

مقایسه میکوباتریوم‌های محیطی

در مناطق کم‌شیوع و پرشیوع بیماری سل استان گلستان

دکتر عزت‌ا. قائمی^۱، دکتر کیومرث قاضی‌سعیدی^۲، هادی کوهساری^۳، دکتر بهناز خدادبخشی^۴، فرامرز کوهسار^۵

ناصر بهنام‌پور^۶، مسعود بازوری^۷، مایا بابایی کوچکسرائی^۸، دکتر شهرام بهمنیار^۹

چکیده

تمام گونه‌های میکوباتریوم‌ها به غیر از مایکوباتریوم توبرکلوزیس، لپره و بوویس جزء میکوباتریوم‌های محیطی تلقی می‌گردند که به طور معمول از خاک، آب، گرد و غبار و ... قابل جداسازی هستند. علاوه بر بیماری‌زایی نقش مهم دیگر میکوباتریوم‌های محیطی تأثیر بر سیستم ایمنی افراد می‌باشد که ممکن است در برابر بیماری‌های میکوباتریال نقش مفید و یا تخریبی داشته باشد. استان گلستان از نظر شیوع بیماری سل دارای دو منطقه است. در منطقه غرب استان گلستان شیوع سل نسبت به منطقه شرق استان کمتر است. هدف این مطالعه علاوه بر تعیین انواع میکوباتریوم‌های محیطی در دو منطقه، مقایسه فراوانی و تنوع آنها با یکدیگر می‌باشد. برای این منظور از خاک این دو منطقه نمونه‌گیری صورت گرفت و پس از مراحل تیمار، روی محیط لوون اشتاین جانسون کشت داده شد. به طور کلی ۲۲۰ نمونه گرفته شد که ۱۲۰ نمونه از مناطق پرشیوع سل بود که از این تعداد ۲۵ عدد (۲۰/۸ درصد) کشت مثبت شدند و ۴۷ نوع میکوباتریوم تشخیص داده شد. در ۱۰۰ نمونه گرفته شده از مناطق کم‌شیوع سل، ۶۶ مورد (۶۶ درصد) کشت مثبت شدند که ۱۱۴ نوع میکوباتریوم تشخیص داده شد. در نتیجه در کل استان بدون درنظر گرفتن شیوع سل از ۲۲۰ نمونه ۹۱ عدد (۴۱/۲ درصد) کشت مثبت شدند و ۱۶۱ نوع میکوباتریوم تشخیص داده شد که شایع ترین آنها عبارت بودند از میکوباتریوم فورچوئیتوم (۲۱/۸ درصد)، میکوباتریوم فلاویسنس (۲۰/۵ درصد) و میکوباتریوم چلونهای (۱۶/۱ درصد). شیوع و تنوع میکوباتریوم‌های محیطی در مناطق کم‌شیوع بسیار بیشتر از مناطق پرشیوع بود. هرچند، این اختلاف می‌تواند مربوط به عوامل زیست محیطی باشد، نشان‌دهنده این است که احتمال برخورد سیستم ایمنی ساکنین این مناطق با میکوباتریوم‌های محیطی بیشتر است.

واژه‌های کلیدی: میکوباتریوم‌های محیطی، بیماری سل، خاک، استان گلستان

- ۱- استادیار دانشگاه علوم پزشکی گرگان، نشانی: گرگان، کیاودت ۳ چادره شهrest کلا، دانشگاه علوم پزشکی گرگان (بنیاد خاصی)، دانشکده پزشکی گروه مکدووب شناسی تلفن: ۰۳۵۴۳۱۶۵۰۰؛
- ۲- دانشیار دانشگاه علوم پزشکی تهران
- ۳- کارشناس ارشد مکدووب شناسی
- ۴- استادیار دانشگاه علوم پزشکی گرگان
- ۵- کارشناس ارشد اکمل شناسی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان
- ۶- کارشناس ارشد آمار، هیاتی و عضو هیئت علمی دانشگاه علوم پزشکی گرگان
- ۷- کارشناس
- ۸- پژوهش عمومی

تضعیف سیستم ایمنی می‌شوند (۴).

