازم برای هضم آنقدر کم بود که پیپت کردن آن را مشکل بود. در این موارد ترجیحا* DNA*را با استفاده از TE رقیق نموده و آنرا مجدد با دستگاه نانودراپ تعیین غلظت می نماییم و برعکس اگر غلظت* DNA*کمتر از 50یا 70 میکروگرم در میلی­لیتر بود، غلظت آن برای هضم آنزیمی بسیار پائین بود باید*DNA  *جدید این نمونه را مجدد استخراج می­کردیم و ازاستفاده این* DNA*منصرف می شدیم.*

3- *حجم نهائی آنزیم محدود کننده مورد استفاده نباید از 10 % تجاوز کند، چون اگر زیاد باشدگلیسرول موجود در آنزیم محدود کننده موجب نگهداری بافر شده و واکنش مختل می­نماید*

4- آندونوکلئاز محدود کننده به حالت های بافر بسیار حساس است. به همین دلیل قبل از افزودن آنزیم، بافر محدود کننده­، آب و DNA را با یکدیگر مخلوط نموده و این محلول را چند ثانیه با میکروسانتریفوژ دور تند سانتریفوژ، سانتریفوژ کرده و بعد آنزیم را اضافه کردیم. ( ابتدا تمام مواد مصرفی رامخلوط کرده ودر آخر آنزیم را می افزاییم).

5- *هنگامی می خواهیم تعداد زیادی نمونه* DNA*را با همان آنزیم هضم نماییم، میزان کل آنزیم مورد نیاز را محاسبه نمودیم(3 – 2 واحد آنزیم برای 1 میکروگرم* DNA *)و ابتدا آنزیم را در بافر محدود کننده* 1X*تهیه و بعد مخلوط آنزیم/بافر را در میکروتیوب­های واکنش تقسیم و سپس نمونه­ها را در مخلوط واکنش پیپت کردیم. این روش باعث صرفه­جوئی زیادی در زمان و آنزیم شد واز آلودگی باقی مانده آنزیم مصرفی جلوگیری می نماید.*

*6-جهت جلوگیری از آلودگی احتمالی میکروتیوپهای حاوی نمونه حین انجام کار پنجره ی اتاق آزمایش باید بسته باشد.*

**19-3-جدا سازی قطعات DNA به وسیله الکتروفورز و تهیه عکسRFLP**

برای جدا سازی قطعات DNA با وزن مولکولی در حدود 5/0 تا 25 کیلو باز در ژل آگارز برای اهداف تجزیه­– تحلیلی وکارهای مقدماتی، الکتروفورز DNA هضم شده انجام گرفت و سپس انتقال قطعات جدا شده به غشاء نایلونی با شارژ مثبت (ساترن بلاتینگ)صورت پذیرفت. تمام شرایط وموارد ضروری ذکر شده در مراحل فوق، رعایت شد..

**الف- تهیه ژل برای الکتروفورز**

1- با توجه به ابعاد ژل مورد نیاز حجم مشخصی از آگارز1% (وزن به حجم) در یک ارلن ریخته و سپس بافر TBE، افزوده گردید (در این آزمایش برای ژل 15x 15 سانتیمتری 22 خانه­ای، 150 میلی­لیتر و برای ژل 25x 15 سانتیمتری 22 خانه­ای 300 میلی­لیتر محلول آگارز 1% استفاده شد). آگارز را با حرارت دادن حل کرده و پس از اطمینان از حل شدن کامل، ارلن حاوی آگارز را در بن ماری Cº65 قرار داده شد تا در زمان مورد نیاز استفاده گردد.

1. همانند مراحلی که قبلا برای سینی ژل ذکر شد لبه های یک سینی ژل تمیز با نوار چسب بسته و روی محفظه ژل افقی قرارگرفت و یک شانه روی سینی ژل با رعایت فاصله از طرفین و کف سینی قرار داده شد.

3- پس از اینکه ژل آگارز کمی سرد شد 100 لاندا اتیدیوم بروماید (با غلظت نهائی 5/0 میکروگرم در لیتر )به ارلن حاوی آگارز حل شده افزوده تا به رنگ پوست پیازی درآید و به سرعت به ژل حرکت دورانی داده و در سینی ژل ریخته شد تا ببندد.

4- *پس ازبسته شدن ژل آگارز نوار چسب ها جهت برقراری جریان برق از محفظه ژل باز و به طوری در تانک الکتروفورز قرار می*گرفت *که طرف شانه دار آن به طرف کاتد (الکترود منفی ، سیاه) باشد.*

5- *مخزن بافر با همان بافری که ژل آکارز تهیه شد (TBE)، پرگردید.ضخامت ژل حدود یک میلی متر بود.*

6- *شانه با احتیاط و به آرامی همزمان از هر دو طرف ژل جدا گردید.*

7- *5 میکرولیتر بافر نمونه* 5X DNA *همراه با* RNase *به 20 میکرولیتر*  DNAهر کدام از*نمونه های هضم شده افزوده گردید (غلظت نهائی بافر نمونه* 1X*شد).و به سایز مارکر نشاندار با دیگوکسیژنین 1 میکرولیتر بافر نمونه* 5X DNA*همراه با* RNase *به 4 میکرولیتر افزوده گردید.*

8- *مخلوط حاصل یک سانتریفوژ کوتاه به مدت 5 ثانیه گردید تا محلول به خوبی هموژن شود.*

9- *از مخلوط سایز مارکر نشاندار با دیگوکسیژنین* مقدار*5 میکرولیتر به اولین چاهک منتقل شد. در دومین چاهک 25 میکروگرم* DNA*کروموزومی هضم شده با Pvu* II*از سویه رفرانس*AN5مایکوباکتریوم توبرکلوزیس *که به عنوان کنترل مثبت می باشد، انتقال یافت.*

10- *از ادامه چاهک ها تا آخرین چاهک مقدارمحاسبه شده از هر یک از نمونه های* DNA*های مورد بررسی که توسط Pvu* II*هضم شده توزیع گردید. جهت جلوگیری از آلودگی برای انتقال هر نمونه ازیک سمپلر جداگانه استفاده گردید وتلاش گردید تا همه چاهک ها به مقدار مساوی از* DNA*ژنومی ریخته و از مخلوط شدن نمونه­ها بین چاهک هااجتناب گردید.*

11- *درب تانک ژل با دقت گذاشته و سیمها به منبع تغذیه متصل گردید و از صحیح بودن مسیر ژل مطمعن شدیم ( دارای بار منفی می باشد و به طرف قطب مثبت حرکت می کند). سپس دستگاه منبع تغذیه روشن گردید (در صورت گرم بودن هوای محیط، تانک الکتروفورز با منبع تغذیه و سیم­های رابط در سردخانه* C*º4 قرار گرفت).*

12- *برای 10 دقیقه اول شروع الکتروفورز جریان 100 ولت تنظیم گردید و سپس ولتاژ 35 ولت کاهش یافت و یک شب الکتروفورز ادامه یافت.*

13- *الکتروفورز تا زمانیکه تا رنگ بافر نمونه نزدیک انتهای ژل قرار بگیرد، ادامه داده شد.*

14- *از ژل حاصله توسط دستگاه ژل­داک عکس تهیه گردید و پس از مشاهده و بررسی در کامپیوتر ذخیره گردید.*

ب- ***مواردی که در طول کار همواره باید رعایت میگردید:***

1- *از یک نوع بافراز یک منبع مشترک، هم در تانک الکتروفورز و هم در ژل استفاده گردید. زیرا تفاوت های جزئی در قدرت یونی یا* pH *بافری که قبل*اً *با آن ژل درست شده است می تواند بر حرکت قطعات* DNA *و سرعت آن تاثیر گذارد.*

2- *برای به دست آوردن غلظت نهائی دقیق (نانوگرم در میلی لیتر) اتیدیوم بروماید، ابتدا یک محلول 500 میکروگرم در میلی لیتر اتیدیوم بروماید به صورت استوک ساخته شد. این محلول استوک به نسبت یک هزارم در آگارز یا در بافر* TBE*(1 میکرولیتر در یک میلی­لیتر) حل شد.*

3- *اتیدیوم بروماید این امکان را فراهم می سازد تا ژل را در هر مرحله از الکتروفورز به وسیله اشعه* UV*بررسی نمود. رنگ فلورسنت با کاتالازداخلی بین جفت بازها، موجب کاهش حرکت*ا*لکتروفورتیکی*DNA *های خطی در حدود 15 % می­گردد.*

4- *اتیدیوم بروماید تا وقتی کهکه محلول آگارز تا* Cº*60 خنک نشده بود، اضافه نمی­شد.*

5-*نباید هیچ حباب هوائی در ژل بخصوص زیر شانه ها باقی می ماند، و در صورت به وجود آمدن حباب در ژل تمام آنها قبل از بسته شدن ژل، توسط یک سر سمپلر استریل خارج گردید.*

6- *همواره جریان الکتریکی کنترل شد. در صورت درست متصل شدن سیمها حبابهای هوا در آند و کاتد تولید (به دلیل الکترولیز) و طی چند دقیقه بروموفنل بلو از چاهک ها به طرف آگارز حرکت می­نمود.*

7- *قدرت میدان الکتریکی (حجم بر سانتیمتر) به وسیله فرمول زیر محاسبه گردید:*

▲ V ▲ V = *اختلاف پتانسیل بر اساس ولت*

E = ------------- ▲ X = *فاصله بین الکترود ها بر اساس سانتیمتر*

▲ X E = *قدرت میدان الکتریکی*

8-DNA*هابا غلظت مساوی در تمام چاهک ها ریخته شد، افزایش غلظت* DNA، *سرعت حرکت را بیشتر می­نمودو باعث دایمر دادن نمونه ها می شود.*

9-*.حرکت مولکولهای* DNA*با معکوس لگاریتم 10 ، تعداد جفت بازهامتناسب می باشد*

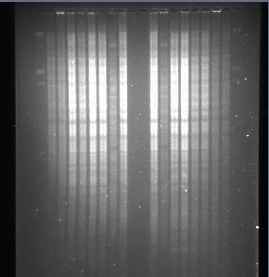
*10-.شکل فضائی*DNA  *بر سرعت حرکت*DNA، *در ژل آگارز تاثیر دارد. به طوری که در یک ژل آگارز مولکولهای* DNA *حلقوی شکسته شده*DNA *حلقوی بسیار پیچیده­ و خطی با وزن های مولکولی­ مشابه دارای سرعت مختلف می­باشند.*

11- *سرعت حرکت قطعات* DNA*هایخطی در ولتاژهای کم، با ولتاژ به کار رفته تناسب دارد. ولی با افزایش ولتاژ حرکت قطعات با وزن مولکولی بالا به صورت متفاوت افزایش می­یابد. پس زمانیکه ولتاژ افزایش می یافت، دامنه جداسازی در ژل آگارز به طور موثری کاهش یافت.*

12- *بعد از یک شب الکتروفورز با ولتاژ40 برای رسیدن سریعتر فاصله دقیق الکتروفورز، ولتاژ را تا50 ولت می توان افزایش داد.باید توجه داشت که ژل باید بزرک باشد وگرنه در طول یک شب باند ها پیشروی کرده و از ژل خارج می شوند.*

13- *برای به دست آوردن جداسازی مطلوب قطعات* DNA *هضم شده، الکتروفورز یک شب باولتاژ 40 نگهداری شد. در ژل های کوچک می­توان برای کوتاه شدن زمان، الکتروفورز را در ولتاژ بالا انجام داد.*

در این تحقیق تعداد 6نمونه توسط آنزیم *Pvu* II مورد هضم آنزیمی و RFLPانجام گرفت (تصویر3-17).



تصویر 3-17: RFLP با استفاده آنزیم *Pvu* II .عکس تهیه شده است.

از چپ به راست : ستون 1سایز مارکر شماره3 شرکت رش آلمان، ستون2- نمونه استانداردAN5 ستون3-نمونه1، ستون4-نمونه 2، ستون5نمونه 3، ستون 6-نمونه 4، ستون7-نمونه 5، ستون8-نمونه 6 از راست به چپ: نيز به صورت قرينه به همين ترتيب مي‌باشد.

**20-3-ساترن بلاتینگ**

به طور کلی در ژنتیک مولکولی به عمل انتقال مولکولهای تفکیک شده در الکتروفورز از ژل به روی یک غشاء ویژه، بلاتینگ یا بلات کردن گفته می‌شود. معنای واژه انگلیسی بلاتینگ، لکه‌گذاری استدر این تکنیک انتقال الکتروفورتیکی قطعات جدا شده DNA (با شارژ منفی به خاطر داشتن باندهای فسفات) به یک غشاء نایلونی با شارژ مثبت، برای استفاده در عملیات هیبریداسیون با استفاده از پروب­های لیبل شده با دیگوکسیژنین صورت می­پذیرد. متعاقب آن در مراحل بعدی آشکار سازی و شناسایی پروب­­های هیبرید شده با استفاده از آنتی­بادی دیگوکسیژنین کنژوگه با آنزیم آلکالاین فسفاتاز (AP)[[82]](#footnote-82)و سوبسترای NBT و BCIP انجام می­گیرد.

ساترن بلاتینگ به دو روش "انتقال موئینه­ای[[83]](#footnote-83) " و "انتقال توسط خلاء[[84]](#footnote-84) " انجام پذیر می باشد. روش انتقال توسط خلاء بسیار سریعتر از انتقال موئینه­ای است (حدود 2-1 ساعت) ولی روش موئینه­ای نیاز به تجهیزات کمتری داشته و راحت تر است و کیفیت انتقال نیز مناسبتر می باشد. در این تحقیق به دلیل فراهم بودن کلیه لوازم مورد نیاز انتقال به روش موئینه­ای در دپارتمان سل، از این روش استفاده گردید. در این مرحله نیز به دلیل کار با اتیدیوم بروماید و پرتو فرابنفش، رعایت کلیه احتیاطات ذکر شده در مراحل قبلی صورت گرفت.

قبل از بلاتینگ برای انتقال مناسب یکنواخت DNA به غشاء­، ژل تحت پرتو UV و عمل آوری با HCl قرار می گیرد. عمل آوری با اسید اجازه می دهد تا دپیورینیشن[[85]](#footnote-85) نسبی ایجاد گردد. محل­های دپیورینه شده در طی عمل­آوری با قلیا برش خورده و اینکار موجب می­گردد تا قطعات DNA از یکدیگر مجزا (واسرشت)[[86]](#footnote-86) گردند تا DNA تک رشته­ای پس از انتقال به غشاء برای عمل هیبرید شدن با پروب آماده گردد.

در روش انتقال موئینه­ای، مولكولهاي DNAاي كه روي ژل آگارز قرار داشتند با خاصيت موئينگي جریان بافر حركت نموده و بر روي غشاء نایلونی جاذبي كه داراي بار الكتريكي مثبت بوده و روی سطح جامد تکیه­گاه بلافاصله پس از ژل قرار گرفته، رسوب می­نماید. ژل آگارز براي مطالعه نوارهاي DNA كه حاوي اطلاعات هستند بسيار ناپايدار است. در اين روش جریان مایع به وسیله فعالیت موئینه­ای غشاءهای جاذبي که روی سطح ژل و غشاء نایلونی روی آن قرار مي­دهند، ایجاد شده و در ادامه محلول­هايي كه زير سطح ژل قرار دارند در درون ژل و غشاء حركت كرده و به وسيله كاغذهاي جاذب حوله­ای خشک روي غشاء، جذب مي­شوند. در پي حركت اين مايعات، قطعات DNA توسط جریان مایع حمل و از ژل خارج شده و عیناً به غشاء، دقيقاً در محل­هائي كه DNA بر روی ژل قرار دارد، متصل مي­گردند امروزه بیشتر از غشاء های نایلونی شارژ شده استفاده می شود. این غشاء ها گروه های آمینی (NH4+) را حمل می کنند و به عنوان نایلون های شارژ شده مثبت شناخته می شوند. اسیدهای نوکلئیک تک رشته ای یا دو رشته ای از ناحیه Back bone به این غشاء ها متصل می شوند. هدف اين روش تشكيل تصوير رونوشتي از محتويات ژل اگارز روي سطح غشاء با روش مستقيم و مرتب است. سپس DNA انتقال يافته روي غشاء با روشهاي مختلفي كه DNA را به طور كووالاني به غشاء متصل مي­نماید، تثبيت مي­شود. چنين DNAي تثبيت شده اي در محل خود پايدار است و مي­تواند با پروب و يا ساير مواد واكنش داشته باشد. نتیجه نهائی این است که DNA قابل واكنش روی غشاء، از نظر اطلاعات مكاني دقيقا مانند DNAي روي ژل اصلي است.

