

FULL PAPERS

Molecular investigations applied to nontuberculous mycobacteria identification

Monica Pecorari, William Gennari, Anna Fabio, Antonella Grottola, Massimino Messinò, Giuliana Fabio, Nadia Nanni, Giulia Forbicini, Rita Magnani, Anna Maria Teresa Sabbatini, Fabio Rumpianesi, Chiara Casolari

Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia,
Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Policlinico, Modena

Key Words: Nontuberculous mycobacteria, GenoType Mycobacteria CM/AS, 16S rDNA sequencing

Indagini molecolari applicate alla caratterizzazione di micobatteri non-tubercolari

SUMMARY

Objective. Aim of this study was molecular identification in clinical specimens of NonTuberculous Mycobacteria (NTM) with commercial methods and automated sequencing.

Materials and methods. Three thousand clinical specimens were analyzed for the isolation of Mycobacteria. Forty strains of NTM were previously analyzed with GenoType Mycobacteria CM/AS kit and then with partial 16S rDNA sequencing.

Results. 38/40 NMT strains were identified with GenoType Mycobacteria CM/AS kit as: *M. goodnae* (15), *M. intracellulare* (8), *M. xenopi* (8), *M. mucogenicum* (2), *M. kansasii* (2), *M. chelonae* (1), *M. avium* (1), *M. lentiflavum* (1). Two unidentified strains were subjected to 16S rDNA sequencing and were identified as *M. kumamotoense*.

Conclusions. Partial 16SrDNA sequencing is a valid assay to study NTM strains unidentified with commercial assays. This new approach, applied to clinical diagnostic, also permits the recognition of unusual strains or new species.

Received May 20, 2009

Accepted July 1, 2009

INTRODUZIONE

I micobatteri non tubercolari (MNT), comunemente considerati saprofiti ambientali o parassiti animali, hanno assunto negli ultimi anni un notevole rilievo clinico come responsabili di infezioni anche di estrema gravità in pazienti immunocompromessi (8, 9, 12) ed occasionalmente in ospiti immunocompetenti (17, 18).

I metodi diagnostici tradizionali richiedono tempi lunghi e forniscono, a volte, risposte limitate sia per l'affidabilità delle identificazioni, valida solo per le specie più comuni, sia per la complessa tassonomia in continua evoluzione (13, 26). Ad oggi sono note circa 130 specie di MNT ed ogni anno mediamente questa lista viene incrementata di tre nuove specie (7).

Le metodiche tradizionali di identificazione vengono generalmente affiancate da saggi molecolari commerciali basati sull'uso di sonde geniche (AccuProbe, bioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France; GenoType Mycobacteria CM/AS, Hain, Lifescience, Nehren, Germany;

INNO-LiPA Mycobacteria v2 Amp., Innogenetics, Technologiepark Gent, Belgium).

Il limite di tali saggi molecolari consiste nella capacità d'identificare solo le specie più comunemente isolate. Perciò risulta necessario introdurre in ambito diagnostico un saggio che sia in grado di identificare tutte le specie finora note ed eventualmente anche specie non descritte.

Il sequenziamento del gene codificante per l'rRNA della subunità ribosomiale 16S (16S rDNA) risulta essere un importante mezzo per l'identificazione di qualsiasi specie batterica (5, 11), compresi i micobatteri (25, 27). Il confronto delle sequenze ottenute con sequenze note del gene 16S rDNA permette di differenziare batteri non solo a livello di genere, ma anche a livello di specie e di sottospecie (4).

