

TÜBERKÜLOZ TANISINDA KLASİK PCR:

“PCR ve RFLP Yöntemleri ile Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu”

Prof.Dr. Ahmet SANIÇ¹ , Doç. Dr. Ahmet KIZIRGİL²

¹Kafkas Üniversitesi Rektörlüğü, Azerbaycan

²Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ.

Mikroskopi ve kültür gibi klasik tanı yöntemleri Mycobacterium'lara bağlı infeksiyonların tanısında önemini eskisi gibi korumakla birlikte daha uzun zaman almakta ve yeni etkenlerin tanımlanmasında yetersiz kalabilmektedir. Moleküler yöntemler oldukça hızlı olmaları ve tanımlama aralıklarının genişliği nedeniyle Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında da yaygın kullanım alanı bulmuştur. Mycobacterium infeksiyonlarının tanısında kullanılan moleküler yöntemlerin amacı, şu ana başlıklar altında toplanabilir:

- Mycobacterium'ların klinik örneklerde varlığının saptanması,
- Klinik örneklerde bulunan veya kültürde üretilen bakterilerin türlerinin saptanması veya tiplendirilmesi,
- Mycobacterium'ların antimikrobiyal ilaçlara karşı dirençli olup olmadıklarının araştırılması,
- Moleküler epidemiyolojik araştırmalar ile Mycobacterium infeksiyonlarının kaynağının ortaya çıkartılması.

POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU (POLYMERASE CHAIN REACTION, PCR)

PCR ilk defa Kary Mullis tarafından 1985 yılında tanımlanmıştır (1). Bu yöntemde çoğaltılması (replikasyon) istenen DNA örneği, replikasyon için gereken maddelerle birlikte bir tüpe konarak, üç değişik ısıda bir döngü (siklus) içerisinde tutulur.

- **Denatürasyon:** Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nda ilk basamak DNA'nın denatürasyonudur. 94-95°C'ye ısıtılan DNA'nın iki zinciri birbirinden ayrılır.
- **Bağlanma (annealing):** İkinci basamak bağlanmadır Ortama konmuş ve sadece çoğaltılmak istenen DNA bölgesine özgül iki primer, sıcaklığın (50-70°C'ye) düşürülmesiyle, ilk basamakta ayrılmış olan kalıp DNA'nın özgül oldukları bölgelerine bağlanırlar.

- **Uzama (ekstansiyon):** Üçüncü basamak primerlerin uzamasıdır. Ortama konmuş ve optimum sentez sıcaklığı 72-74 °C olan *Thermus aquaticus* (Taq) polimerazı (ya da ısıya dayanıklı başka polimerazlar) bu ısıda hedef DNA'ya yapışmış primerlerin 3' ucundan başlayarak istenen DNA bölgesinin sentezini yapar.

PCR Uygulamasında Karşılaşılan Sorunlar

- Yalancı pozitif ve negatiflik
- Deneyimli personel ve hassas çalışma gerektirme
- Uzun süre ve iş yoğunluğu
- Özel laboratuvar alt yapısı ve ekipman gerektirme
- Sonuçların deneyimli kişiler tarafından yorumlanması
- Standardizasyon gerekliliği
- Maliyet

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (RFLP)

Restriksiyon enzimlerinin (RE)'leri çift zincirli DNA dizisini belli nükleotit dizelerinden (ör. ATGC gibi) tanıyan ve kesen enzimlerdir. Günümüzde yaklaşık 1200 RE tanımlanmış ve sınıflandırılmıştır. Sınıflandırmada ilk üç harf enzimin kaynağı olan bakteriyi; romen rakamları da tanımlanma sırasını ifade eder. Örneğin PvuI enzimi *Proteus vulgaris*'ten elde edilen ilk RE'ni ifade eder. RFLP tüm kromozomal DNA veya PCR sonrası elde edilen DNA'nın RE'leri ile kesilerek DNA parçalarının agaroz jelde büyüklüklerine göre ayrıldıktan sonra ethidium bromid ile boyanarak değerlendirilmesi esasına dayanır.

