ارزیابی حساسیت سه پرایمر مختلف با استفاده از روش PCR– RFLP برای تمایز مولکولی مایکوباکتریوم‌های آتیپیک

فضه حیدری[1]، پریسا فرنیا[2]، جمیله نوروزی[3]، احمد مجد[4]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
۲- دانشیار میکروبیولوژی، مرکزتحقیقات مایکوباکتریولوژی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی،
۳- دکترای تخصصی میکروب شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران
۴- دکترای تخصصی بیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

یافته / دوره سیزدهم / شماره ۲ / تابستان ۹۰ / مسلسل ۴۸

چکیده

دریافت مقاله: ۸۹/۱۲/۲ ، پذیرش مقاله: ۹۰/۱/۲۱

* **مقدمه:** با افزایش عفونت های ناشی از مایکوباکتریوم های آتیپیک (Non- tuberculosis mycobacterium; NTM) در سال های اخیر، تشخیص سریع این دسته از اهمیت ویژه ای برخوردار است. از آنجایی که روش‌های فنوتیپی وقت‌گیر و پرهزینه هستند، امروزه از روش های مولکولی به طور وسیعی برای شناسایی و تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم ها استفاده می‌شود. هدف ازاین مطالعه، تمایز مولکولی مایکوباکتریوم های آتیپیک با استفاده از سه پرایمر TB و 16S-23S rRNA gene spacer و hsp65 در روش PCR- RFLP و ارزیابی حساسیت این پرایمرها است.

* **مواد و روش‌ها:** بررسی روی ۴۸ نمونه مایکوباکتریوم آتیپیک جدا شده از بیماران مبتلا به سل ریوی که توسط تست‌های فنوتیپی شناسایی شده بودند، صورت گرفت. حساسیت دارویی با روش نسبی (Proportional method) انجام و قطعاتی از ژنهای hsp65، 16S-23S rRNA gene spacer توسط PCR تکثیریافت. سپس قطعات تکثیر یافته توسط آنزیم‌های AVaII، HpaII، HaeIII، HphI، BsteII هضم و الگوی بدست آمده روی آگارز ۲٪ بررسی شد.

* **یافته‌ها:** از مجموع ۴۸ نمونه، ۸ نمونه (۱۶/۶٪) MDR (مقاوم به چند دارو)، ۴ نمونه (۸/۳٪) حساس و ۳۶ نمونه (۷۵٪) غیر MDR (مقاوم به یک دارو) بود. ۱۳ نمونه (۲۷٪) تند رشد و سایر نمونه ها (۷۳٪) کند رشد بود. سرعت تشخیص پرایمر hsp65 در روش PCR- RFLP، در بسیاری از گونه ها بالاتر از بقیه پرایمر ها گزارش شد.

* **بحث و نتیجه‌گیری:** روش hsp65 PCR- RFLP از حساسیت و دقت بالایی برای تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم‌های غیرتوبرکلوزیس برخوردار است.

* **واژه‌های کلیدی:** مایکوباکتریوم های آتیپیک، تمایز مولکولی، روش PCR- RFLP

آدرس مکاتبه: تهران، انتهای اتوبان بابایی، شهرک امام خمینی(ره)، نرگس ۵، بلوک ۱٤، واحد ۹
پست الکترونیک: fzheidari@yahoo.com