Il gene 16S rDNA è lungo circa 1550 paia di basi (bp) ed è composto prevalentemente da regioni altamente conservate e da due aree ipervariabili A e B (corrispondenti in *Escherichia coli* ai nucleotidi in posizione 130-210 e 430-500 rispettivamente) (2, 25). I primers utilizzati per il sequen-

Corresponding author: Monica Pecorari

Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia,
Azienda Integrata Ospedaliero-Universitaria, Policlinico - Via del Pozzo 71, 41100 - Modena
Tel: 059-4223758 - Fax: 059-4223625 - E-mail: pecorari.monica@policlinico.mo.it

ziamento sono complementari alle regioni conservate dell'estremità 5' e 3' dell'intero gene o, in alternativa, complementari agli estremi delle prime 540 basi del gene; la sequenza delle regioni variabili viene utilizzata per la tassonomia comparativa (3, 19). La scelta di sequenziare le prime 540 bp o l'intero gene dipende dallo scopo della ricerca. Di solito si sequenzia l'intero gene per riuscire a distinguere tra loro ceppi molto particolari o per riuscire ad identificare delle nuove specie (23, 24); comunque il sequenziamento delle prime 500 bp è in genere sufficiente per un'adeguata identificazione degli isolati batterici di origine clinica in virtù della ipervariabilità della regione analizzata (4, 14).

Nel nostro studio 40 ceppi di micobatteri non tubercolari, isolati con le metodiche tradizionali, sono stati analizzati mediante il test molecolare GenoType Mycobacteria CM/AS.

I ceppi non identificati con il GenoType Mycobacteria CM/AS sono stati sottoposti a sequenziamento delle prime 523 bp del gene 16S rDNA.

MATERIALI E METODI

Nel 2006, presso la Struttura Complessa di Microbiologia e Virologia del Policlinico di Modena, sono stati analizzati 3000 campioni clinici per la ricerca di micobatteri di cui 40 ceppi sono risultati essere MNT. Tutti i 40 campioni clinici, provenienti ciascuno da un singolo paziente, erano negativi all'esame microscopico per la ricerca di batteri alcool-acido resistenti; di questi, 18 (11 espettorati; 7 lavaggi bronco-alveolari) sono stati testati con il saggio Amplified Mycobacterium tuberculosis direct test (Gen-Probe -BioMérieux SA, Marcy l'Etoile, France) su richiesta clinica, risultando tutti negativi. Tutti i 40 ceppi isolati sono stati sottoposti allo stesso saggio con esito negativo.

I ceppi di MNT provenivano per il 75% da pazienti di sesso maschile (30/40) e per il 25% da pazienti di sesso femminile (10/40), con una netta prevalenza di isolamenti da materiali respiratori (bronco-aspirati e lavaggi bronco-alveolari; 37/40) rispetto a materiali provenienti da altri distretti (urine: 2/40; essudati:1/40). Trentotto su 40 pazienti erano negativi per il test dell'HIV; 11 su 40 erano gli immunodepressi di cui 2 positivi per il test dell'HIV.

Su questi 40 ceppi di MNT si è proceduto alla genotipizzazione previa estrazione dell'acido nucleico da coltura.

Genotipizzazione Ibrida Inversa

I ceppi di MNT sono stati analizzati con un metodo molecolare di genotipizzazione per l'identifi-

cazione di specie, previa estrazione degli acidi nucleici totali secondo le indicazioni del kit GenoType Mycobacterium CM/AS (20).

Sequenziamento

Il DNA estratto è stato sottoposto a sequenziamento della regione 5' terminale del gene 16S rDNA, previa amplificazione tramite reazione a catena della polimerasi (PCR). I primers utilizzati per la PCR, disegnati utilizzando il software Primer3 (22): FW (nt 15-35) GATCATGGCTCAGATTGAACG, Rv (nt537-520) CGTATTACCGCGGCTGCT, complementari alle regioni conservate del gene, generano un frammento di 523 bp.

La reazione di amplificazione era costituita da 50 ng del DNA estratto, 250 µmol di ciascuna base, 50pmoli di ciascun primer, 2,5 U AmpliTaq Gold Polymerase (Applied Biosystem, Foster City, CA) in un volume finale di 50 µl. I campioni venivano sottoposti a 35 cicli di amplificazione, previa denaturazione a 94°C per 6 minuti, secondo lo schema: 94°C per 30secondi, 55°C per 30 secondi, 72°C per 60 secondi. Al termine veniva fatta una estensione a 72°C per 10 minuti.