لازم به ذکر است که بار DNA به دلیل وجود فسفات منفی بوده و غشاء نایلونی مورد استفاده حتماً باید دارای شارژ مثبت باشد و این اختلاف بار نه تنها عمل انتقال را تسهیل نموده بلکه برای انتقال مناسب، بسیار ضروری است. در قسمتی از این تحقیق از غشاء نایلونی بدون بار استفاده شد و مشخص گردید که انتقال DNA، بدون داشتن شارژ مثبت غشاء به خوبی صورت نمی پذیرد.

در انتقال به وسیله دستگاه خلاء، ژل در تماس با یک تکیه گاه فیلتری بر روی یک تور متخلخل بالای یک محفظه خلاء قرار می­گیرد. بافر از یک مخزن بالا کشیده شده و باعث شستن اسید­های نوکلئیک از ژل و رسوب آنها روی غشاء می­گردد. انتقال با خلاء بسیار سریعتر از انتقال موئینه­ای است.

**21-3- عمل آوری ژل قبل از بلاتینگ**

1-1- ژل به مدت 5 دقیقه در معرض پرتو UV روی دستگاه ترانس لومیناتور و یا ژل داک قرار داده شد. خاصیت فلورسنت DNA تقریباً در این قسمت ناپدید شد.

1-2- سینی محتوی ژل به مدت 10-5 دقیقه در 500 میلی لیتر اسید کلریدریک 25/0 مولار قرار گرفت تا عمل دپیورینه شدن صورت پذیرد.

1-3- دو بار ژل به مدت کوتاه (هر بار حدود 10 ثانیه) با آب مقطر شستشو داده شد.

1-4- برای واسرشت (دناتوره شدن) DNA دو بار سینی محتوی ژل هر بار به مدت 20-15 دقیقه در 500 میلی لیتر سود 4/0 مولار قرار گرفت و سپس مانند مرحله قبل دو بار شستشو صورت پذیرفت.

1-5- دو بار ژل به مدت 15 دقیقه در محلول خنثی کننده[[87]](#footnote-87) قرار داده شد.

1-6- یک دقیقه ژل در بافر[[88]](#footnote-88)2x SSC قرار گرفت.

از این قسمت به بعد را می توان از روش خلاء یا روش موئینه­ای استفاده نمود، که در این تحقیق تنها از روش موئینه­ای استفاده شد.

**22-3-بلاتینگ به وسیله روش موئینه­ای[[89]](#footnote-89)**

روش زیر ساخت بلات را نشان می­دهد

2-1- یک نگهدارنده ژل (در این تحقیق از سینی تانک الکتروفورز که ژل روی آن تهیه شده بود، به صورت وارونه استفاده گردید) که در یک سینی پلاستیکی به طور وارونه قرار گرفت.

2-2- سینی پلاستیکی تا زیر صفحه نگاهدارنده ژل از بافر 20x SSC پر گردید.

2-3- نگهدارنده ژل با یک قطعه کاغذ واتمن که قبلا به دقت با 20x SSC خیسانده شده بود، به اندازه عرض سینی (عرض ژل) و مقداری بلندتر از طول سینی به نحوی که دو انتهای آن درون بافر قرار بگیرد، پوشانیده شد. تمام حبابها به وسیله غلتاندن پی پت بر روی کاغذ، خارج گردد.

2-4- ژل به طور وارونه روی کاغذ واتمن به نحوی قرار گرفت که دقیقاً روی نگهدارنده ژل تنظیم گردد.

2-5- در یک سمت گوشه ژل با بریدن قطعه بسیار کوچک از آن علامت زده شد تا بتوان نقطه شروع ژل و اولین و آخرین خط را شناسائی نمود.

2-6- یک غشاء[[90]](#footnote-90) نیتروسلولز به اندازه ژل بریده و یک کد بالای غشاء نوشته شد.

2-7- غشاء به مدت 2-1 دقیقه در آب مقطر دیونیزه و سپس در 20x SSC قرار گرفت.

2-8- غشاء به دقت بر روی ژل گذاشته و وضعیت آن دقیقاً روی ژل تنظیم گردید. دقت می­گردید تا تمام حبابها به وسیله غلتاندن پی­پت بر روی کاغذ خارج گردد.

2-9- تمام چهار طرف فیلتر (یا بین ژل و فیلتر) با پارافیلم پوشانیده شد.

اینکار باعث ایجاد حالت عایق بین ژل و غشاء گردید و موجب شد تا از حرکت بافر از لبه­های ژل به طرف بالا جلوگیری شود و حتما بافر از درون ژل عبور کند.

2-10- سپس 6 قطعه کاغذ واتمن نازک و بدنبال آن 6 قطعه کاغذ واتمن کلفت روی فیلتر قرار گرفت.

2-11- نهایتاً یک دسته دستمال کاغذی به ارتفاع 15 سانتیمتر (کاغذ کار یا کاغذ با جذب بالا) و یک وزنه یک کیلوگرمی روی یک صفحه شیشه­ای در بالای برج بلات[[91]](#footnote-91) قرار گرفت.

در طول مراحل مختلف ساترن بلاتینگ، همیشه از تشکیل حباب هوا اجتناب شد و همچنین فیلتر Hybond N-plus و تمام کاغذهای واتمن و ژل به دقت هم اندازه بریده شد.

2-12- در صورت نیاز، به بافر 20x SSC سینی افزوده شد تا بافر به پائین صفحه نگهدارنده ژل برسد و ساترن بلاتینگ به مدت 4 تا 6 ساعت (در این تحقیق یک شب) انجام گرفت. پس از طی زمان فوق، ژل کاملا نازک شده بود.

[](http://yakhteh.net/wp-content/uploads/2013/01/southern-blot2.jpg)

*تصویر 3-18*: راهنمای ترتیب قرار گرفتن کاغذها، ژل، غشاء نیتروسلولزی و وزنه در روش موئینه­ای (ژل/فیلتر)

23-3- **عمل آوری غشاء بعد از بلاتینگ**

3-1- بلات برای دو دقیقه روی یک فیلتر واتمن که با سود 4/0 نرمال اشباع شده بود، قرار گرفت.

3-2- غشاء به مدت دو دقیقه با 5x SSC شسته شد.

در این مرحله بلات را می­توان مستقیماً برای عملیات هیبریداسیون استفاده نمود و یا در پلاستیک سر بسته در شرایط مرطوب نگهداری کرد.

3-3- برای حصول اطمینان از انتقال کامل DNA به فیلتر، پس از بلاتینگ به مدت 1 یا 2 ساعت ژل در بافر الکتروفورز با 5/0 میکرو­گرم در میلی­لیتر اتیدیوم بروماید قرار داده و حضور DNA بر روی ژل ردیابی گردید. در صورت انتقال کامل هیچ اثری از DNA بر روی ژل باقی نمی­ماند و یا تنها اثر بسیار ناچیزی از آن مشهود بود اگر انتقال به طور کامل انجام شده باشد نباید هیچ و یا تنها میزان کمی DNA روی ژل باقی بماند.

نکات مورد توجه در ساترن بلاتینگ :

1- در طی انکوباسیون با اسید کلریدریک یا سود، ژل به طور کامل با محلول پوشیده شد.

2- هنگام حمل غشاء ها همیشه از دستکش استفاده شد. چربیها و آنزیم DNase موجود در پوست، می­تواند موجب انتقال آرتیفکت (اثر مصنوعی) گردد.

3- از ایجاد حبابهای هوا بین ژل و فیلترها جلوگیری شد.

4- اگر ژل با آگارز به خوبی آب بندی نشود، بافر به سرعت از بین آنها نشت کرده و بلاتینگ در این حالت به خوبی انجام نمی­شود.

5- انتقال در ژل­های نازکتر میتواند بسیار سریعتر از ژل­های ضخیم باشد. به طور مشابه انتقال قطعات کوچکتر DNA بسیار سریعتر از قطعات بزرگتر می­باشد( در این تحقیق از ژل ضخیم استفاده شد).

**24-3-تثبيت DNA بر روی غشاء[[92]](#footnote-92)**

به سه روش می­توان DNA را بر روي غشاء ثابت نمود:

1- با تاباندن پرتو اولترا ویوله بر روی غشاء

2- قرار دادن غشاء در C*º* 120 به مدت 30 دقيقه

3- قرار دادن غشاء در C*º* 80 به مدت 2 ساعت

در این تحقیق از روش دوم یعنی قرار دادن غشاء در فور120 درجه به مدت 30 دقيقه استفاده شد. غشاء آماده شده براي مرحله قبل از هیبریداسیون (پری هیبریداسیون)[[93]](#footnote-93) را مي­توان در يك پلاستيك خشك در دماي C*º* 4 تا موقع مصرف نگهداري نمود.

**25-3-تهیه پروبهاي هيبريداسيون**

كاوشگرها (پروب ها ) قطعه­ای از ملكولهاي تك رشته­اي DNA يا RNA هستند كه به روشهای مختلف نشان­دار (لیبل) می­شوند و همین قطعات نشان دار شده برای بررسی هیبریداسیون به عنوان پروب به کار می­روند تا با توالی نوكلئوتيدي مكمل خود از DNA هدف تحت شرایط ويژه آزمايشگاهی هيبريد ­شوند. سپس نواحي هيبريد شده به طرق مختلف رديابي شده تا تفاوت سويه­ها به لحاظ جايگزيني پروب در نواحي خاص كروموزوم نمايان گردد. به طور كلی پروب­ها به 3 دسته بزرگ تقسيم مي­گردند که عبارتند از: اوليگو­پروب­ها (مانند PGRS و DR)، PCR پروب­ها (مانند IS6110 و IS1081) و RNAپروب­ها. در اين مطالعه از 2 اولیگوپروب PGRS و DR استفاده شد .

الف- **پروب (Polymorphic GC – rich Repetitive Sequence) PGRS**

اوليگو نوكلئوئيد PGRS لیبل شده با دیگوکسیژنین که در این تحقیق استفاده شد، با سکانس زیر به شرکت طوبی نگین سفارش داده شد و از کمپانی DNA Technology A/S دانمارک تهیه گردید. میکروتیوب حاوی پروب که ليوفيليزه شده بود با توجه به غلظت آن با 500 ميكرو­ليتر آب مقطر استريل به صورت محلول در آمد تا غلظت نهائی آن به Pmol/µl 158/0 رسید. سپس پروب حاضر شده در چندين میکروتیوب تقسيم و براي استفاده در مراحل بعدي در فریزر C*º* 20- نگهداري شد. توالي اين پروب به صورت زير است.

5’ CGG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG TTG CCG CCG3’

براي نشان دار نمودن اوليگونوكلئوتيد با digoxigenin سه روش وجود دارد:

1-3’end labeling 2-3’ tailing 3-5’ end labeling

در اين پايان نامه از PGRS و DR نشان دار شده با دیگوکسیژنین به روش اول (3’end labeling) ساخت شركتDNA Technology A/S دانمارک استفاده گرديد.

**26-3-شناسائی**

شناسائی به معني مشاهده نوارها یا قطعات مربوط به پروب نشاندار (لیبل شده) متصل شده بهDNA مورد بررسي است كه به روشهای زیر صورت می­پذیرد.

1- کلریمتری با NBT و BCIP

2- کیمیولومینسانس[[94]](#footnote-94)

در اين تحقيق از روش اول با استفاده از NBT و BCIP صورت گرفت.

شناسائی به روش کلریمتری با NBT و BCIP:

پس از شستشوهاي لازم، مراحل زير انجام گرفت.

1- غشاء در محلول بافر شستشو[[95]](#footnote-95) به مدت 1 دقيقه قرار گرفت.

2- غشاء در محلول بلوکینگ یک برابر به مدت 60-30 دقيقه در دماي اتاق قرار داده شد.

3- قطعه Fab آنتی دیگوکسیژنین آنتی بادی کنژوگه با آلکالاین فسفاتاز[[96]](#footnote-96) در محلول بلوکینگ به نسبت 1:5000 رقيق شد. سپس محلول رقيق شده آنتي بادي روی غشاء ریخته و به مدت 30 دقيقه در دماي اتاق قرار داده شد به ترتيبي كه محلول رقيق شده آنتي بادي تمام سطح غشاء را بپوشاند.

4- غشاء دو بار در بافر شستشو به مدت 15 دقيقه قرار گرفت. اين شستشو باعث شد كه آنتي بادي هاي باند نشده از سطح غشاء شسته شوند.

5- غشاء در بافر شناسائی[[97]](#footnote-97) به مدت 2 دقيقه در دماي اتاق قرار گرفت.

45 ميكروليتر محلولNBT و 35 ميكروليتر محلول BCIP در 15 ميلي­ليتر بافر شناسائی مخلوط شد(این محلول همیشه به طور تازه مصرف گردید). محلول حاصل که بنام محلول رنگ کننده سوبسترا[[98]](#footnote-98) خوانده می­شود، روي غشاء ريخته و در تاريكي قرار داده شد تا واكنش صورت پذیرد (چند دقيقه تا 16 ساعت). همچنین از هر گونه لرزش و تكان شدید در طي پيشرفت واكنش اجتناب شد.

6- غشاء در بافر TE به مدت 15 دقیقه شستشو می­شد و پس از خشک شدن، عکس تهیه گردید و بین دو برگ طلق شفاف نگهداری شد.

**27-3-پری هیبریداسیون و هیبریداسیون با پروب نشاندار با دیگوکسی­ژنین**

**1-27-3-مرحله پري­هيبريدیزاسيون**

مرحله پری هیبریداسیون، غشاء را با پوشاندن قسمت­هاي غير اختصاصي متصل شونده با اسيد نوكلئيك، براي مرحله هيبريداسيون آماده مي­سازد و بدين ترتيب رنگ تیره زمينه[[99]](#footnote-99) به كمترين ميزان خود مي­رسد. روش كار به این صورت است که غشاء بدون تا خوردگی لوله گردیده(در این تحقیق چون با دو پروب کار کردیم 2تا لوله برداشته شد) و داخل لوله مخصوص آون هیبریداسیون[[100]](#footnote-100) قرار می­گرفت و محلول پری­هيبريدیزاسيون[[101]](#footnote-101) داخل لوله ریخته می­شد (حجم محلول معادل ml20 به ازاء هر 100 سانتی متر مربع از سطح غشاء مي­باشد). سپس لوله داخل دستگاه آون هیبریداسیون گذاشته و به مدت 4-3 ساعت در دمای 65 درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

**2-27-3-مرحله هيبريداسيون[[102]](#footnote-102)**

پس از اتمام مرحله پری­هیبریداسیون، محلول پری­هيبريداسيون از لوله آون هیبریداسیون خارج کرده و دور ریخته شد و مراحل زیر به ترتیب انجام گردید.

محلول هيبريداسيون که حاوی پروب PGRS لیبل شده با دیگوکسیژنین بود، به همان مقداری که در مرحله قبل، محلول پری­هیبریداسیون به کار رفته بود، به درون لوله ريخته شد. پروب ليبل شده با غلظت مناسب و مقدار مناسب و با توجه به حجم يا به عبارتي مساحت ممبرين با سمپلر برداشته و به محلول هيبريداسيون[[103]](#footnote-103)افزوده گردید (در این آزمایش برای 50 میلی­لیتر بافر هیبریداسیون 10 میکرولیتر پروب استفاده شد).

دماي بهينه هيبريداسيون اختصاصي براي پروب تنظيم شد كه بستگي به طول پروب و اندازه ترادفي كه با ترادف هدف همتائي (همولوژي) دارد، تعيين مي­گردد. در این تحقیق مرحله هيبريداسيون به مدت یک شب در دماي ºC65 انجام گرفت. سپس غشاء به صورت زیر شسته شد تا پروب­های باند نشده خارج گردند، در غير اين صورت سیاهی زمينه بسيار بالا خواهد بود.



شکل(3-19) Digoxigen

2-3- دو بار شستشو با محلول شستشوی دو برابر(washing solution 2x)و هر بار به مدت 5 دقيقه در دماي اتاق انجام شد.

2-4- دوبار شستشو با محلول شستشوی 1/0 برابر((washing solution 0/1x و هر بار به مدت 15 دقيقه در دماي ºC55 (داخل همان لوله­ها و دستگاه آون هیبریداسیون) انجام پذیرفت.

2-5- یکبار شستشو با بافر شستشوی یک برابر به مدت يك دقيقه در دمای اتاق غشاء شناسائی شد.

**فصل چهارم**

**نتـایـج**

**نتایج**

**نمونه برداري:**

در روند این مطالعه جمعا تعداد127 نمونه ماهی پرورشی از5استخر پرورش ماهی و چندین فروشگاهعرضه کننده ماهی مختلف در استان قزوینبه شکل تصادفی و به علت داشتن ضایعات انتخاب گردیدکه نمونه ها به صورت تازه و یا فریز شده به آزمایشگاه رفرنس ملی سل سرم سازی رازی منتقل گردیدند.