مقدمه

سنت جان بروکز (Sent John Broks) هفتاد سال پیش درباره مایکوباکتریوم های ساپروفیت عنوان کرد " اهمیت این میکروارگانیسم ها فقط در این است که تحت وضعیت خاصی ممکن است آن ها را با باکتری سل واقعی اشتباه کنند و یا اینکه در جریان کارهای تجربی بر روی حیوان های آزمایشگاهی، به علت آلودگی سبب اشتباه شوند".(۱)اما پس از مطالعات انجام شده طی دو دهه اخیر، مدارکی به دست آمد که حاکی از ایجاد تنوعی از بیماری های انسانی در ریه، پوست، غدد لنفاوی، استخوان و ... توسط مایکوباکتریوم های آتیپیک بود (۲). امروزه محققین معتقدند که بعضی از انواع مایکوباکتریوم های آتیپیک نه به عنوان فرصت طلب، که در صورت وجود نقص ایمنی قادر به ایجاد بیماری باشند، بلکه به عنوان باکتری های پاتوژن و بیماری زا مطرح هستند، به طوری که از بیش از ۱۰۰ گونه شناخته شده مایکو باکتریوم های آتیپیک، حدود یک سوم با بیماری های انسانی مرتبط هستند (۴،۳). بیماری زا بودن مایکو باکتریوم های آتیپیک به همراه انتشار وسیع این گروه در طبیعت موجب شده است که مطالعات بسیاری برای تشخیص و متعاقب آن درمان سریع عفونت های ناشی از مایکو باکتریوم های غیر توبرکلوزیس صورت گیرد(۵). از آنجایی که روش های فنوتیپی علی رغم مفید بودن، وقت گیر و پرهزینه هستند، امروزه از روش های مولکولی به طور وسیعی برای شناسایی و تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم استفاده می شود(۶). یکی از روش های پرکاربرد مولکولی که بر اساس PCR بوده روش (PCR- PRA restriction fragment length polymorphism analysis) است. در این روش، قطعه ی خاصی از DNA پس از تکثیر، توسط آنزیم های برش دهنده ویژه ای، برش خورده و قطعات DNA حاصل روی ژل آگارز به طریق چشمی آنالیز می گردد(۷). قطعات مختلفی از DNA برای تکثیر در این روش پیشنهاد شده است ، Telenti در سال ۱۹۹۳ قطعه ی TB را با بکارگیری دو آنزیم HaeIII، BsteII برای تمایز گونه های مایکوباکتریومی به کار برد (۸)، پس از آن Rott، در سال ۱۹۹۹ ازقطعه 16S-23S rRNA gene spacer با استفاده از آنزیم HaeIII و Hong Kim در سال ۲۰۰۸ از قطعه ی hsp65 به کمک سه آنزیم HphI ، HpaII ،AVaII به تشخیص گونه های مایکوباکتریومی پرداختند (۱۰، ۹). بررسی حساسیت و دقت قطعات ذکر شده در بالا از اهمیت ویژه ای برخوردار است، زیرا با تعیین حساس ترین قطعه می توان به تشخیص سریع و کم هزینه گونه های مایکوباکتریومی پرداخت. بدین منظور در این مطالعه حساسیت سه پرایمر TB، hsp65 ، 16S-23S rRNA gene spacer در روش PCR- RFLP برای تمایز مولکولی مایکو باکتریوم های آتیپیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

این بررسی، بر روی ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جدا شده از بیماران با علایم سل ریوی، مراجعه کننده مرکز آموزشی پژوهشی سل و بیماری های ریوی (مسیح دانشوری) از تیر ۸۶ تا اردیبهشت ۸۷ صورت گرفت. جداسازی اولیه این نمونه ها باروش پتروف ۴٪ با استفاده از محیط Lowenstein Jensen (LJ) و تست های افتراقی شامل احیای نیترات، آزمایش فعالیت کاتالاز، آزمایش نیاسین، سرعت رشد و تولید پیگمان انجام شد . حساسیت دارویی در برابر ایزونیازید(۰/۲ µg/ml) ،ریفامپین (۴۰ µg/ml)، استرپتومایسین(۱۰µg/m) ، اتامبوتول(۲µg/ml) و پیرازینامید (۲µg/ml) به روش تناسبی انجام وسویه ها به سه گروه حساس ، MDR و غیرMDR تقسیم بندی شد. استخراج DNA از کلنی های مثبت باروش فنل - کلروفرم صورت گرفت.