Il prodotto di amplificazione era controllato su gel d'agarosio all'1.5%, purificato mediante kit commerciale (QiaQuick PCR purification kit, Qiagen, Milano, Italia) e quantizzato utilizzando una curva standard di DNA a concentrazione nota (pGEM linearizzato [10 ng/ml]). In seguito si procedeva alla reazione di cycle sequencing bidirezionale usando il Big-dye terminator Kit (Applied Biosystem, Foster City, CA). La reazione era effettuata in un volume totale di 20 µl contenenti 4 µl di BigDye® Terminator v1.1 Ready Reaction Mix, 3.2 pmol di primer e DNA nella quantità di 10 ng ogni 100 bp sequenziate. La reazione di sequenziamento veniva condotta utilizzando gli stessi primers usati per la PCR per 25 cicli con denaturazione a 96°C per 10 secondi, annealing a 50°C per 5 secondi ed estensione a 60°C per 1 minuto. I prodotti erano, infine, purificati con colonne Centri sep (Princeton Separations), sottoposti ad elettroforesi capillare su sequenziatore automatico a fluorescenza ABI PRISM 310 Genetic analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA). Le sequenze senso e antisense ottenute venivano analizzate con un software di allineamento (Autoassembler, Applied Biosystem, Foster City, CA), ottenendo una sequenza consenso. Tale consenso veniva inserito nel database GenBank per il confronto con le sequenze del gene 16S rDNA già ufficialmente accertate (software BLAST) al fine di ottenere l'identificazione di specie.

RISULTATI

I 40 ceppi di MNT, provenienti dai 3000 campio-

ni clinici sottoposti alla ricerca di micobatteri, sono stati isolati da materiali clinici di varia natura, come descritto in Tabella 1.

Trentotto dei 40 ceppi di MNT (95%) sono stati identificati con i kit del commercio Genotype *Mycobacterium* CM/AS come appartenenti alle specie riportate in Tabella 2. In particolare il kit Genotype *Mycobacterium* CM ha permesso di identificare 35/40 ceppi delle seguenti specie: *M. gordonae* (n° 15 ceppi), *M. intracellulare* (n° 8 ceppi), *M. xenopi* (n° 8 ceppi), *M. kansasii* (n° 2 ceppi), *M. chelonae* (n° 1 ceppo), *M. avium* (n° 1 ceppo). I 5/40 ceppi non identificati con il kit Genotype *Mycobacterium* CM sono stati saggiati con il kit Genotype *Mycobacterium* AS, permettendo di identificare 3/5 ceppi di cui *M. mucogenicum* (n° 2 ceppi), *M. lentiflavum* (n° 1 ceppo). La Figura 1 riporta i profili delle specie identificate nonché i profili dei due ceppi risultati indeterminati.

Per quanto riguarda la corrispondenza ai criteri microbiologici di diagnosi delle patologie polmonari da MNT, in 8/40 pazienti i ceppi di MNT erano stati isolati da almeno un campione di BAL; tutto ciò depone per una loro significatività clinica rispondente ai criteri dell'American Thoracic Society (ATS) (10). In particolare i ceppi isolati da BAL erano *M. intracellulare* (n° 3 ceppi), *M. xenopi* (n° 2 ceppi), *M. lentiflavum* (n° 1 ceppo), *M. kansasii* (n° 1 ceppo), *M. gordonae* (n° 1 ceppo). Di questi 8 pazienti, 4 erano immunodepressi (pazienti nn. 22, 31, 38, 40 della Tabella 1) e negativi per il test dell'HIV. Nei pazienti n.35, n.36 e n.39 (Tabella 1) erano state ottenute colture positive da almeno due differenti campioni di espettorato. I ceppi isolati erano stati identificati come *M. xenopi*. Dei tre pazienti solo il n.39 era immunodepresso e tutti erano negativi per il test dell'HIV.

