مجله دانشگاه علوم پزشکی جیرفت

سال ۳(۲)، شهریور۱۳۹۶، صفحه ۹۴-۸۶

مقاله پژوهشی

شناسایی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس با استفاده از روش ترادف‌یابی چندجایگاهی

مسعود کیخا[1]*

[1] دانشجوی کارشناسی ارشد میکروب شناسی، گروه میکروب شناسی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

چکیده

مقدمه: مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به‌صورت گسترده در محیط وجود دارند و عامل ایجادکننده بیماری در حیوانات، پرندگان و بیماران نقص سیستم ایمنی و افراد سالم می‌باشد. هدف از این مطالعه به کارگیری روش ترادف یابی چند جایگاهی (MLSA) در شناسایی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بود.

روش کار: در این مطالعه، ابتدا توالی ژن های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* برای ۸ زیرگونه از کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از بانک ژنی جمع‌آوری شد. سپس این توالی‌ها به‌وسیله نرم‌افزار clustalW2 هم‌ردیف شدند و بر اساس این ژن‌ها درخت‌های فیلوژنتیکی رسم شد. در نهایت، توسط نرم‌افزار CLC Main benchwork توالی مربوط به هر زیرگونه با هم ترکیب شد و درخت فیلوژنتیک با روش neighbor-joining رسم شد.

یافته‌ها: نتایج مبنی بر روش MLSA بهتر از مطالعه جداگانه ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* بود.

نتیجه‌گیری: روش MLSA ابزاری مفید برای شناسایی و افتراق زیرگونه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس است.

کلید واژه‌ها : مایکوباکتریوم آویوم، ترادف‌یابی چند جایگاهی، 16S rRNA، *gyrB*، *hsp65*

اطلاعات مقاله

دریافت : ۱۳۹۶/۰۴/۳۰

پذیرش : ۱۳۹۶/۰۶/۲۰

***مولف مسئول**

مسعود کیخا

ایران، اصفهان، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، دانشکده پزشکی، گروه میکروب شناسی پزشکی.

تلفن: ۰۹۳۸۶۸۳۶۴۲۵

پست الکترونیک:

masoudkeikha@outlook.com

Journal of Jiroft University of Medical Sciences

Vol. 3, No. 2, Sep 2017, P.86-94

Original Article

Identification of *Mycobacterium avium* complex using Multi Locus Sequence Analysis

Masoud Keikha[1*]

[1] MSc Student in Microbiology, Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Abstract

Introduction: *Mycobacterium avium* complex (MAC) are ubiquitous in the environment which are the cause of disease in animals, birds and patients with immunodeficiency and healthy individual. The purpose of this study was to apply the multi-location sequencing method (MLSA) to identify *mycobacterium avium complex*.

Methods: In this study, the sequences of 16S rRNA, *rpoB* and *hsp65* genes were collected from the GenBank for 8 subtypes of *Mycobacterium avium complex*. Then, these sequences were aligned using clustalW2 software, and based on these genes, phylogenetic trees were constructed. Finally, CLC Main Benchwork Software combined the sequence for each sub-species, and the phylogenetic tree was constructed with a neighbor-joining technique.

Results: The results of the MLSA method were better than the separate study of 16S rRNA, *rpoB*, and *hsp65* genes.

Conclusion: The MLSA method is a useful tool for identifying and differentiating *Mycobacterium avium* complex subtypes.

Keywords: *Mycobacterium avium*, Multi-locus Sequence Analysis, 16S rRNA, *rpoB*, *hsp65*

Article Info
Received: Jul. 21, 2017
Accepted: Sep. 11, 2017

[*]**Corresponding Author:**

Masoud Keikha

Department of Medical Microbiology, Faculty of Medicine, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Tel: 09386836425

Email:
masoudkeikha@outlook.com

Vancouver referencing:
Keikha M. Identification of *Mycobacterium avium* complex using Multi Locus Sequence Analysis. *Journal of Jiroft University of Medical Sciences* 2017; 3(2): 86-94.

