

Anna B. Kubiak¹, Arkadiusz Wojtasik¹, Ewa Augustynowicz-Kopec², Anna Zabost²,
Zofia Zwolska², *Paweł Parniewski¹

Genotypowanie *M. kansasii* metodą TRS-PCR¹⁾

TRS-PCR based genotyping of *Mycobacterium kansasii*

¹Pracownia Genetyki Molekularnej, Instytut Biologii Medycznej Polskiej Akademii Nauk w Łodzi

Kierownik Pracowni: dr hab. Paweł Parniewski, prof. IBM PAN

²Zakład Mikrobiologii, Instytut Gruźlicy i Chorób Płuc w Warszawie

Kierownik Zakładu: prof. nadzw. dr hab. Ewa Augustynowicz-Kopec

Streszczenie

Wstęp. W ostatnich latach obserwowany jest wzrost zachorowań wywołanych przez prątki należące do grupy NTM, w tym *Mycobacterium kansasii*. Z tego względu ważne jest znalezienie odpowiedniej metody, która pozwoli na analizę epidemiologiczną zakażeń.

Materiał i metody. W badaniach wykorzystano kolekcję 48 szczepów *M. kansasii*, którą wstępnie zanalizowano pod kątem różnorodności profili PRA-*hsp65*, a następnie wygenerowano profile prążkowe za pomocą testu TRS-PCR oraz wykonano analizę jego powtarzalności.

Wyniki i wnioski. 39 z 48 szczepów na podstawie profilu PRA-*hsp65* zostało zaklasyfikowanych jako *M. kansasii* typ I, najczęściej izolowanego od ludzi. Testy CGG-PCR i CCG-PCR dla kolekcji szczepów *M. kansasii* okazały się najlepsze, gdyż zróżnicowały je w największym stopniu, co potwierdzają wysokie wartości współczynnika różnicowania, zaś ich powtarzalność była na zbliżonym poziomie. Test TRS-PCR pozwolił na potwierdzenie wyniku analizy PRA-*hsp65* w przypadku trzech szczepów, które według profilu PRA-*hsp65* zostały zaklasyfikowane jako *M. fortuitum* typu I. Szczepy te grupowały się oddzielnie od szczepów *M. kansasii* we wszystkich analizach TRS-PCR. Otrzymane przez nas wyniki mogą świadczyć o możliwości zastosowania metody TRS-PCR w dochodzeniach epidemiologicznych dla *M. kansasii*, w przypadku gdy zostanie ona uzupełniona dodatkową metodą różnicowania.

Słowa kluczowe: *Mycobacterium kansasii*, TRS-PCR, epidemiologia, genotypowanie

Summary

Introduction. In recent years increasing number of infections caused by NTM, including *Mycobacterium kansasii*, has been observed. For this reason it is important to find a reliable method, which would allow to lead epidemiological investigations.

Material and methods. In our research 48 *M. kansasii* strains were used, its PRA-*hsp65* profiles were initially analyzed. Then we generated fingerprints using TRS-PCR method and analysed the repeatability of research results.

Results and conclusions. 39 of 48 strains were classified according to PRA-*hsp65* profiles as *M. kansasii* type I, which is the most commonly isolated type from humans. CGG-PCR and CCG-PCR tests proved to be the best method for our collection of *M. kansasii*, as they allowed for the greatest distinction between the strains. It was confirmed by high values of discriminatory indices, with repeatability at very similar levels. The TRS-PCR test has allowed us to confirm the PRA-*hsp65* results for three strains, which according to PRA-*hsp65* database were classified as *M. fortuitum* type I. These strains clustered separately from *M. kansasii* in all TRS-PCR analyses. Achieved results may suggest that TRS-PCR method has a potential to be used in epidemiological investigations of *M. kansasii* but only when is supported by other method.

Key words: *Mycobacterium kansasii*, TRS-PCR, epidemiology, genotyping

WSTĘP

Bakterie należące do gatunku *Mycobacterium kansasii* to wolnorosnące prątki należące do grupy Non-Tuberculous Mycobacteria (NTM). Ich naturalnym rezerwuarem jest głównie woda wodociągowa (1, 3, 4). Prątki te były izolowane z naturalnych zbiorników

wodnych, systemów dystrybucji wody pitnej, a także z gleby oraz od niektórych zwierząt rzeźnych (3, 4, 5, 6, 23). Badania oparte na analizie polimorfizmu genu *hsp65* pozwalają na wyodrębnienie od 5 do 7 typów *M. kansasii* (1, 3, 4, 5, 6). *M. kansasii* jest jednym z najczęściej izolowanych NTM w USA (1, 5). Choroby płuc

¹⁾Badania częściowo finansowane z grantu MNiSW401 162137.

wywoływane przez *M. kansasii* obserwowane są także w innych regionach świata, w Europie, w tym w Polsce znacznie częściej na terenach zurbanizowanych niż rolnych (1, 3, 4, 6, 7, 9).

