

TÜBERKÜLOZ DIŞI MİKOBAKTERİ İZOLATLARININ TANIMLANMASINDA INNO-LiPA MYCOBACTERIA, INNO-LiPA MYCOBACTERIAv2 VE *hsp65* DİZİ ANALİZİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

EVALUATION OF INNO-LiPA MYCOBACTERIA, INNO-LiPA MYCOBACTERIAv2 AND *hsp65* SEQUENCING FOR IDENTIFICATION OF THE CLINICAL NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIAL ISOLATES

Cengiz ÇAVUŞOĞLU*, **Ajda TURHAN***, **Yusuf Engin YAYGIN***
Yeşer KARACA DERİCİ*, **Altınay BİLGİÇ***

ÖZET: Bu çalışmada, klinik örneklerden elde edilen 29 adet mikobakteri izolatının tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ters hibridizasyon temelli INNO-LiPA Mycobacteria ve INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium) testleri ile *hsp65* geninin parsiyel dizi analizinin performansları değerlendirilmiştir. Çalışmada saptanan yeni ve özgün *hsp65* gen dizileri AY379074, AY379077, AY379075 ve AY553874 kabul numaraları ile EMBL (European Molecular Biology Laboratory) gen bankasında saklanmıştır. Bütün mikobakteri izolatları her iki LiPA testinde de cins düzeyinde saptanmış, ayrıca, LiPA Mycobacteria v2 ile bu çalışmada değerlendirilen 9 farklı mikobakteri türünden 8'i (*M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum* ve *M.peregrinum*) tür düzeyinde tanımlanmıştır. 16S-23S rRNA ITS bölgesini hedef alan LiPA testlerinden elde edilen tanımlama sonuçları ile *hsp65* genine yönelik DNA dizi analizi sonuçları arasında bir uyum olduğu görülmüştür. LiPA Mycobacteria v2 ile bütün mikobakteri türlerinin tanımlanamamasına karşın, bu testin DNA dizi analizinin yapılamadığı klinik laboratuvarlarda rutin çalışmalarda yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

Anahtar sözcükler: *Tüberküloz dışı mikobakteri, INNO-LiPA Mycobacteria, INNO-LiPA Mycobacteria v2, hsp65 geni, DNA dizi analizi.*

ABSTRACT: In this study, polymerase chain reaction (PCR) reverse hybridization based line probe assays, INNO-LiPA Mycobacteria and INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgium) and partial sequencing of *hsp65* gene were evaluated for the identification of 29 clinical mycobacterial isolates. Unique *hsp65* sequences identified during the study were deposited in EMBL (European Molecular Biology Laboratory) under accession numbers AY379074, AY379077, AY379075 and AY553874.

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Bornova, İzmir.

All mycobacterial isolates were identified at the genus level on both LiPA assays, whereas 8 of 9 different known mycobacteria species (*M.kansasii*, *M.gordonae*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.fortuitum* and *M.peregrinum*) were identified at species level with LiPA Mycobacteria v2. A clear correlation was found between the results of identifications obtained by the both LiPA assays, which targeted the 16S-23S rRNA ITS region, and DNA sequencing, which targeted the hsp65 gene. In conclusion, although LiPA Mycobacteria v2 could not identify all mycobacteria species, it may be especially useful for routine work in clinical laboratories, which are not capable of carrying out DNA sequencing.

Key words: Non-tuberculous mycobacteria, INNO-LiPA Mycobacteria, INNO-LiPA Mycobacteria v2, hsp65 gene, DNA sequencing.