مقدمه

اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم (*Mycobacterium avium* complex) یکی از مهم‌ترین گروه از باکتری‌های ساکن منابع محیطی هستند که به‌عنوان پاتوژن طیف وسیعی از پرندگان، حیوانات و انسان‌ها شناخته می‌شوند. مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس پس از اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم توبرکلوزیس (*Mycobacterium tuberculosis* complex)، دومین گروه از مایکوباکتریوم-های بیماری‌زای شایع انسانی می‌باشند که عفونت‌های فرصت‌طلبانه‌ای را در بیماران نقص سیستم ایمنی و عفونت‌های تنفسی را در افراد سالم و بیماران نقص سیستم ایمنی به وجود می‌آورند (۱). تاکنون مطالعات متعددی در زمینه جداسازی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از منابع محیطی از قبیل آب، خاک، پرندگان، دام‌ها گزارش شده است. با توجه به اینکه گزارشی از انتقال فردبه‌فرد در عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس وجود ندارد و همچنین گزارش‌های متعددی که در زمینه جداسازی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از منابع محیطی بیمارستان‌ها وجود دارد؛ لذا طبق شواهد موجود، منابع محیطی بیمارستانی منشأ اصلی عفونت‌های بیمارستانی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به‌حساب می‌آیند؛ بیماران نقص سیستم ایمنی در هنگام استنشاق آئروسل‌ها[1]، حمام و شرب آب به این میکروارگانیسم‌ها آلوده شده و در نتیجه به عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مبتلا می‌شوند (۲). اشکال بالینی عفونت‌های اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بسته به عملکرد سیستم ایمنی میزبان متفاوت است؛ به‌طوری‌که عفونت‌های مایکوباکتریوم آویوم در افراد سالم بیشتر به‌صورت عفونت‌های تنفسی و لنفادنیت‌های گردنی می‌باشد، درحالی‌که در میزبانان نقص سیستم ایمنی بیشتر به شکل سیستمیک یا منتشره است (۳).

گونه‌های مایکوباکتریوم طبق طبقه‌بندی Runyon در چهار گروه قرار می‌گیرند؛ گروه اول متعلق به گونه‌های کند رشد فوتوکروموژن[2] (تولید رنگ‌دانه در حضور نور)، گروه دوم شامل گونه‌های کند رشد اسکوتوکروموژن[3] (تولید پیگمان در غیاب نور)، گروه سوم که اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم نیز به همین گروه تعلق دارند گونه‌های کند رشد نان کروموژن[4] (عدم تولید رنگ‌دانه) هستند، در نهایت گروه پنجم که متعلق به مایکوباکتریوم‌های تند رشد می‌باشند (۲). ابتدا فرض بر این بود که کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شامل دو گونه مایکوباکتریوم آویوم و انتراسلولار است، اما با توجه به پیشرفت‌های علم مولکولی در سال ۱۹۹۰ مشخص شد که مایکوباکتریوم آویوم شامل سه زیرگونه: مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (*M. avium* subsp. *avium*)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (*M. avium* subsp. *paratuberculosis*) و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم (*M. avium* subsp. *silvaticum*) می‌باشد. در سال ۲۰۰۲ چهارمین زیرگونه مایکوباکتریوم آویوم تحت عنوان مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه هومینی سوئیس (*M. avium* subsp. *hominissuis*) شناسایی شد (۱). در سال‌های اخیر دو زیرگونه *Mycobacterium chimaera* (MAC-A) و *Mycobacterium colombiense* (MAC-X) نیز به اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم اضافه شده‌اند (۴). برخلاف سایر گونه‌های مایکوباکتریومی تا به امروز هیچ روش فنوتیپیک یا مولکولی استانداردی برای افتراق و طبقه‌بندی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم تعیین نشده است؛ اکثر مایکوباکتریوم‌ها توسط تکنیک توالی یابی ژن‌های 16S rRNA و 16S-23S rRNA (ITS) شناسایی و افتراق داده