I due ceppi, isolati dai pazienti n.29 e n.30 (Tabella 1), non identificati con nessuna delle due metodiche commerciali sopra indicate, sono stati sequenziati e identificati mediante software BLAST (Database, Genbank). Entrambi i ceppi risultavano avere il 99% di similarità di sequenza rispetto allo stesso ceppo di riferimento CST7274 depositato in GenBank, classificato come *Mycobacterium kumamotonense*. Le sequenze ottenute differivano per sole due basi rispetto al ceppo di riferimento; in particolare in un ceppo si sono riscontrate le mutazioni G88A e G464T, mentre nell'altro le mutazioni G88A e C169T, secondo la numerazione del 16S rDNA di *E. Coli*. Per entrambi i ceppi di *M. kumamotonense* isolati mancava l'aderenza ai criteri di valutazione della significatività clinica dettati dall'ATS (10). In particolare per il paziente n.

29 erano state effettuate due colture su espettorato per ricerca di Micobatteri; essendo risultata positiva la prima coltura, era stato richiesto un secondo campione di espettorato la cui coltura è risultata negativa. Al momento della seconda coltura il paziente riportava di non avere più disturbi respiratori, senza avere effettuato nessuna specifica terapia. Il paziente n. 30 aveva effettuato un'unica coltura su espettorato, risultata positiva. Entrambi i pazienti non erano immunodepressi e risultavano negativi per il test dell'HIV.

Tabella 1. Materiali clinici di isolamento ed identificazione di 40 ceppi di MNT

Paziente	Materiale clinico	Micobatteri identificati
1	espettorato	<i>M. avium</i>
2	espettorato	<i>M. chelonae</i>
3	espettorato	<i>M. gordonae</i>
4	espettorato	<i>M. gordonae</i>
5	espettorato	<i>M. gordonae</i>
6	espettorato	<i>M. gordonae</i>
7	lavaggio broncoalveolare	<i>M. gordonae</i>
8	espettorato	<i>M. gordonae</i>
9	liquido pleurico	<i>M. gordonae</i>
10	espettorato	<i>M. gordonae</i>
11	espettorato	<i>M. gordonae</i>
12	espettorato	<i>M. gordonae</i>
13	espettorato	<i>M. gordonae</i>
14	espettorato	<i>M. gordonae</i>
15	espettorato	<i>M. gordonae</i>
16	urina	<i>M. gordonae</i>
17	espettorato	<i>M. gordonae</i>
18	essudato aperto	<i>M. intracellulare</i>
19	espettorato	<i>M. intracellulare</i>
20	espettorato	<i>M. intracellulare</i>
21	lavaggio broncoalveolare	<i>M. intracellulare</i>
22	lavaggio broncoalveolare	<i>M. intracellulare</i>
23	espettorato	<i>M. intracellulare</i>
24	lavaggio broncoalveolare	<i>M. intracellulare</i>
25	espettorato	<i>M. intracellulare</i>
26	espettorato	<i>M. kansasii</i>
27	lavaggio broncoalveolare	<i>M. kansasii</i>
28	urina	<i>M. kansasii</i>
29	espettorato	<i>M. kumamotonense</i>
30	espettorato	<i>M. kumamotonense</i>
31	lavaggio broncoalveolare	<i>M. lentiflavum</i>
32	espettorato	<i>M. mucogenicum</i>
33	espettorato	<i>M. mucogenicum</i>
34	essudato bronchiale	<i>M. xenopi</i>
35	espettorato	<i>M. xenopi</i>
36	espettorato	<i>M. xenopi</i>
37	espettorato	<i>M. xenopi</i>
38	lavaggio broncoalveolare	<i>M. xenopi</i>
39	espettorato	<i>M. xenopi</i>
40	lavaggio broncoalveolare	<i>M. xenopi</i>