در بررسی‌های مختلف در زمینه سوش‌های تقویت کننده و تضعیف کننده محققین به این نتیجه رسیدند که گونه‌هایی نظری میکوباکتریوم واکی^۱ و نانکروموزنیکوم^۲ تقویت کننده و میکوباکتریوم مارینیوم^۳ و میکوباکتریوم کانزاسی^۴ تضعیف کننده می‌باشند (۵).

استان گلستان از استان‌هایی است که شیوع بیماری سل در آن بسیار بالاست ولی از طرفی شهرستان‌هایی از استان هستند که بیماری سل در آنها کمتر دیده می‌شود. به عبارتی دیگر، در استان گلستان شهرستان‌هایی با شیوع بالای بیماری سل و همچنین شهرستان‌هایی با شیوع پایین بیماری سل وجود دارد. هدف ما بررسی مقایسه‌ای میکوباکتریوم‌های محیطی در خاک این دو منطقه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

برای این مطالعه ۲۰ نمونه از خاک مناطق مختلف استان تهیه شد. ۲۰ محل در مناطق کم‌شیوع سطح استان به طور تصادفی تعیین گردید و از هر محل ۵ نمونه خاک تهیه شد (جمعاً ۱۰۰ نمونه). برای مناطق پرشیوع بیماری سل ۲۴ محل تعیین و از هر محل ۵ نمونه خاک تهیه شد (جمعاً ۱۲۰ نمونه). نمونه‌های خاک از عمق ۳-۵ سانتی‌متری خاک، ترجیحاً از خاک مرطوب و گل آلود برداشت شد، چون احتمال حضور میکوباکتریوم‌های محیطی در خاک مرطوب بیشتر است. نمونه‌ها در پلاستیک‌های علامت‌گذاری شده به آزمایشگاه منتقل شدند.

ما برای تیمار و کشت نمونه‌ها در یک لوله آزمایش مقدار ۱۰ اسی‌سی آب مقطار استریل به همراه چند قطره محلول

مقدمه

بیش از پنجاه سال پیش سنت جان بروکز در بارهٔ میکوباکتریوم‌های ساپروفیت محیط گفت: «اهمیت این سازواره‌ها (ارگانیسم‌ها) فقط در این است که تحت وضعیت خاصی ممکن است آنها را با میکروب سل واقعی اشتباه کنند و یا این که در جریان کارهای تجربی روی حیوان‌های آزمایشگاهی به علت آلودگی سبب اشتباه شوند» (۱).

امروزه اهمیت این میکوباکتریوم‌ها اگر بیشتر از خود میکرب سل نباشد، کمتر از آن نیست و لازم است که به این ریزسازواره‌ها (میکروارگانیسم‌ها) توجه خاصی مبذول شود. میکوباکتریوم‌های محیطی می‌توانند باعث ایجاد عفونت در انسان شوند که این تعداد در دو دسته بیماری‌زاوی اجباری و اختیاری قرار می‌گیرند. گونه‌های بیماری‌زاوی اختیاری در مواردی از جمله ضعف سیستم ایمنی باعث مشکل در بدن انسان می‌شوند که با توجه به ظهور و پیشرفت بیماری ایدز در جهان مهم می‌باشند (۲). مقاوم بودن این میکروب‌ها نسبت به داروهای اصلی ضدسلی نیز از مشکلات دیگری است که گسترش این میکروب‌ها و عدم تشخیص صحیح آنها در نمونه‌های بیماران به همراه دارد (۳).

اهمیت دیگر این میکوباکتریوم‌ها در تحریک سیستم ایمنی می‌باشد که می‌تواند نقش عمدی‌ای در تکامل سیستم ایمنی مهره‌داران ایفاء کند.

تماس با گونه‌های مختلف میکوباکتری‌ها می‌تواند یک حدی از ایمنی اکتسابی طبیعی در برابر میکوباکتریوم توبرکلوزیس را بوجود آورد و بدن را برای پذیرش اثر حفاظتی واکسن BCG آماده نماید و اثر آن را تقویت کند. همچنین بعضی از انواع آن باعث کاهش اثرات واکسن BCG می‌شوند. به عبارتی دیگر، بعضی از گونه‌های میکوباکتریوم‌های محیطی باعث تقویت و بعضی موجب

^۱ M. vaccae

^۲ M. nonchromogenicum

^۳ M. marinum

^۴ M. kansasii

سویه میکوباکتریوم از خاک این مناطق جدا شد که این سویه‌ها متعلق به ۸ گونه مختلف بود. اما در مناطق کم‌شیوع بیماری سل از ۱۰۰ نمونه مورد بررسی در ۶۶ محیط رشد مشاهده گردید و در آن جمعاً ۱۱۴ سویه رشد نمودند که متعلق به ۱۲ گونه مختلف مایکوباکتریوم بود (جدول ۱).