[1]. Aerosol
[2]. Photo-chromogen
[3]. Scoto-chromogen
[4]. Non-chromogen

می‌شوند، درحالی‌که این ژن‌ها فقط توانایی افتراق کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از سایر مایکوباکتریوم‌ها را دارند (۵). بنا به مطالعاتی که در زمینه شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم صورت گرفته است، بررسی توالی ژن‌های *sodA*، *dnaJ*، *gyrB*، *recA*، 32 KDa protein gene، *hsp65*، *rpoB* و حتی ITS توانایی افتراق گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس را دارند (۴،۱). دسته‌ای دیگر از مطالعات بر حضور و عدم حضور برخی توالی الحاقی خاص (insertion sequences) تأکید دارند (۵). در میان این مطالعات نیز پراکندگی‌های زیادی وجود دارد، به‌عنوان مثال طبق برخی مطالعات IS900 تنها در اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، IS901 در اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (MAA) یا مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم (MAS) حضور دارد و در نهایت اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه هومینی سوئیس (MAH) فاقد هریک از این ژن‌ها هستند (۵) و یا اینکه IS902 برای شناسایی مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم، IS1110 برای مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم و IS1245 برای شناسایی و افتراق اعضای مایکوباکتریوم آویوم زیر گونه‌های آویوم و پاراتوبرکلوزیس کاربرد دارد؛ نتایج به‌دست آمده از این مطالعات نیز متفاوت است لذا مطالعه توالی الحاقی نیز نمی‌توانند به‌عنوان روش استاندار طلایی شناسایی افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شناخته شوند (۸-۶). با توجه به اینکه شناسایی هریک از اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس بر اساس یک ژن امکان‌پذیر نیست و هر ژن گروه خاصی از اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را شناسایی و افتراق می‌دهد، در نتیجه روش ترادف یابی چند جایگاهی (multi-locus sequence analysis) نتایج بهتری را ارائه می‌کند؛ در این تکنیک چند ژن به‌طور هم‌زمان بررسی می‌شوند (۵).

با توجه به اینکه مطالعات شناسایی اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس (MAC) به ما کمک می‌کند تا شناخت کامل‌تری را نسبت به این گروه از باکتری‌ها به دست آوریم، لذا این مطالعه با هدف شناسایی اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس با استفاده از تکنیک MLSA و بر اساس جستجوی بیوانفورماتیک ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* صورت گرفت.

روش کار

*دریافت توالی ژن‌های 16S rRNA، rpoB و hsp65*در این مطالعه ابتدا ۸ توالی از ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* متعلق به اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم که شامل ۲ توالی از مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه آویوم (MAA)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه پاراتوبرکلوزیس (MAP)، مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه سیلواتیکوم (MAS) و مایکوباکتریوم آویوم زیرگونه اینتراسلولار (MAI) از بانک ژنی به آدرس www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide دریافت شد. لازم به ذکر است که با توجه به اینکه توالی ژن‌های *gyrB* و *recA1* برای تمامی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم در بانک ژنی (Gene Bank) وجود نداشت، لذا این ژن‌ها از مطالعه حذف شدند که این خود نشان‌دهنده ضرورت انجام این‌گونه مطالعات را نشان می‌دهد.