Do czynników ryzyka zakażeń wywoływanych przez *M. kansasii* zalicza się choroby powodujące zaburzenia czynności układu immunologicznego, powodując obniżoną odporność organizmu. Zaobserwowano zwiększone ryzyko zachorowania u osób cierpiących na pylicę płuc, przewlekłą obturacyjną chorobę płuc (POChP), mukowiscydozę, choroby nowotworowe o charakterze złośliwym, AIDS oraz wśród nosicieli wirusa HIV (1, 5, 7, 3, 6, 9).

Liczba infekcji wywoływanych przez prątki należące do grupy NTM ma tendencję wzrostową (1, 2, 6, 7, 8), wskutek czego schorzenia przez nie wywoływane są istotnym problemem klinicznym. Typowanie szczepów prątków metodami biologii molekularnej jest ważnym elementem kontroli epidemiologicznej.

Konwencjonalne metody identyfikacji i diagnostyki mykobakterii są czasochłonne i wymagające dużego nakładu pracy (8, 10, 11). W identyfikacji prątków z grupy NTM powszechnie stosowana jest analiza PRA-*hsp65* (8, 6, 11, 12). Wykorzystuje się również inne metody w oparciu o sekwencjonowanie wybranych fragmentów DNA, real-time PCR, a także testy hybrydizacyjne, takie jak The AccuProbe (Gen-Probe, San Diego, CA, USA), Inno LiPA Mycobacteria v2 (Innogenetics, Ghent, Belgia), GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany) (8, 12, 10, 9). W celach epidemiologicznych stosuje się techniki MIRU-VNTR, rep-PCR, PFGE, RFLP, a także analizy wykorzystujące specyficzne dla danego gatunku rodzaje sekwencji insercyjnych (8, 4, 1, 15).

M. kansasii uważany jest za bardzo zróżnicowany gatunek NTM (4, 6), dlatego istnieje potrzeba skutecznej metody identyfikacji tych prątków, użytecznej również w dochodzeniach epidemiologicznych. Dotychczas nie udało się opracować łatwego i skutecznego testu epidemiologicznego dla *M. kansasii*. Metody oparte o analizę sekwencji 16S rDNA, amplifikację regionu pomiędzy genami kodującymi 16S i 23S rRNA, badanie polimorfizmu genu kodującego białko szoku cieplnego, a także obecności sekwencji insercyjnej IS1652 nie pozwalają na dostateczne różnicowanie szczepów *M. kansasii* (4, 23).

W tej pracy proponujemy zastosowanie testu TRS-PCR w analizach różnicowania kolekcji szczepów *M. kansasii*. Trójnukleotydomy sekwencje powtórzone (TRS – *trinucleotide repeat sequences*) to powszechne motywy mikrosatelitarne obecne w genomach wielu gatunków drobnoustrojów (21). W przypadku szczepów *M. tuberculosis* CDC1551, *M. tuberculosis* H37Rv i *M. bovis* stwierdzono, że motywy (CGG)_n są nadreprezentowane (22), zaś obecność różnych motywów TRS wykazano także w genomach innych gatunków bakterii, np. *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. tuberculosis*, *S. enterica* (22). W naszych poprzednich badaniach wykorzystaliśmy test TRS-PCR do

skutecznego różnicowania szczepów *Mycobacterium gordonae* (14) oraz uropatogennych szczepów *Escherichia coli* (13).

W pierwszym etapie określiliśmy przydatność testu do różnicowania kolekcji 48 szczepów *M. kansasii*. Spośród zastosowanych dziesięciu starterów PCR (tab. 2) wybraliśmy dwa najlepiej różnicujące – zawierające motyw CGG lub CCG. Startery te pozwalają różnicować szczepy *M. kansasii*, jednakże dla celów epidemiologicznych analizy takie musiałyby być uzupełnione przez dodatkowe metody różnicowania. Ponadto wykazaliśmy skuteczność różnicowania za pomocą metody CGG-PCR takich gatunków prątków jak *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. tuberculosis* i *M. intracellulare*.