UYGULAMA

PCR ve RFLP YÖNTEMLERİ İLE MYCOBACTERIUM TÜRLERİNİN İDENTİFİKASYONU

Gereken Maddeler

EDTA (Etilen diamin tetra asetik asit)	Sigma
Trizma Base	Sigma
Borik asit	Sigma

Chelex-100	Sigma
Standard agaroz	Sigma
NuSieve GTG agaroz	FMC BioProduct
Ethidium bromid	Sigma
Taq polimeraz (5 U/μl)	Promega, Roche veya Fermentas
dNTP	Promega, Roche veya Fermentas
Primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3'	50 nmol
Primer TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3'	50 nmol
Enjeksiyonluk distile su	Eczacıbaşı ilaç
Muhtelif Filtreli pipet uçları: 1-10, 10-100, 50-200 ve 100-1000 μl hacimlerinde	
Muhtelif Eppendorf tüpleri: 0.2 ml (ince cidarlı), 0.5 ml, (thermal cycler'da kullanılacaksa ince cidarlı) ve 1.5 ml (yazı yazmak için yan yüzleri pürüzlü) hacimlerinde	

Gereken Aletler

Su banyosu veya kuru ısıtıcı blok	Nüve, Clifton veya diğer markalar
Vorteks	Techne veya diğer markalar
Derin dondurucu (-20oC)	Nuarie veya diğer markalar
Buzdolabı 2 adet (temiz ve kirli odada) -20 oC'lik bölmesi olan ve No frost değil	
Laminer hava akımlı kabin	CB 1204, dan LAF veya yerli üretim
Mikrosantrifüj	en az 14.000 devir, soğutmalı olabilir
Thermal cycler	Birçok üretici var
Agaroz Jel Elektroforez Sistemi	Birçok üretici var
pH metre	Birçok üretici var
UV transilliminatör	Birçok üretici var
Mikrodalga fırın veya	
küçük elektrik ısıtıcısı	Birçok üretici var
Mikropipetler (1-10, 10-100, 50-200, 100-1000 l)	Rainin, Biohit, Costar

Çalışmanın Üç Aşaması Bulunmaktadır:

1. Mycobacterium DNA'sının izole edilmesi: DNA izolasyon kiti kullanılacaktır.
2. Mycobacterium DNA'sının çoğaltılması: Spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini (hsp65) bölgesinin PCR ile çoğaltılması: Tüberküloz basilleri kompleksi dışındaki mikobakterilerde de bu gen bulunur. Ancak Mikobakteri türleri arasında polimorfizm gösterir.
3. Tüm mycobacterium'lara spesifik 65 kilo daltonluk ısı şok proteini bölgesine ait PCR ürününün restriksiyon enzimleri ile kesilerek mycobacterium türlerinin identifikasyonu.

I. Mycobacterium DNA'sının İzole Edilmesi:

Nükleik asitlerin hücrelerden ayrılarak, fiziksel ve/veya kimyasal işlemlerden geçirilip saflaştırılma işlemi ekstraksiyon olarak tanımlanmaktadır. Bu işlem esnasında nükleik asitlerin parçalanmaya karşı korunması, amplifikasyon inhibitörlerinin ortamdaki uzaklaştırılması ve hedef nükleik asidin saflaştırılarak konsantre edilmesi amaçlanmaktadır. Değişik ekstraksiyon yöntemleri geliştirilmiştir: Fenol-kloroform yöntemi, distile suda kaynatma, deterjanlar + proteinaz K, değişik kimyasalların kullanımı (Chelex-100, Guanidium vb.) ve sonikasyon gibi yöntemler DNA ekstraksiyonu için kullanılmıştır. Ayrıca ticari olarak kullanılan DNA/RNA ekstraksiyon kitleri mevcuttur. Mikobakterilerin DNA izolasyonu ekstraksiyon kitleri ile yapılması planlanmıştır.

II. Mycobacteriumlara spesifik hsp65 bölgesinin PCR ile çoğaltılması:

DNA'nın çoğaltılabilmesi için PCR tepkime karışımında gerekli olan elemanlar :

- **DNA Ektraktı:** Ekstraksiyonu yapılmış, DNA ekstraksiyon kiti yardımı ile amplifikasyona hazır hale getirilmiş DNA örneğidir.
- **Primer'ler:** Çoğaltılacak bölgeyi sağdan ve soldan sınırlayan, çoğaltılması istenen bölgenin iki ucundaki DNA dizisini özgül olarak tanıyıp bağlanacak olan bir çift sentetik DNA parçalarıdır. Primerler liyofilize halde geldi ise DNAz ve RNAz free distile suda 10 veya 50 pmol/μl olacak şekilde sulandırılır. Daha sonra küçük hacimlere (10-20 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Tüm mycobacterium'ların PCR ile saptanması için primer TB11: 5'-ACC AAC GAT GGT GTG TCC AT-3' ve TB12: 5'-CTT GTC GAA CCG CAT ACC CT-3' kullanılır .