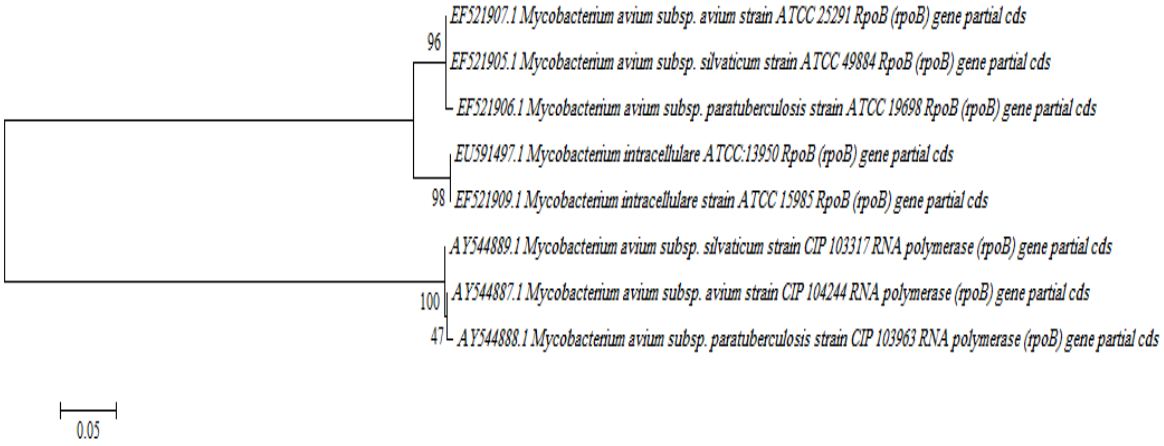
هر یک از این توالی‌ها ابتدا به‌صورت جداگانه توسط نرم‌افزار ClustalW2 هم‌ردیف شدند. سپس درخت فیلوژنتیک توالی‌های مورد اشاره شده با *استفاده از روش* Neighbor joining، مدل K2P و عدد Replication Bootstrap= 100 توسط نرم‌افزار MEGA 7.0.26 رسم شد (شکل ۱-۳). برای افتراق بهتر اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم از تکنیک MLSA استفاده شد؛ برای این کار ابتدا به کمک نرم‌افزار CLC Main Workbench 5 توالی‌های مربوطه از ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* را با هم تلفیق

کرده و در نهایت قطعه‌ای به طول ۴۵۲۰- ۵۷۲۵ به‌دست‌آمده سپس توالی به‌دست‌آمده به فرمت FASTA ذخیره شد و درخت فیلوژنتیکی بر اساس روش Neighbor joining توسط نرم‌افزار MEGA رسم شد (شکل ۴) (۹).