**كشت ميكروبي:**

پس از انجام مراحل کشت ماهی های پرورشی تحت شرایط استریل بر روی محیط های لونشتاین جانسون پیرووات دار، لونشتاین جانسون گلیسرینه، هرولداگ، هرولداگ مایکوباکتین دار، تمامی محیط ها در دمای 25 و37 درجه انکوباسیونشد. پس از گذشت حدود یک الی دوهفته از زمان کشت، پرگنه هایی به شکل گل کلم، رنگی و گاه بی رنگ برروی محیط های کشت ظاهر شد.

بعد از آن تهیه اسمیر از کلنی ها انجام گرفت و برای هر کدام دو سری لام گسترش تهیه و رنگ آمیزی گردید. دررنگ آمیزی فلئوروکروم باسیل های اسید فست دیده و بارنگ آمیزی ذیل نلسن تائید گردید. در این تحقیق جمعا13جدایه اسید فست جدا گردید.

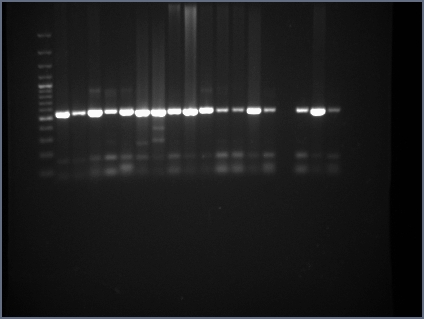
|  |  |
| --- | --- |
| ANd9GcQ7AJXkDXltdi0zvavVwBJFElruOvt-pOIkyffv5LXGQii6N7kB |  |

تصویر4-1 :باسیل اسید فست مایکوباکتریوم در رنگ آمیزی فلئوروکروم وذیل نلسن

**آزمون PCR-16SrRNA:**

با انجام PCR در ایزوله های اسید فست، تعلق داشتن همه نمونه های جدا شده از ماهی به مایکوباکتریوم تائید گردید. اعمال این استراتژِی در مورد تمام جدایه ها منجر به مشاهده یک باند الکتروفورزی مشخص به اندازه 546 جفت باز بروی ژل آگارز گردید(شکل4-2)

14 13 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 + - M



**546bp**

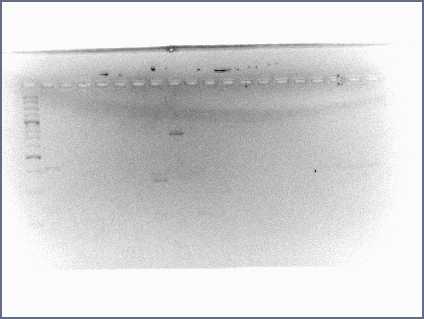
تصویر4-2: **: الکتروفورز محصول PCR برای سکانس546جفت بازی** 16SrRNA

M: سايز ماركر،+ : شاهد مثبت، ستون شماره1الي 13جدایه هاي ماهی مورد مطالعه ،- : شاهد منفي

**آزمون PCR-IS*6110* :**

با انجام آزمایشPCR درنمونه هاتعلق هیچ کدام ازجدایه هابه گروه کمپلکس *مایکوباکتریومتوبرکلوزیس*مشخص نگردید.دراعمال اين تکنیک در مورد جدايه ها مشاهده هیچ باند الكتروفورزي مشخص به اندازه 245 جفت باز بر روی ژل آگارز نگرديد(تصویر4-3 ).

M + - 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16



**245bp**

تصویر4-3: الکتروفورز محصول PCR برای سکانس 245 جفت بازی IS6110

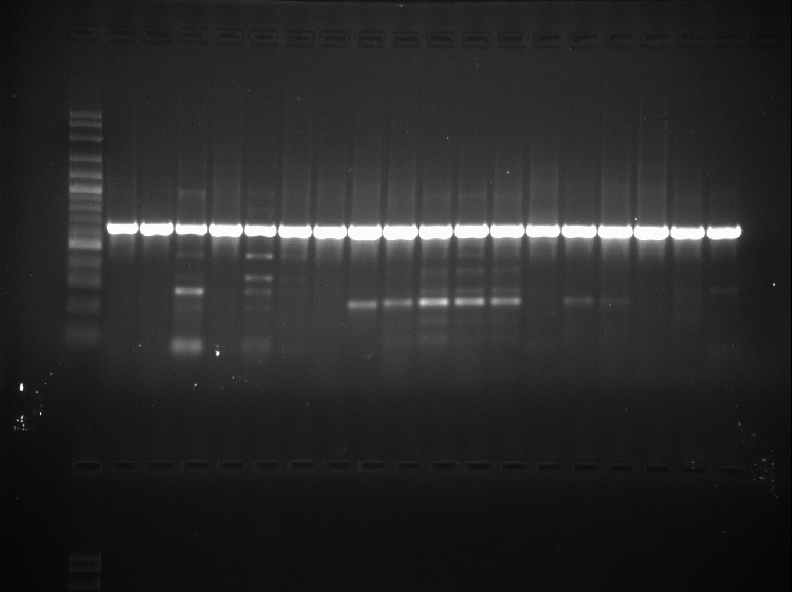
M: سايز ماركر ، +: شاهد منفي، ، ستونشماره 1 الي16 جدایه های ماهی مورد مطالعه منهای ستون 8 که-: شاهد مثبت می باشد

**آزمون PCR-HSP65:**

با انجام تست-hsp65PCR در نمونه ها تعلق داشتن همه آنها به گروه مایکوباکتریوم تائید گردید. اعمال اين استراتژي در مورد تمام جدايه ها منجر به مشاهده یک باند الكتروفورزي مشخص باندازه 295 زوج باز بر روی ژل آگارز گرديد(تصویر4-4 ).

14M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13

**295bp**



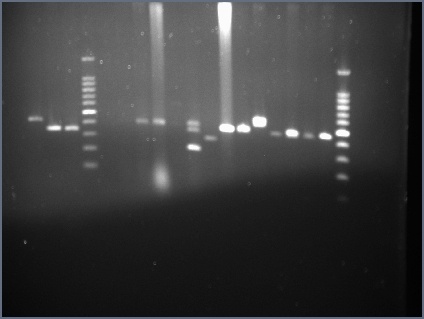
تصویر4-4 :الکتروفورز محصولPCRبرای سکانس بازی 295 جفت بازیHsp65

M: سايز ماركر در ، ستونشماره 1 تا 13 جدایه های ماهی مورد مطالعه، ستون آخر کنترل مثبت

**آزمون ITSPCR-:**

اعمال اين استراتژي در مورد تمام جدايه ها منجر به مشاهده یک باند الكتروفورزي مشخص باندازه 380 زوج باز بر روی ژل آگارز گرديد**(**تصویر4-5**).**

**M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 M**

****

**(**تصویر4-5**):**M: سايز ماركر در دو طرف، ستون شماره 1 نمونه موردبررسی، ستون شماره-:2 کنترل منفی،ازستون 3الی 14نمونه های مورد مطالعه

**SequencingوAlignment:**

تمامی13جدایه مایکوباکتریوم به دست آمده، جهت تعیین توالی نوکلئوتیدی آماده گردید. جدایه ها به شرکت ماکروژن کشور کره ارسال شد ودر نهایت با دو بار خوانش نوکلئوتید ها، وهر 13 نمونه با پرایمر hsp65،16SrRNA وITS تعیین توالی گردید که در پیوست آمده است. با استفاده از نرم افزار blast n و مقایسه توالی های مرتب شده با تعداد زیادی از سویه های ثبت شده *مایکوباکتریوم فورتوئیتومومارینوم*در gene bank ، تعلق داشتن این 2 نمونه به *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم*و2 نمونه *مایکوباکتریوم مارینوم* مورد تائید قرار گرفت. ضمنا در این مطالعه این موضوع را تست های بیوشیمیایی هم تائید نمود(پیوست).

**آزمون های بیوشیمیایی ا نجام شده در این تحقیق:**

در مطالعه حاضر ابتدا جدایه ها تحت تست اوره آز قرار گرفتند. بعد از گذشت 4 روز نمونه ها به رنگ صورتی تغییر رنگ دادند و اوره آز مثبت گردیدند در این تحقیق به منظور بررسی دقیق تر دو لوله آزمایش در نظر گرفته شد، یکی در انکوباتور 37 درجه ودیگری در انکوباتور 25 درجه قرار گرفت که در نتیجه تغییر رنگ در محیط 37 درجه سریع تر انجام گرفت.

|  |  |
| --- | --- |
| **تصوير100** | **تصوير123** |
| تصویر4-6: آزمایش اوره آز | تصویر4-7:آزمایش کاتالاز |

**تست کاتالاز:**

در تحقیق حاضر طبق روشی که توضیح داده شده برای 5 تا از جدایه ها تست کاتالاز انجام گردید، حبابهایی که در سطح مایع به وجود آمدند کاتال از مثبت بودن این جدایه ها رانشان دادند.

**آزمایش پیگمانتاسیون:**

در این آزمایش مقداری از کلنی در آب مقطر استریل حل گردید(باید دقت شود که غلظت این محلول با لوله مک کانکی یکسان باشد). سپس از این محلول حدود 100میکرولیتر بر داشته و روی محیط کشت دادیم. باکتری های کشت داده شده در دو مرحله جداگانه در تاریکی ودر حضور نور قرار گرفت که در 3 تا از آنها بعد از قرار دادن در حضور نور تغییر رنگ مشاهده شد و رنگ کلنی ها به زرد پررنگ متمایل شد. در بقیه جدایه ها هیچ گونه تغییر رنگی مشاهده نشد ومشخص گردید که باکتری مربوطه پیگمان تولید نمی کند.

**آزمایش تحمل درجه حرارت:** دراین تست باکتری های 11 جدایه در این بررسی را بعد از کشت دادن در 42 درجه انکوبه نمودیم. پس از گذشت یک هفته رشد مثبت در 4 تا از نمونه مشاهده گردید و بقیه این جدایه ها رشد منفی داشتند.

**آزمایش رشد در دماهای مختلف:**

به این منظور بعد از انجام کشت تعدادی از محیط های یکسان به طور همزمان در 25،37 و42درجه قرار گرفت که در کمتر از 7 روز تمام باکتری ها رشد یافتند که تائیدی برسریع الرشد بودن می باشد.

**آزمون RFLP بر مبنای مارکرهایPGRS و DR :**

6 مورد از جدایه به همراهیک سوش استاندارد AN5به عنوان شاهد جهت انگشت نگاری ژنومی و بررسی پلی مورفیسم *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* جدا شده از ماهیان پرورشی استان قزوین مورد بررسی قرار گرفت. به دلايل تكنيكي و كيفيت ماده ژنومي‌استخراج شده، 6نمونه DNAاستخراج شده از این جدايه ها جهت انجام اين تکنیک مناسب تشخيص داده شد. همچنین بر اساس پروپوزال پایان نامه پیشنهاد گردیده بود انگشت نگاریDNA نمونه ها مطابق دستور العمل WHOبا آنزیم (*ALU I*) انجام گیرد، که به منظور کسب تمایز و دست یافتن به پلی مورفیسم از دو پروب PGRS و DR و آنزیم PVUII استفاده گردید. در نتيجه انجام آزمون تعداد 5ژنوتيپ با استفاده از روش RFLP-PGRS وهمچنين با بكارگيري روش RFLP-DR دو ژنوتيپ مشخص گرديد .

الف – با مقایسه چشمی باند های با وزن مولکولی بالا (2027 تا 23130 جفت باز ) و با استفاده از نرم افزار ژل پرواز 6 سویه هضم شده ماهی پرورشی با آنزیم (*Pvu* II ) پس از RFLP و هیبرید شدن با پروب PGRS و آشکارسازی، تعداد 5 الگوی متفاوت بدست آمد، که الگوی آن درتصویر4-15 نشان داده شده است.

|  |
| --- |
| Untitled-1  8 7 6 5 4 3 2 1 M M1 2 3 4 5 6 7 8  23130bp  11755bp  11144bp  9988bp  7460bp  6897bp  23130bp  11755bp  11144bp  9988bp  7460bp  6897bp |

تصویر4-8:RFLP با آنزیم*Pvu*IIو هیبریدیزاسیون با پروبPGRS ,DR

از چپ به راست: ستون اول سایز مارکر شماره 3شرکت رش آلمان، ستون1- نمونه استانداردAN5، ستون3- نمونه شماره1، ستون4- نمونه شماره2، ستون5- نمونه شماره3، ستون 6- نمونه شماره4، ستون7 - نمونه شماره5ستون8 - نمونه شماره6

از چپ به راست مربوط به پروب PGRS با ترتیب نام برده شده می باشد.

ب – با مقایسه چشمی باندهای با وزن مولکولی 6897 تا 12056 جفت باز برای نمونه های استاندارد دیده شد و با استفاده از نرم افزار ژل پرو، از6 سویه هضم شده با آنزیم (*Pvu* II ) پس از RFLP و هیبرید شدن با پروب DRو آشکار سازی، یک الگوحاصل شد.

بررسی فوق نشانگر این است که تشابه بین سویه های مایکوباکتریوم توبرکلوزیس کمپلکس و سویه هایی که از ماهیان جداگردید بسیار نادر بوده و در مقایسه با سویه های استاندارد سل انسانی تفاوت اساسی مشاهده شد. در این مطالعه5 الگوی ژنومی مختلف به دست آمد که بیانگر این است که احتمالا 5 سویه متفاوت در بین مایکوباکتریوم های جدا شده از ماهیان پرورشی در استان قزوین در گردش بوده و این الگو های ژنومی باندهای تکی داشتند که به علت نبود الگوی ژنومی مشابه در ایران با نرم افزار ژل پرو آنالیز گردید.

**فصل پنجم**

**بحث**

**نتیجه گیری و بحث:**

هم اکنون طبق دستورالعمل OIE و سازمان بهداشت جهانی، کشت و جداسازی مایکوباکتریوم قطعی ترین روش تشخیص بیماری سل می­باشد(49). در این بررسی نیز به دلیل نامشخص بودن نوع باکتری های جداشده، از روش کشت در محیط­های لونشتاین جانسون گلیسرین دار، پیروات دار، هرولداگ مایکوباکتین دار و هرولداگ بدون مایکوباکتین جهت جداسازی اولیه مایکوباکتریوم از ماهیان پرورشی استفاده گردید. در روش استاندارد برای جداسازی مایکوباکتریوم، محیط­های لونشتاین جانسون به عنوان بهترین محیط­ها معرفی گردیده است(49). در این آزمایش نیز مایکوباکتریوم ها پس از آلودگی زدایی در شرایط استریل، جهت جداسازی اولیه بر روی همه محیط های مذکور، کشت داده شدند. همچنین محیط MGIT به عنوان محیطی که موجب بالا رفتن سرعت و دقت تشخیص می­گردد، معرفی شده است(43). در این تحقیق از محیط ذکر شده استفاده نگردید.

اگرچه کشت نمونه، آزمون قطعی برای تایید عفونت های مایکوباکتریومی به شمار می آید اما امکان دارد این روش هفته ها یا ماه ها طول بکشد (18).

در مطالعه حاضراز روش استاندارد جداسازی DNA از مایکوباکتریوم ها که سال 1993 میلادی توسط ون سولینگن در دستورالعمل WHOثبت شد، برای انگشت نگاری ژنومی *مایکوباکتریوم ها* استفاده شد. در سال 2002 میلادی مجدداین دستورالعمل باتغییراتی ارائه شد و شناخته شده ترین روش استخراج DNA از مایکوباکتری ها جهت استفاده درRFLP است (114).

به طور معمول عفونت های مایکوباکتریال حیوانات بی نهایت شایع است. در یک تحقیق مایکوباکتریایی دربین خوکهای وحشی مناطق شمالی استرالیا، 7/47% از 751 خوک وحشی موردآزمایش دارای آبسه­های قابل مشاهده بودند که از این آبسه­ها2/80% مشکوک به مایکوباکتریوم بود. و از 193 خوکی که بررسی های باکتریولوژیک روی آنها انجام شددر مجموع 93 سویه مایکوباکتریومی جدا گردید و بعد از قطعی شدن تعیین گونه، گونه‌های *مایکوباکتریوم بویس* (37 سویه)، کمپلکس *مایکوباکتریومایویوم اینتراسلولار* (15 سویه)، *مایکوباکتریوم اسکوروفولاسئوم* (8 سویه)، *مایکوباکتریوم گوردونه*[[104]](#footnote-104) (2 سویه)، *مایکوباکتریوم سیمیه* (2 سویه)، *مایکوباکتریوم زولگائی*[[105]](#footnote-105) (2سویه)، *مایکوباکتریوم گزنوپی* (2 سویه)، *مایکوباکتریوم واکسی*[[106]](#footnote-106) (1 سویه) و *مایکوباکتریوم کانزاسی* (1 سویه) شناخته شد. ازتحقیق مذکورنتیجه گرفته شد که احتمال اینکه میزبان نهائی گونه­های *مایکوباکتریوم بویس* و مایکوباکتریومهای آتیپیک (غیرسلی)، خوکهای وحشی باشندحتمی می­باشندومنبع عفونت معنی داری برای گاوها به حساب نمی آیند. ضمنا تایید گردید، با این که *مایکوباکتریوم بویس* عامل مهم مرگ و میر خوکهای وحشی به شمار نمی آید ، اما از عوامل مهم شیوع در آنها است.