روش TB PCR- RFLP: برای تکثیر و هضم قطعه‌ی ۴۳۹ جفت بازی TB، از دو پرایمر Tb11(5´-ACCAACGATGGTGTGTCCAT3') و Tb12 (5´-CTTGTCGAACCGCATACCCT3') استفاده شد. سیکل PCR مورد استفاده به صورت ۴۵ سیکل شامل: ۱ دقیقه در

۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد پس از اتمام سیکل، ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود.محصولات PCR با دو آنزیمHaeIII ، BsteII به صورت جداگانه و طبق پروتکل های استاندارد هضم و الگوی بدست آمده روی آگارز ۲٪ بررسی شد(۸).

روش 16S-23S rRNA gene spacer PCR- RFLP

برای تکثیر و هضم قطعه ی ۲۰۰ تا ۳۰۰ جفت بازی SP ، از دو پرایمر

Sp1 (5'-ACC TCC TTT CTA AGG AGC ACC-3')و

Sp2 (5'-GAT GCT CGC AAC CAC TAT CCA-3') استفاده شد. سیکل PCR مورد استفاده به صورت ۳۸ سیکل شامل: ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۵۹ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. آنزیمHaeIII برای هضم محصولات PCR انتخاب و الکتروفورز روی آگارز ۲٪ انجام شد(۹).

روش hsp65 PCR- RFLP

برای تکثیر و هضم قطعه ی 644 جفت بازی shock heat ۶۵kD RPC Restriction Analysis) protein) hsp65، از دو پرایمر HSPF3 (5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3') HSPR4 (5'-AAG GTG CCG CGG ATC TTG TT-3') استفاده شد. سیکل PCR مورد استفاده به صورت ۳۰ سیکل شامل: ۱ دقیقه در ۹۵ درجه سانتی گراد، ۴۵ ثانیه در ۶۲درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد پس از اتمام سیکل، ۱۰دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود.محصولات PCR با سه آنزیم HphI, ، HpaII، AVaII به صورت جداگانه و طبق پروتوکل های استاندارد هضم و الگوی بدست آمده روی آگارز ۲٪ بررسی شد(۱۰،۱۷).

در این مطالعه، برای تعیین حساسیت پرایمر های مورد استفاده از فرمول زیر استفاده شد:

حساسیت: تعداد نمو نه های مثبت / تعداد نمونه های مثبت + تعداد نمونه های منفی

یافته‌ها

از بین ۴۸ نمونه مورد مطالعه، ۲۰ نفر (۴۱/۶٪) زن و ۲۸ نفر (۵۸/۳٪) مرد بودند. از نظر ملیت نمونه های مورد آزمایش، ۳۵ نمونه (۷۲/۹٪) ایرانی و ۱۳ نمونه (۲۷٪) افغانی بودند. دامنه سنی بیماران مورد مطالعه از ۱۸ تا ۸۵ سال و میانگین دامنه سنی آن ها ۱ ± ۵۲ بود. میانگین سن افراد ایرانی ۵۴/۷ و افراد افغانی ۳۰/۳ گزارش شد. از کل نمونه های مورد بررسی، ۴۶ مورد (۹۵/۸٪) نمونه ریوی و دو مورد (۴/۲٪) نمونه خارج ریوی که مربوط به خون و ادرار بود گزارش شد.

نتایج حاصل از تست های فنوتیپی با روش PCR – RFLP همخوانی داشته که در جدول شماره ۱ ارائه شده است.