- **dNTP Karışımı:** Amplifikasyon esnasında denatüre edilen zincirlerin tamamlanmasında kullanılacak olan deoksi nükleotit trifosfatlar (dNTP'ler: eşit oranda dATP, dGTP, dCTP, dTTP)'lardan oluşur. 100 mM konsantrasyonda olan stok dNTP'ler 10 defa DNAz ve RNAz free distile suda sulandırılarak küçük hacimlere (25-50 örneklik) bölünerek -20oC'de saklanır. Sulandırılan bu solüsyondan 50 µl PCR karışımı için 1µl dNTP eklenir.
- **DNA Polimeraz:** PCR çalışmalarının büyük çoğunluğunda *Thermus aquaticus* (Taq) bakterilerinden elde edilen termostabil Taq DNA polimeraz enzimi kullanılmaktadır. Taq DNA polimeraz optimal sıcaklıkta (70-80oC) saniyede 35-100 nükleotidin polimerizasyonu ve 5'-3' ekzonükleaz aktivitesini gerçekleştirme yeteneğine sahiptir (1,16). Taq polimeraz genellikle 5 ünite/µl konsantrasyonda gelir ve -20oC'de saklanır.
- **Tamponlar ve MgCl₂:** 10x PCR tamponunda 100 mM Tris ve 500 mM KCl bulunur. Taq DNA polimeraz MgCl₂ varlığında etkindir. MgCl₂'ün PCR'ın özgülülüğü ve ürün verimi üzerinde çok önemli bir etkisi vardır. Genellikle optimum MgCl₂ konsantrasyonu olarak 1.5 mM tercih edilir. Düşük Mg²⁺ iyon konsantrasyonu zayıf ürün oluşumuna, yüksek Mg²⁺ iyon konsantrasyonu ise spesifik olmayan ürün oluşumuna sebep olmaktadır. 10x PCR bufer ve MgCl₂ (25 mM) genellikle Taq enzimi ile birlikte gelir ve aşağıda belirtilen konsantrasyonda kullanılır.

Tablo 1: PCR Karışımının Hazırlanması*:

Distile su	30.75	µl
PCR Bufer (10x konsantrasyonda)	5	µl
MgCl ₂ (25 mM)	3	µl
dNTP (10 mM)	1	µl
Primer 1 (TB11, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Primer 2 (TB12, 10 pmol/µl)	2.5	µl
Taq polimeraz (5 U/µl)	0.25	µl
Örnek DNA	5	µl
Toplam	50	µl

**Karışım kırk buz üzerindeki 1.5 ml'lik reaksiyon tüpünde hazırlanır.*

Yukarıdaki karışım vorteksenerek karıştırıldıktan sonra santrifüje edilir. Çalışılacak

örnek sayısının çarpımı kadar hazırlanan karışım 45'er µl olarak örnek numaraları yazılmış 0.2 veya 0.5 ml'lik (Thermal cycler'a bağlı olarak) eppendorf tüplerine dağıtılır. Üzerine 5 µl Mycobacterium DNA'sı eklenerek thermal cycler aletine yerleştirilir. Thermal cycler aletinde aşağıdaki siklus programı uygulanır:

Tüm Mycobacterium'lara Spesifik PCR Programı:

94 oC'de	5 dk	1 siklus
94 oC'de	1 dk	35 siklus
55 oC'de	1 dk	
72 oC'de	2 dk	
72 oC'de	8 dk	1 siklus

c) Agaroz Jel Elektroforezi:

Amplifiye edilen PCR ürünleri değişik yöntemlerle belirlenebilir. En yaygın olarak kullanılanı agaroz jel elektroforezidir. PCR ile elde edilen ürünler agaroz jel kullanılarak elektrik alanında büyüklüğüne göre ayrılır. Agaroz jelde DNA bantlarının görülebilmesi için PCR ürünlerinin flouresan bir boyayla (ör. Ethidium bromid) muamele edilmesi gerekir. Ethidium bromid'le boyanan DNA bantları ultraviyole (UV) transilliminatör veya epiilliminatör ışığı altında görünür hale gelir. Beklenen PCR ürünlerinin varlığı DNA molekül ağırlık standartları (DNA marker) veya pozitif kontroldeki bant büyüklüğü ile karşılaştırılarak belirlenir. Beklenen PCR ürünü büyüklüğüne göre agaroz konsantrasyonu aşağıdaki tablodan belirlenir.