Tabella 2. Risultati della genotipizzazione di 40 ceppi di MNT ottenuti mediante Genotype Mycobacterium CM/AS

Specie identificate con Genotype Mycobacterium CM/AS	Numero di ceppi identificati con Genotype Mycobacterium CM	Numero di ceppi identificati con Genotype Mycobacterium AS
<i>M. gordonae</i>	15	-
<i>M. intracellulare</i>	8	-
<i>M. xenopi</i>	8	-
<i>M. mucogenicum</i>	-	2
<i>M. kansasii</i>	2	-
<i>M. chelonae</i>	1	-
<i>M. avium</i>	1	-
<i>M. lentiflavum</i>	-	1
Totale ceppi identificati	35/40	3/5
Totale ceppi non identificati	5/40	2/5

DISCUSSIONE

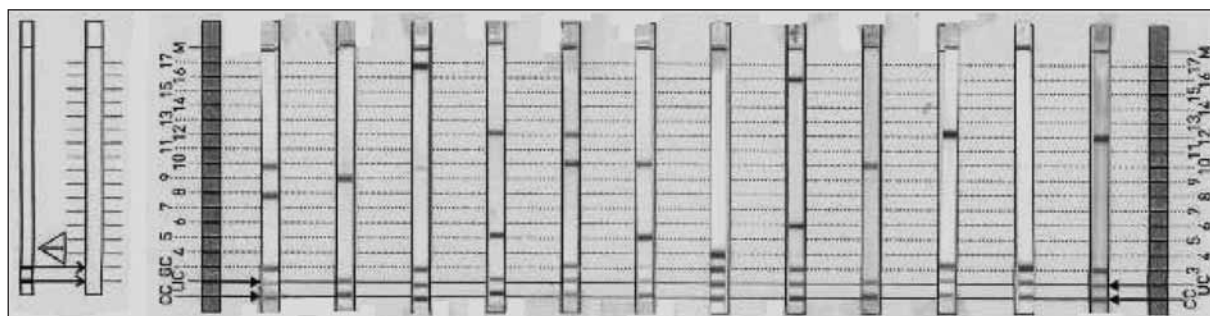
La tassonomia dei MNT è in continua evoluzione e non ha ancora raggiunto un assetto definitivo a causa della continua identificazione di nuove specie.

Inoltre il crescente interesse clinico-epidemiologico per le patologie sostenute da micobatteri non tubercolari sta rendendo sempre più urgente il bisogno di disporre di mezzi diagnostici che consentano un'identificazione ed una collocazione tassonomica rapide ed affidabili di questi microrganismi. Infatti è sempre più frequente l'isolamento di micobatteri non tubercolari, spesso ambientali, in materiali clinici provenienti per lo più da soggetti immunocompromessi (1, 28). La classificazione dei MNT, basata fino agli anni '80 esclusivamente sui caratteri fenotipici, negli ultimi 15 anni si è basata principalmente sui caratteri genotipici. Questo ha permesso la messa a punto e la commercializzazione di metodi di identificazione molecolare, attualmente abba-

stanza diffusi. I metodi molecolari del commercio, però, per quanto altamente sensibili e specifici, non sono in grado di tipizzare tutte le specie descritte, ma solo 22 con INNO-LiPA Mycobacterium V2 e 32 con GenoType Mycobacteria CM/AS delle specie di MNT più frequentemente isolate nei campioni clinici. Per superare questo limite si può ricorrere al sequenziamento di particolari geni, che sono i *target* ideali per studi tassonomici, ma che possono essere estremamente utili anche in ambito diagnostico. I principali geni utilizzati per l'identificazione batterica tramite il sequenziamento sono: 16S rDNA, 23S rDNA, *hsp65*, Internal Transcribed Spacer (ITS), *rpoB*, *gyrB*.