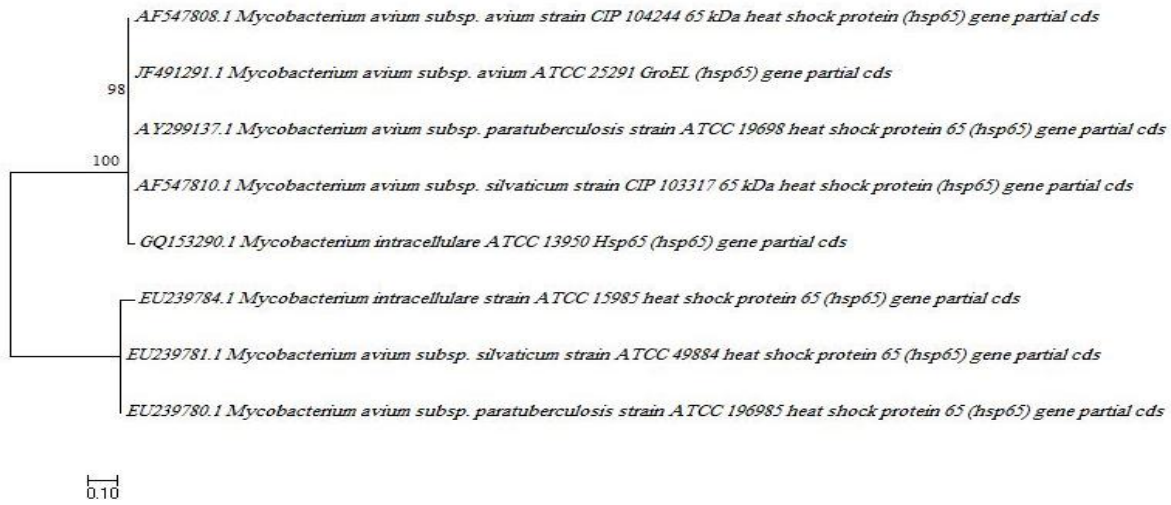
یافته‌ها

توالی ژن 16S RNA هر یک از این گونه ها به لحاظ وجود First signature مایکو باکتریوم ها در موقعیت های: ۷۰-۹۸ (A-T)، ۲۹۳-۳۰۴ (G-T)، ۳۰۷ (C)، ۳۲۸ (T)، ۶۱۴-۶۲۶ (A-T)، ۶۳۱ (G)، ۶۶۱-۷۴۴ (G-C)، ۸۲۴-۸۷۶ (T-A)، ۸۲۵-۸۷۵ (A-T)، ۸۴۳ (C) و ۱۱۲۲-۱۱۵۱ (A-T) بررسی و تأیید شدند (۱۰). درخت‌های فیلوژنتیک ترسیم شده بر اساس ژن های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* هر کدام گونه های خاصی از کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را شناسایی و افتراق می‌دهند؛ در این میان ژن 16S rRNA گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم و سیلواتیکوم را تشخیص و افتراق داد، ژن *rpoB* تنها گونه مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس و ژن *hsp65* توانست گونه های مایکوباکتریوم اینتراسلولار و پاراتوبرکلوزیس را تشخیص دهد (اشکال ۳-۱). روابط فیلوژنیک بر اساس ژن *rpoB* در مقایسه با سایر ژن‌ها دقیق‌تر و کامل‌تر بود؛ طبق این ژن اعضای کمپلکس مایکوباتریوم آویوم با عدد Bootstrap بالایی از هم تفکیک شده‌اند (شکل ۲)؛ اما با این‌حال هر ژن توانست فقط زیر گونه‌های خاصی از مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس را تشخیص دهد. درخت فیلوژنتیک حاصل از ترکیب ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* توانست زیر گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم، مایکوباکتریوم انتراسلولار و پاراتوبرکلوزیس را تشخیص دهد؛ طبق درخت فیلوژنیک حاصل، مایکوباکتروم آویوم و انترا سلولار در یک شاخه قرار دارند؛ همچنین زیرگونه‌های مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس و سیلواتیکوم نیز یک گروه را تشکیل داده‌اند. به‌طورکلی درخت فیلوژنتیک حاصل از تلفیق ژن های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* در مقایسه با روابط فیلوژنتیک جداگانه هر یک از این ژن‌ها عملکرد بهتری داشت و گونه‌های بیماری‌زای مهم انسانی چون مایکوباکتریوم آویوم، پاراتوبرکلوزیس و انتراسلولار را تشخیص داد، لذا می‌توان نتیجه‌گیری کرد که بررسی هم‌زمان چند ژن یا همان تکنیک MLSA ابزاری قدرتمند در تشخیص و افتراق باکتری‌ها می‌باشد.

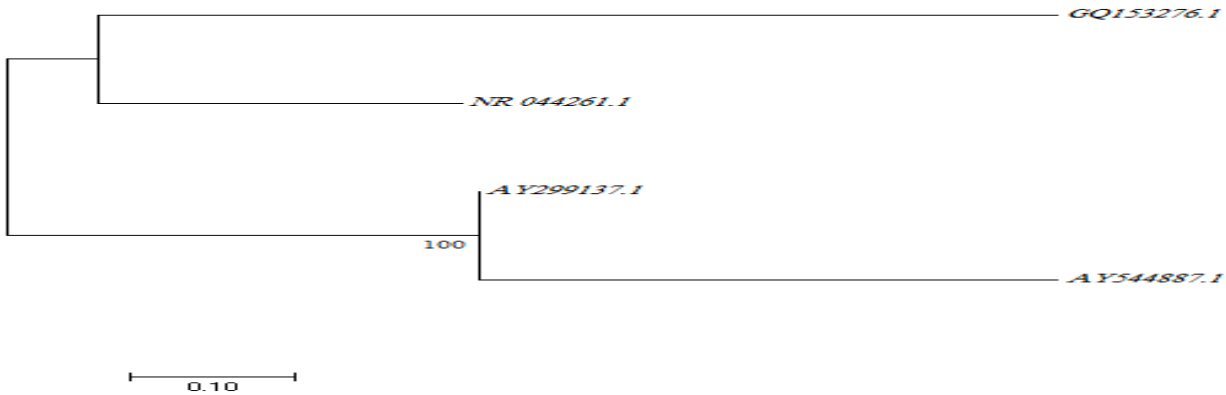
شکل ۱: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن 16S rRNA