MATERIAŁ I METODY

Szczepy bakteryjne

W badaniach wykorzystano 48 szczepów izolowanych od chorych pochodzących z kolekcji Zakładu Mikrobiologii IGIChP. Kolekcja ta została wstępnie zdefiniowana jako *Mycobacterium kansasii* na podstawie wyników testu HPLC i GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany). W badaniach wykorzystano również szczepy: *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. tuberculosis* i *M. intracellulare* (IGIChP, Warszawa).

Izolacja DNA

Izolację genomowego DNA wykonano metodą z użyciem DNAzolu oraz perełek szklanych według wcześniej opublikowanych procedur (19, 14). Wyszuszony osad DNA, zawieszano w 50 µl wody destylowanej (MiliQ Plus, Milipore), a następnie doprowadzano do stężenia około 50 ng/µl.

Analiza PRA-*hsp65*

W pierwszym etapie dokonano amplifikacji fragmentu genu *hsp65* (441 pz) według opisanej wcześniej metody (20). Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze T-3000 (Biometra). Analizę wielkości i liczby fragmentów powstałych po trawieniu enzymami BstEII i HaeIII (Fermentas), wykonywano na podstawie rozdzielności elektroforetycznych wobec standardu wielkości fragmentów DNA – GeneRuler™ 50 bp DNA Ladder (Fermentas). Typy profili PRA-*hsp65* określano poprzez porównanie danych dostępnych w bazie PRASITE (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Analizy TRS-PCR

Reakcje PCR prowadzono według opisanej wcześniej procedury (13, 14) w termocyklerze T-3000 (Biometra). Uzyskane produkty rozdzielano elektroforetycznie w żelach agarozowych (1,6%, TAE), wobec standardu wielkości DNA GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Żele barwiono roztworem bromku etydydny, a następnie fotografowano w świetle UV z wykorzystaniem systemu Fc8800 (Alphainnotech).

Analiza komputerowa profili prążkowych TRS-PCR

Analizę komputerową podobieństwa profili prążkowych wykonano za pomocą oprogramowania BioNumerics (Applied Maths) przy zastosowaniu korelacji Pearsona oraz metody UPGMA (13, 14). Wzory prążkowe normalizowano wobec standardu wielkości DNA GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas), zawierającego 14 fragmentów o wielkości od 3000 pz do 100 pz. Siłę różnicowania poszczególnych analiz określano poprzez wyliczenie współczynnika różnicowania (DI – *discriminatory index*) według Hunter'a i Gastona (16). Wykonano analizę powtarzalności (R) według uprzednio opisaney procedury (13, 14).

WYNIKI I DYSKUSJA

W pierwszym etapie pracy wstępnie scharakteryzowano szczep *M. kansasii* metodą PRA-hsp65 (tab. 1). Według bazy danych PRASITE 39 szczepów zostało zaklasyfikowanych jako *M. kansasii* typu I, który uznany jest przez wielu autorów jako najczęściej izolowany od ludzi, rzadziej ze źródeł środowiskowych (3, 6, 18). Jeden szczep (K20) zaklasyfikowany został jako *M. avium* typ I, natomiast 3 szczepy (K7, K27, K45), określone we wczesnych etapach identyfikacji gatunkowej jako *M. kansasii*, według profilu PRA-hsp65 określone zostały jako *M. fortuitum* typu I. Taki wynik może sugerować, że są to nieopisane wcześniej nowe typy *M. kansasii*, ponieważ już wcześniej wykazano identyczne lub bardzo podobne profile PRA-hsp65 dla różnych gatunków (12). Pięć szczepów (K12, K32, K33, K39, K40) zostało określonych jako niemożliwe do zidentyfikowania według PRA-hsp65. Podobne problemy były, opisywane w badaniach innych ośrodków. Świadczyć to może o małej elastyczności metody PRA-hsp65. Ponadto, często opisywane są nowe warianty PRA-hsp65 dla różnych gatunków z rodzaju *Mycobacterium* (11, 12), dlatego też konieczne wydaje się sukcesywne uaktualnianie bazy danych profili PRA-hsp65 lub też prowadzenie wewnętrznej bazy danych takich profili przez każde laboratorium zajmujące się oznaczeniami tego typu.