Tablo 2: Agaroz Konsantrasyonu ile DNA Ayırma Gücü Arasındaki İlişki.

Agaroz Konsantrasyonu (%)	DNA Ayırma Aralığı (baz çifti)
0.3	5000 - 60000
0.6	1000 - 20000
0.7	800 - 10000
0.8	500 - 7000
1.2	400 - 6000
1.5	200 - 3000
2.0	100 - 2000

PCR Ürününün Agaroz Jelde Yürütülmesi:

- İlk olarak PCR ürününü büyüklüğü hesaplanarak kullanılacak jelin agaroz yüzdesine karar verilir (Tablo). 200 ile 3000 baz çifti arasındaki bir ürün için % 1.5'lik agaroz yeterlidir.
- Önce agaroz ve terazinin bulunduğu odaya girilir. Elektroforez tankının büyüklüğüne göre dökülecek jel miktarı belirlenir. Örnek: 40 ml'lik tank için; 0.6 gram agaroz tartılıp 40 ml 0.5X TBE tamponuna ilave edilir.
- Stok 5X TBE bufer (50 gr Tris base, 27.5 gr Boric acid, 20 ml 0.5 M EDTA pH:8.0, 1 litre distile suda eritilir) on defa distile suda sulandırılarak 0.5X TBE bufer kullanma solüsyonu hazırlanır.
- 40 ml 0.5X TBE bufer behere konulur. Üzerine tartılan agaroz eklenerek karıştırılır.
- Mikrodalga fırında 1 dakika 400 Watta tutulur. Mikrodalga yoksa ocak üzerinde arada bir karıştırılarak agaroz eritilebilir.
- Karıştırıldıktan sonra soğuması için beklenirken agaroz jelin döküleceği plate hazırlanır. Örnek sayısına göre 8'li veya 12'li tarak yerleştirilir.
- 50oC civarına kadar soğuyan 40 ml'lik agaroz 4 µl ethidium bromide (5 mg/ml) eklenip karıştırıldıktan sonra jel dökülür.
- Jel donduktan sonra (yaklaşık 30 dakika oda ısısında) plate'nin iki tarafındaki lastikler ve tarak çıkarılır.
- Her örnek için parafilm üzerine 2 µl yükleme solüsyonu (5x Loding bufer: 250 mg Bromophenol blue, 3 ml gliserol, 7 ml distile su) konur. 10'ar µl PCR ürünü 2 µl yükleme solüsyonu ile karıştırıldıktan sonra sırayla agaroz jele yüklenir.
- 125 voltta 20 dakika veya 90 voltta 60 dakika elektroforez uygulanır.
- Elektroforez durdurulduktan sonra jel UV transilliminatorde incelenir. Beklenen bant görülen örnekler pozitif kabul edilir. Gerekirse poloroid fotoğraf makinası veya jel dökümantasyon sistemi ile jeller fotoğrafı alınır.

III. Tüm Mycobacterium'lara Spesifik 65 Kilo Daltonluk Isı Şok Proteini Bölgesine Ait PCR Ürününün Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Mycobacterium Türlerinin İdentifikasyonu (10)

Uygun bant görülen (beklenen yerde ve yeterli yoğunlukta) örneklerin 11'er µl'si HaeIII (BsuRI) ve BstEII (Eco91I) enzimleri ile kesilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir.

Tablo 3: HaeIII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer R ⁺	1.5	µl
HaeIII (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

Tablo 4: BstEII ile PCR ürününün kesilmesi:

Distile su	2.0	µl
Bufer O ⁺	1.5	µl
BstEII (10 U/µl, Fermentas)	0.5	µl
PCR ürünü	11.0	µl
Toplam	15.0	µl

- Enzim ve bufer karışımları örnek sayısınınca temiz odada hazırlandıktan sonra 0.2 veya 0.5 ml'lik eppendorf tüplerine 4'er µl olarak bölünür.
- Daha sonra kirli odada üzerlerine 11'er µl PCR ürünü eklenir ve 37oC'de 4 saat su banyosu veya thermal cycler'da tutulur.
- Daha sonra Mycobacterium türlerinin identifikasyonu için restriksiyon enzimleri ile kesilen ve kesilmeyen ürünler birlikte %3'lük NuSieve GTG agaroz (FMC BioProduct)'da yürütülür.
- PCR ürününün kesilmesi ile jel elektroforezde ortaya çıkan bantların bp uzunlukları değerlendirilerek Mycobacterium türleri identifiye edilir (Şekil 1, 2)