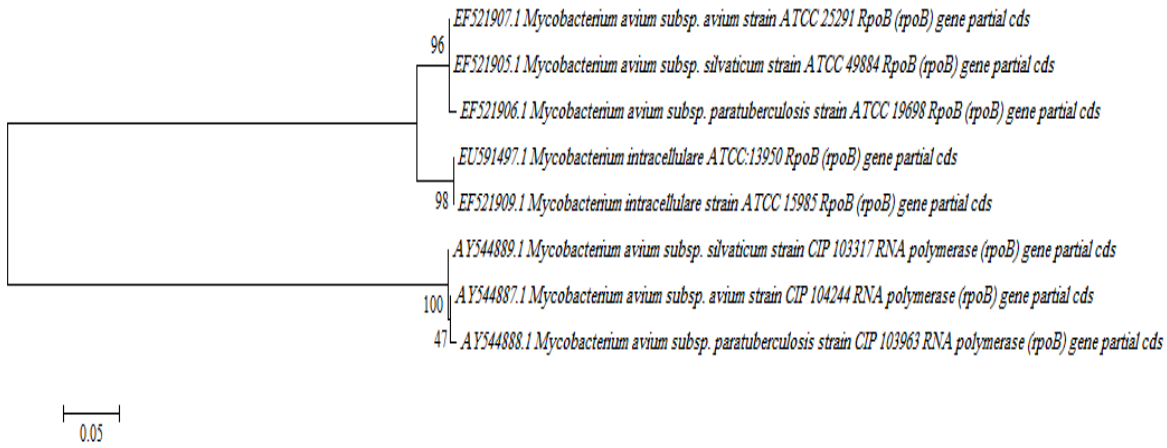


شکل ۲: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن *rpoB*



شکل ۳: درخت فیلوژنتیک بر اساس ژن *hsp65*





شکل ٤: درخت فیلوژنتیک بر اساس ترکیب ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65*

در این شکل GQ153276.1: مایکوباکتریوم انتراسلولار، NR044261.1: مایکوباکتریوم آویوم، AY299137.1: مایکوباکتریوم سیلواتیکوم و AY544887.1: مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس می‌باشد

بحث

اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مشابه سایر مایکوباکتریوم‌ها به صورت ساپروفیت در منابع محیطی زندگی می‌کنند؛ این گروه از باکتری‌ها قادرند در سیستم‌های توزیع آب‌رسانی بیوفیلم تشکیل داده و در نتیجه در برابر مواد ضد میکروبی مقاوم شوند. با توجه به اینکه شواهد زیادی وجود دارد که نشان می‌دهد آب، خاک و سایر منابع محیطی بیمارستان‌ها حاوی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم هستند، لذا می‌توان نتیجه گرفت که این منابع به‌عنوان منبع اصلی انتقال عفونت به بیماران به‌حساب می‌آیند. با توجه به اینکه اکثر مارکر های میکروبیولوژیک ارزیابی کیفیت آب قادر به شناسایی مایکوباکتریوم‌ها نیستند لذا این پدیده مورد غفلت قرار می‌گیرد (۱۲-۱۱). هرکدام از اعضای مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس قادرند عفونت هایی را در انسان و حیوانات پدید آورند، به‌عنوان مثال مایکوباکتریوم هومینی سوئیس (MAH) که عامل عفونت‌های تنفسی مزمن و لنفادنیت در انسان ها و خوک می باشد، مایکوباکتریوم پاراتوبرکلوزیس (MAP) که عامل اصلی بیماری جونز و اسهال مزمن گرانولوماتوز در حیوانات است و سالانه خسارت‌های مالی زیادی به بار می‌آورد و یا مایکوباکتریوم آویوم (MAA) و مایکوباکتریوم سیلواتیکوم (MAS) که علاوه بر بیماری‌های انسانی، از مهم‌ترین عامل سل پرندگان محسوب می‌شوند (۱۲).