شناسايي منبع های عفونت، مسيرهاي انتقال و شناختن مخازن بالقوه حیات وحش از مهمترین مشکلات اصلی در ریشه کنی عفونت ها می باشد و جهت دست یابی به هدف تمایز سویه­های مختلف مايكوباكتريوم الزامی می باشد. همچنین به علت گوناکونی و فراوانی گونه های فرصت طلب و فراوانی مخازن طبیعی اطلاعات در زمینه اپیدمیولوژی بسیار ناچیز می باشد.

باتوجه به اینکه ندرتا عفونتهای مایکوباکتریایی در حیوانات وحشی یافت می­شود، یکی از مثالهای عجیب وجود عفونتهای شبه جذامی طبیعی در آرمادیلو نه خط وحشی[[107]](#footnote-107) در تگزاس ومکزیک می باشد. هر چند از سال 1971 آرمادیلو به عنوان یک مدل تجربی برای عفونت مایکوباکتریوم لپره (جذام) مورد استفاده قرارمی گیرد (یک گونه­ای که همچنان به صورت غیر قابل کشت در محیط های آزمایشگاهی باقی مانده است)، در سال 1975 از چند حیوان وحشی که شکار شده بودند نیز بیماری عفونی شبیه با آرمادیلوهای آلوده مشاهده شد(93). دراین آرمادیلوها مستعد بودن ابتلا به گونه های دیگر قابل کشت مایکوباکتریومی افزایش یافته و برخی از گونه­ها مثل *مایکوباکتریوم گوردونه، مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* و *مایکوباکتریوم ایویوم* از حیوانات عفونی با مایکوباکتریوم لپره، جدا گردیده اند .از مایکوباکتریوم لپره ای که از آرمادیلو بیمار یا بافت جذامی گرفته می شود ماده ای به نام او- دی فنل اکسیداز استخراج شده است. در یک تحقیق مروری بر گذشته که روی سرم گرفته شده از182 آرمادیلو بین سالهای 1960 و 1964جهت انجام درتحقیقات جذام ،صورت گرفت، مشاهده شد که، از182سرم گرفته شده 17سرم، برای تست آنتی ژن گلیکولیپید-1 فنوله که تست اختصاصی برای مایکوباکتریوم لپره می باشد، مثبت است (93). در نتیجه به نظر می­رسد که مایکوباکتریوم لپره در آرمادیلوهای وحشی شیوع همه­گیر دارد. نظر به اینکه در میان آرمادیلوهای جذامی پلاسنتیت لپروماتوز و عفونت داخل رحمی جنین حامله دیده شده است امکان مسری بودن عفونت در آرمادیلوها وجود دارد.

مایکوباکتریوم هایی که در حیوانات مختلف از قبیل آبزیان وجود دارد، به آسانی قابل انتقال به انسان هستند و قابلیت بیماری زایی بسیاری دارند و می توانند در انسان بیماری های نگران کننده ای ایجاد نمایند. با بررسی های انجام شده در تحقیق حاضر و با نظر به اینکه مایکوباکتریوم هامی توان از منابع گوناگونی جدا نمود و قادر هستند طیف گسترده ای از موجودات اعم از انسان وحیوانات وآبزیان را آلوده نمایند، می توان این باکتری ها را به عنوان یکی از مهمترین معضلات بهداشتی، اقتصادی کشور به شمار آورد.طی سال 1387 در یک مطالعه توصيفی 62 بيمار HIV مثبت به روش تصادفی از ميان مراجعين يک مرکز ترک اعتياد در اهواز تحت آزمایشTST با ماده PPD 5 و سنجش IgM عليه آنتی‌ژن‌های باسيل سل قرار گرفتند. این مطالعه نشان داد که شيوع عفونت سل نهفته در بين معتادان تزريقی HIV مثبت در منطقه مورد مطالعه از ساير نقاط دنيا بيشتر است. آزمون جلدی توبرکولين تست مفيدی برای تشخيص سل نهفته در افراد HIV مثبت است و بر سنجش IgM عليه آنتی‌ژنهای مايکوباکتريوم‌ توبرکلوزيس ارجحيت دارد(152). بروز این مایکوباکتریوم ها در افراد با نقص سیستم ایمنی و یا سیستم ایمنی ضعیف مثل افراد مسن، کودکان وبیمارانی که مشکلات ریوی دارند بالاتر می باشد و در این افراد می تواند سل منتشره ایجاد نماید و اندام های بسیار و حتی اندام های عمقی تر را درگیر سازد.

آلودگی با *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* از عفونت هایی است که در افراد به شکل عفونت های ریوی نیز ظاهر می شود. این نوع از مایکوباکتریوم زئونوز بود که بین آبزیان و انسان مشترک می باشد، در کشور ایران نیز وجود دارد، از این رو بررسی منبع های طبیعی حیات وحش، مسیرهای انتقال و اپیدمیولوژی این باکتری از اهمیت ویژه ای برخوردار است که در این امر تکنیک های مولکولی مانند استخراجDNA وRFLP کارساز می باشد.

در سال 1988 میلادی در مطالعه ای که توسط ایکیاما و همکارانش صورت گرفت مایکوباکتریوم فورتوئیتوم از آب، خاک و گرد وغبار جدا گردید (67).

در سال 1994 در مطالعه ای دیگری که توسط فردی به نام ون ریون وهمکارانش همچنین در سال1999توسط ارنسون انجام شد، سیستم توزیع آب نیز به عنوان یک منبع مهم برای عفونت در بیمارستان ها، کارخانه ها و ساختمان های تجاری و مسکونی معرفی گردید (115).

توسط شناسایی سریع عفونت و راه های انتقال می توان شیوع آن را در افراد را کنترل کرد و از مرگ و میر اجتناب نمود. شیوع عفونت در استخرهای پرورش ماهی، محل فراوری محصولات ماهیان، اکواریوم ها، استخرهای شنا، محل های نگهداری ماهیان زینتی، منابع شیلات کشور و مغازه های خرید و فروش اکواریوم، فروشگاه های عرضه کننده ماهیان خوراکی و در جاهایی که انسان ها با آبزیان واستخرهای ماهی ارتباط بیشتری دارند، افزایش می یابدوهمیشه احتمال آلودگی در این مکان هارا باید در نظر قرار گیرد تا از معضلات بهداشت عمومی- فردی و اقتصادی جلوگیری شود. این بیماریها همچنین می توانند از طریق منابع آب، ماهیان وحشی، پرندگان و یا مدفوع آنها، غذای ماهی، دستها و بویژه چکمه کارکنان مزرعه و رانندگان کامیون وارد مزرعه گردند.

تاکنون مایکوباکتریوم های گوناگون از جمله *م. فورتوئیتوم، مارینوم، شلونئی، اسمگماتیس، آبسسوز، ایویوم،* ه*موفیلوم، لنتی فلاوم، نئوناروم، سیمیه، اسکوروفولاسئوم، پری گرینیوم، سپتیکوم، ترائه، تریویاله، شوتزی،* زولگائی و تریپلکس از ماهی های مختلفی جدا گردیده است (52).

برای پیشگیری از شیوع عفونت های ویروسی و باکتریال اپی زوئیک در کشور، با روش هایی مانند تغییردادن مکان ماهی، تخم ها، حذف کردن ماهیان آلوده و قرنطینه کردن موارد آلوده راه کارهایی ارائه گردیده اما تا به حال این مسئله مهم نادیده گرفته شده وهیچگونه اقدامی برای شناسایی و از بین بردن بیماری های مایکوباکتریومی انجام نگرفته است. آگاهي پزشکان از احتمال عفونت با مايکوباکتريوم‌هاي آتيپيک و همچنين ساير پاتوژن‌هاي عفونت‌زاي منتقله از آب مي‌تواند باعث تشخيص به موقع، درخواست آزمايش‌ها و نمونه‌هاي جراحي مناسب، درمان درست و کافي و کاهش چشم‌گير عوارض ناشي از اين نوع عفونت شود.

جستجو و بررسی هایی که از طریق DNA و آزمایشات PCR جهت وجودباکتری های بیماری زا در زیست محیط، بافتهای مختلف بدن و تخمهای ماهی بسیار مفید می باشد. متدهایکه بر مبنای DNA بکار گرفته شده مثل ریبوتایپوrandomly amplified polymorphic DNAوژل الکتروفورز(pulsed-field gel electrophoresis of DNA) که روشهای مهمی در تشخیص ارتباطات ژنتیکی بین پاتوژن های ایزوله شده از مناطق مختلف جغرافیائی می باشد، کارآمد بوده و سپس در تحقیقات اپیدمیولوژیکی استفاده می شود. داروهای عمده آنتی میکروبی که در آبزی پروری مورد استفاده میشود، جزء آنتی بیوتیکها و ترکیبات سنتتیک از جمله سولفونامیدها و نیتروفوران هامی باشند (39).

به طور معمول پیشگیری با دارو، در استخرهای ماهی می تواند برای جلوگیری از شیوع بیماری عفونی به کار گرفته شود، اما امکان دارد این داروهای آنتی میکروبیال از قبیل تتراسیکلین ها وسولفامرازین باعث برگشت بیماری و افزایش مقاومت داروئی در میان باکتری های بیماری زا در ماهیان گردد. این مقاومت ضمن اینکه باعث کاهش کنترل بیماری های ماهی می گردد، می تواند به عنوان پاتوژن انسانی نیز مشکل ایجا نماید. آنتی بیوتیک ها در محیط باقی مانده و انباشتگی دربافت بدن ماهی انباشته می گردد. کاربرد داروها در مزارع پرورش ماهی یکی از مسائل مهم در سال 1990 بوده است که در اثر فشار پزشکان و طرفداران محیط زیست، موجب تقلیل مجوز داروهای آنتی میکروبیال در مزارع پرورش ماهی گردیده است. اگر چه در بیشتر کشورهای تولید کننده ماهی به سرعت استفاده از این داروها در مزارع کاهش یافته اما می توان از آنتی بیوتیک ها و داروهای نوین در درمان عفونتهای حاد و مزمن استفاده نمود و همکاری وسیع و قابل توجهی بین کارخانجات صنایع غذایی و داروسازی الزامی می باشد(43).

اخیر جداسازی گونه های متفاوتی ازمایکوباکتریوم از منابع مختلفی در کشورماننیز گزارش شده است ازجمله تحقیقی که سال 1393خانوم شیرین اکبری بر روی ماهیان زینتی استان البرز انجام دادند. در این تحقیق60 نمونه ماهی زینتی جمع آوری وپس ازکشت و رنگ آمیزی اختصاصی 36 جدایه اسیدفست شدند که با روشهای مولکولی وجود *م. فورتوئیتوم* را در این ماهیان اثبات گردید(11). اما تاکنون هیچ گونه تحقیق منسجم و مشابهی برروی ماهیان پرورشی استان قزوین صورت نگرفته است. به طور مثال در یک تحقیق انواع مایکوباکتریوم های محیطی در رسوبات استخرهای پرورش ماهی شمال ایران توسط دکتر سعیدی و همکارانش بررسی شد که بعد از نمونه برداری از مناطق و استخر های مختلف، کشت فقط در محیط لوون اشتاین جانسون و در محیط 37 درجه انجام شده بود که در این بررسی فقط با توجه به خصوصیات بیوشیمیایی چندین نوع مایکوباکتریوم شناسایی کردند که فراوانی *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم* از همه بیشتر بود. در نمونه ای دیگر فراوانی گرانولوم استخر شنا و *مایکوباکتریوم مارینوم* در کار کنان صنعت شیلات و ماهی های آشوراده استان گلستان را بررسی کردند که معاینه بالینی از 387 نفر کارکنان شیلات که با ماهی تماس داشتند از نظر وجود زخم های جلدی انجام گرفت(53,95).

همچنین درتحقیقی که سال1382 بر روی 113 نمونه آبشش ماهیان خاویاری بندر ترکمن رنگ آمیزی ذیل نلسون و سپس تیمار با سود انجام شده بود در این ماهیان شیوع پائینی از عفونت های مایکوباکتریومی را گزارش کردند ولی در ایزوله های شیلات دو مورد مشکوک به *مایکوباکتریوم مارینوم* گزارش گردید. با توجه به اینکه مایکوباکتریوم های محیطی در مناطقی که دارای آب و هوای معتدل ومرطوب می باشند وفور بیشتری دارند در استان های گیلان ومازندران بیشترین تحقیقات صورت گرفته است(54).

در تحقیقی دیگر برروی مایکوباکتریوم های محیطی در استان گلستان نمونه برداری از خاک صورت پذیرفت که از 220 نمونه جدا گردیده، 91 کشت مثبت و 161 سویه مختلف مایکوباکتریوم گزارش گردید که بیشترین آنها *مایکوباکتریوم فورتوئیتوم، شلونئی*و*فلاووسنس* بود(53). طی یکصد سال اخیر و مدت کوتاهی پس از کشف باسیل سل توسط کخ در یافتند که گونه های دیگری به غیر از گونه های کمپلکس مایکو باکتریوم ها به جز عوامل مولد سل و جذام وجود دارند. در سال 1953 به طور سیستماتیک کلکسیون بزرگی از مایکوباکتریوم ها غیر از باسیل های کلاسیک سل را جمع آوری کردند که ازجهات متعددی با *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* تفاوت داشت ازجمله میتوان *مایکوباکتریوم مارینوم* را نام برد. در سال 1950 آقایان نوردرن و لینل گزارشی در موردگرانولوم استخر شنا منتشر کردند و*M.Balnei*  را نامگذاری کردندکه بعدها مشخص شد که این ارگانیسم همان پاتوژن ماهی یعنی*م. مارینوم* است. مواردی از بیماری در دست ها، پاها، انگشتان و همچنین در پل بینی وچانه ماهیگیران دیده شده است(41). در تحقیقی دیگر که توسط دکتر آمنه علائین وهمکارانش در اراک صورت گرفت یک مورد گرانولوم آکواریوم در انگشت دست خانم 25 ساله ای که در محل نگهداری ماهیان زینتی در خمین مشغول کار بوده است گزارش گردید که سابقه ضایعه مشابه در یکی همکاران بیمار هم وجود داشت که نتایج آن تحقیق نشان دادکه 45 درصد موارد عفونت در مشاغل مرتبط با ماهی یا تفریحات و سرگرمی های مرتبط با آب دیده شده است و در 61 در صد موارد سابقه تروما را نیز گزارش کرده اند(92).

همچنین در تحقیقی که آقای کیومرث قاضی سعید و همکارانشان انجام دادندکه دراین تحقیق معاینه بالینی از387نفر از کارکنان شیلات که باماهی تماس داشتند، ازنظر زخم های جلدی انجام گرفت پس از انجام مراحل کشت از طریق تیمارسود ورنگ آمیزی، هیچ *م.مارینوم* اززخم های مشکوک جدانگردید(9). در مطالعه دیگری که توسط آقای هاشمی وهمکارانشون روی تنوع توالی 48 مایکوباکتریوم *فورتوئیتوم* ازنمونه جدا، که این بررسی بصورت توالی جداگانه s23-s 16 فضای رونویسی انجام گردید. این مطالعه نشان داد که منطقه ITS دارای قدرت تفکیک کنندگی بالایی بین نمونه جدا، درسطح کلونال دارد. حدس زده می شود احتمال وجود توانایی کلون قالب در*م. فورتوئیتوم* بیماران مبتلا در ایران دارد. داده ها نیز اشاره دارد که درنتیجه انواع زیادی از *م. فورتوئیتوم* می تواند تولید بیماری نماید اگر چه کلون خاص غالب به نظر برسد(154،153). در تحقیق حاضرپس از جمع آوری نمونه، برای آلودگی زدایی سرو دم و احشاء ماهی ها از هم جدا شد و به علت احتمال آلودگی بیشتر، از سود نرمال که به عنوان یک آلودگی زدای قوی می باشد، استفاده گردید. پس از انجام مراحل کشت میکروبی تحت شرایط استریل، نمونه ها در دمای 25 و37 درجه انکوبه گردیدند. در مدت زمان یک الی دو هفته کلنی ها به طور واضح مشاهده شد که وجود باکتری در محیط اثبات کرد و لازم به ذکر است که نمونه هایی به طور همزمان در انکوباتور 37 درجه قرار گرفته بودند، در مدت زمان کمتر از یک هفته رشد یافتند که سریع الرشد بودن باکتری های جدا شده می باشدتائید گردید. رشد کلنی باکتری در هر چهار محیط وجود داشت اما به دلیل اینکه لونشتاین جانسون محیط اختصاصی استاندارد مایکوباکتریوم می باشد، رشد باکتری در این محیط به میزان قابل توجهی بیشتر از هرولداگ و هرولداگ مایکوباکتین دار بود. برای شناسایی جدایه های حاصل از ماهیان پرورشی، اسمیر تهیه گردید و بعد از مشخص شدن اسید فست بودن باکتری ها، استخراجDNA ژنومی انجام شد و برای اطمینان از مایکوباکتریوم بودن جدایه ها با استفاده از پرایمر های اختصاصی 16S rRNA ،PCR انجام گرفت.