Następnie wykonano testy TRS-PCR dla całej kolekcji szczepów *M. kansasii* z użyciem starte-

ów posiadających bogate w pary G/C motywy TRS: (N)₆(CGG)₄, (N)₆(CCG)₄, (N)₆(CAC)₄, (N)₆(CAG)₄, (N)₆(GTC)₄, (N)₆(GTG)₄, (N)₆(CTG)₄, (N)₆(GAC)₄, (N)₆(TCC)₄, (N)₆(AGG)₄. Dla każdej z analiz określono powtarzalność uzyskiwanych wyników. Stwierdzono, że największą powtarzalność uzyskano dla analiz TRS-PCR z wykorzystaniem startera zawierającego motyw CAG (R = 93,61%) (tab. 2). Jednak biorąc pod uwagę siłę różnicowania (16) najbardziej przydatne okazały się startery (N)₆(CGG)₄ (DI = 0,943) i (N)₆(CCG)₄ (DI = 0,939) (ryc. 1A i B), a powtarzalność uzyskiwania wzorów prążkowych była na zbliżonym poziomie i wynosiła odpowiednio 92,61 i 90,82% (tab. 2). Takie wyniki są zgodne z faktem wysokiej zawartości par G/C i nadreprezentacji motywów CGG w genomach prątków (22), prawdopodobnie również w przypadku *M. kansasii*, którego sekwencja genomowa nie została jeszcze opisana. W przypadku pozostałych starterów otrzymano wzory prążkowe dla każdego szczepu, jednakże obliczone wartości indeksu Hunter'a – Gaston'a (16) wskazywały na wysokie podobieństwo szczepów *M. kansasii* między sobą i wynosiły poniżej 0,9.