شناسایی این گروه از باکتری ها به جهت تجویز رژیم‌درمانی مناسب و همچنین انجام مطالعات اپیدمیولوژیک مهم است (۱۲-۱۱). امروزه روش های مولکولی متعددی در زمینه شناسایی مولکولی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم معرفی شده است که می‌توان به روش‌هایی همچون: Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP)، تکنیک‌های هیبریدیزاسیون، توالی یابی ژن‌های مختلف، MIRU-VNTR و Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) اشاره کرد (۱۳۸). ژن‌هایی که در این مطالعات استفاده می‌شوند، اغلب ژن های خانه‌دار (House keeping genes) و توالی الحاقی هستند (۴-۵). مطالعه حاضر بررسی بیوانفورماتیکی در زمینه شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم بود. در این مطالعه مشخص شد که بررسی هم‌زمان ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* در مقایسه با مطالعه جداگانه ژن ها نتایج بهتری را در بر می‌گیرد.

Turenne و همکارانش طی مطالعات خود دریافتند که انتهای 3′ ژن *hsp65* یکی از مفیدترین ابزار برای افتراق کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس می باشد (۱). در مطالعه ما مشخص شد که ژن *rpoB* نسبت به ژن *hsp65* بهتر عمل می‌کند. همچنین طبق مطالعات Salah و همکارانش بر روی ایزوله‌های بالینی مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس مشخص شد که ژن *rpoB* در مقایسه با ژن‌های 16S rRNA و *hsp65* بهتر عمل می‌کند (۴). طبق مطالعات Park و همکارانش در زمینه شناسایی مولکولی مایکوباکتریوم انتراسلولار می‌توان نتیجه گیری کرد که Internal Transcribe Spacer-1 (ITS1) در مقایسه با ژن های *hsp65* و 16S rRNA بهتر عمل می‌کند؛ طبق مطالعه ما قطعه ۴۴۱ جفت بازی از ژن *hsp65* قادر بود گونه های مایکوباکتریوم انتراسلولار را شناسایی کند (۱۴). با جستجو در پایگاه‌های اطلاعاتی موجود می‌توان نتیجه گرفت که تاکنون مطالعات محدودی در زمینه شناسایی زیر گونه‌های مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به روش MLSA انجام شده که این خود لزوم چنین مطالعاتی را بازگو می‌کند؛ اما طبق مطالعه Kolb و همکارانش در خصوص شناسایی اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم کمپلکس به روش MLST برخی توالی الحاقی و همچنین مطالعه Cayrou و همکارانش توسط تکنیک Multi-spacer sequence typing (MST) می‌توان دریافت که بررسی هم‌زمان چند ژن موجب افزایش قدرت تشخیص و تفریق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم می‌شود (۱۵،۵). در مطالعه ما نیز مشخص شد که توالی تلفیق‌شده از ژن‌های 16S rRNA، *rpoB* و *hsp65* در مقایسه با توالی جداگانه هر یک از این ژن‌ها قدرت تشخیص و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم را بهبود بخشید.

نتیجه‌گیری

بر اساس این مطالعه، هر چند شناسایی و افتراق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم به دلیل شباهت ژنتیکی درون‌گونه‌ای بالا بسیار دشوار است و تا به امروز روش استاندارد طلایی برای افتراق اعضای این خانواده معرفی نشده است؛ اما با این وجود، تکنیک هایی از قبیل ترادف یابی چندجایگاهی (MLSA) شناسایی و افتراق این گونه‌ها را بهبود بخشیده و به‌عنوان یکی از مهم‌ترین روش‌های شناسایی و تفریق اعضای کمپلکس مایکوباکتریوم آویوم شناخته می‌شود.