GİRİŞ

Günümüzde *Mycobacterium* cinsi içinde, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks üyeleri ile 70'den fazla tüberküloz dışı mikobakteri (TDM) türü bulunmaktadır¹. Mikobakterilerin hızlı ve doğru bir şekilde tanımlanması, hem bulaşma için önlem alınması gerekıp gerekmediğine karar vermek, hem de uygun tedavi seçimlerini belirlemek için gereklidir². Tür tanımlamasında kullanılan geleneksel yöntemler ve fenotipik testler zaman alıcı ve zahmetlidir. Ayrıca çoğu kez klinik laboratuvarların kapasitesini aşan özel testler gerektirir. Bu nedenle mikobakterilerin hızlı ve doğru tanımlanmasını sağlayacak moleküler yöntemlerin geliştirilmesi için çaba harcanmaktadır. Son yıllarda mikobakterilerin tanımlanmasında polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)-restriksiyon fragman uzunluğu polimorfizmi analizi, rRNA hibridizasyon deneyi, PCR-ters hibridizasyon deneyi ve hsp65, 16S rRNA, 16S-23S rRNA ITS ve rpoB' yi kodlayan hedef genlerin PCR temelli dizi analizi gibi çeşitli moleküler yöntemler geliştirilmiştir³⁻⁸.

Bu çalışmada klinik örneklerden elde edilen mikobakteri türlerinin tanımlanmasında INNO-LiPA Mycobacteria, INNO-LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium) ve hsp65 geninin parsiyel dizi analizinin duyarlılıklarının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Mikobakteri İzolatları: Çalışmada 1997-2004 yılları arasında Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Mikobakteriyoloji Laboratuvarı'nda 29 farklı hastadan elde edilen 29 adet TDM izolatu değerlendirildi. Çalışmaya alınan izolatlar daha önce Accu-Probe rRNA hibridizasyon deneyi (Gen-Probe Inc, San Diego, CA) ya da üreme hızı ve pigment oluşturma gibi fenotipik sınıflandırma yöntemleri ile tanımlandı⁹.

LiPA Testleri: INNO-LiPA Mycobacteria ve INNO-LiPA Mycobacteria v2 üretici firmanın önerilerine göre kullanıldı. Özetle, her iki protokolde de hedef genler biotin ile işaretli özgül primerler kullanılarak PCR ile amplifiye edildi, oluşan biotinli

amplikonlar nitroselüloz şerit üzerinde bulunan türe özgü oligonükleotit problarla hibridize edildi ve DNA/DNA hibritleri enzim ve kromojenik substratla görünür hale getirildi. Elde edilen bant paternleri kitle birlikte sağlanan kartla değerlendirilerek tür tanımlaması yapıldı.

DNA Dizi Analizi: Kültürde üreyen mikobakterilerden elde edilen genomik DNA'nın *hsp65* geninin 441 baz çiftli bölgesi TB11 (5'-ACCAACGATGGTGTGTCCAT-3') ve TB12 (5'-CTTGTGCAACCGCATACCCT-3') primerleri kullanılarak amplifiye edildi¹⁰. Daha sonra aynı primerler kullanılarak PCR ürünlerinin DNA dizileri oluşturuldu. DNA dizi analizi otomatize Applied Biosystems 310 DNA sekans cihazı (Applied Biosystems, Foster City, CA) ile yapıldı. Değerlendirme için elde edilen diziler BLAST programı kullanılarak GenBank'daki referans dizilerle karşılaştırıldı.

Nükleotit Dizisi Kabul Numaraları: Çalışmada saptanan yeni diziler AY379072, AY379073, AY379074, AY379075, AY379076, AY379077, AY536637 ve AY553874 kabul numaraları ile EMBL (European Molecular Biology Laboratory) kayıtlarında saklandı.

B U L G U L A R

Çalışmaya alınan 29 mikobakteri izolatının tümü her iki INNO-LiPA testinde de *Mycobacterium* cinsine ait problar ile hibridize olmuştur. Yirmi dokuz mikobakteri izolatının 15'i her iki INNO-LiPA testiyle de tür düzeyinde tanımlanırken, 8 izolat yalnız INNO-LiPA *Mycobacteria* v2 ile tür düzeyinde tanımlanabilmiştir. Kalan 6 izolat ise her iki INNO-LiPA testiyle de tür düzeyinde tanımlanamamıştır (Tablo I).