در ادامه یک نوبت PCR ، با پرایمرهای IS6110 که برای شناسایی TB کمپلکسها می باشد صورت گرفت که از 13 جدایه مایکوباکتریوم، هیچ کدام از این نمونه با این استراتژی مثبت نبودند. با توجه به این نکته که جدایه های مورد بررسی در ماهیان پرورشی در ارتباط مستقیم با تغذیه وبهداشت عمومی می باشند و بیشترین نمونه های موجود در مطالعات پیشین شامل *مایکوباکتریوم مارینوم، فورتوئیتوم* می باشند، بررسی های بیشتر در زمینه وجود کمپلکس *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* در ماهی الزامی به نظر رسید.

پس از تائید مایکوباکتریوم بودن نمونه ها، با استفاده از پرایمر های اختصاصی مایکوباکتریوم *مارینوم* که مختص آبزیان می باشد، PCR انجام شد که 2تا از جدایه ها متعلق به *مایکوباکتریوم مارینوم*بود. سپس، چندین نوبت PCR با استفاده از پرایمر های پروتئین های شوک حرارتی HSP65 که مایکوباکتریوم های بسیاری را شناسایی می نماید انجام گرفت.

برای بررسی مجدد تعیین هویت این نمونه ها تست RV0577، که به عنوان مکمل IS6110 می باشد، انجام گرفت که با توجه به اینکه در آزمون IS6110 هیچ باندی مشاهده نشد در این تست نیزهیچ مایکوباکتریومی مثبت نشد.

همچنین برای تمایز 13 سویه ی جدا شده از ماهی از تکنیک RFLP و سپس تکنیک ساترن بلاتینگ استفاده شد. در تکنیک RFLP برای هضم آنزیمی از آنزیم Pvu II که در روش استاندارد توسط ون سولینگن در سال 2002 میلادی برای انگشت نگاری ژنومی مایکوباکتریومها ارائه شد، استفاده گردیدو5 ژنوتیپ بااستفاده از پروبPGRSو دو ژنوتیپ با پروب DRنمایان شد. به علت بزرگ بودن ژنوم مایکوباکتریوم­ها با دارا بودن حدود 4/4 جفت مگا باز تفسیر الگوی RFLP به تنهائی و بدون هیبریداسیون مشکل می باشد، در حالی که پس از انتقال DNA به غشاء و هیبریداسیون با پروب و آشکار سازی، تفسیر امکان پذیر می­گردد.

با توجه به اینکه تاکنون هیچ گونه انگشت نگاری ژنومی در آبزیان انجام نشده ،از نتایج به دست آمده در این مطالعه چنین استنباط می شود که جهت تعیین الگوی ژنومی مایکوباکتریوم در آبزیان نیاز به پروب های اختصاصی می باشد و تفسیر نتایج با دو پروب PGRS و DR که بیشتر برای *مایکوباکتریوم توبرکلوزیس* به کار می رود، مشکل می باشد و احتمال اشتباه وجود دارد. 5الگوی ژنومی حاصل در این مطالعه هیچ شباهتی با سویه های استاندارد مایکوباکتریوم توبرکلوزیس نداشتند.

با توجه به اهمیت بیماری زایی مایکوباکتریوم در ماهیان پرورشی و در کشور ایران تاکنون هیچ گونه تحقیق منسجمی در این زمینه انجام نگردیده چند نوبت PCR با استفاده از پرایمرهای 16SrRNA وhsp65انجام گرفت. تمامی13جدایه نمونه برای Sequencing انتخاب شدوجهت تعیین توالی نوکلئوتیدی،با هماهنگی های انجام شده بین سرم سازی رازی و شرکت ماکروژن نمونه ها به کشور کره ارسال گردید. در نهایت بعد از خوانش نوکلئوتید ها، هر13 نمونه با پرایمر HSP65 و16S rRNAو ITSتعیین توالی شد)پرایمر HSP65 در حین مراحل تحقیق، همواره نتایج بهتری در بر داشت(، که در پیوست آمده است.

با استفاده از نرم افزار های Chromas،Clustal x ،Clustal w ،Gene runner ، Blastn تک تک نوکلئوتیدها مورد تفسیر قرار گرفت و در قالب فرمت fasta به نمایش در آمد، سپس به دلیل در دسترس نبودن ژنوم کامل مایکوباکتریوم فورتوئیتوم، با استفاده از تعداد زیادی از سویه های ثبت شده مایکوباکتریوم فورتوئیتوم درGene bank مقایسه وAlignment گردید که از این 13 جدایه2 نمونه از مایکوباکتریوم های تعیین توالی شده، کاملا با مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و2 نمونه با مایکوباکتریوم مارینوم مطابقت داشت. جهت اطمینان بیشتر مرتب بودن توالی ها با برنامه نرم افزاریClustal w مجددا تائید شد.

این بررسی نشان داد که بهترین روش برای تعیین هویت و شناسایی سویه های مایکوباکتریوم تعیین توالی نوکلئوتیدی می باشد، زیرا قابلیت مقایسه سویه مورد نظر با دیگر سویه های مشابه راامکان پذیر می سازد و میزان قرابت گونه ای را نیز، می توان به راحتی با برنامه Blast n تخمین زد و نیازی به استفاده از پرایمرهای مختلف نمی باشد، همچنین این مطالعه روشن نمود که جواب آزمون هایPCR مختلف برای تعیین سویه همواره صادق نیست و برخلاف انتظار خیلی از این تست ها اختصاصی عمل نمی کنند و امکان آلودگی یا کراس در این تست ها همیشه وجود خواهد داشت که نتیجه را تغییر می دهد و ممکن است مانند این تحقیق کمی با تعیین توالی نوکلئوتید ها مغایرت داشته باشد. قابل ذکر است با توجه به آلودگی در بین نمونه های جداشده از ماهیان پرورشی در این مطالعه 2 مورد مایکوباکتریوم مارینومی جدا گردید واین سویه عامل بیماری گرانولوم استخرشنا می باشد واز آنجاکه وجود گرانولوم در دست و پای افراد و تائید باسیل اسید فست بودن با اکتفا به لام های رنگ آمیزی که تاکنون چندین مورد در کشورمان گزارش گردیده، دلیل محکمی مبنی بر وجود مایکوباکتریوم مارینوم می باشد و تحقیقات بیشتری را در این زمینه، طلب می نمایدو همچنین وارد شدن ماهیان آلوده در زنجیره غذایی انسان و ارتباط آن با تغذیه ،انجام تحقیقات جدی و گسترده ای را در سراسر کشور الزامی می دارد.

**پیشنهادات**

1-در ابتدا پیشنهاد می شود با توجه به اهمیت این تحقیق، این بررسی ها در نقاط دیگرکشور نیزانجام شود. و حتما مطالعات همراه با مارکر های ژنتیکی دیگر (مثل پروب اختصاصی مایکوباکتریوم فورتوئیتوم و مایکوباکتریوم مارینوم) بکارگرفته شود.

2- پیشنهاد دیگر اینکه با توجه به عدم یک برنامه کامل جهت ریشه کنی سل در ماهیان پرورشی در ایران انجام تحقیقات مولکولار اپیدمیولوژی در سراسرکشوربه طور حتم صورت گیرد.

3-به دلیل مسری بودن این بیماری و انتقال در انسان ها و ایجاد گرانولوم استخر شنا وآلودگی آب استخرها نظارت دقیق تر و بیشتر بهداشتی براستخر های شنا توصیه می شود.

4-با توجه به اهمیت فراوان تحقیق صورت گرفته در ایران و شناسایی بیماری در آبزیان و قدرت بالای انتقال آن به انسان بررسی روی ماهیان وحشی وماهیان آب شور مناطق مختلف کشور پیشنهاد می شود**.**

5- پیشنهاد می شود که احتمال جداسازی مایکوباکتریوم های خطرناک، از ماهیان مورد توجه قرار گیردو همواره در هنگام جداسازی اولیه در محیط کشت تمام نکات ایمنی در روند کشت رعایت گردد.

6-در انتهاباتوجه به اینکه این تحقیق بر روی ماهیان خوراکی انجام شده وارتباط مستقیم آن با بهداشت انسان نظارت های سازمان بهداشت بر مراکز پرورش و فروشگاه های عرضه کننده ماهی به طور جدی توصیه می گردد.

**منابع فارسی׃**

1- برومند، احمدرضا، 1372، روش های آزمایشگاهی جهت جداسازی و تعیین هویت مایکوباکتریوم ها، انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت، درمان وآموزش پزشکی، صفحه80 -55

2- تاج بخش، حسن1366، باکتری شناسی عمومی، انتشارات تهران، صفحه 60-96

3- مصوری، نادر 1385، بررسی پلی مورفیسم سویه های مایکوباکتریوم بوویس جداشده از نمونه های ارسالی به موسسه رازی با استفاده از RFLPوDNAهیبریداسیون، پایان نامه دوره دکترای تخصصی میکروبیولوژی، دانشکده دامپزشکی شهید چمران اهواز.

4- مصوری وهمکاران، 1387، تشخیص ملکولی جدایه های گاوی مایکوباکتریوم بویس از جدایه های انسانی مایکوباکتریوم توبرکلوزیس در ایران به روش PCR-RFLP و مقایسه با 5 سویه استاندارد.

5- میر خلف، حمید (1373)، آدنیت سلی در انسان و رابطه آن با سل گاوی، پایان نامه دوره دکترای حرفه ایدامپزشکی، دانشگاه تهران، شماره 2255، صفحه 1-14

6- نبی پور، ایر ج1387، پزشکی دریایی، دانشگاه علوم پزشكي و خدمات بهداشتي درماني بوشهر

7- ولایتی، علی اکبر1366، بیماری سل، صفحات: 1- 20 (مرکز نشر دانشگاهی)

8-چهراقی سیدعلی. اویسی بهروز. "تشخیص شما چیست ؟ ". فصلنامه بیماری های پوست. تابستان1383 .277-274

9-قاضی سعید کیومرث. هاشم زاده رقیه، مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی، شماره2. صفحات 60-62

10-پیغان رحیم. حیدری بختیار، مجله تحقیقات دامپزشکی، 1391، شماره4 ،353-358

11-اکبری شیرین. مصوری نادر، مجله میکروب شناسی، شماره 12،پاییز 1390

منابع انگلیسی:

12-Alexander, Bob (November 2005). ["The first Parlour Aquariums and the Victorian Aquarium Craze"](http://www.parlouraquariums.org.uk/Papers/b%20AQUARIUM%20HISTORY/History%20Papers/Parlour%20aquarum.htm). History of parlour aquarium. parlouraquariums.org.

[13-Ang, P., Rattana-Apiromyakij, N. and Goh, C.-L. "Retrospective study of *Mycobacteriummarinum* skin infections". International Journal of Dermatology. 2000. Volume 39. p. 343-347.](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-4362.2000.00916.x/full)

14-Antonio D.B., Swanson C., Cech J.J., Mager R.C., Doro­shov S., Hedrick R.P. (2000). Prevalence of *Mycobacte­rium* in wild and captive delta smelt. Calif. Fish Game, 86,p. 233–243.

15-Aronson JD. Spontaneous tuberculosis in saltwater fish. Infectious Diseases 1926; 39: 315–320.

16-Astrofsky K.M., Schrenzel M.D., Bullis R.A., Smolowitz R.M., Fox J.G. (2000). Diagnosis and management of atypical *Mycobacterium* spp.61-30.

17-Austin, B. and Austin, D.A. (2007), Bacterial Fish Pathogens, 3rd edn. Chichester, UK: Springer Praxis.1-100.

18-AYELE, W. Y., MACHACKOVA, M. & PAVLIK, I. (2001). The transmission andimpact of paratuberculosis infection in domestic and wild ruminants. Vet. Med.-Czech, 46, 205–224

19-Bataillon E., Dubard R., Terre U. (1897). Un nouveau type de tuberculose. C. R. Soc. Biol., 49, 446–449.

20-[Boer AS](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22de%20Boer%20AS%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Borgdorff MW](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Borgdorff%20MW%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus),  [Haas PE](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22de%20Haas%20PE%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Nagelkerke NJ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22Nagelkerke%20NJ%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [Embden JD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22van%20Embden%20JD%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus), [van Soolingen D](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?Db=pubmed&Cmd=Search&Term=%22van%20Soolingen%20D%22%5BAuthor%5D&itool=EntrezSystem2.PEntrez.Pubmed.Pubmed_ResultsPanel.Pubmed_DiscoveryPanel.Pubmed_RVAbstractPlus).Analysis of rate of change of IS6110 RFLP patterns of *Mycobacterium tuberculosis* based on serial patientisolates. [Infectious Diseases](javascript:AL_get(this,%20'jour',%20'J%20Infect%20Dis.');).1999, 180(4):1238-44

21-Brunner, Bernd (2003). The Ocean at Home. New York: Princeton Architectural Press. pp. 21–2

22-Brand, N.J, vallins. W.J, Yacoub, M. and Barton, P.J.R. (1991). The polymerase chain reaction andits applications to basic research in molecular biology. In Genetic Manipulation: techniques andapplication. Grange JM, Fox A, Morgan NL. (Eds). Oxford: Blackwell.p279-293

23-Bull, T.J and Shanson, D.C (1992). Rapid misdiagnosis by*Mycobacerium avium*intracellularBull, T.J and Shanson, D.C (1992) Rapid misdiagnosis by *Mycobaceriumavium* intracellularemasquerading astuberberculosis PCR/DNAprobe tests.Lancet 340:1360

24-Cennimo DJ, Agag R, Fleegler E, et al. (2009). "*Mycobacterium marinum* Hand Infection in a "Sushi Chef"". Eplasty 9: 43.

25-Cheung I, Wilson A*. Mycobacterium fortuitum* infection following total knee arthroplasty:a case report and literature review. Knee. 2008; 15:61-3.

26-Cloud JL, Meyer JJ, Pounder JI, Jost KC, Jr., Sweeney A, Carroll KC, Woods GL. *Mycobacterium arupense* sp. nov., a non-chromogenic bacterium isolated from clinical specimens. Int J Syst Evol Microbiol. 2006;56:1413–1418. doi: 10.1099/ijs.0.64194-0

27-Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.VEiglmeier K., Gas S., Barry C.E., Tekaia F., Badcock K., Basham D., Brown DChillingwort T., Conner R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N.,Holroyed S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., McLean J., Moule S., Murphy L., OliverK., Osborne J., Quail M.A., Rajandream M.A., Roger J., Rutter S., Seeger K., Skelton JSquares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. & Barrell B.G. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genomesequence. Nature, 393: 537-544.

28-Cole S.T. Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. JClin Microbiol. 2002; 148(Pt 10):2919-28

29-Collins, C. H. 1985. *Mycobacterium marinum* infections in man. J Hyg Camb 94:135-149.

30-Collins, D. M., and Stephens, D.M. 1991. Identification of insertion sequence, IS1081, inMycobacterium *bovis*. FEMS Lett. (83): 11-16.

**31-Collins, D. M. (1999). DNA typing of *Mycobacterium bovis* strains from the Castlepoint area of the Wairarapa. N. Z. vet. J., 47: 207-20**

32-Collins C. H., Grange J.N., Yates M.D.(1997).Tuberculosis Bacteriology. 2 nd ednOxford: Butter word- Heinemann. Pp. 110-117

33-Cousins D., Williams S., Liebana E., Aranaz A., Bunschoten A., van Embden J.D.A. & Ellis T(1998). Evaluation of four DNA typing techniques in epidemiological investigations of bovinetuberculosis. Journal of Clinical Microbiology (36): 168-178.

**34-Cousins, D. V., S. N. Williams, B. C. Ross, and T. M. Ellis.** 1993. Use of a repetitive elementisolated from *Mycobacterium tuberculosis* in hybridization studies with *Mycobacterium bovis*: a new tool for epidemiological studies of bovine tuberculosis. Vet. Microbiol. 37:1-1

35-Cousins D.V. (2001). *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. In Mycobacterial infections in domestic and wild animals (E.J.B. Manning & M. T. Collins, Eds). Revue Scientifique et Technique, Office Internation Des Epizooties  20 (1):71-85.

36-Cox, R. and S. M. Mirkin. 1997. Characteristic enrichment of DNA repeats in different genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences 94:5237-5242.