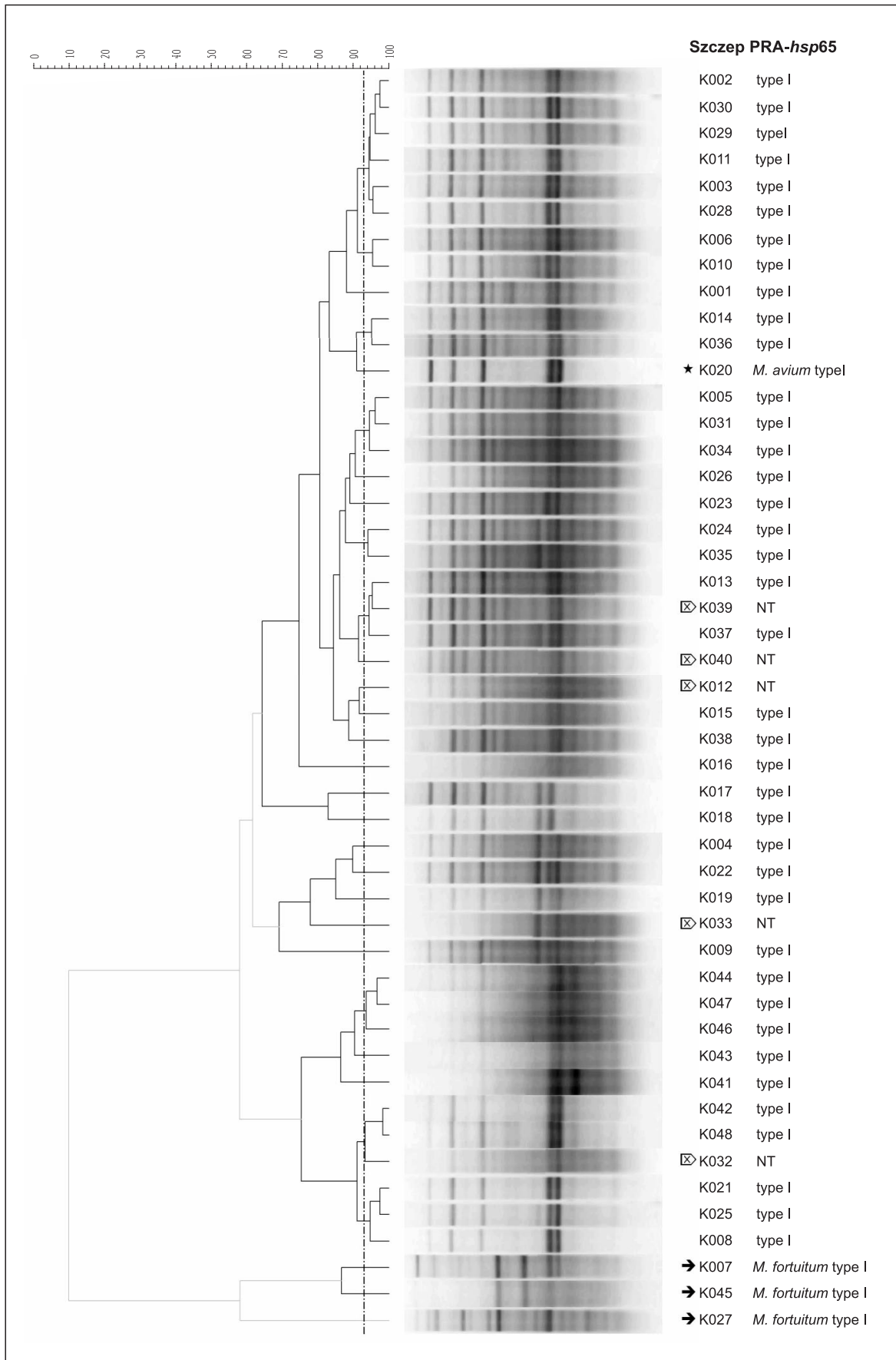
Warto zwrócić uwagę na to, że wzory prążkowe uzyskane za pomocą testu CCG-PCR grupują się w trzy jednorodnie klastry, podczas gdy analiza podobieństwa profili uzyskanych poprzez test CGG-PCR wykazuje duże zróżnicowanie genetyczne szczepów oznaczonych jako K002, K013, K019, K043, K048. Szczepy te, określone według PRA-hsp65 jako *M. kansasii* typu I, różnią się nie tylko od większości szczepów z kolekcji, jak i między sobą (ryc. 1A). Można więc wnioskować, że metoda wykorzystująca starter zawierający motyw CGG w porównaniu do metody CCG-PCR pozwala na większe zróżnicowanie w obrębie kolekcji szczepów *M. kansasii*. Ponadto, szczepy określone jako nietypowe według PRA-hsp65 oraz szczep określony jako *M. avium* typu I, grupowały się razem ze szczepami określonymi jako *M. kansasii* typu I zarówno w testach CGG-PCR i CCG-PCR, jak i w pozostałych analizach TRS-PCR. Sugeruje to przynależność tych szczepów do gatunku *M. kansasii*. Dodatkowo, szczepy oznaczone jako K007, K027, K045, które według profilu PRA-hsp65 zostały określone jako *M. fortuitum* typu I

