

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

فضه حیدری^۱، پریسا فرنیآ^۲، جمیله نوروزی^۳، احمد مجد^۴

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران

۲- دانشیار میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات 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: ۸۹/۱۱/۲۰ ، 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 روش های فنوتیپی وقت گیر و پرهزینه هستند، امروزه از روش های مولکولی به طور وسیعی برای شناسایی و تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم ها استفاده می شود. هدف از این 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 روش ها: بررسی روی ۴۸ نمونه مایکوباکتریوم آتیپیک جدا شده از بیماران مبتلا به سل رویی که توسط تست های 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 تکثیر یافت. سپس قطعات تکثیر یافته توسط آنزیم های HpaII، AVaII، HpaI، HaeIII، HphI، BstEII هضم و الگوی بدست آمده روی آگارز ۲٪ بررسی شد.

* یافته ها: 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 پرایمرها گزارش شد.

* بحث و نتیجه گیری: روش PCR-RFLP hsp65 از حساسیت و دقت بالایی برای تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم های غیر توبرکلوزیس برخوردار است.

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

آدرس مکاتبه: تهران، انتهای اتوبان بابایی، شهرک امام خمینی (ره)، نرگس ۵، بلوک ۱۴، واحد ۹

پست الکترونیک: fzheidari@yahoo.com

مقدمه

سنت جان بروکز (Sent John Brooks) 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 آتیبیک بود (۲). امروزه محققین معتقدند که بعضی از انواع مایکوباکتریوم های آتیبیک 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 آتیبیک، حدود یک سوم با بیماری های انسانی مرتبط هستند (۳،۴). بیماری زا بودن مایکو باکتریوم های آتیبیک 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 (PCR-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 از قطعه 16S-23S rRNA gene spacer استفاده از آنزیم HaeIII و Hong Kim در سال ۲۰۰۸ از قطعه ی hsp65 به کمک سه آنزیم HpaII, AVaII, HphI به تشخیص گونه های مایکوباکتریومی پرداختند (۹، ۱۰). 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 16S-23S rRNA gene, hsp65, TB spacer در روش PCR-RFLP برای تمایز مولکولی مایکو باکتریوم های آتیبیک مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

این بررسی، بر روی ۴۸ نمونه ریوی و خارج ریوی جدا شده از بیماران با علائم 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 ایزونیاژید (۰/۲ μg/ml)، ریفامپین (۴۰ μg/ml)، استرپتوماپسین (۱۰ μg/ml)، اتامبوتول (۲ μg/ml) و پیرازینامید (۲ μg/ml) به روش تناسبی انجام و سویه ها به سه گروه حساس، MDR و غیر MDR تقسیم بندی شد. استخراج DNA از کلنی های مثبت باروش فنل - کلروفورم صورت گرفت. روش TB PCR-RFLP: برای تکثیر و هضم قطعه ی ۴۳۹ جفت باز TB، از دو پرایمر 5'-Tb11 (5'-Tb12 (5'-ACCAACGATGGTGTGCCAT3') و 3'-CTTGTCTGAACCGCATAACCCT3') استفاده شد. سیکل PCR مورد استفاده به صورت ۴۵ سیکل شامل: ۱ دقیقه در

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

حساسیت: تعداد نمونه 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 52 ± 1 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 فوتوتیپی 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

مایکوباکتریوم های آتیپیک	
تعداد گونه	گونه
۳	مایکوباکتریوم کلونی زیر گونه‌ی کلونی
۳	مایکوباکتریوم فورچوئیتوم
۷	مایکوباکتریوم کلونی زیر گونه‌ی آبسوس
۱۸	مایکوباکتریوم سیمیه
۸	مایکوباکتریوم کانزاسی
۱	مایکوباکتریوم گوردونی
۴	مایکوباکتریوم اسکروفولاسئوم
۱	مایکوباکتریوم مالمونس
۳	مایکوباکتریوم اینتراسلولار
۴۸	تعداد کل