Oggetto del nostro interesse è stato il gene 16S rDNA, target principe per la tassonomia molecolare dei micobatteri (6,21) e per l'identificazione di isolati clinici di MNT (13). Il sequenziamento del gene 16S rDNA, per il quale si dispone di una vasta mole di informazioni presenti nei *databases* pubblici (GenBank, RIDOM, RDP), permette di identificare le specie di MNT isolate per confronto con sequenze già ufficialmente accertate (10) e permette di definire una nuova specie con una differenza nella sequenza anche solo dell'1% (16, 25).

Nel nostro studio il sequenziamento della regione 5' terminale del gene 16S rDNA ha permesso di identificare come *M. kumamotonense* i due isolati non altrimenti identificabili con la diagnostica molecolare del commercio. L'identificazione di *M. kumamotonense* rappresenta un dato di estremo interesse poiché si tratta di una specie di recente classificazione e di cui non è stato ancora ampiamente indagata l'importanza clinica. Isolato per la prima volta in Giappone nel 2001 dal gruppo di Masaki della Gifu School of Medicine, deve il suo nome al distretto di Kumamoto, luogo di provenienza della paziente. Le caratteristiche fenotipiche e filogenetiche collocano *M. kumamotonense* nel *M. terrae* complex (15). In conclusione, l'analisi di



CC: controllo del coniugato, UC: controllo universale, GC: controllo del genere.

Ceppi identificati con CM: 1 *M. gordonae* (ceppo 3), 2 *M. intracellulare* (ceppo 19), 3 *M. xenopi* (ceppo 35), 5 *M. kansasii* (ceppo 26), 6 *M. chelonae* (ceppo 2), 7 *M. avium ssp* (ceppo 1). Ceppi identificati con AS: 4 *M. mucogenicum* (ceppo 32), 8 *M. lentiflavum* (ceppo 31). Ceppi non identificati con CM: 9, 11 (rispettivamente ceppo 29 e ceppo 30) e con AS: 10, 12 (rispettivamente ceppo 29 e ceppo 30).

Figura I. Specie di micobatteri non tubercolari evidenziate con i kit GenoType Mycobacteria CM/AS

sequenza della regione 5' terminale del gene 16S rDNA, che comprende le due regioni ipervariabili A e B, ha consentito di identificare una specie di MNT inusuale e di recente classificazione. Il sequenziamento della regione A è di solito sufficiente per riconoscere la maggior parte delle specie di MNT, ma è necessario analizzare anche la regione B per l'identificazione di specie non descritte o per quelle specie non differenziabili con il sequenziamento della sola regione A (10, 25). Anche l'intera sequenza del 16S rDNA può non essere sufficiente a differenziare alcune specie strettamente correlate quali: *M. kansasii*/*M. gastrii*, *M. ulcerans*/*M. marinum*, *M. chelonae*/*M. abscessus*, *M. avium intracellulare*/*M. paratuberculosis*. In considerazione di ciò, in affiancamento ai metodi tradizionali dovrebbero essere analizzati altri targets genetici per una più ampia possibilità di identificazione di MNT in ambito diagnostico; in particolare *hsp65* e *rpoB* risultano utili per l'identificazione di micobatteri a rapida crescita mentre si può ricorrere a *ITS* e *gyrB* per i micobatteri a lenta crescita (29).

Per tali ragioni nel prossimo futuro intendiamo estendere l'analisi ai target diagnostici suddetti, al fine di aumentare la possibilità di identificazione di tutte le specie di micobatteri non tubercolari finora descritte nonché di specie nuove o inusuali.