Yirmi dokuz izolatın 25'i *hsp65* dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanmıştır (Tablo I). Dizi analizi ile özgül bir tür olarak belirlenen her bir mikobakteri, o türün standart suşu ile en az %99 dizi homolojisi göstermiştir. Dört mikobakteri izolatının ise (izolat 1, izolat 2, izolat 3 ve izolat 4) *hsp65* geninin dizi analizinde elde edilen diziler daha önce bildirilmemiş özgün dizilerdir; dolayısıyla bu izolatlar *hsp65* geni dizi analizi ile tür düzeyinde tanımlanamamışlardır. İzolat 1'in (AY379074) belli bir mikobakteri suşu ile %95.3'den daha fazla bir dizi homolojisi göstermediği belirlenmiş, buna karşın, izolat 2 (AY379077), izolat 3 (AY379075) ve izolat 4 (AY553874)'ün *Mycobacterium* sp. variant MS430, *Mycobacterium lentiflavum* ve *Mycobacterium triplex* ile sırasıyla %99, %99.8 ve %98.6 oranlarında dizi benzerlikleri gösterdiği saptanmıştır.

Tablo I: Mikobakteri İzolatlarının LiPA *Mycobacteria*, LiPA *Mycobacteria* v2 ve *hsp65* Dizi Analizi İle Tanımlanması

İzolat	<i>hsp65</i>	<i>LiPA-Mycobacteria</i> v2		<i>LiPA-Mycobacteria</i>	
	Takson*	Hibridize olan prob(lar)		Hibridize olan prob(lar)	
		CSP	TSP	CSP	TSP
İzolat 1	<i>Mycobacterium</i> sp.	+	-	+	-
İzolat 2	<i>Mycobacterium</i> sp.	+	-	+	-
İzolat 3	<i>Mycobacterium</i> sp.	+	-	+	-
İzolat 4	<i>Mycobacterium</i> sp.	+	-	+	-
MM-1	<i>M. mucogenicum</i>	+	-	+	-
MM-2		+	-	+	-

Tablo I: Mikobakteri İzolatlarının LiPA Mycobacteria, LiPA Mycobacteria v2 ve hsp65 Dizi Analizi İle Tanımlanması (Devamı)

İzolat	<i>hsp65</i>	<i>LiPA-Mycobacteria v2</i>		<i>LiPA-Mycobacteria</i>	
	Takson*	Hibridize olan prob(lar)		Hibridize olan prob(lar)	
MF-1	<i>M. fortuitum</i>	+	MFO	+	-
MF-2		+	MFO	+	-
MF-3		+	MFO	+	-
MF-4		+	MFO	+	-
MP-1	<i>M. peregrinum</i>	+	MFO	+	-
MP-2		+	MFO	+	-
MP-3		+	MFO	+	-
MP-4		+	MFO	+	-
MC-1	<i>M. chelonae</i>	+	MCH-1	+	MCH-1
MC-2		+	MCH-1	+	MCH-1
MA-1	<i>M. abscessus</i>	+	MCH-1, MCH-2	+	MCH-1, MCH-2
MA-2		+	MCH-1, MCH-2	+	MCH-1, MCH-2
MA-3		+	MCH-1, MCH-2	+	MCH-1, MCH-2
MI-1	<i>M. intracellulare</i>	+	MAIS, MIN-1	+	MAIS
MI-2		+	MAIS, MIN-1	+	MAIS
MI-3		+	MAIS, MIN-1	+	MAIS, MIN
MI-4		+	MAIS, MIN-2	+	MAIS, MIN
MV-1	<i>M. avium</i>	+	MAIS, MAV	+	MAIS, MAV
MV-2		+	MAIS, MAV	+	MAIS, MAV
MV-3		+	MAIS, MAV	+	MAIS, MAV
MG-1	<i>M. gordonae</i>	+	MGO	+	MGO
MG-2		+	MGO	+	MGO
MK-1	<i>M. kansasii</i>	+	MKA-1	+	MKA-1

* Suşlar hsp65 dizi analizi ile tanımlandı. CSP: Cins özgül prob, TSP: Türe özgül prob.