جدول ۱: توزیع فراوانی موارد کشت مثبت مایکوباکتریوم محیطی از خاک مناطق مورد مطالعه در استان گلستان

منطقه کم‌شیوع بیماری سل	منطقه پرشیوع بیماری سل	تعداد نمونه مورد مطالعه
۱۰۰	۱۲۰	۲۲۰
(۶۶/۴۱)	(۲۰/۸)	۹۱
۱۲	۸	۱۳

اعداد داخل پرانتز نشان دهنده درصد است.

تعداد مواردی که رشد باکتری در محیط لون اشتاین صورت گرفته در دو محیط اختلاف معنی دار دارد ($P < 0.05$). تنوع گونه‌ها نیز در مناطق کم‌شیوع بیماری سل بیشتر از مناطق پرشیوع می‌باشد.

در مجموع در خاک مناطق مورد بررسی در استان گلستان از جمع ۲۲۰ نمونه مورد آزمایش در ۹۱ لوله رشد میکوباکتریوم مشاهده گردید که مربوط به ۱۶۱ سویه می‌باشد که بعد از تست‌های زیست - شیمیایی در ۱۳ گونه مختلف قرار گرفت.

شایع‌ترین گونه‌ها در دو منطقه به ترتیب شامل چهار گونه فورچوئیوم، فلاویسنس، چلونهای و ترمورزیستیل بود. درصد سویه‌ها به منطقه پرشیوع ۶/۶۷۸ و درصد سویه‌ها به منطقه کم‌شیوع اختصاص داشتند (جدول ۲).

فقط گونه گاستری در منطقه پرشیوع بیماری سل جدا شده که در منطقه کم‌شیوع بیماری یافت نشد اما چهارتا از

توئین ۸۰ درصد^۱ وارد کرده و یک گرم از گل مورد آزمایش را به آن افزودیم (۶). توئین ۸۰ درصد اسید چربی است با زنجیره بلند که برای پراکنده گی میکوباکتریوم‌ها در محلول به کار می‌رود.

این مخلوط را برای مدت ۳۰ دقیقه با دستگاه تکان‌دهنده بهم زده و سپس همین مدت به حال خود می‌گذاشتیم. آنگاه در یک لوله سانتریفیوژ، ۳ سی سی از محلول فوق را وارد کرده و به مقدار هم حجم آن یعنی ۳ سی سی محلولی شامل ۱۱/۷ گرم در لیتر سود سوزآور و هیپوکلریت سدیم ۵ درصد به نسبت ۶ قسمت سود با یک قسمت هیپوکلریت سدیم اضافه کردیم (۶).

عمل محلول ذکر شده این است که برای سایر میکروارگانیسم‌های موجود در خاک سمی است ولی برای میکوباکتریوم‌ها سمی نمی‌باشد و به ما امکان داد تا بتوانیم میکوباکتریوم‌های احتمالی خاک را جدا کنیم. سپس لوله‌ها را برای مدت ۱۵-۳۰ دقیقه در دور ۲۰۰۰ سانتریفیوژ کردیم.

چون محلول تیمار در زمان طولانی برای خود میکوباکتری‌ها نیز مضر است، باید عمل خنثی‌سازی را نیز انجام می‌دادیم که برای این منظور از آب مقطر استریل استفاده کردیم. پس از سانتریفیوژ از رسوب باقی‌مانده، دو لوب روی محیط کشت لون اشتاین جانسون کشت دادیم (۶). نتایج رشد میکوباکتریوم‌ها در دو منطقه براساس تعیین درصد مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته‌ها

از ۱۲۰ نمونه خاک مورد بررسی از مناطقی که شیوع بالای بیماری سل داشتند تنها در ۲۵ مورد کشت از نظر میکوباکتریوم‌ها مثبت گردید (۶/۰۸ درصد) چون در بعضی از محیط‌های کشت بیش از یک کلنی ظاهر گردید جمعاً ۴۷