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

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

۹۴ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۶۰ درجه سانتی گراد، ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد پس از اتمام سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR با دو آنزیم HaeIII، 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. آنزیم HaeIII 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) HSPF3 (protein hsp65) (5'-ATC GCC AAG GAG ATC GAG CT-3') از دو پرایمر 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 ۶۲ درجه سانتی گراد، ۹۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی گراد پس از اتمام سیکل، ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی گراد بود. محصولات PCR با سه آنزیم HphI، HpaII، AVaII به صورت جداگانه و طبق پروتکل های استاندارد هضم و الگوی بدست آمده روی آگارز ۲٪ بررسی شد (۱۰، ۱۷).

hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد. سه گونه *Myco. intracelular* مورد شناسایی قرار گرفت. سرعت تشخیص به وسیله 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 میکوباکتریوم نشد اما پرایمرهای TB و hsp65 با حساسیت بالایی این گونه را شناسایی کردند.

بحث و نتیجه گیری

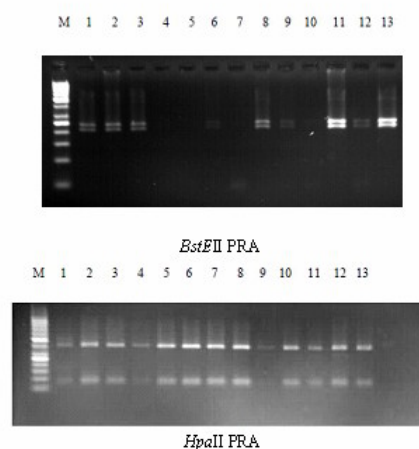
در سال ۱۹۸۲ همه کارشناسان دنیا معتقد بودند که بیماری سل تا سال ۲۰۰۰، کنترل و بحث آن به کتب پزشکی محدود می شود، ولی این امید چند سالی بیش تر به طول نکشید. به طوری که در سال ۱۹۹۳، این بیماری از طرف سازمان بهداشت جهانی به عنوان فوریت جهانی اعلام گردید (۱۱).

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 و اپیدمی سوم، بروز و گسترش سل مقاوم به دارو که این همه گیری بسیار خطرناک است (۱۲).

مقاوم بودن میکوباکتریوم های آتیبیک 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 میکوباکتریوم های آتیبیک می تواند حائز اهمیت باشد (۱۳). روش PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) با به کار گیری قطعات مختلفی از DNA قادر است با حساسیت بالایی به تمایز گونه های مختلف میکوباکتریوم بپردازد.

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

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 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 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 پرایمر TB و SP، ۸۵/۷٪ و پرایمر hsp65، ۱۰۰٪ مشاهده شد.



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

سه نمونه به عنوان *Myco. furuitum* که سرعت تشخیص به وسیله 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 شد که هر سه پرایمر TB، SP، hsp65 قادر به شناسایی این میکوباکتریوم بودند. ۴ نمونه به عنوان *Myco. scrofulaceum* و سرعت تشخیص به وسیله پرایمر TB، ۱۰۰٪، پرایمر SP، ۷۵٪ و پرایمر

یک روش سریع و دقیق با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ معرفی گردید. البته در این بررسی علاوه بر آنزیم HaeII از آنزیم های دیگری نظیر CfoI, DdeI و MspI نیز استفاده شد که باعث بالا تر بردن حساسیت روش ذکر شده گردید (۱۵).

در مطالعه ای که توسط Roth در سال ۲۰۰۵ انجام شد، ۸۱۱ گونه باکتریایی مورد مطالعه قرار گرفت که از این میان ۶۷۸ گونه (۵۴ دسته) متعلق به مایکوباکتریوم ها بودند. روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA با به کارگیری آنزیم HaeIII موفق شد ۳۹ دسته از ۵۴ دسته مایکوباکتریوم را با حساسیتی برابر ۸۴٪ شناسایی کند. دسته های دیگر که مربوط به Myco. avium complex, Myco. chelonae, Myco. abscessus بود برای شناسایی نیاز به هضم با آنزیم های بیشتری داشت (۹).