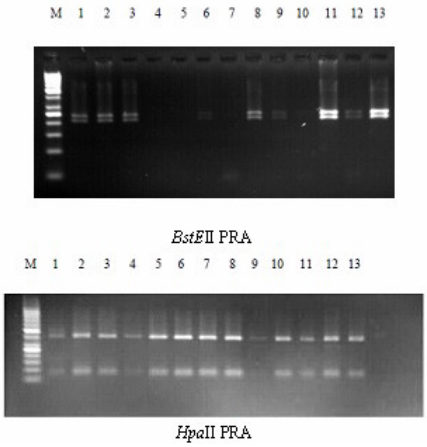
جدول شماره ۱: تعداد و نوع مایکوباکتریوم های آتیپیک مورد مطالعه

	مایکو باکتریوم های آتیپیک	
	گونه	تعداد گونه
سریع الرشد	مایکو باکتریوم کلونی زیر گونه‌ی کلونی	۳
	مایکو باکتریوم فورچوئیتوم	۳
	مایکو باکتریوم کلونی زیر گونه‌ی آبسسوس	۷
کند رشد	مایکو باکتریوم سیمیه	۱۸
	مایکو باکتریوم کانزاسی	۸
	مایکو باکتریوم گوردونی	۱
	مایکو باکتریوم اسکروفولاسئوم	۴
	مایکو باکتریوم مالموئنس	۱
	مایکو باکتریوم اینتراسلولار	۳
تعداد کل		۴۸

بررسی حساسیت سه پرایمر TB، 16S-23S rRNA gene spacer،hsp65 :

از ۴۸ گونه مایکوباکتریوم آتیپیک مورد آزمایش، ۱۷ نمونه به عنوان Myco. simiae شناسایی شد. سرعت تشخیص به وسیله

پرایمر TB و SP، ۸۲/۳٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ گزارش شد(شکل ۱). ۸ نمونه به عنوان Myco. kansasii که سرعت تشخیص به وسیله ی پرایمر TB، ۸۷/۵٪، پرایمر SP، ۶۲/۵٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ بود. ۳ نمونه به عنوان Myco. chelonae chelonae که سرعت تشخیص به وسیله ی پرایمر TB، ۶۶,۶٪، پرایمر SP و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد. ۷ نمونه متعلق به Myco. chelonae abscessus بود که سرعت تشخیص به وسیله ی پرایمر TB و SP، ۸۵/۷٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد.



شکل ۱: تشخیص مایکوباکتریوم سیمیه ای (*Mycobacterium simiae*) با استفاده از روش PCR- RFLP
M: مارکر DNA (50bp ladder)

سه نمونه به عنوان Myco. furtuitum که سرعت تشخیص به وسیله ی پرایمر TB، ۶۶/۶٪، پرایمر SP و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ گزارش شد. در نمونه های مورد مطالعه، تنها یک نمونه به عنوان Myco. gordonae شناسایی شدکه هر سه پرایمر TB، SP، hsp65 قادر به شناسایی این مایکوباکتریوم بودند. ۴ نمونه به عنوان Myco. scrofulaceum وسرعت تشخیص به وسیله پرایمر TB، ۱۰۰٪، پرایمر SP، ۷۵٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد. سه گونه Myco. intracelullar مورد شناسایی قرار گرفت. سرعت تشخیص به وسیله‌ی پرایمر TB، خصوصا آنزیم HaeIII ۱۰۰٪، پرایمر SP, ۶۶/۶٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد و در نهایت ۲ نمونه متعلق به Myco. malmoense بود که پرایمر SP قادر به شناسایی این مایکوباکتریوم نشد اما پرایمرهای TBو hsp65 با حساسیت بالایی این گونه را شناسایی کردند.

بحث و نتیجه‌گیری

در سال ۱۹۸۲ همه کارشناسان دنیا معتقد بودند که بیماری سل تا سال ۲۰۰۰، کنترل و بحث آن به کتب پزشکی محدود می شود، ولی این امید چند سالی بیش تر به طول نکشید. به طوری که در سال ۱۹۹۳، این بیماری از طرف سازمان بهداشت جهانی به عنوان فوریت جهانی اعلام گردید (۱۱).