Tabela 1. Zestawienie wyników analizy PRA-hsp65 badanych izolatów *M. kansasii*.

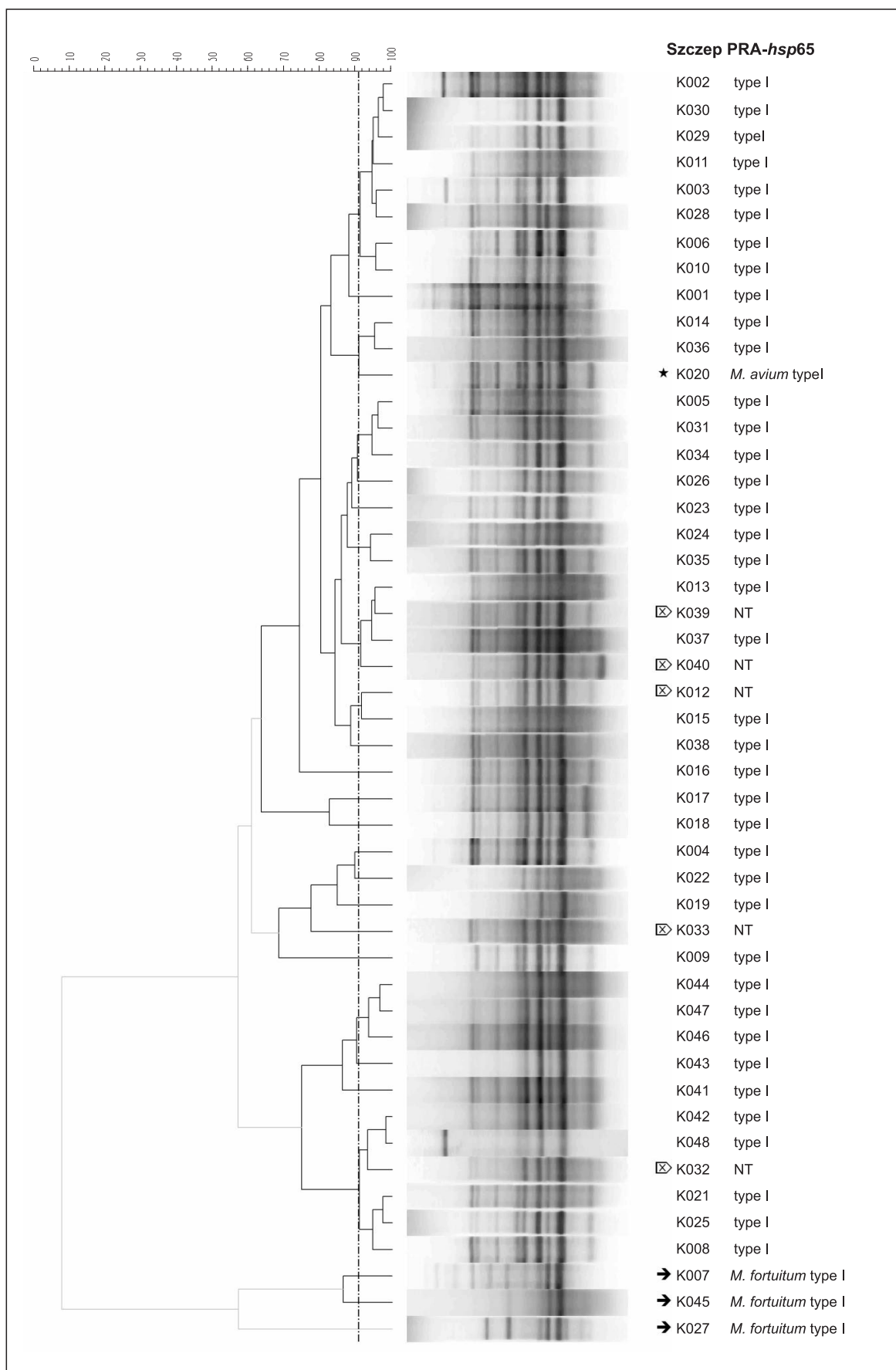
Typ PRA – hsp65	Typ I <i>M. kansasii</i>	Szczepy nietypowe	Szczepy zaklasyfikowane jako <i>M. fortuitum</i> typ I	Szczepy zaklasyfikowane jako <i>M. avium</i> typ I
Liczba szczepów	39	5	3	1

Tabela 2. Analiza stopnia różnicowania oraz powtarzalności testu TRS-PCR dla badanych izolatów *M. kansasii*.

Starter	CGG	CCG	CAG	GTC	GTG	CAC	CTG	GAC	TCC	AGG
Współczynnik różnicowania (DI)	0,943	0,939	0,845	0,769	0,583	0,574	0,540	0,452	Brak produktów amplifikacji	Brak produktów amplifikacji
Powtarzalność analizy (R) (%)	92,61	90,82	93,61	93,14	90,89	81,21	89,01	92,92		



Ryc. 1A. Analiza CGG-PCR dla *M. kansasii*. Przerywana linia oznacza wartość powtarzalności testu.



Ryc. 1B. Analiza CCG-PCR dla *M. kansasii*. Przerywana linia oznacza wartość powtarzalności testu.

stanowią odrębną grupę, z podobieństwem do szczepów *M. kansasii* poniżej 50%, w przypadku większości analiz TRS-PCR (z wyjątkiem GAC-PCR, podobieństwo 63% oraz TCC- i AGG-PCR, gdzie nie uzyskano produktów amplifikacji). Zjawisko to jest szczególnie widoczne w przypadku analiz podobieństwa wykonanych na podstawie testów CGG-PCR i CCG-PCR (ryc. 1A i B). Ponadto szczepy K007, K027, K045 wykazywały inny charakter wzrostu na podłożu Lowensteina – Jensena od pozostałych szczepów z analizowanej kolekcji. Z powyższych względów można było wysnuć przypuszczenie, że nie należą one do gatunku *M. kansasii* i zostały błędnie określone gatunkowo we wczesnych etapach identyfikacji lub też uległy one zakażeniu podczas kolejnych pasażowań. Powtórne analizy z wykorzystaniem testu GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany) wykazały przynależność tych szczepów do *M. fortuitum*. Zastosowanie testów CGG-PCR i CCG-PCR pozwoliło potwierdzić odrębność szczepów *M. fortuitum*, a co za tym idzie pozwoliło na wykrycie takich błędnie sklasyfikowanych szczepów, co może stanowić dużą zaletę metody TRS-PCR.