تقدیر و تشکر

بدین‌وسیله از زحمات همکاران دانشگاه علوم پزشکی اصفهان تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تعارض منافع

هیچ تعارض منافعی توسط نویسندگان بیان نشده است.

References

1. Turenne CY, Semret M, Cousins DV, Collins DM, Behr MA. Sequencing of hsp65 distinguishes among subsets of the Mycobacterium avium complex. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(2):433-40.
2. Field SK, Fisher D, Cowie RL. Mycobacterium avium complex pulmonary disease in patients without HIV infection. CHEST Journal. 2004;126(2):566-81.
3. Parvandar-Asadollahi K, Mosavari N, Mayahi M. Genotyping of Mycobacterium avium subsp. avium isolates from naturally infected lofts of domestic pigeons in Ahvaz by IS901 RFLP. Iranian Journal of Microbiology. 2015;7(5):260-4.
4. Salah IB, Adekambi T, Raoult D, Drancourt M. rpoB sequence-based identification of Mycobacterium avium complex species. Microbiology. 2008;154(12):3715-23.
5. Kolb J, Hillemann D, Möbius P, Reetz J, Lahiri A, Lewin A, et al. Genetic characterization of German Mycobacterium avium strains isolated from different hosts and specimens by multilocus sequence typing. International Journal of Medical Microbiology. 2014;304(8):941-8.
6. Englund S, Bölske G, Johansson K-E. An IS900-like sequence found in a Mycobacterium sp. other than Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. FEMS Microbiology Letters. 2002;209(2):267-71.

7. Johansen TB, Djønne B, Jensen MR, Olsen I. Distribution of IS1311 and IS1245 in Mycobacterium avium subspecies revisited. Journal of Clinical Microbiology. 2005;43(5):2500-2.
8. Guerrero C, Bernasconi C, Burki D, Bodmer T, Telenti A. A novel insertion element from Mycobacterium avium, IS1245, is a specific target for analysis of strain relatedness. Journal of Clinical Microbiology. 1995;33(2):304-7.
9. Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution. 2007;24(8):1596-9.
10. Azadi D, Shojaei H, Pourchangiz M, Dibaj R, Davarpanah M, Naser AD, et al. Species diversity and molecular characterization of nontuberculous mycobacteria in hospital water system of a developing country, Iran. Microbial Pathogenesis. 2016;100:62-9.
11. Wallace RJ, Iakhiaeva E, Williams MD, Brown-Elliott BA, Vasireddy S, Vasireddy R, et al. Absence of Mycobacterium intracellulare and presence of Mycobacterium chimaera in household water and biofilm samples of patients in the United States with Mycobacterium avium complex respiratory disease. Journal of Clinical Microbiology. 2013;51(6):1747-52.
12. Nishiuchi Y, Iwamoto T, Maruyama F. infection Sources of a Common Non-tuberculous Mycobacterial Pathogen, Mycobacterium avium Complex. Frontiers in Medicine. 2017;4:1-17.
13. Romano M, Amadio A, Bigi F, Klepp L, Etchechoury I, Llana MN, et al. Further analysis of VNTR and MIRU in the genome of Mycobacterium avium complex, and application to molecular epidemiology of isolates from South America. Veterinary Microbiology. 2005;110(3):221-37.
14. Park J-H, Shim T-S, Lee S-A, Lee H, Lee I-K, Kim K, et al. Molecular characterization of Mycobacterium intracellulare-related strains based on the sequence analysis of hsp65, internal transcribed spacer and 16S rRNA genes. Journal of Medical Microbiology. 2010;59(9):1037-43.
15. Cayrou C, Turenne C, Behr MA, Drancourt M. Genotyping of Mycobacterium avium complex organisms using multispacer sequence typing. Microbiology. 2010;156(3):687-94.