تا کنون دنیا با سه اپیدمی جهانی از بیماری سل روبرو بوده است: اپیدمی اول، بازگشت مجدد بیماری سل که ناشی از کاهش توجه و رعایت نکردن بهداشت در رابطه با کنترل بیماری است. اپیدمی دوم، همراهی عفونت ایدز و بیماری سل واپیدمی سوم، بروز و گسترش سل مقاوم به دارو که این همه گیری بسیار خطرناک است (۱۲).

مقاوم بودن مایکوباکتریوم های آتیپیک به اکثر داروهای ضد سلی متداول و انتشار وسیع آن، جهان را در آستانه روبروشدن با یک اپیدمی دیگر قرار داده است که تشخیص سریع این دسته و به دنبال آن درمان مناسب و به موقع مایکوباکتریوم های آتیپیک می تواند حائز اهمیت باشد(۱۳). روش PCR- RFLP (PCR- restriction fragment length polymorphism) با به کار گیری قطعات مختلفی از DNA قادر است با حساسیت بالایی به تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم بپردازد.

در مطالعه ای که توسط Telenti در سال ۱۹۹۳ انجام شد، از روش TB PRA با استفاده از دو آنزیم HaeIII و BstEII

برای تمـایز ۳۳۰ گونـه مایکوبـاکتریوم اسـتفاده شـد. ایـن روش توانست تمام گونه های مورد مطالعه را با حـساسیتی برابـر ۱۰۰٪ شناسایی کند (۸). در مطالعه مشابه دیگری کـه توسـط Taylor در سال 1997 صورت گرفت، از ۱۰۳ نمونـه مـورد بررسـی ۱۰۰ نمونه با روش TB PRA شناسایی شد امـا، ۳ نمونـه بـه صـورت ناشناخته باقی ماند. ۲ نمونه با استفاده از روش‌های بیوشیمیایی به عنوان Myco. terra complex و Myco. gordonae و یک نمونه باقی مانده فقط به عنوان یک گونه مایکوباکتریوم گزارش شد بدون این که نوع دقیق گونه آن مـشخص شـود. در ایـن مطالعـه، حساسیت روش TB PRA، ۹۷٪ گزارش شد (۱۴).

در این مطالعه روش TB PRA با به کار گیری دو آنـزیم HaeIII و BstEII توانست از ۴۸ گونه مایکوباکتریوم آتیپیک مـورد مطالعـه، ۳۴ نمونـه را شناسـایی کنـد. ایـن روش بـا حساسیتی برابر۷۰/۸٪ توانست گونه های مختلف مایکوباکتریوم را از یکدیگر تمایز دهد. عدم شناسایی ۱۴ نمونه، بـا توجـه بـه حساسیت بالای این روش در مطالعـات نـامبرده، چنـدان قابـل انتظار نبود هر چند این تفاوت می توانـد بـه علـت غلظـت کـم نمونه ها باشد اما از انجا که روش هـای مـورد مطالعـه در ایـن مقاله روی نمونه هایی با غلظت یکسان انجام گرفته حـساسیت ذکر شده برای روش TB PRA قابل مقایسه با دو روش دیگـر بوده و نتایج حاصل کاربردی می‌باشد.

در مطالعه ای که توسط Springer در سـال ۱۹۹۶ انجـام شد، برای تمایز و شناسایی ۳۴ نمونه مایکوباکتریوم از روش هـای مولکولی و روش های فنوتیپی از قبیل سـرعت رشـد، مورفولـوژی کلنی ها، کروماتوگرافی و غیره استفاده شد. ۲۰ نمونه با حساسیت بالایی توسط هر ۲ روش شناسایی شدند. ۱۰ نمونه بـا حـساسیت پائینی در روش های فنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفت. ۴ نمونـه توسط روش هـای فنـوتیپی شناسـایی نـشد و روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA با شناسایی هر ۳۴ گونه به عنوان یک روش سریع و دقیق با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ معرفـی گردیـد. البته دراین بررسی علاوه بر آنزیم HaeII از آنـزیم هـای دیگـری نظیر CfoI، DdeI و MspI نیز استفاده شد کـه باعـث بـالا تـر بردن حساسیت روش ذکر شده گردید (۱۵).