TARTIŞMA

Bu çalışmada *hsp65* geninin parsiyel DNA dizi analizi yapılan izolat 1 hiçbir mikobakteri türü ile %95.3'den daha fazla bir dizi homolojisi göstermezken, izolat 2 yeni tanımlanmakta olan *Mycobacterium sp.* variant MS430 ile %99 dizi benzerliği göstermiştir. Ayrıca izolat 3 ile *M. lentiflavum* arasında %99.8 ve izolat 4 ile *M. triplex* arasında %98.6 oranında dizi homolojisi saptanmıştır. Özgün nükleotid dizileri saptanan bu dört izolatın yeni mikobakteri türleri ya da bilinen türlerin yeni sekovarları (sequovar=sequence variant) olabileceği düşünülmüştür. Buna karşın bu izolatların biyokimyasal testlerle tanımlanması yapılamamıştır. Sözü edilen izolatların LiPA Mycobacteria ve LiPA Mycobacteria v2 testleriyle de tür düzeyinde tanımlaması mümkün olamamıştır.

Çalışmamızda, dört *M. fortuitum*, dört *M. peregrinum*, üç *M. abscessus*, iki *M. chelonae* ve iki *M. mucogenicum* izolatından oluşan toplam 15 hızlı üreyen mikobakteri (HÜM) izolatı *hsp65* geninin parsiyel dizi analizi ile tanımlanmıştır. Dizi analizi ile bütün HÜM türleri birbirinden kolayca ayrılmış ve *M. fortuitum*, *M. mucogenicum* ve *M. chelonae* izolatlarında tür içi allelik çeşitlilik saptanmamıştır.

(Şekil 1). Bu çalışmadaki *M. mucogenicum* izolatları, *M. mucogenicum* AJ307637 suşu ile aynı *hsp65* geni dizisine sahiptir. İki *M. mucogenicum* izolatı her iki LiPA testi ile de tür düzeyinde tanımlanamamıştır.

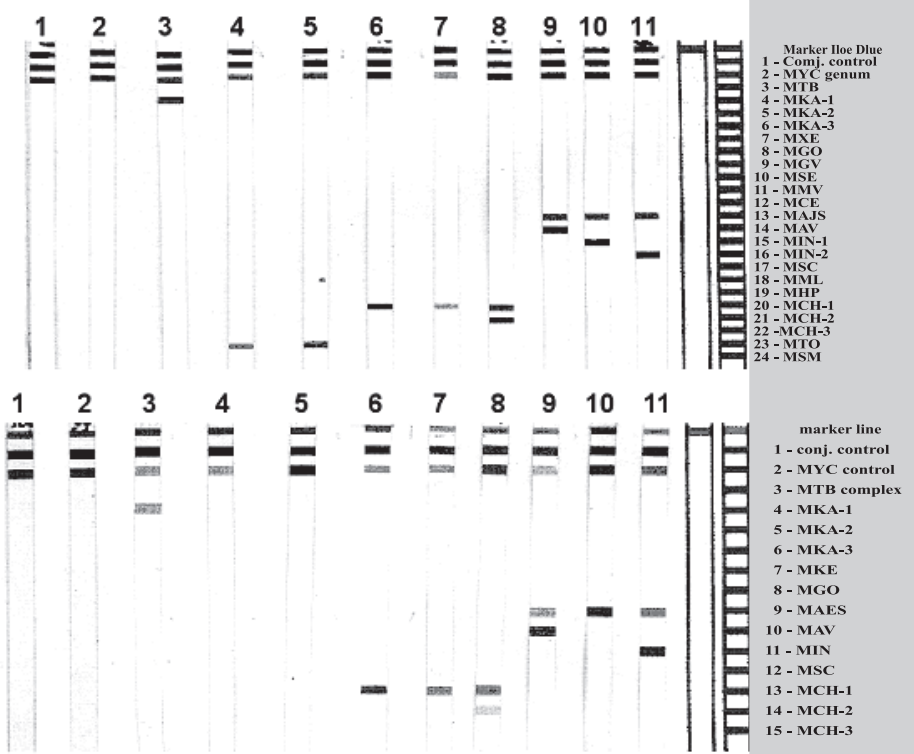
On yılı aşkın bir süreden beri *M. abscessus* ve *M. chelonae* ayrı türler olarak bilinmelerine karşın, birçok klinik laboratuvar bu türleri ayıramamakta ya da yanlış tanımlamaktadır¹². Ayrıca Ringuet ve arkadaşlarının⁶ da bildirdiği gibi, *M. abscessus* ve *M. chelonae*'nin *hsp65* dizileri ile ilgili olarak bazı veri hataları bulunmaktadır. Örneğin; nükleotit veri tabanlarında *M. chelonae* olarak tanımlanan bazı suşların *M. abscessus* ATCC19977^T ile aralarında 0-6 baz farkı varken, *M. chelonae* ATCC35752^T ile 30-32 baz farkı olduğu saptanmıştır⁶. *M. abscessus* ATCC19977^T ve *M. chelonae* ATCC35752^T ile karşılaştırıldıklarında, bu çalışmada değerlendirilen üç izolat *M. abscessus*, iki izolat ise *M. chelonae* olarak tanımlanmıştır. Önceki çalışmalarla^{1,13,14,15} uyumlu olarak üç *M. abscessus* izolatı her iki LiPA testinde de MHC-1 ve MHC-2 problemleri ile hibridize olurken iki *M. chelonae* izolatı her iki testin serisinde de yer alan MCH-1 probu ile olumlu sinyal vermiştir.