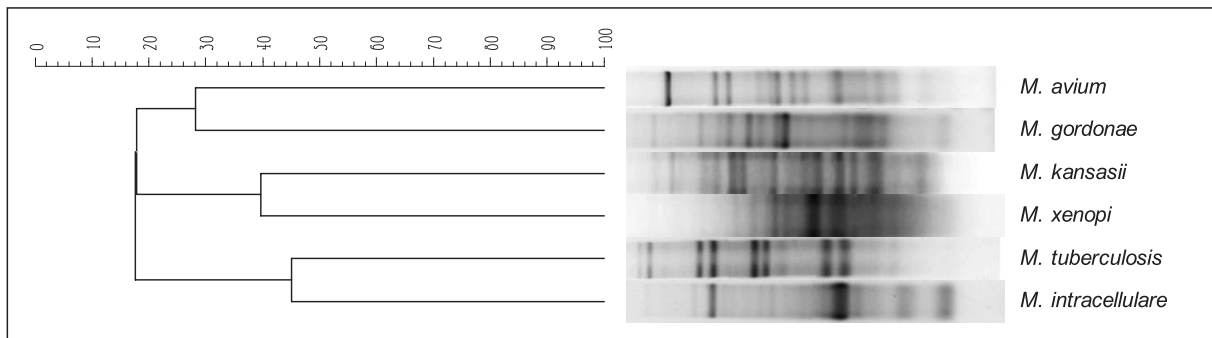
Dodatkowo, to zjawisko sugeruje, że test TRS-PCR może być testem dobrze grupującym szczepy gatunkowo. W związku z tym w dalszej części pracy wykonaliśmy analizy przydatności testu CGG-PCR, najefektywniejszego w różnicowaniu kolekcji szczepów

M. kansasii, do różnicowania wybranych gatunków z rodzaju *Mycobacterium*, takich jak *M. avium*, *M. gordonae*, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. tuberculosis* i *M. intracellulare*. Poziom podobieństwa wzorów prążkowych uzyskanych dla analizowanych gatunków nie przekraczało 50% (ryc. 2). Zatem test ten może znaleźć zastosowanie w analizach identyfikacji gatunkowej prątków, szczególnie w przypadku odróżniania mykobakteriozy od gruźlicy.

Reasumując, można stwierdzić, że test TRS-PCR umożliwia różnicowanie *M. kansasii*. Pomimo że analizy z wykorzystaniem starterów zawierających motywy CGG i CCG wykazały wysoką siłę różnicowania i profile prążkowe różniły się między sobą, to różnice te nie są na tyle wyraźne, żeby test stosowany samodzielnie był definitywnie rozstrzygający w dochodzeniach epidemiologicznych, które wymagałyby uzupełnienia dodatkowymi metodami.

WNIOSKI

1. Test molekularny TRS-PCR jest przydatny do różnicowania podtypów *Mycobacterium kansasii* i umożliwia identyfikację wybranych gatunków prątków atypowych.
2. Ze względu na powszechność występowania prątków atypowych w Polsce istnieje konieczność poszukiwania testów odróżniających *M. tuberculosis* complex od prątków niegruźliczych NTB.



Ryc. 2. Różnicowanie gatunków z rodzaju *Mycobacterium* z wykorzystaniem metody CGG-PCR.