در مطالعه ای که توسط Roth در سال ۲۰۰۵ انجـام شـد، ۸۱۱ گونه باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت که از این میـان ۶۷۸ گونه (۵۴ دسته) متعلق به مایکوباکتریوم هـا بودنـد. روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA بـا بـه کـارگیری آنـزیم HaeIII موفق شد ۳۹ دسـته از ۵۴ دسـته مایکوبـاکتریوم را بـا حساسیتی برابر ۸۴٪ شناسایی کند. دسته‌های دیگر که مربوط به Myco. avium complex, Myco. chelonae, Myco. abscessus بود برای شناسـایی نیـاز بـه هـضم بـا آنـزیم‌هـای بیشتری داشت(۹).

در بررسـی حاضـر، روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA با به کارگیری آنزیم HaeIII توانست ۳۸ گونـه از ۴۸ گونه مایکوباکتریوم آتیپیک مورد مطالعه را شناسایی کند اما موفق به شناسایی ۱۰ گونه نـشد. ایـن روش بـا حـساسیتی برابـر ۷۹/۱٪ قادر به تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم شد. لازم بـه ذکر است که به کارگیری این روش فقـط بـا یـک آنـزیم مـانع از تعیین دقیق گونه Mycobacterium simiae از اعضای دیگر Myco. simiae complex شد و برای آنالیز دقیـق گونـه هـا باید از آنزیم های بیش تری برای هضم استفاده می شد. آنزیم های متعددی در مطالعات مشابه برای این روش پیشنهاد شده است که هر کدام به نوبه خود حساسیت تشخیص را بالا تر می برند و گاهی برای تشخیص یک گونه استفاده همزمان از چند آنزیم مطرح شده است که این امر موجب زیاد شدن هزینه و کـاربردی نبـودن ایـن روش می شـود. اسـتفاده از آنـزیم HaeIII مـورد تاییـد مقـالات بیشتری بوده(۹،۱۴) و نتایج حاصل از آن نیز قابل قبول می باشـد بنابراین هر چند حساسیت این روش با بـه کـارگیری یـک آنـزیم

چندان بالا نیست اما کاربردی و کم هزینه بوده و به همین دلیل ارزش مقایسه با دو روش دیگر را دارد.

در مطالعه ای که توسط Hong Kim در سال ۲۰۰۸ انجام شد، روش hsp65 PRA روی ۶۲ گونه مایکوباکتریوم و ۴ گونه باکتریایی انجام شد. این روش توانست ضمن شناسایی گونه های مورد مطالعه، حساسیت بالایی در تمایز Myco. avium و Myco. intracelullarنشان دهد. دقت این روش برای تمایز دو گونه نام برده که جز کمپلکس MAC می باشند، حاکی از برتری این روش نسبت به روش های دیگر بود. Hong Kim در مطالعات بعدی خود، روش Hsp65 PRA را برای شناسایی ۲۵۱ گونه به کار برد و الگوریتم تشخیصی بر این اساس منتشر کرد(۱۰).

در مطالعه دیگری که توسط Chimara در سال ۲۰۰۸ صورت گرفت، روش hsp65 PRA توانست ۳۹۲ گونه از ۴۳۴ گونه مایکوباکتریوم مورد مطالعه را شناسایی کند. این روش در مقابل روش های فنوتیپی که قادر به شناسایی ۳۳۸ گونه شده بود، با حساسیت بیش از ۹۰٪ به عنوان یک روش سریع و مطمئن انتخاب شد (۱۶).