KAYNAKLAR

1. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 8.1-8.24.
2. Diagnostic Standards and Classification of Tuberculosis in Adults and Children. This official statement of the American Thoracic Society and the Centers for Disease Control and Prevention was adopted by the ATS Board of Directors, July 1999. This statement was endorsed by the Council of the Infectious Disease Society of America, September 1999. American Journal of Respiratory Critical

Care Medicine, 161, 1376–1395.

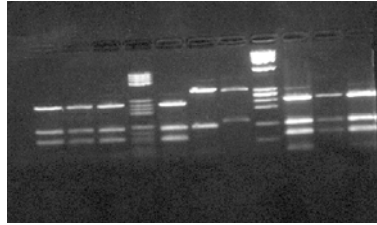
3. Durmaz R. Nükleik Asit Amplifikasyon Yöntemlerinde Sorunlar ve Standardizasyon. (2001). Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji. Durmaz R (Eds.) 2. Baskı. Kozan Ofset, Ankara, 45-56.
4. Sambrook J, Russell DW. (2001). Molecular Cloning A laboratory Manual. Third edition. CSHL Press, New York, 5.1-5.17.
5. Hellyer TJ, DesJardin LE, Assaf MK, Bates JH, Cave MD, Eisenach KD. (1996). Specificity of IS6110-based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. J Clin Microbiol. 34:2843–2846.
6. Gillespie, S. H., & McHugh, T. D. (1997). Monitoring the therapy of pulmonary tuberculosis by nested polymerase chain reaction. Journal of Infection, 35, 324–325.
7. Davies, A. P., Newport, L. E., Billington, O. J., & Gillespie, S. H. (1999). Length of time to laboratory diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection: comparison of in-house methods with reference laboratory results. Journal of Infection, 39, 205–208.
8. Carrino, J. J., & Lee, H. H. (1995). Nucleic acid amplification methods. Journal of Microbiological Methods, 23, 3–20.
9. Wittwer C. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Rapid Cycle Real-Time PCR: Methods and Applications. Meuer S, Wittwer C, Nakagawara KI (Eds.) Page:1-8.
10. Taylor TB, Patterson C, Hale Y, Safranek WW. (1997). Routine Use of PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of Mycobacteria Growing in Liquid Media. J Clin Microbiol. 35:79-85.
11. Pao CC, Yen B, You JB, et. al. (1990). Detection and identification of Mycobacterium tuberculosis by DNA amplification. Journal Clinical Microbiology, 28: 1877-1880.
12. Almeda J, Garcia A, Gonzales J, et. al. (2000). Clinical evaluation of an in-house IS6110 polymerase chain reaction for diagnosis of tuberculosis. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 19: 859-867.
13. Walsh PS, Metzger DA, Higuchi R. (1991). Chelex-100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. Biotechniques, 10: 505-513.
14. Torres M, Criado A, Polomares J, et. al. (2000). Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated

- mutations in *M. tuberculosis* . Journal of Clinical Microbiology, 38(9): 3194-3199.
15. Henegariu O, Heereme NA, Dlouhy SR et. al. (1997). Multiplex PCR: critical parameters and step by step protocol. Bio Techniques, 23: 504-511.
16. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, et. al. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239:487-491.
17. Pershing DH. (1991). Polymerase chain reaction: trenches to benches. Journal Clinical Microbiology, 29: 1281-1285.

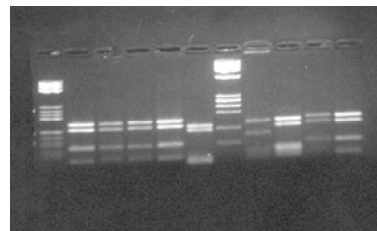
EK:

1. Bazı mycobacterium türlerinin DNA amplifikasyon ürünlerinin BstEII ve HaeIII enzimleri ile kesim sonucu oluşan DNA bant paternleri (Şekil 1)
2. PCR-RFLP ile mikobakterilerin identifikasyon tablosu (Şekil 2)

Şekil 1 : Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün BstEII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