^۱ Tween 80

نشان داده است که عوامل فوق به همراه PH خاک در تعیین فلور میکوباکتریوم‌های منطقه تاثیر به سزایی دارند (۱۰). از طرفی دیگر ، مطالعاتی که در خاک اهواز و آذربایجان شرقی انجام شد به ترتیب وفور میکوباکتریوم‌های محیطی در خاک این شهرها را برابر ۲۴/۱ درصد (۱۱) و ۱۲/۱ درصد (۵) برآورد نمودند که آشکارا ، پایین‌تر از یافته‌های مطالعه حاضر می‌باشد. این نیز می‌تواند ناشی از عوامل محیطی ذکر شده باشد.

فرارانی میکوباکتریوم‌های محیطی در شهرهای گنبد ، علی‌آباد و مینودشت که در این مطالعه به عنوان شهرهای پرشیوع بیماری مورد بررسی قرار گرفت برابر ۲۰/۸ درصد می‌باشد. این شهرها به نسبت شهرهای گروه با شیوع پایین بیماری یعنی بندرگز ، بندرترکمن و کردکوی از آب و هوایی گرم‌تر ، رطوبت پایین‌تر و فاصله بیشتر از دریا برخوردار می‌باشند. احتمالاً به همین دلیل تعداد میکوباکتریوم‌های جدا شده از خاک آن کمتر از منطقه ساحلی و حاشیه جنگل می‌باشد و به آمار شهرهای اهواز و اهر در آذربایجان شرقی نزدیک‌تر است (جدول ۳).

جدول ۳ : فرارانی میکوباکتریوم‌های محیطی

جدا شده از خاک مناطق مختلف در کشور

شایع‌ترین میکوباکتریوم	موارد مثبت میکوباکتریوم		نام منطقه	فرارانی
	درصد	تعداد		
م.آویوم	۱۲/۱	۹۲	آذربایجان شرقی	
م.زلکایی	۲۶/۱	۸۷	اهواز	
م.تررا	۵۱/۶	۶۱	گیلان	
م.فورچوتیوم	۳۳/۳	۵۳	مازندران	
م.فورچوتیوم	۳۶/۰۸	۱۰۷	استخرهای پرورش ماهی گیلان و مازندران	
م.فورچوتیوم	۴۱/۳۶	۹۱	استان گلستان	

گونه‌هایی که در خاک مناطق کم‌شیوع بیماری یافت شده بود در منطقه پرشیوع یافت نگردید.

جدول ۲ : توزیع فرارانی انواع مایکوباکتریوم‌های محیطی

جدا شده از خاک مناطق مورد مطالعه در استان گلستان

نوع منطقه	مجموع نمونه‌ها		کم‌شیوع بیماری سل		پرشیوع بیماری سل		نوع منطقه
	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	
م.فورچوتیوم	۲۱/۱	۳۵	۱۶/۶	۱۹	۳۴	۱۶	
م. فلاوسنس	۲۰/۰	۳۳	۲۰/۱	۲۳	۲۱/۲	۱۰	
م. چلونه‌ای	۱۶/۱	۲۷	۱۸/۴	۲۱	۱۲/۱	۶	
م. ترموزوستیبل	۱۲/۴	۲۰	۱۳/۱	۱۵	۱۰/۶	۰	
م. فلائی	۸/۷	۱۴	۱۲/۳	۱۴	-	-	
م. تری‌ویال	۶/۲	۱۰	۵/۳	۶	۸/۰	۴	
م. تررا	۳/۷	۶	۵/۳	۶	-	-	
م. گوردونه	۲/۵	۴	۳/۰	۴	-	-	
م. فالاکسی	۲/۰	۴	۱/۱	۲	۴/۳	۲	
م. گاستری	۱/۹	۳	-	-	۷/۴	۳	
م. شیمیوئیدی	۱/۲	۲	۱/۱	۲	-	-	
م. مارینوم	۱/۲	۲	۰/۹	۱	۲/۱	۱	
م. کانتراسی	۰/۶	۱	۰/۹	۱	-	-	
جمع	۱۰۰	۱۶۱	۱۰۰	۱۱۴	۱۰۰	۴۷	