در بررسی حاضر، روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA با به کارگیری آنزیم HaeIII توانست ۳۸ گونه از ۴۸ گونه مایکوباکتریوم آتیپیک مورد مطالعه را شناسایی کند اما موفق به شناسایی ۱۰ گونه نشد. این روش با حساسیتی برابر ۷۹/۱٪ قادر به تمایز گونه های مختلف مایکوباکتریوم شد. لازم به ذکر است که به کارگیری این روش فقط با یک آنزیم مانع از تعیین دقیق گونه Mycobacterium simiae از اعضای دیگر Myco. simiae complex شد و برای آنالیز دقیق گونه ها 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 کاربردی نبودن این روش می شود. استفاده از آنزیم HaeIII مورد تایید مقالات بیشتری بوده (۹، ۱۴) و نتایج حاصل از آن نیز قابل قبول می باشد بنابراین هر چند حساسیت این روش با به کارگیری یک آنزیم

برای تمایز ۳۳۰ گونه مایکوباکتریوم استفاده شد. این روش توانست تمام گونه های مورد مطالعه را با حساسیتی برابر ۱۰۰٪ شناسایی کند (۸). در مطالعه مشابه دیگری که توسط Taylor در سال ۱۹۹۷ صورت گرفت، از ۱۰۳ نمونه مورد بررسی ۱۰۰ نمونه با روش TB PRA شناسایی شد اما، ۳ نمونه به صورت ناشناخته باقی ماند. ۲ نمونه با استفاده از روش های بیوشیمیایی به عنوان Myco. gordonae و Myco. terra complex و یک نمونه باقی مانده فقط به عنوان یک گونه مایکوباکتریوم گزارش شد بدون این که نوع دقیق گونه آن مشخص شود. در این مطالعه، حساسیت روش TB PRA ۹۷٪ گزارش شد (۱۴).

در این مطالعه روش TB PRA با به کار گیری دو آنزیم HaeIII و BstEII توانست از ۴۸ گونه مایکوباکتریوم آتیپیک مورد مطالعه، ۳۴ نمونه را شناسایی کند. این روش با حساسیتی برابر ۷۰/۸٪ توانست گونه های مختلف مایکوباکتریوم را از یکدیگر تمایز دهد. عدم شناسایی ۱۴ نمونه، با توجه به حساسیت بالای این روش در مطالعات نامبرده، چندان قابل انتظار نبود هر چند این تفاوت می تواند به علت غلظت کم نمونه ها باشد اما از آنجا که روش های مورد مطالعه در این مقاله روی نمونه هایی با غلظت یکسان انجام گرفته حساسیت ذکر شده برای روش TB PRA قابل مقایسه با دو روش دیگر بوده و نتایج حاصل کاربردی می باشد.

در مطالعه ای که توسط Springer در سال ۱۹۹۶ انجام شد، برای تمایز و شناسایی ۳۴ نمونه مایکوباکتریوم از روش های مولکولی و روش های فنوتیپی از قبیل سرعت رشد، مورفولوژی کلنی ها، کروماتوگرافی و غیره استفاده شد. ۲۰ نمونه با حساسیت بالایی توسط هر ۲ روش شناسایی شدند. ۱۰ نمونه با حساسیت پائینی در روش های فنوتیپی مورد شناسایی قرار گرفت. ۴ نمونه توسط روش های فنوتیپی شناسایی نشد و روش 16S-23S rRNA gene spacer PRA با شناسایی هر ۳۴ گونه به عنوان

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. intracelullar نشان 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 HpaII، HphI، AvaII 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 کاملاً مشخص و با فواصل دور از هم بودند که منجر به آنالیز دقیق تر و سریع تر گردید. از طرفی، استفاده از سه آنزیم AvaII، HpaII و HphI 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

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

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.