Şekil 2: Isı şok proteinini kodlayan gen bölgesinin ampifikasyon ürününün HaeIII enzimi ile kesilmesi sonucu elde edilen bant patern görüntüleri



PCR-RFLP ile MIKOBAKTERİLERİN İDENDİFİKASYON TABLOSU*

BstEII	HaeIII	Türlerin Adı
	170-130-0	<i>M.trivale</i> type 1
	160-85-55	<i>M.flavescens</i> type 3
	145-130-0	<i>M.lentiflavum</i> type 1
440	140-100-90	<i>M.new</i> type 1
	140-55-50	<i>M.flavescens</i> type 1
	130-115-70-55	<i>M.aurum</i> type 2
	130-110-0	<i>M.new</i>
	130-105-70	<i>M.szulgai</i> type 1
325-130	200-60-55	<i>M.chelonae</i> type 1
	160-110-0	<i>M.haemophilum</i> type 1
	185-140-0	<i>M.terrae</i> type 1
	170-140-0	<i>M.neoaurum</i> type 1
	145-130-50	<i>M.simiae</i> type 4
	140-85-55	<i>M.chitae</i> type 1
325-120	140-60-55	<i>M.nonchromogenicum</i> type 2
	130-115-60	<i>M.gordonae</i> type 4
	130-110-70-55	<i>M.gordonae</i> type 8
	130-105-0	<i>M.genavense</i> type 1
	130-95-75-60	<i>M.kansasii</i> type 5
	200-70-60	<i>M.abscessus</i> type 1
	180-135-70-50	<i>M.thermoresistibile</i> type 1
	180-130-0	<i>M.simiae</i> type 1
	180-100-50	<i>M.new</i> type 1
	145-140-100-55	<i>M.peregrinum</i> type 1
	145-130-95	<i>M.scrofulaceum</i> type 1
	145-130-0	<i>M.intracellulare</i> type 3
240-210	145-105-80	<i>M.marinum</i> type 1
	145-105-60	<i>M.new</i> type 1
	145-70-60-50	<i>M.abscessus</i> type 1
	140-120-100-60	<i>M.pregrium</i> type 2
	140-105-80	<i>M.intracellulare</i> type 2
	140-80-60-50	<i>M.phlei</i> type 1
	130-115-0	<i>M.gordonae</i> type 5
	130-105-80	<i>M.kansasii</i> type 1
		<i>M.branderi</i> type 1
	130-105-60	<i>M.avium</i> type 1
	130-105-0	<i>M.aium</i> type 2
	130-80-60	<i>M.celatum</i> type 1
240-210	125-110-0	<i>M.interjectum</i> type 1
	120-115-110	<i>M.intracellulare</i> type 4
	110-105-0	<i>M.asiaticum</i> type 1
240-135-80	140-105-70	<i>M.shimodei</i> type 1

	160-85-55	<i>M.species</i> type 1
	145-140-100-60	<i>M.peregrinum</i> type 3
	145-125-60	<i>M.smegmatis</i> type 1
	130-105-80	<i>M.celatum</i> type 2
240-130-85	130-105-70	<i>M.gastrit</i> type 1
	130-105-0	<i>M.kansasii</i> type 2
	130-100-75	<i>M.kansasii</i> type 6
	130-90-70	<i>M.kansasii</i> type 3
	130-95	<i>M.lentiflavum</i> type 4
	165-115-0	<i>M.gordonae</i> type 9
	160-110-60	<i>M.gordonae</i> type 7
	145-130-60	<i>M.intracellulare</i> type 1
240-120-100	145-130-0	<i>M.lentiflavum</i> type 3
	140-105-80	<i>M.malmoense</i> type 1
	140-60-0	<i>M.hibemiae</i> type 1
	130-110-0	<i>M.gordonae</i> type 3
	130-95-60	<i>M.intracellulare</i> type 4
	220-110-0	<i>M.gordonae</i> type 2
	185-140-50	<i>M.senegalense</i> type 1
	160-115-60	<i>M.gordonae</i> type 1
	160-105-60	<i>M.xenopi</i> type 1
240-120-85	150-130-70	<i>M.tuberculosis</i> complex
	150-60-55	<i>M.nonchromogenicum</i> type 1
	145-120-55-50	<i>M.fortuitum</i> type 1
	140-125-55-50	<i>M.farcinogenes</i> type 1
	140-95-90	<i>M.fortuitum</i> type 2
	130-115-70-50	<i>M.kansasii</i> type 4