37-Crosswell,Tom (2009). ["Advanced filtered bowl aquariums - biOrb Aquariums"](http://www.reef-one.com/technology). Reef-one.com.

38-Daoust P.Y., Larson B.E., Johnoson G.R. (1989): Mycobac­teriosis in yellow perch (*Perca flavescens*) from two lakes in Alberta. J. Wild. Dis., *25*, 31–37.

39-Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F. Piscine mycobacteriosis:a literature review covering the agent andthe diseases it causes in fish and humans. Vet Micro2004;99:159-166.

40-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (2000). List of microbial general Mycobacterium (bacteria). Website:

http://www.dsmz.de/species/gn250376. htm (document accessed on 19 December 2000).

41-Deutekom H, Gerritsen J, Soolingen D. A molecular epidemiology approach to studying transmission of tuberculosis in Amsterdam Journal of Infection Disease. 1997; 1071-1077

42-Diamant A., Banet A., Ucko M., Colorni A., Knibb W., Kvi􀄴 H. (2000): Mycobacteriosis in wild rabbitfish *Si­ganus rivulatus* associated with cage farming in the Gulf

43-DICKENSON. (1996) BBL.MGITproduct for theDetection of Mycobacteria. 88- 0950

44-Doucette K and Fishman JA. Nontuberculous mycobacterial infection in hematopoietic stem cell and solid organ transplant recipients. Clin Infect Dis, 2004; 38:1428–39.

45-Douglas MG, Cyr DM, Langer T (1994). "DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70". Trends Biochem. Sci. 19 (4): 176

46-Durr P.A., Clifton-Hadley R.S. & Hewinson R.G. (2000). Molecular epidemiology of bovintuberculosis.II. Applications of genotyping. Revue Scientifique ET Technique, Office InternationDes Epizooties 19 (3): 689-701

47-Dye C, Espinal MA, Watt CJ, Mbiaga C and William BG. World wide incidence of multidrug resistant tuberculosis. Journal of Infection Disease, 1197-1202

48-Emerson, Jim (1999-08-01). ["Aquarium Hobbyists"](http://directmag.com/mag/marketing_aquarium_hobbyists/). Retrieved 2007-05-02

49-EPIZOOTIES, O. I. D. (2004) Manual of standards for Diagnostic Tests and Vaccine. IN EPIZOOTIES, O. I. D.

50-Fabroni C, Buggiani G, Lotti T. Therapy of environmental mycobacterial infections. Dermatol Ther. 2008; 21(3):1

51-Fang Z and Forbes KJ. *Mycobacterium tuberculosis* IS6110 Preferential Locus for Insertiointo the genome. Journal of clinical Microbiology. 1997; 35(2), 476-481

52-Gauthier, D. T., and M. W. Rhodes. 2009. Mycobacteriosis in fishes: a review. Veterinary Journal 180:33–47.

53-Ghazi-saeed K, Mohammadi M.,1997. Some of different types of mycobacteria in sediments of fish breeding pools of north of Iran. Journal of medical Faculty. 3,4: 45-49.

54-Ghaemi E. O, Ghazesaeed K, Fatemi Nasab F, Hashemzade Z, Vtani Sh, Mohamedi M, Mansourian A.R (2006) *Mycobacterium marinum* in caviar fishes and fisherman’s in a Caspian Sea Province in north of Iran. Journal of biological sciences. 6(6): 1150-1152

55-Goodfellow M. & Wayne L G. (1982). Taxonomy and nomenclature. In The biology of the mycobacteria, Vol. 1. Physiology, indentification and classification (C. Ratledege& J .Stanford,Eds) Acadmic press,Londen, 471 – 521.

**56-Haas, W. H., W. R. Butler, C. L. Woodley, and J. T. Crawford.** 1993. Mixed-linker polymerase chain reaction: a new method for rapid fingerprinting of isolates of the *Mycobacterium tuberculosis*complex. Journal of Clinical Microbiology (31):1293-1298.

57-Hatami H. Epidemiology and control of tuberculosis. Hatami H, Razavi M, Eftekhar AH, editors. Text book of public health. 2nd ed. Tehran: Ministry of Health; 2006: 1121-1139.

58-Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. Mol Cell Probes. 2004; 18:59–65. Doi: 10.1016/j.mcp.2003.09.003

59-Han, X.Y., De, I., Jacobson, K.L., 2007. Rapidly growing mycobacteria clinical and microbiologic studiesof 115 cases. Am. J. Clin. Pathol. 128, 612–621.

60-Heifets LB, and Good RC, (1994). Current laboratory methods for the diagnosis of tuberculosis.In: Bloom BR, ed. Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington DC; AmericanSociety for Microbiology. 1994; pp85-1

61-Hermans PW, Van Soolingen D, Bik EM. Insertion element IS987 from *Mycobacterium bovisBCG* is located in a hot spot integration region for insertion elements in Mycobacteriumtuberculosis complex strains. *Infect Im62*

62-Hillemann D, Weizenegger M, Kubica T, Ritcher E. (2005). Use of the genotype MTBDR assayfor rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*complexisolates. J. Clin. Microbiol. 43(8): 3699-3703

63-Hooper L.C., Johnson M.M., Khera V.R. &Barrow W.W. (1986). Macrophage uptake and retention ofradiolabeled glycopeptidolipid antigens associated with the superficial L1 layerM*ycobacterium intracellular* serovar 20. Infection Immunology (54): 133-141.

64-Homolka S, Post E, Oberhauser B, Garawani George A and et al. High genetic diversity among*Mycobacterium tuberculosis* complex strains from S5-Huminer, D., S. D. Pitlik, C. Block, L. Kaufman, S. Amit, and J. B. Rosenfeld. 1986. Aquarium-borne *Mycobacterium marinum* skin infection.32, 733-9

65-Huard, R. C., L. C. Lazzarini, et al. (2003). "PCR-based method to differentiate the subspecies of the *Mycobacterium tuberculosis* complex on the basis of genomic deletions." J Clin Microbiol 41(4): 1637-50.

66-ICHIYAMA, S., SHIMOKATA, K. & TSUKAMURA, M. (1988). The isolation of *Mycobacterium avium* complex from soil, water, and dusts. Microbiol Immunol, 32, 733-9

67-Jarlier V & Nikaido, H. (1994). Mycobacterium cell wall: structure and role in nature resistance to antibiotics FEMS Microbiology Letters (123):11-18.

68-J. F. Rahier, S. Ben-Horin, Y. Chowers, et al., “European evidence-based Consensus on the prevention, diagnosis and management of opportunistic infections in inflammatory bowel disease,” Journal of Crohn's and Colitis, vol. 3, no. 2, pp. 47–91, 2009.

69-Jing C, Anthony G, Tsalaki X, Jian M, Qian G. Deletion targeted Multiplex PCR (DTM\_PCR) for identification of Beijing/W genotypes of *Mycobacterium tuberculosis*,tuberculosis.2007;87(5):446-449

70-KalkutG. (2000).The classroom: interdiction to tuberculosis and anti – tuberculosis therapy. (Documentaccessed on 19 December 2000)

71-Kane, A.J., Gonzalez, J. F., Reimschuessel, R: "Fish and Amphibian Models Used in Laboratory Research". Laboratory Animal. Vol 25:6(1996), pp 33-38

72-Kingson, Jennifer A. (August 19, 2010). ["The Six-Figure Fish Tank Catches On"](http://www.nytimes.com/2010/08/19/garden/19aqua.html). New York Times. p. D1. Retrieved August 22, 2010.

73-Kiesch N. (2000). Aquariums and mycobacterioses. Rev. Med. Brux., *21*, 255–256.

74-Kox, L. F. F., S. Kuijper, and A. H. J. Kolk. 1995. Early diagnosis of tuberculous meningitis by polymerase chain reaction. Neurol 45:2228-2232

75-Kulaga S, Behar MA and Schwartzman K. Genetic fingerprinting in the study of *tuberculosis*transmission. 1999; (36:2), 1163 – 1169

76-Kusuda R., Kawai K. (1998). Bacterial diseases of cultured marine fish in Japan. Fish Pathol.*33*, 221–227.

77-Limeschenko E,Tsalaki X, Jian M, Qian G. *Hand book of TB*, 2008, 610-616

78-List of prokaryotic names with standing in Nomenclature (LPSN), 2010.

79-Martinez-Yamout, M.; Legge, G. B.; Zhang, O.; Wright, P. E.; Dyson, H. J. (2000). "Solution Structure of the Cysteine-rich Domain of the Escherichia coli Chaperone Protein DnaJ

80-Mcfadden,J.J., Van Der Giessen, J.W.B.,Haring, R.M. and Van Der Zeijst,B.A.M.(1994) Comparison of the 23S ribosomal RNA genes and the Spacer region between the 16S AND 23s rRNA genes of the closely related *Mycobacterium avium* and mycobacterium para tuberculosis and the fast growing *Mycobacterium phlei* . Journal of General Microbiolgy , 140:1103-1108

81-Milan J, Hauge K, Natalia E and et al. Expanded Geographical Distribution of the N Family of *Mycobacterium tuberculosis* Strains within the United States. Journal of clinical microbiology.2004; 1064-1068

82-Montali R.J., Mikota S.K. & Cheng L.1. (2001). *Mycobacterium tuberculosis* in zoo and wildlife species. In Mycobacterial infections in domestic and wild animals (E.J.B. Manning & M. T. Collins, Eds). Revue Scientifique et Technique, Office Internation Des Epizooties 20(1): 291-303.

83-Murry M and Nardell E. Molecular epidemiology of *tuberculosis*: achievements and challenges to current knowledge, Bullentin of the world Health organization. 2002; (80) 477 – 482

84-Nikolayevskyy V, GopaulK, BalabanovaY, Brown, T, Fedorin, I and Drobniewski F.Differentiation of tuberculosis strains in a population with mainly Beijing-family strains.[Emerging Infectious Diseases](http://www.encyclopedia.com/Emerging+Infectious+Diseases/publications.aspx?pageNumber=1) . 2006; 12(9):1406-13

85-Noga E.J. (1995). Fish disease. Diagnosis and treatment. 1st ed. Mosby. 367 pp.

86-Novotny L., Dvorska L., Lorencova A., Beran V. & Pavlik I. (2004) Fish: a potential source of bacterial pathogens forhuman beings. Veterinarni Medicina 49, 343–358

87-Office Internation Des Epizooties ;(2001) Revue Scientifique et TechniqueVolume20(1), April21-54

88- ["On the increase of Madrepores"](http://books.google.com/books?id=CrBMAAAAYAAJ&lpg=PA449&ots=wRUXd0ykn7&dq=anne%20thynne%20zoology&pg=PA449#v=onepage&q&f=false). The Annals and magazine of natural history (London: Taylor and Francis) 3 (29): 449–461. 1859.

89-O'Reilly L.M. & Daborn C.J. (1995). The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: a review. Tubercle & Lung Diseases 76 (Suppl. 1): 1-4

90-Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J. & Portaels, F***.(****2007****).***Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.; 76(5): 538-7.

91-Pearson SH, Shenenberger DW. Painful erythematous nodules. *Mycobacterium marinum*. Am FAM Physician. 2007; 76(5): 697-8.

92-Rastogi, N.; Legrand, E.; Sola, C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature andpathogenesis. Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties. 2001. 20 (1)21-54.

93-Rastogi, N. & McFadden J.J. (1992). 8th forum in microbiology - mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune systemResearch Microbiology (143): 361-436

94-Rahbar M, Lamei A, Babazadeh H, Afshar-Yavari Sh, 2010. Isolation of rapid growing mycobacteria from soil and water in Iran. African Journal of Biotechnology 9(24), 3618-3621.

95-Roberts R.J: *Fish Pathology*, Bailliere Tindall, London, Second edition, 1989. Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K., Dwyer, B. (1992). Molecular cloning of a highly repeated DNA element from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. Journal of Clinical Microbiology (30): 942-946

96-Rodgers C.J., Furones M.D. (1998). Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean. Fish Pathol.33, 157–164.

97-Rogall, T., J. Wolters, E. C. Böttger, and T. Flohr. 1990. towards a phylogeny and definition of species at the molecular level within the genus Mycobacterium. Int J Syst Bacteriol 40:323-330.

98-Ross, B.C., Raios, K., Jackson, K., Dwyer, B. (1992). Molecular cloning of a highly repeated DNAelement from *Mycobacterium tuberculosis* and its use as an epidemiological tool. Journal of ClinicalMicrobiology (30): 942-946

99-Salfinger, M .and Pfyffer, G.E. (1994).The new diagnostic mycobacteriology laboratoryEuropean Journal of Clinical Mycobacteriology and Infections diseses, 13: 961-979

100-Segundo A, Mario H, Rosario D. Evaluation of Henes - PCR Assay for MycobacteriumDetectionin Different Clinical Specimens From Patients With or Without Tuberculosis*-*Associated HIVInfection, Journal of Clinical Laboratory Analysis, 2000, 14:238–245

101-Shinnick T.M & Good R.C. (1994). Mycobacterial taxonomy. Eur. J. clin. Microbiol. Infect. Dis., 13: 884-901

102-Shitaye, E.J., Grymova, V., Grym, M., Halouzka, R., Horvathova, A., Moravkova, M., Beran, V., Svobodova, J., Dvorska-Bartosova, L., Pavlik, I., 2009. *Mycobacterium avium*subsp hominissuis Infection in a PetParrot. Emerg. Infect. Dis. 15, 617–619.

103-Smith S.A. (1997): Mycobacterial infections in pet fish. Semin. Av. Exot. Pet. Med., *6*, 40–45.

104-Streit M, Bregenzer T, Heinzer I. Hautinfektionen durch atypische Mykobakterien. Hautarzt. 2008; 59(1):60-89

105-Stackebrandt E, Rainey F. A. & Ward \_ Rainey N. L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria, classis now. International Journal of Systematic Bacteriology (47): 479-491

106-Tautz, D. and C. Schlotterer. 1994. Simple sequences. Curr Opin Genet Dev 4:832-837

107-Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Bottger EC, 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

108-Tran H, Kamino H, Walters RF. *Mycobacterium marinum* infection. Dermatol Online J 2008; 14: 7

109-Tuberculosis status, Center for Disease Control and Prevention (Division of TB and Leprosy Elimination), ministry of health and medical education, Iran, Availabl athttp://www.cdc.hbi.ir (Accessed March2011). (Persian)

110-Turenne C, Chedore P, Wolfe J, Jamieson F, May K, Kabani A. Phenotypic and molecular characterization of clinical isolates of Mycobacterium elephantis from human specimens. J Clin Microbiol. 2002; 40:1230–1236. Doi: 10.1128/JCM.40.4.1231-1236.2002

111-Van Soolingen D. Molecular epidemiology of tuberculosis. Journal of Inter.Medicine. 2001;249(1):1-26

112-Van Soolingen D., Hermans P.W.M., de Haas P.E.W. & van Embden J.D.A. (1992). Insertion element IS1081 associated restriction fragment length polymorphism in *Mycobacterium tuberculosis* complex species: a reliable tool for recognizing *Mycobacterium bovis* BCG. Journal of clinical Microbiology (30): 1772-1777.

**113-Van Soolingen D., T. Hoogenboezem, P. E. W. de Haas, P. W. M. Hermans, M. A. Koedam, K. S. Teppema, P. J. Brennan, G. S. Besra, F. Portaels, J. Top, L. M. Schouls, and J. D. A. van Embden.**(1997). A novel pathogenic taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* complex, canettii: characterization of an exceptional isolate from Africa. International Journal of Systematic Bacteriology (47): 1236-1245.

1141-VON REYN, C. F., MASLOW, J. N., BARBER, T. W., FALKINHAM, J. O., 3RD & ARBEIT, R. D. (1994). Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. Lancet, 343, 1137-41.

115-Wayne L.G., Kubica G.P. (1986). Genus MycobacteriumLehmann and Neumann 1896, 363AL. In: Sneath P.H.A., Mair N.S., Sharpe M.E., Holt J.G. (eds.): Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, 2*.* The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 1436–1457.

116-Wendt, J. R., R. C. Lamm, D. I. Altman, H. G. Cruz, and B. M. Achauer. 1986. An unusually aggressive *Mycobacterium marinum* hand infection. J Hand Surg 11A:753-755.

117-WHO. Global Tuberculosis control: A short update to the 2009 report. Geneva World Health Organization; available at:

<http://www.who.int/tb/publications/global/> accessed Jan 2010

118-Winthrop KL, Albridge K, South D, Albrecht P, Abrams M, SamuelMC, et al. The clinical management and outcome of nailsalon–acquired *Mycobacterium fortuitum* skin infection. Clin InfectDis. 2004;38:38–44. Epub 2003 Dec 08.

119-Wolinsky E. Nontuberculous mycobacteria and associationdiseases. *Am Rev Respir Dis* 1979; 119: 107–159.