بحث

در ۱/۴ درصد نمونه‌های خاک تهیه شده از مناطق مختلف استان گلستان ، حداقل یک سویه میکوباکتریوم محیطی جدا گردید. از این نظر یافته‌ما با مطالعات مشابهی که با همین منظور انجام شد در خاک استان مازندران (۷) ، از رسوب استخرهای پرورش ماهی در استان‌های گیلان و مازندران (۸) و در خاک استان گیلان (۹) ، مطابقت دارد که به ترتیب منجر به جداسازی ۳۳/۳ درصد ، ۳۴/۰۸ درصد و ۵۸/۶ درصد گردید. این می‌تواند به علت تشابه نسبی آب و هوای رطوبت و پوشش گیاهی در این سه استان باشد. زیرا مطالعات مختلف به خوبی

فلئی، تررا و گوردونا که از شیوع نسبتاً بالایی در منطقه کشمیش بیماری سل برخوردار هستند ولی در منطقه دیگر یا جدا نشده و یا شیوع کمتری دارند باید صورت پذیرد. در این میان توجه به میکوباکتریوم فلئی به علت فراوانی زیاد در یک منطقه و عدم جداسازی در منطقه دیگر حائز اهمیت بیشتری می‌باشد یعنی پیشنهاد می‌شود که با بررسی آنتیژن‌های این باکتری و اثر آن بر سیستم ایمنی حیوانات آزمایشگاهی نقش آن مشخص‌تر گردد. همچنین مطالعات دقیق‌تر در مورد اثر تماس‌های مکرر با میکوباکتریوم فورچوئیوم ، فلاوسنس و چلونه‌ای در تحریک سیستم ایمنی نیز ضروری به نظر می‌رسد. شواهد متعدد حاکی از آن است که بین فراوانی میکوباکتریوم‌های محیطی جدا شده از نمونه‌های بالینی در یک منطقه با وفور میکوباکتریوم‌های موجود در محیط به خصوص خاک ، آب و اثروسل‌های آن منطقه رابطه مستقیم وجود دارد (۱۲). برخی محققان فراوان بودن موارد میکوباکتریوم کانزاسی در امریکا (۱۳) ، آویوم در جنوب شرقی امریکا ، زنوبی در فرانسه و انگلیس (۱۴) را ناشی از این واقعیت می‌دانند. در یک مطالعه در اهواز نیز مشخص گردید که بسیاری از میکوباکتریوم‌های نامعمول جدا شده از بیماران ریوی مشکوک به سل همان انواعی هستند که در خاک منطقه نیز شایع می‌باشند ، مخصوصاً میکوباکتریوم فورچوئیوم و گوردونه. بنابراین پیشنهاد می‌گردد که در مطالعه موارد مشکوک به سل در استان گلستان جستجو برای میکوباکتریوم‌های غیرسلی به خصوص گونه فورچوئیوم که در منطقه ما بالاترین شیوع را دارد انجام گیرد.

اگرچه عوامل محیطی علت اصلی اختلاف در تعداد و نوع میکوباکتریوم‌های محیطی در دو منطقه موردنظر در استان گلستان می‌باشد ولی نشان‌دهنده این است که احتمال برخورد سیستم ایمنی ساکنین این مناطق با میکوباکتریوم‌های محیطی متفاوت است. این میکوباکتریوم‌ها می‌توانند به عنوان دوز یادآور واکسن BCG دائماً سیستم ایمنی را در حال تحریک و فعالیت نگه‌دارند و در صورت برخورد با میکروب سل بدن را از استعداد پاسخگویی مناسب برخوردار نمایند زیرا مطالعات نشان داده است که واکسن BCG با گذشت زمان کارآیی کمتری پیدا می‌کند و دریافت دوزهای یادآور با انواع محیطی می‌تواند در حفظ کارایی آن مؤثر باشد و این احتمالاً یکی از پدیده‌هایی است که در مناطق با شیوع پایین بیماری سل وجود دارد و در کنار عوامل متعددی که در بروز سل در یک منطقه مؤثرند (فقر ، وضعیت بهداشتی ، فراوانی تماس با میکروب سل ، عوامل ژنتیکی و ...) می‌تواند پراکندگی سل را تحت تأثیر قرار دهد.