PISMIENICTWO

1. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Elliott BA et al.: On behalf of the ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee, An Official ATS/IDSA Statement: Diagnosis, Treatment and Prevention of Non-tuberculous Mycobacterial Diseases. *Am J Respir Crit Care Med* 2007; Vol 175: 367-416.
2. Shin JH, Lee EJ, Lee HR et al.: Prevalence of non-tuberculous mycobacteria in a hospital environment. *Journal of Hospital Infection* 2007; 65: 143-148.
3. Alcaide F, Richter I, Bernasconi C et al.: Heterogeneity and Clonality among Isolates of *Mycobacterium kansasii*: Implications for Epidemiological and Pathogenicity Studies. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; Vol. 35, No. 8, p. 1959-1964.
4. Picardeau M, Prod'homme G, Raskine L et al.: Genotypic Characterization of Five Subspecies of *Mycobacterium kansasii*. *Journal of Clinical Microbiology* 1997; Vol. 35, No. 1: p. 25-32.
5. Zahang Y, Mann LB, Wilson RW et al.: Molecular Analysis of *Mycobacterium kansasii* Isolates from the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 2004; Vol. 42, No. 1: p. 119-125.
6. Taillard C, Greub G, Weber R et al.: Clinical Implications of *Mycobacterium kansasii* Species Heterogeneity: Swiss National Survey. *Journal of Clinical Microbiology* 2003; Vol. 41, No. 3, p. 1240-1244.
7. Szturmowicz M, Fijałkowska A, Rowińska-Zakrzewska E et al.: *Mycobacterium kansasii* infection in chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), report of two cases. *Pneumonol i Alergol Pol* 2004; 72: 523-529.
8. Neonakis IK, Gitti Z, Krambovitis E, Spandidos DA: Molecular diagnostic tools in Mycobacteriology. *Journal of Microbiological Methods* 2008; 75: 1-11.

9. Safianowska A, Walkiewicz R, Nejman-Gryz P et al.: The comparison between two methods for typing of nontuberculous mycobacteria: high pressure liquid chromatography and molecular assay GenoType Mycobacterium CM/AS. *Pneumologia Alergol Pol* 2010; Vol. 78, No. 5, 363-368.
10. Richter E, Niemann S, Rusch-Gerdes S, Hoffner S: Identification of *Mycobacterium kansasii* by Using a DNA Probe (AccuProbe) and Molecular Techniques. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; Vol. 37, No. 4: 964-970.
11. Chimara E, Ferrazoli L, Ueky SYM 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. *BioMed Central Microbiology* 2008; 8: 48.
12. Sajduda A, Martin A, Portales F, Palomino JC: hsp65 PCR-restriction analysis (PRA) with capillary electrophoresis in comparison to three other methods for identification of *Mycobacterium species*. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 80: 190-197.
13. Adamus-Bialek W, Wojtasik A, Majchrzak M et al.: (CGG)4-Based PCR as a Novel Tool for Discrimination of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Comparison with Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus – PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 2009, Vol. 47, No. 12: 3937-3944.
14. Wojtasik A, Majchrzak M, Adamus-Bialek W et al.: Trinucleotide repeat sequence-based PCR as a potential approach for genotyping *Mycobacterium gordonae* strains. *Journal of Microbiological Methods* 2011; 85: 28-32.
15. Thibault VC, Grayon M, Boschirolu ML et al.: New variable-number tandem-repeat markers for typing *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* and *M. avium* strains: comparison with IS900 and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2404-2410.
16. Hunter PR, Gaston MA: Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J Clin Microbiol* 1988; 26: 2465-2466.
17. Fangrat A, Walkiewicz R, Safianowska A et al.: Identification of Mycobacteriaceae species based on the hsp-65 gene polymorphism analysis by PCR-RFLP. *Pneumologia Alergol Pol* 2006; 74: 95-100.
18. Tortoli E: *Mycobacterium kansasii*, species or complex? Biomolecular and epidemiological insights. *Kekkaku* 2003; 78: 705-709.
19. Madiraju MV, Qin MH, Yamamoto K et al.: The dnaA gene region of *Mycobacterium avium* and the replication activities of its 5' and 3' flanking regions. *Microbiology* 1999; 145: 2913-2921.
20. Telenti A, Marchesi F, Balz M et al.: Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol* 1993; 31: 175-178.
21. Parniewski P, Bacolla A, Jaworski A, Wells RD: Nucleotide excision repair affects the stability of long transcribed (CTG)ⁿCAG tracts in an orientation – dependent manner in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 1999; 27: 616-623.
22. Otsuka Y, Parniewski P, Zwolska Z et al.: Characterisation of a trinucleotide repeat sequence (CGG)⁵ and potential use in restriction fragment length polymorphism typing of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 3538-3548.
23. Van Soolingen D: Molecular epidemiology of tuberculosis and other mycobacterial infections: main methodologies and achievements. *Journal of Internal Medicine* 2001; 249: 1-26.

otrzymano/received: 18.08.2011
zaakceptowano/accepted: 14.09.2011

Adres/address:
*Paweł Parniewski
Pracownia Genetyki Molekularnej
Instytut Biologii Medycznej PAN
ul. Lodowa 106, 93-232 Łódź
tel.: (42) 272-36-33
e-mail: pparniewski@cbm.pan.pl