Çalışmamızda değerlendirilen HÜM izolatlarının *hsp65* geninin 441 baz çift (bcç)'lik parçasında nükleotit farklılıkları özellikle 24-59. kodonlar ile 74-111. kodonlar arasında sık görülmüştür. Nükleotit değişikliklerinin çoğu kez ya aminoasit değişikliğine yol açmadığı ya da fonksiyonel olarak aynı aminoasitlerin kodlanmasına neden olduğu, aminoasit değişikliğine yol açan nükleotit değişikliklerinin ise hemen daima 77. ve 90. kodonlar arasında olduğu saptanmıştır. Sonuç olarak bu bölgelerin *hsp65* geninin çok değişken bölgeleri olduğu sonucuna varılmıştır. HÜM izolatlarının *hsp65* dizileri Şekil 2a'da görülmektedir.

Hızlı üreyen mikobakteriler normal ve bağışıklık sistemi baskılanmış hastalarda travma ve cerrahi sonrası yara enfeksiyonları, kronik akciğer enfeksiyonları, yaygın enfeksiyonlar ve kateter enfeksiyonları olmak üzere birçok hastalığa neden olmaktadır¹⁶. Bu çalışmada da birer *M. abscessus* (MAB-2) ve *M. peregrinum* (MPE-1) suşu IL-12 reseptör beta 1 eksikliği bulunan iki çocuğun lenf bezi örneklerinden izole edilmiştir. Başka bir çalışmada da, IL-12 reseptör beta 1 eksikliği gibi makrofaj aktivasyonu bozuklukları olan hastalarda yaygın mikobakteri enfeksiyonları bildirilmiştir¹⁷. Diğer klinik HÜM izolatlarında ise mikobakteri enfeksiyonu kanıtlanamamıştır.