نقش بعضی از انواع میکوباکتریوم‌های محیطی مثل میکوباکتریوم واکی و نانکروموزنیکوم در تقویت سیستم ایمنی و همچنین نقش مارینیوم و کانزاسی در تضعیف سیستم ایمنی کاملاً تایید شده است (۵). اما با مقایسه انواع میکوباکتریوم‌های محیطی در دو منطقه مورد مطالعه این سوال در ذهن ایجاد می‌شود که آیا سایر انواع محیطی نیز قادر به تقویت یا تضعیف سیستم ایمنی هستند و می‌توان آنها را در گروه میکوباکتریوم‌های تقویت کننده قرارداد یا خیر؟ براین اساس انجام مطالعات دقیق‌تر روی میکوباکتریوم

منابع

- ۱) ضیاطریفی ، ابوالحسن. زیست‌شناسی و باکتری‌شناسی میکوپاکتریوم‌ها. چاپ اول. تهران. انتشارات ابوریحان. ۱۳۶۶. صفحه ۱۴۳.
- ۲) Covert TC, Rodgers MR, Reyes AL, Stelma GN. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Applid and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 2492-2496.
- ۳) Papilln F. Nontuberculous mycobacteria disease of the long in a pulmonology Bul. IUATLD. 1988; 63(4): 1719.
- ۴) ولایتی ، علی‌اکبر. ضیاطریفی ، ابوالحسن. طباطبایی ، سیدجواد و مسجدی ، محمد رضا. مبانی سل‌شناسی. جلد اول. تهران. دفتر نشر فرهنگ اسلامی. ۱۳۷۱. صفحات: ۱۲۳ تا ۱۲۹.
- ۵) قاضی‌سعیدی ، کیومرث. بررسی وفور میکوپاکتریوم‌های محیطی به وسیله کشت خاک در منطقه اهر آذربایجان شرقی. پایان‌نامه جهت اخذ درجه تحصصی در رشته پاتوبیولوژی (میکروبیولوژی). دانشگاه تهران. دانشکده بهداشت. سال ۱۳۶۰-۶۱. صفحات ۷۸ تا ۸۵.
- ۶) Donoghue HD, Overend E, Stanford JL. A long itudianl study of environmental mycobacteria on a farm in South-West England. *Jounal of Applied Microbilogy*. 1997; 82(1): 57-67.
- ۷) رستگار ، مژگان. بررسی وفور میکوپاکتریوم‌های محیطی در منطقه مازندران به وسیله کشت خاک. پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی پزشکی. دانشگاه تهران. دانشکده بهداشت. ۱۳۷۰-۷۱. صفحات ۶۵ تا ۶۹.
- ۸) محمدی ، مریم. بررسی میکوپاکتریوم‌های محیطی در استخراهای پرورش ماهی استان‌های شمالی ایران (گیلان و مازندران). پایان‌نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی پزشکی. دانشگاه تهران. دانشکده بهداشت. ۱۳۷۲-۷۳. صفحات ۵۴ تا ۶۱.
- ۹) بشیری ، علی‌رضا. بررسی وفور میکوپاکتریوم‌های محیطی به وسیله کشت خاک در منطقه گیلان. پایان‌نامه جهت اخذ کارشناسی ارشد باکتری‌شناسی پزشکی. دانشگاه تهران. دانشکده بهداشت. ۱۳۶۶-۶۷. صفحات ۵۳ تا ۵۵.
- 10) Ratledg C, Stanford J. *The biology of mycobacteria*. First edition. London. Academi Press INC. 1982; 251-253.
- 11) رعایایی اردکان ، محمد. قاضی‌سعیدی ، کیومرث. جمشیدیان ، محمود. جداسازی میکوپاکتریوم‌های محیطی از خاک و بیماران مشکوک به سل در منطقه اهواز. مجله بیماری‌های عفونی و گرمیسری ایران. سال ۱۳۷۸. سال چهارم شماره ۱۰. صفحات ۶۹ تا ۷۸.
- 12) Brook WR. Epidemiology by nontuberclous mycobacteria. *American Review infections diseases*. 1984; 13: 630-633.
- 13) Tellis CJ, Putnam JS. Pulmonary disease caused by montuberculous mycobacteria. *Medical Clinical of North Amereican*. 1980; 64(3): 433-446.
- 14) Radford AJ. *Mycobacterium ulcerans* in Australia. AUST NZ J M. 1975; 5: 162-166.