120-Wolf J.C., Smith S.A. (1999). Comparative severity of experimentally induced mycobacteriosis in striped bass Morone saxatilisand hybrid tilapia *Oreochromis* spp. Dis. Aquat. Org., *38*, 191–200.

121-World Health Organization. Tuberculosis MDR-TB & XDR-TB 2011. Progress Report. Available at:

<http://www.who.int/tb/challenges/mdr/factsheet_mdr_progress_march2011.pdf>

122-World Health Organization. Stop Tuberculosis. TB situation in the region Geneva. 2009. Available at:

[http://www.emro.who.int/STB/tbsituationregionalprofile- epidemiology.htm](http://www.emro.who.int/STB/tbsituationregionalprofile-%20epidemiology.htm)

123-Yip, M.J., Porter, J.L., Fyfe, J.A.M., Lavender, C.J., Portaels, F., Rhodes, M., Kator, H., Colorni, A., Jenkin., G.A., Stinear, T. 2007. Evolution of *Mycobacterium ulcerans* and Other Mycolactone-Producing Mycobacteria from a Common *Mycobacterium marinum* Progenitor. J Bacteriol. 189(5):2021-2029

124-Zanoni RG *et al*. 2008. Occurrence of *Mycobacterium* spp. in ornamental fish in Italy. J Fish Diseases 31: 433-441.

125-E. Skin disease and Nontuberculous mycobacterium. ***Int JDermatol.*** 2000; 39: 659.

126- Cosma CL, Sherman DR, Ramakrishnan

L. The secret lives of the pathogenic

mycobacteria. Ann Rev Microbiol. 2003;

57: 641-76.

127-Freedberg IM, Elsen AZ. Fitzpatrick’s

Dermatoloyy in General medicine. 2004;

2: 1946-47.

129-Rastogi, N. & McFadden J.J. (1992). 8th forum in microbiology - mycobacteria and AIDS: epidemiological and genetic markers, virulence factors and interactions with the immune system. Research Microbiology (143): 361-436.

129-Rothschild BM, Martin LD, Lev G et al. (August 2001). ["Mycobacterium tuberculosis complex DNA from an extinct bison dated 17,000 years before the present"](http://www.journals.uchicago.edu/cgi-bin/resolve?CID001531). Clin. Infect. Dis.33 (3): 305–11. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1086/321886](http://dx.doi.org/10.1086%2F321886). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [11438894](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11438894). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

130-Pearce-Duvet J (2006). "The origin of human pathogens: evaluating the role of agriculture and domestic animals in the evolution of human disease". Biol Rev Camb Philos Soc81 (3): 369–82. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1017/S1464793106007020](http://dx.doi.org/10.1017%2FS1464793106007020). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [16672105](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16672105).

131-127Comas, I; Gagneux, S (2009 Oct). "The past and future of tuberculosis research.". PLoS pathogens5 (10): e1000600. [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [19855821](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19855821). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js));Check date values in: |date= ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

132-Zink A, Sola C, Reischl U, Grabner W, Rastogi N, Wolf H, Nerlich A (2003). ["Characterization of Mycobacterium tuberculosis Complex DNAs from Egyptian Mummies by Spoligotyping"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149558). J Clin Microbiol41 (1): 359–67. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1128/JCM.41.1.359-367.2003](http://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.41.1.359-367.2003). [PMC](http://fa.wikipedia.org/wiki/PubMed_Central) [149558](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149558). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [12517873](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517873).

133-[The Chambers Dictionary.](http://books.google.ca/books?id=pz2ORay2HWoC&pg=RA1-PA352). New Delhi: Allied Chambers India Ltd. 1998. p. 352. [ISBN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Book_Number) [978-81-86062-25-8](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%88%DB%8C%DA%98%D9%87:%D9%85%D9%86%D8%A7%D8%A8%D8%B9_%DA%A9%D8%AA%D8%A7%D8%A8/978-81-86062-25-8).

134- Hippocrates.[Aphorisms.](http://web.archive.org/web/20050211173218/http:/classics.mit.edu/Hippocrates/aphorisms.mb.txt) Accessed 7 October 2006.

135-Konomi N, Lebwohl E, Mowbray K, Tattersall I, Zhang D (2002). ["Detection of Mycobacterial DNA in Andean Mummies"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154635). J Clin Microbiol40 (12): 4738–40. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1128/JCM.40.12.4738-4740.2002](http://dx.doi.org/10.1128%2FJCM.40.12.4738-4740.2002). [PMC](http://fa.wikipedia.org/wiki/PubMed_Central) [154635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC154635). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [12454182](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12454182).

136- Sledzik, Paul S.; Nicholas Bellantoni (June 1994). ["Bioarcheological and biocultural evidence for the New England vampire folk belief"](http://www.ceev.net/biocultural.pdf) (PDF). American Journal of Physical Anthropology94 (2): 269–274. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1002/ajpa.1330940210](http://dx.doi.org/10.1002%2Fajpa.1330940210). [ISSN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Serial_Number) [0002-9483](http://www.worldcat.org/issn/0002-9483). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [8085617](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8085617). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

137-Trail RR (April 1970). ["Richard Morton (1637-1698)"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1034037). Med Hist14 (2): 166–74. [PMC](http://fa.wikipedia.org/wiki/PubMed_Central) [1034037](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1034037). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [4914685](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4914685). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

138=Zur Pathogenie der Impetigines. Auszug aus einer brieflichen Mitteilung an den Herausgeber. [Müller’s] Archiv für Anatomie, Physiologie und wissenschaftliche Medicin. 1839, page 82.

139- [Kentucky: Mammoth Cave long on history.](http://edition.cnn.com/2004/TRAVEL/DESTINATIONS/02/26/mammoth.cave.ap/index.html)[CNN](http://fa.wikipedia.org/wiki/CNN). 27 February 2004. Accessed 8 October 2006.

140-McCarthy OR (August 2001). ["The key to the sanatoria"](http://www.jrsm.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=11461990). J R Soc Med94 (8): 413–7. [PMC](http://fa.wikipedia.org/wiki/PubMed_Central) [1281640](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1281640). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [11461990](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11461990). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

141-[Nobel Foundation](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Nobel_Foundation&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js). [The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1905.](http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1905/)Accessed 7 October 2006.

142-Waddington K (January 2004). ["To stamp out "So Terrible a Malady": bovine tuberculosis and tuberculin testing in Britain, 1890–1939"](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC546294). Med Hist48 (1): 29–48. [PMC](http://fa.wikipedia.org/wiki/PubMed_Central) [546294](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC546294). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [14968644](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14968644). Cite uses deprecated parameters ([help](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=%D8%B1%D8%A7%D9%87%D9%86%D9%85%D8%A7:CS1_errors&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js))

143-Bonah C (2005). "The 'experimental stable' of the BCG vaccine: safety, efficacy, proof, and standards, 1921–1933". Stud Hist Philos Biol Biomed Sci36 (4): 696–721. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1016/j.shpsc.2005.09.003](http://dx.doi.org/10.1016%2Fj.shpsc.2005.09.003). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [16337557](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16337557).

144-Comstock G (1994). "The International Tuberculosis Campaign: a pioneering venture in mass vaccination and research". Clin Infect Dis19 (3): 528–40. [doi](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=Digital_object_identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js):[10.1093/clinids/19.3.528](http://dx.doi.org/10.1093%2Fclinids%2F19.3.528). [PMID](http://fa.wikipedia.org/w/index.php?title=PubMed_Identifier&action=edit&redlink=1&preload=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%B3%D8%AA%D8%AE%D9%88%D8%A7%D9%86%E2%80%8C%D8%A8%D9%86%D8%AF%DB%8C&editintro=%D8%A7%D9%84%DA%AF%D9%88:%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87/%D8%A7%D8%AF%DB%8C%D8%AA%E2%80%8C%D9%86%D9%88%D8%AA%DB%8C%D8%B3&summary=%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF+%DB%8C%DA%A9+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D9%86%D9%88+%D8%A7%D8%B2+%D8%B7%D8%B1%DB%8C%D9%82+%D8%A7%DB%8C%D8%AC%D8%A7%D8%AF%DA%AF%D8%B1&nosummary=&prefix=&minor=&create=%D8%AF%D8%B1%D8%B3%D8%AA+%DA%A9%D8%B1%D8%AF%D9%86+%D9%85%D9%82%D8%A7%D9%84%D9%87+%D8%AC%D8%AF%DB%8C%D8%AF&withJS=MediaWiki:Intro-Welcome-NewUsers.js) [7811874](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7811874).

145-Bloom, editor, Barry R. (1994). Tuberculosis: pathogenesis, protection, and control. Washington, D.C.: ASM Press. [ISBN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Book_Number) [978-1-55581-072-6](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%88%DB%8C%DA%98%D9%87:%D9%85%D9%86%D8%A7%D8%A8%D8%B9_%DA%A9%D8%AA%D8%A7%D8%A8/978-1-55581-072-6).

146-Persson, Sheryl (2010). [Smallpox, Syphilis and Salvation: Medical Breakthroughs That Changed the World](http://books.google.ca/books?id=-W7ch1d6JOoC&pg=PA141). ReadHowYouWant.com. p. 141. [ISBN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Book_Number) [978-1-4587-6712-7](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%88%DB%8C%DA%98%D9%87:%D9%85%D9%86%D8%A7%D8%A8%D8%B9_%DA%A9%D8%AA%D8%A7%D8%A8/978-1-4587-6712-7).

147-editor, Caroline Hannaway, (2008). [Biomedicine in the twentieth century: practices, policies, and politics](http://books.google.ca/books?id=o5HBxyg5APIC&pg=PA233). Amsterdam: IOS Press. p. 233. [ISBN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Book_Number) [978-1-58603-832-8](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%88%DB%8C%DA%98%D9%87:%D9%85%D9%86%D8%A7%D8%A8%D8%B9_%DA%A9%D8%AA%D8%A7%D8%A8/978-1-58603-832-8).

148-Shields, Thomas (2009). [General thoracic surgery](http://books.google.ca/books?id=bVEEHmpU-1wC&pg=PA792) (7th ed. ed.). Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins. p. 792. [ISBN](http://fa.wikipedia.org/wiki/International_Standard_Book_Number) [978-0-7817-7982-1](http://fa.wikipedia.org/wiki/%D9%88%DB%8C%DA%98%D9%87:%D9%85%D9%86%D8%A7%D8%A8%D8%B9_%DA%A9%D8%AA%D8%A7%D8%A8/978-0-7817-7982-1).

149-David H.L., Ratogi N., Clavel-Seres S., Clement F. & Thorel M.F. (1987). Structure of the cell envelope of Mycobacterium avium. Zentralbl. Hyg. A, (264): 49-66.

150-collin C oh and et al(1985).mycobacterium marinum in men. J. hyg.camb

151-jernigan ja,farr BM.incubation period and sources of exposure for cutaneous mycobacteriummarinum infection; case report and review of the literature. Clin infect dis. 2000;31(2):439-43

152- alavi seyed mohamad. Nadimi mohamad .majale elmi olom pezeshki gorgan. Namber2.71-76

153-Hashemi-Shahraki A, Heidarieh P, Biranvand M,Zaker bostanabad S, Shikhi N, Hashemzadeh M, Karami M, Feizabadi M (January 2014). " Heterogeneity of Iranian clinical isolates of Mycobactrium fortuitum".

154-Shojaei H, Hidarieh P, Hashemi A, Feizabadi MM, DaeiNaser A.Species identification of neglected nontubercu lous mycobactria in developing country. Jan j Infect Dis 2011;64: 265-271

پیوست

**hsp652801<**

ATCGCCAAGGAGATCGAGCTCACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCCGCCTACTTCATGACCGACCCGGA

GCGTATGGAGGCCGTCTTCGACGACCCGTACATCCTGATCGTCAACAGCAAGATCTCGTC

GGTGAAGGACCTGCTCCCGATCCTGGAGAAGGTCATGCAGTCGGGCAAGCCGCTGCTGAT

CATCGCCGAGGACCTGGAGGGCGAGGCCCTCGCCACCCTGGTGGTCAACAAGATCCGCGG

CACCTTAAGTTGGGGATTTCCCGGCCCAGCGCGCCCCCTGTGTCTCATGTTGCCCACACG

TTGGTTGGCGACTCTTGAGAGACTGCCGGGTTCAACTCGAAAGAGGGGGGAATAACTCCA

AGCCTTCTGGCCCTTTAGTCCCGGGGTTCCACCATGGCAAAAAGGCCGGAAAAAAAGGGT

GCCAATCCCCTGGGGTTAACCAAACCCTTTAAACAAGATCCGCGGCACCTT

**hsp652802<**

ACAGCAATCGACAGCTAGAGCGCCTAGCTGGTCAAGAGGTCGCCACCAACACCGACGACG

TCGCGGGTGACGGC

ACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCACTGGTCAAGGAAGGCCTGCGCAACGTGGCC

GCCGGAGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGCGAAGATCACC

GAGGGTCTTCTCGCCCCGGCCGAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCGACCGCC

GGTATCTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTC

GGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTGGAGCTC

ACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCTGGCTACTTCGTCACCGACGCCGAG

CGTCAGGAAGCGGTCCTGGAGGACCCCTACATCCTGATGGTCAGCTCCAAGATCTCGACG

GTCAAGGACCTGCTGCCGTTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAAGCCGTTGCTGATC

ATCGCCGAGGACGTGGAGTGACGGCCGAGCGTCAGGAAGC

**hsp652803<**

ATGCCAACGAGAGATCGGCGCTGAGCTCGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGT

CGCGGGCGACGGCACCACCACCGCCACCGTTCTGGCACAGGCCCTGGTTCGTGAAGGTCT

GCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGT

CGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGAGCGCCAAGGAGGTGGAGACCAAGGAGCAGAT

CGCTGCCACCGCCGGTATCTCCGCCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGC

CATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGAGCAACACCTTCGGCCT

GCAGCTGGAGCTCACCGA

**hsp652804<**

ACGGTGGGTACTAGGTGTGGGTTTCCTTC

CTTTAGGGATCCGTGCCGTAGCTAACGCATTAAGTACCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCA

AGGCTAAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGCGGAGCATGTGGATTAAT

TCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGTTTGACATGCACAGGACGCCGGTAGAGATAT

CGGTTCCCTTGTGGCCTGTGTGCAGGTGGTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA

TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTCTCATGTTGCCAGCACGTAATGGT

GGGGACTCGTGAGAGACTGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCA

TCATGCCCCTTATGTCCAGGGCTTCACACATGCTACAATGGCCGGTACAAAGGGCTGCGA

TCCCGTGAGGGTTAGCGAATCCTTTAAAGCCGGTCTCAGTTCGGATTGGGGTCTGCAA

CGACCCCATGAAGTCGGAGTCGCT

**>hsp652805**

ATCGCCAAGGAGATCGAGCTCGGCATGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGAGAAGGTC

ACCGAGACGCTGCTGAAGACGGCCAAAGAGGTCGAGGCCAAGGAGCCAGATCGCGGCGAC

CGCCGGCATTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAG

GTGGGCAACGAGGGCGTCATCTAAGGGGAGGAGGACAACGTTATCGCCAAAGGGGATCGA

GCTCACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCCGCCTACTTCATGACCGACCCGGAGC

GTATGGAGGCCGTCTTCGACGACCCGTACATCCTGATCGTCAACAGCAAGATCTCGTCGG

TGAAGGACCTGCTCCCGATCCTGGAGAAGGTCATGCAGTCGGGCAAGCCGCTGCTGATCA

TCGCCGAGGACCTGGAGGGCGAGGCCCTCGCCACCCTG

**>hsp652806**

GGATCGCCAAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACCGACGACGTG

GCCGGTGACGGCACGACGACGGCCACCGTGCTGGCCCAGGCGCTGGTCAAGGAAGGCCTG

CGCAACGTTGCGGCCGGTGCCAACCCGCTCGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCAGTC

GAGAAGGTCACCGAGACCTTGCTCAAGTCGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATC

GCGGCGACCGCAGCCATCTCCGCCGGCGACCAGTCGATCGGCGACCTGATCGCCGAGGCG

ATGGACAAGGTGGGCAACGAGGGCGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTG

CAGCT

**>hsp652807**

GGATCGCCAAGAAGATCGGCGCTGAGCTGGTCAAGGAAGTTGCCAAGAAGACCGACGACGTG

GCCGGTGACGGCACGACGACGGCCACCGTGCTGGCCCAGGCGCTGGTCAAGGAAGGCCTG

CGCAACGTTGCGGCCGGTGCCAACCCGCTCGGTCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCAGTC

GAGAAGGTCGAGACCTTGCTCAAGTCGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATC

GCGGCGACCGCAGCCATCTCCGCCGGCGACCAGTCGATCGGCGACCTGATCGCCGAGGCG

ATGGACAAGGTGGGCAACGAGGGCGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTG

**hsp651221<**

ATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTCGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTC

GCGGGCGACGGCACCAACCACCGCCACCGTTCTGGCACAGGCCCTGGTTCGTGAAGGTCT

GCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGT

CGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGAGCGCCAAGGAGGTGGAGACCAAGGAGCAGAT

CGCTGCCACCGCCGGTATCTCCGCCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGC

CATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGAGCAACACCTTCGGCCT

GCAGCTGGAGCTCACCGAGGGTATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCGGGCTACTTCGT

GACCGACGCCGAGCGTCAGGAAGCCGTCCTGGAGGATCCCTACATCCTGCTGGTCAGCTC

CAAGGTCTCGACCGTCAAGGACCTGCTGCCGCTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAA

GCCGCTGCTGATCATCGCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGTCGACCCTGGTGG

**hsp652625<**

ATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCCTACGAGAAGATGGGCGCCGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGT

CGCGGGTGACGGCACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCACTGGTCAAGGAAGGCCT

GCGCAACGTGGCCGCCGGAGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGT

CGCGAAGATCACCGAGGGTCTTCTCGCCACGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGAT

CGCGGCGACCGCCGGTATCTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGC

CATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCT

GCAGCTGGAGCTCACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCTGGCTACTTCGT

CACCGACGCCGAGCGTCAGGAAGCGGTCCTGGAGGACCCCTACATCCTGCTGGTCAGCTC

CAAGATCTCGACGGTCAAGGACCTGCTGCCGTTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAA

GCCGTTGCTGATCATCGCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGAGCACCCTGGT

**hsp652121<**

ATCGCCAAGGAGATCGAGCTGGAGGACCCGTACGAGAAGATCGGCGCTGAGCTCGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTC

GCGGGCGACGGCACCAACCACCGCCACCGTTCTGGCACAGGCCCTGGTTCGTGAAGGTCT

GCGCAACGTCGCTGCCGGCGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGT

CGAGAAGGTCACCGAGACGCTGCTGAAGAGCGCCAAGGAGGTGGAGACCAAGGAGCAGAT

CGCTGCCACCGCCGGTATCTCCGCCGGTGACCAGTCCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGC

CATGGACAAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGAGCAACACCTTCGGCCT

GCAGCTGGAGCTCACCGAGGGTATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCGGGCTACTTCGT

GACCGACGCCGAGCGTCAGGAAGCCGTCCTGGAGGATCCCTACATCCTGCTGGTCAGCTC

CAAGGTCTCGACCGTCAAGGACCTGCTGCCGCTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAA

GCCGCTGCTGATCATCGCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGTCGACCCTGGTGG

**>hsp652797**

TGGCAAACTAGAGATCGGCGCCGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTCGCGGGT

GACGGCACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCACTGGTCAAGGAAGGCCTGCGCAAz

GTGGCCGCCGGAGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGCGAAG

ATCACCGAGGGTCTTCTCGCCACGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCG

ACCGCCGGTATCTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGAC

AAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTG

GAGCTCACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCTGGCTACTTCGTCACCGAC

GCCGAGCGTCAGGAAGCGGTCCTGGAGGACCCCTACATCCTGCTGGTCAGCTCCAAGATC

TCGACGGTCAAGGACCTGCTGCCGTTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAAGCCGTTG

CTGATCATCGCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGAGCACCCTGGT

**hsp65 2810<**

GTGCCATCGACAGATAGGCGCCGAGCTGGTCAAAGAGGTCGCCAAGAAGACCGACGACGTCGCGGGT

GACGGCACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCACTGGTCAAGGAAGGCCTGCGCAAC

GTGGCCGCCGGAGCCAACCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGCGAAG

ATCACCGAGGGTCTTCTCGCCACGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCG

ACCGCCGGTATCTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGAC

AAGGTCGGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTG

GAGCTCACCGAGGGCATGCGCTTCGACAAGGGCTACATCTCTGGCTACTTCGTCACCGAC

GCCGAGCGTCAGGAAGCGGTCCTGGAGGACCCCTACATCCTGCTGGTCAGCTCCAAGATC

TCGACGGTCAAGGACCTGCTGCCGTTGCTGGAGAAGGTCATCCAGTCCGGCAAGCCGTTG

CTGATCATCGCCGAGGACGTCGAGGGCGAAGCCCTGAGCACCC

**hsp652820<**

CCCGGCAGCAGACGACAGTCGCGCGAGTTGGTCTAGAGGTGGCGACGAAGACCGACGACG

TCGCCGGCGACGGCACCACCACCGCCACCGTGCTGGCCCAGGCGATGGTCCGCGAAGGCCTGCGCAACGTGATC

GCCGGAGCCATCCCGCTCGGCCTGAAGCGCGGCATCGAGAAGGCCGTCGCGAAGATCACC

GAGGGTCTTCTCGCCACGGCCAAAGAGGTCGAGACCAAGGAGCAGATCGCGGCGACCGCC

GGTATCTCCGCGGGCGACCAGACCATCGGTGACCTGATCGCCGAGGCCATGGACAAGGTC

GGCAACGAGGGTGTCATCACCGTCGAGGAGTCCAACACCTTCGGCCTGCAGCTGG

1. - Benjamin Marten [↑](#footnote-ref-1)
2. - Austin Flint [↑](#footnote-ref-2)
3. 3- Rivolta [↑](#footnote-ref-3)
4. 4-Maffuci [↑](#footnote-ref-4)
5. 5- Smith [↑](#footnote-ref-5)
6. - Mycobacterium [↑](#footnote-ref-6)
7. - Aquired Immunodefficiency Synderom [↑](#footnote-ref-7)
8. - M.leprae [↑](#footnote-ref-8)
9. - M. simiae [↑](#footnote-ref-9)
10. - M. xenopi [↑](#footnote-ref-10)
11. - M. smegmatis [↑](#footnote-ref-11)
12. - M. phlei [↑](#footnote-ref-12)
13. -M. avium- M.intracellular- M.scrofulaceum (MAIS) [↑](#footnote-ref-13)
14. -DNA-hybridisition [↑](#footnote-ref-14)
15. -Mycobacteria other than the M. tuberculosis complex [↑](#footnote-ref-15)
16. - Runyon [↑](#footnote-ref-16)
17. - Thiophen-2-Carboxylic Acid Hydrazine (TCH) [↑](#footnote-ref-17)
18. - Battey Bacillus [↑](#footnote-ref-18)
19. - Scrofula [↑](#footnote-ref-19)
20. - M. fortuitum [↑](#footnote-ref-20)
21. - M. lepraemurium [↑](#footnote-ref-21)
22. - M. marinum [↑](#footnote-ref-22)
23. - M. scrofulaceum [↑](#footnote-ref-23)
24. - M. silvaticum [↑](#footnote-ref-24)
25. - Lipopolysaccharide layer [↑](#footnote-ref-25)
26. - Rutheninum red [↑](#footnote-ref-26)
27. - GPLs or C-mycosides [↑](#footnote-ref-27)
28. - m-Fluoro–Phenyl Alanin [↑](#footnote-ref-28)
29. 30-Insertion sequense [↑](#footnote-ref-29)
30. -Spoligotyping [↑](#footnote-ref-30)
31. - Variable number tandem repeat [↑](#footnote-ref-31)
32. -Multiplex PCR [↑](#footnote-ref-32)
33. - Restriction Fragment Length Polymorphisms [↑](#footnote-ref-33)
34. -Southern blotting [↑](#footnote-ref-34)
35. - Restriction Endonuclease Analysis [↑](#footnote-ref-35)
36. 37- Restriction endonucleases [↑](#footnote-ref-36)
37. 38- Transposons [↑](#footnote-ref-37)
38. 39- Insertion sequences [↑](#footnote-ref-38)
39. 40- Jumping genes [↑](#footnote-ref-39)
40. 41-Van Soolingen [↑](#footnote-ref-40)
41. 42-Direct repeat (DR) sequences [↑](#footnote-ref-41)
42. 43-Spoligotyping [↑](#footnote-ref-42)
43. 44-Polymophic GC-rich Repeatative Sequences (PGRS)

    45-Van Embden [↑](#footnote-ref-43)
44. 46- Southern Blotting [↑](#footnote-ref-44)
45. 47- Chromogen digoxigenin [↑](#footnote-ref-45)
46. [↑](#footnote-ref-46)
47. -Polymorphic GC-rich Repeatative Sequences(PGRS) [↑](#footnote-ref-47)
48. 49- Direct repeat restriction fragment length polymorphism [↑](#footnote-ref-48)
49. 50-Spoligotyping [↑](#footnote-ref-49)
50. PCR51- [↑](#footnote-ref-50)
51. - Direct Repeat [↑](#footnote-ref-51)
52. -Direct Variable Repeat [↑](#footnote-ref-52)
53. - M. nonchromogenicum [↑](#footnote-ref-53)
54. - M. Hanaba

    56- M. malmosense [↑](#footnote-ref-54)
55. [↑](#footnote-ref-55)
56. 57- M. asiaticum [↑](#footnote-ref-56)
57. 58- M. shimoidei [↑](#footnote-ref-57)
58. -5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosohate (BCIP) [↑](#footnote-ref-58)
59. -NitroBlue Tetrazolium salt in dimethylformamide (NBT) [↑](#footnote-ref-59)
60. 61- Hexadecyl Trimethyl-Ammonium Bromide (Cetyltrimethylammonium bromide) (CTAB) [↑](#footnote-ref-60)
61. 62-Oleic Acid- Alanin- Dextrose-Catalase (OADC) [↑](#footnote-ref-61)
62. 63-Polymixin B, 6000 units-Amphotericin B 600 µg-Nalidixic Acid, 2400 µg –Trimethoprim, 600 µg – Azlocilin, 600 µg (PANTA) [↑](#footnote-ref-62)
63. 65-Deconex [↑](#footnote-ref-63)
64. -Sigma [↑](#footnote-ref-64)
65. -Sartorius [↑](#footnote-ref-65)
66. -Yellow Line [↑](#footnote-ref-66)
67. -Eppendorf [↑](#footnote-ref-67)
68. -Memmert [↑](#footnote-ref-68)
69. -Kia Gen [↑](#footnote-ref-69)
70. -BioRad [↑](#footnote-ref-70)
71. -Gerhardt [↑](#footnote-ref-71)
72. -Thermohybaid [↑](#footnote-ref-72)
73. -GFL [↑](#footnote-ref-73)
74. -TTL [↑](#footnote-ref-74)
75. -Lowenstein Jensen [↑](#footnote-ref-75)
76. -Herrold ‘s egg yolk Medium(Heym) [↑](#footnote-ref-76)
77. 83-**بافر**10 X TE: تریس HCl، دارای pH 8 با 100 میلی مول EDTA 10 میلی مول مخلوط و پس از اتوکلاو، در حرارت اتاق تا یکسال نگهداری می­شد. برای ساختن 1xTE، 10 میلی­­لیتر از محلول فوق را در 100 میلی لیتر آب مقطر رقیق و در حرارت اتاق تا یکسال نگهداری می­گردید. [↑](#footnote-ref-77)
78. 84- مخلوط SDS / پروتئیناز K:برای هر نمونه 5 میکرولیتر پروتئیناز K، 10 میلی گرم در میلی لیتر با 70 میکرولیتر SDS 10 % مخلوط می­گردید. [↑](#footnote-ref-78)
79. 85- محلول NaCl/CTAB: 1/4 گرم نمک (مرک p.a.)، در 80 میلی­لیتر آب مقطر حل می­گردید. سپس 10 گرمCTAB به آن اضافه می­شد. محلول تا 65 درجه گرم و حجم محلول با آب مقطر به 100 میلی لیتر رسانیده می­شد. محلول را می­توان به مدت 6 ماه در هوای اتاق نگهداری نمود. [↑](#footnote-ref-79)
80. 86- بافر تریس – بورات –EDTA یک برابر (TBE 1X) : تریس (p.a) ، 89 میلی مولار با اسید بوریک 89 میلی مولار و EDTA 5/2 میلی مولار مخلوط و pH محلول روی 2/8 تنظیم می­گردید. محلول فوق پس از اتوکلاو در حرارت اتاق بمدت یک سال نگهداری می گردید. [↑](#footnote-ref-80)
81. 87- Loading buffer یا بافر نمونه 1X DNAهمراه باRNase :یک استوک با محلول بافر نمونه 5X DNA همراه با RNase تهیه می­گردید.گلیسیرین 50 گرم ، 50 میلی مولار تریس HCl با pH 5/7، 5 میلی مولار EDTA بروموفنل بلو 05/0 گرم، 300 میکرولیتر از RNase 10 میلی­گرم در میلی­لیتر. به مواد بالا آب مقطر تا حجم نهائی محلول به 100 میلی­لیتر برسد، اضافه می­گردید. محلول بمدت 15 دقیقه در بن ماری 100 درجه قرار می­گرفت. برای به دست آوردن غلظت یک برابر (این محلول استوک)، به نسبت 5/1 رقیق شد. [↑](#footnote-ref-81)
82. - Alkaline phosphatase (AP) [↑](#footnote-ref-82)
83. - Capillary transfer [↑](#footnote-ref-83)
84. - Vacuum transfer [↑](#footnote-ref-84)
85. - Depurination [↑](#footnote-ref-85)
86. - Denaturation [↑](#footnote-ref-86)
87. [↑](#footnote-ref-87)
88. 89- محلول خنثی کننده (Neutralization): تریس HCl، 5/0 مولار با نمک 3 مولار مخلوط گردیده و با آب مقطر حجم آن به یک لیتر رسانیده و سپس pH آن روی 5/7 تنظیم می­گردید.

    90**-** طرزتهیه محلول بافر SSC بیست برابر (20x SSC): مقدار 5/175 گرم کلریدسدیم خالص به همراه 2/88 گرم سیترات سدیم در یک لیتر آب مقطر حل و سپس pH آن روی 7 تنظیم می­گردید. برای تهیه 2x SSC یک حجم از 20x SSC به 9 حجم آب مقطر اضافه می­شد. برای تهیه 5x SSC یک حجم از 20x SSC به 3 حجم آب مقطر اضافه می­شد. [↑](#footnote-ref-88)
89. 91- Microcapillary [↑](#footnote-ref-89)
90. 92- Hybond N-plus [↑](#footnote-ref-90)
91. 93- Blot-tower [↑](#footnote-ref-91)
92. - Fixation [↑](#footnote-ref-92)
93. - Pre hybridization [↑](#footnote-ref-93)
94. - Chemiluminesent Detection [↑](#footnote-ref-94)
95. 99- طرز تهیه بافر شستشو یک برابر (Washing buffer 1x): 60/11 گرم مالئیک اسید به همراه 78/8 گرم کلریدسدیم خالص در یک لیتر اب مقطر به خوبی حل می­گردید و سپس 3 میلی لیتر توئین بیست به آن اضافه و pH محلول روی 5/7 تنظیم می گردید. [↑](#footnote-ref-95)
96. - Anti DIG – Alkaline phasphatase [↑](#footnote-ref-96)
97. 100- طرز تهیه بافر شناسائی (آشکار ساز) Detection buffer: 76/15 گرم تریس هیدروکلراید (Tris-HCl) را به همراه 85/5 گرم کلرید سدیم خالص در یک ارلن ریخته و یک لیتر آب مقطر به آن اضافه و سپس pH محلول روی 5/9 تنظیم می گردید. [↑](#footnote-ref-97)
98. . color – substrate solution [↑](#footnote-ref-98)
99. - Back ground [↑](#footnote-ref-99)
100. - Oven hybridization [↑](#footnote-ref-100)
101. 103- طرز تهیه محلول پری هیبریداسیون (Prehybridization): 1/0 گرم ان لوریل سارکوزین و 02/0 گرم پودر SDS در 50 میلی­لیتر آب مقطر به خوبی حل می­گردید و سپس یک گرم پودر بلوکینگ در محلول فوق ریخته و روی مگنت هات پلیت در دمای Cº33 به مدت 20 دقیقه قرار می­­گرفت و طی این مدت به تدریج آب مقطر تا حجم نهائی 100 میلی­لیتر به آن اضافه می گردید تا مخلوط شیری رنگ یکنواخت به دست آید. [↑](#footnote-ref-101)
102. - Hybridization [↑](#footnote-ref-102)
103. 105- طرز تهیه محلول هیبریداسیون (Hybridization): مقدار 50 میکرولیتر از نشانگر لیبل شده با دیگوکسیژنین (Dig-lable marker) در 30 میلی­لیتر محلول پری­هیبریداسیون ریخته و به خوبی مخلوط می­گردید. [↑](#footnote-ref-103)
104. - M. gordonae [↑](#footnote-ref-104)
105. - M. szulgai [↑](#footnote-ref-105)
106. - M. vaccae [↑](#footnote-ref-106)
107. - Dasypus novemcinctus [↑](#footnote-ref-107)