Çalışmamızda dört *M. intracellulare*, üç *M. avium*, iki *M. gordonae* ve bir *M. kansasii* izolatı *hsp65* geninin parsiyel dizi analizi ile tanımlanmıştır. Değerlendirilen *M. avium* izolatları arasında allelik çeşitlilik saptanmamış, bütün *M. avium* izolatlarının *hsp65* gen dizileri AF547810 suşununki ile aynı bulunmuştur. *M. intracellulare* izolatlarının *hsp65* geni dizileri arasında dokuz, *M. avium* ve *M. intracellulare* izolatlarının arasında ise 11 nükleotitte farklılık vardır. Buna karşın hiçbir nükleotit değişikliği aminoasit değişikliğine yol açmamıştır. Nükleotit farklılıkları özellikle 45-59. kodonlar ile 100-111. kodonlar arasında siktir. *M. avium* ve *M. intracellulare* izolatlarının *hsp65* dizileri Şekil 1b'de görülmektedir. Bütün *M. avium*, *M. gordonae* ve *M. kansasii* izolatları her iki LiPA testi ile doğru olarak tanımlanmıştır. Buna karşın *M. intracellulare* izolatlarının tümü LiPA-Mycobacteria v2 ile tür düzeyinde tanımlanırken, iki izolat LiPA-Mycobacteria testinde yalnız MAIS probu ile sinyal

vermiştir (Şekil 2). Bu bulgu diğer araştırmacılar tarafından da bildirilmiştir^{1,8,13-15,18}. Çalışmada değerlendirilen *M.intracellulare*, *M.avium* ve *M.kansasii* suşları kanıtlanmış pulmoner enfeksiyonu olan hastaların örneklerinden izole edilmişlerdir. İlginç olarak bu hastaların hiçbirinde bilinen bir bağışıklık sistemi yetersizliği yoktur.



Şekil 2: LiPA- Mycobacteria v2 (A) ve LiPA-Mycobacteria (B) sonuçları. Problemlerin yerleri sağda gösterilmiştir. Şeritler; 1: izolat 1, 2: izolat 2, 3: *M.kansasii*, 4: *M.fortuitum*, 5: *M.peregrinum*, 6 ve 7: *M.chelonae*, 8: *M.abscessus*, 9: *M.avium*, 10 ve 11: *M.intracellulare*.

DNA dizi analizi mikobakteri türlerinin tanımlanmasında altın standart haline gelmiştir. Bu yöntemle bilinen mikobakteri türlerinin tanımlanmasının yanı sıra, bilinen bir türün yeni sekovarları ya da yeni türler de tanımlanabilmektedir. Buna karşın dizi analizi teknolojisi rutin çalışmalar için oldukça pahalı bir işlemdir. Son yıllarda Accu-Probe rRNA hibridizasyon ve LiPA-Mycobacteria testleri klinik olarak önemli mikobakterilerin tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmasına rağmen, bu yöntemlerle tanımlanabilen tür sayısı kısıtlıdır^{1,3}. INNO-LiPA Mycobacteria v2 testinde ise *M.tuberculosis*, *M.kansasii*, *M.xenopi*, *M.gordonae*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*, *M.chelonae*/*M.abscessus*, *M.genavense*, *M.simiae*, *M.marinum*/*M.ulcerans*, *M.celatum*, *M.malmoense*, *M.heamophilum*, *M.fortuitum* ve *M.smegmatis* gibi klinik olarak önemli mikobakteri türlerinin çoğu için özgül problemler bulunmaktadır¹⁹. Bu nedenle LiPA- Mycobacteria v2'nin tanımlama

spektrumu LiPA- *Mycobacteria* ve Accu-Probe'den daha geniŐtir. Ayrıca, LiPA *Mycobacteria* v2 testi ile *M.intracellulare* Min-A,-B,-C ITS sekovarları MIN-1 probu ile saptanırken, Mac-A sekovarları MIN-2 probu ile belirlenmektedir. Buna karşın LiPA- *Mycobacteria*'nın *M.intracellulare* probu ise sadece tanımlanmış Min-A ve Min-D sekovarları ile hibridize olmaktadır¹⁸. Diğ er yandan LiPA- *Mycobacteria* v2 testinin en önemli eksiği testin *M.mucogenicum*'u tanımlayamamasıdır.