در این مطالعه ، روش hsp65 PRA با به کارگیری سه آنزیم AvaII،HphI و HpaII موفق به شناسایی تمام نمونه ها شد که بنابر مطالعات ذکر شده در بالا چندان دور از انتظار نبود. این روش در مقایسه با روش های دیگر، زمان کمتری برای الکتروفورز نیاز داشت که این موضوع باعث صرفه جویی در وقت برای دریافت نتایج می شد. قطعات حاصل از برش آنزیمی در این روش کاملا مشخص و با فواصل دور از هم بودند که منجر به آنالیز دقیق تر و سریع ترگردید. از طرفی، استفاده از سه آنزیم AvaII، HphIو HpaII برای قطعه hsp65، دقت این روش را بسیار بالا برد به طوری که تمام ۴۸ گونه مورد بررسی با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ مورد شناسایی قرار گرفت .

References

1. Cruz AT, Goytia VK, Starke JR. Mycobacterium simiae complex infection in an immunocompetent child. J Clin Microbiol. 2007;45(8):2745-46.
2. Lee ES, Lee MY, Han SH, Ka JO. Occurrence and molecular differentiation of environmental mycobacteria in surface waters. J Microbiol Biotechnol. 2008;18(7): 1207-15.
3. Hartmans S. Bont AM. The Genus Mycobacterium Nonmedical Prokaryotes. 2006; 3: 889-918.
4. Katoch VM. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). Indian J Med Res 2004;120:290-304.
5. Bell RC, Higuchi JH, Donovan WN, Krasnow I, Johanson WG. Mycobacterium simiae: clinical features and follow-up of twenty four patients. Am Rev Respir Dis. 1983;127:35-38.
6. Legrand E, Devallois A, Horgen L, Rastogi N. A molecular epidemiological study of Mycobacterium simiae isolated from AIDS patients in Guadeloupe. J Clin Microbiol. 2000;38(8):3080-84.
7. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SYM, Martins MC, Durham AM, Arbeit RD, et al. Reliable identification of mycobacterial species by PCR-restriction enzyme analysis (PRA)-hsp65 in a reference laboratory and elaboration of a sequence-based extended algorithm of PRA-hsp65 patterns. BMC Microbiol. 2008;8:48-59.
8. 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(2):175-78.
9. Roth A, Reischl U, Streubel A, Naumann L, Kroppenstedt RM, Habicht M, et al. Novel diagnostic algorithm for identification of mycobacteria using genus-specific amplification of the 16S-23S rRNA gene spacer and restriction endonucleases. J Clin Microbiol. 2000;38(3):1094-104.
10. Kim H, Kim SH, Shim TS, Kim M, Bai GH, Park YG, et al. PCR restriction fragment length polymorphism analysis (PRA)-algorithm targeting 644bp heat shock protein 65(hsp65) gene for differentiation of Mycobacterium spp. J Microbiol Method. 2005;62:199-209.
11. Wallace RJ Jr, Glassroth J, Griffith DE, Olivier KN, Cook JL, Gordin F. Diagnosis and treatment of disease caused by nontuberculous mycobacteria. Am J Respir Crit Care Med. 1997;156:Suppl:S1-S25.
12. World Health Organization. WHO/IUATLD global project to anti-tuberculosis drug resistance surveillance 2000. WHO. Geneva, Switzerland; WHO, 278, 2000
13. Sriyabhaya N, Wonswatana S. Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria: a report of 24 cases in Thailand. Rev Infect Dis. 1981;3:1085-89.
14. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. Routine use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis for identification of mycobacteria growing in liquid media. J Clin Microbiol. 1997;35(1):79-85.
15. Springer B, Stockman L, Teschner K, Roberts GD, Bottger EC. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic

tuberculous mycobacteria and description of new hsp65 restriction fragment length polymorphism patterns. Mol Cell Probes. 2004;18(1):59-65.

methods. J Clin Microbiol. 1995;34(2):296-303.

16. Hafner B, Haag H, Geiss HK, Nolte O. Different molecular methods for the identification of rarely isolated non-

This document was created with Win2PDF available at http://www.daneprairie.com.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.