BIBLIOGRAFIA

- American Thoracic Society. 1987. Mycobacterioses and the acquired immunodeficiency syndrome. Joint Position Paper of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control. *Am Rev Respir Dis* 136:492-6
- Bottger EC. 1996. Approaches for identification of microorganisms. *ASM News* 62:247-250
- Chen K, Neimark H, Rumore P, et al. 1989. Broad range DNA probes for detecting and amplifying eubacterial nucleic acids. *FEMS Microbiol Lett* 48:19-24
- Clarridge JE 3rd. 2004. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* 17:840-62
- Drancourt M, Bollet C, Carlouz A, et al. 2000. 16S ribosomal DNA sequence analysis of a large collection of environmental and clinical unidentifiable bacterial isolates. *J Clin Microbiol* 38:3623-30
- Edwards U, Rogall T, Blocker H, et al. 1989. Isolation and direct complete nucleotide determination of entire genes. Characterization of a gene coding for 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acids Res* 17:7843-53
- Euzeby JP. 1997. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* 47:590-2. www.bacterio.cict.fr/m/mycobacterium.html
- Falkinham JO 3rd. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. *Clin Microbiol Rev* 9(2):177-215
- Field SK, Cowie R. 2006. Lung disease due to the more common nontuberculous mycobacteria. *Chest* 129:1653-72
- Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA, et al. 2007. An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 175:367-416
- Harmsen D, Karch H. 2004. 16s rRNA for diagnosis pathogens: a living tree. *ASM News* 70:p. 19-24
- Jarzembowski JA, Myers Y. 2008. Nontuberculous mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 8:1333-41
- Katoch VM. 2004. Infections due to non-tuberculous mycobacteria (NTM). *Indian J Med Res* 120:290-304
- Kattar MM, Chavez JF, Limaye AP, et al. 2000. Application of 16S rRNA gene sequencing to identify *Bordetella hinzii* as the causative agent of fatal septicemia. *J Clin Microbiol* 38:789-94
- Masaki T, Ohkusu K, Hata H, et al. 2006. Mycobacterium kumamotoense Sp. Nov. recovered from clinical specimen and the first isolation report of Mycobacterium arupense in Japan: Novel slowly growing, nonchromogenic clinical isolates related to Mycobacterium terrae complex. *Microbiol Immunol* 50:889-97
- McNabb A, Eisler D, Adie K, et al. 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of Mycobacterium species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol* 42:3000-11
- Parrish SC, Myers J, Lazarus A. 2008. Nontuberculous mycobacterial pulmonary infections in Non-HIV patients. *Postgrad Med* 4:78-86
- Piersimoni C, Scarparo C. 2008. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients. *Lancet Infect Dis* 5:323-34
- Relman DA. 1999. The search for unrecognized pathogens. *Science* 284:1308-10
- Richter E, Rusch-Gerdes S, Hillemann D. 2006. Evaluation of the GenoType Mycobacterium assay for identification of mycobacterial species from cultures. *J. Clin. Microbiol.* 44:1769-1775
- Rogall T, Flohr T, Bottger EC. 1990. Differentiation of Mycobacterium species by direct sequencing of amplified DNA. *J Gen Microbiol* 136:1915-20
- Rozen S, Skaletsky HJ. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386
- Sacchi CT, Whitney AM, Mayer LW, et al. 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* 8:1117-23
- Sacchi CT, Whitney AM, Reeves MW, et al. 2002. Sequence diversity of *Neisseria meningitidis* 16S rRNA genes and use of 16S rRNA gene sequencing as a molecular subtyping tool. *J Clin Microbiol* 40:4520-7
- Tortoli E. 2003. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* 16:319-54
- Tortoli E. 2006. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunol Med Microbiol* 48:159-78
- Turenne CY, Tschetter L, Wolfe J, et al. 2001. Necessity of quality-controlled 16S rRNA gene sequence databases: identifying nontuberculous Mycobacterium species. *J Clin Microbiol* 39:3637-48
- von Reyn CF, Arbeit RD, Horsburgh CR, et al. 2002. Sources of disseminated Mycobacterium avium infection in AIDS. *J Infect* 44:166-70
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. 2008. Then and now: use of 16S rDNA gene sequencing for bacterial identification and discovery of novel bacteria in clinical microbiology laboratories. *Clin Microbiol Infect*. Oct;14(10):908-34. Review