Bu  alıŐmada 16S-23S ITS bölgesini hedef alan LiPA testlerinden elde edilen tanımlama sonuçları ile *hsp65* genini hedefleyen DNA dizi analizi sonuçları arasında uyum olduğu saptanmıştır. LiPA-*Mycobacteria* v2, bu çalışmada değerlendirilen bütün mikobakteri izolatlarını cins düzeyinde ve bilinen dokuz farklı mikobakteri türünden sekizini tür düzeyinde tanımlamıştır. LiPA-*Mycobacteria* v2 ile bütün mikobakteri türleri tanımlanamamasına karşın, bu testin DNA dizi analizinin yapılamadığı klinik laboratuvarlarda rutin çalışmalarda yararlı olacağı sonucuna varılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Suffys PN, da Silva Rocha A, de Oliveira M, et al: Rapid identification of *Mycobacteria* to the species level using INNO-LiPA *Mycobacteria*, a reverse hybridization assay. J Clin Microbiol. 2001, 39: 4477-4482.
2. Falkinham IIIrd JO: Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996, 9: 177-215.
3. Beggs ML, Stevanova R, Eisenach KD: Species identification of *Mycobacterium avium* complex isolates by a variety of molecular techniques. J Clin Microbiol 2000, 38: 508-512.
4. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, Crawford JT, Cooksey RC: Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis. J Clin Microbiol 1999, 37: 3688-3692.
5. Lee H, Bang HE, Bai GH, Cho SN: Novel polymorphic region of the *rpoB* gene containing *Mycobacterium* species-specific sequences and its use in identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2003, 41: 2213-2218.
6. Ringuet H, Akoua-Koffi C, Honore S, et al: *hsp65* sequencing for identification of rapidly growing mycobacteria. J Clin Microbiol 1999, 37: 852-857.
7. Roth A, Fischer M, Hamid ME, Michalke S, Ludwig W, Mauch H: Differentiation of phylogenetically related slowly growing mycobacteria based on 16S-23S rRNA gene internal transcribed spacer sequences. J Clin Microbiol 1998, 36: 139-147.
8. Tortoli E, Nanetti A, Piersimoni C, et al: Performance assessment of new multiplex probe assay for identification of mycobacteria. J Clin Microbiol 2001, 39: 1079-1084.
9. Kent PT, Kubica GP: Public health mycobacteriology. A guide for a level III laboratory. 1985. US Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control, Atlanta.
10. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, B ttger 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.
11. Pai S, Esen N, Pan X, Musser JM: Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*). Arch Pathol Lab Med 1997, 121: 859-864.
12. Yakus MA, Hernandez SM, Floyd MM, Sikes D, Butler WR, Metchock B: Comparison of methods for identification of *Mycobacterium abscessus* and *M.chelonae* isolates. J Clin Microbiol 2001, 39: 4103-4110.
13. Lebrun L, Gonullu N, Boutros N, et al: Use of INNO-LIPA assay for rapid identification of mycobacteria. Diagn Microbiol Infect Dis 2003, 46: 151-153.

14. Makinen J, Sarkola A, Marjamaki M, Viljanen MK, Soini H: Evaluation of GenoType and LiPA Mycobacteria assays for identification of Finnish mycobacterial isolates. *J Clin Microbiol* 2002, 40: 3478-3481.
15. Miller N, Infante S, Cleary T: Evaluation of the LiPA Mycobacteria assay for identification of mycobacterial species from Bactec 12B bottles. *J Clin Microbiol* 2000, 38: 1915-1919.
16. Brown-Elliott BA, Wallace RJ Jr: Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 2002, 15: 716-746.
17. Andrews T, Sullivan KE: Infections in patients with inherited defects in phagocytic function. *Clin Microbiol Rev* 2003, 16: 597-621.
18. Mijs W, de Vreese K, Devos A, et al: Evaluation of a commercial line probe assay for identification of mycobacterium species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, 21: 794-802.
19. Tortoli E, Mariottini A, Mazzealli G: Evaluation of INNO-LiPA Mycobacteria v2: improved reverse hybridization multiple DNA probe assay for mycobacterial identification. *J Clin Microbiol* 2003, 41: 4418-4420.