

ELAZIĞ YÖRESİNDE TÜBERKÜLOZLU HAŞTALARIN BALGAM ÖRNEKLERİNDE MİKOBAKTERİ TÜR DAĞILIMININ PCR-RFLP YÖNTEMİ İLE BELİRLENMESİ

DETECTION OF *MYCOBACTERIUM* SPECIES DISTRIBUTION IN THE SPUTUM SAMPLES OF TUBERCULOSIS PATIENTS BY PCR-RFLP METHOD IN ELAZIG PROVINCE

Ahmet AĞAÇAYAK¹, Yasemin BULUT¹, Adnan SEYREK¹

ÖZET: Bu çalışmada, Elazığ yöresindeki tüberküloz olgularından alınan balgam örneklerinde *Mycobacterium* türlerinin PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi kullanılarak belirlenmesi amaçlanmıştır. Elazığ Verem Savaş Dispanseri'nde kültür pozitifliği ile tüberküloz tanısı konulmuş toplam 60 (32 erkek, 28 kadın) hastanın balgam örneklerinden izole edilen DNA'lar, mikobakterilerin 65 kDa proteinini kodlayan gen bölgesine ait primerler (birinci aşamada: TB1; 5'-GAG ATC GAC TGG AGG ATC C-3' ve TB2; 5'-AGC TGC AGC CCA AAG GTG TT- 3', ikinci aşamada: TB1 ve TB3; 5'-GTG TTG GAC TCC TCG ACG GT-3') kullanılarak iki adımlı (seminested) PCR ile çoğaltılmıştır. Çalışmada, *hsp65* gen bölgesine göre 51 (%85) balgam örneği pozitif olarak saptanırken dokuz (%15) örnek tanımlanamamıştır. Bu PCR ürünlerinin *HaeIII* enzimiyle kesim deneyi sonunda, 52 örneğin 44'ü (%86.3) *M.tuberculosis* kompleksi, dördü (%7.8) *M.scrofulaceum*, ikisi (%3.9) *M.avium* ve biri (%1.9) *M.intracellulare* olarak tanımlanmıştır. *M.tuberculosis* kompleks türlerinin ayırt edilebilmesi için ise, 44 DNA örneğinden *gyrB* gen bölgesi özgül primerler (MTUB-f; 5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC-3' ve MTUB-r; 5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-3') ile çoğaltılmış ve ürünlerin *RsaI* ve *TaqI* enzimleriyle kesimi sonunda, örneklerin 34'ünün (%77.3) *M.tuberculosis*, sekizinin (%18.2) *M.bovis*, birinin (%2.3) *M.microti* ve birinin (%2.3) de *M.africanum* olduğu belirlenmiştir. Çalışmamızın verileri, yöremizde tüberküloz etkeni olarak en az yedi farklı mikobakteri türünün varlığını ortaya koymuştur. Sonuç olarak, ülkemizin tüm bölgelerindeki tür dağılımının moleküler yöntemlerle belirlenmesinin ve bunların antitüberküloz ilaçlara direnç durumlarının bilinmesinin tüberküloz ile savaşta başarılı olabilmek için gerekli olduğu düşünülmüştür.

Anahtar sözcükler: Mikobakteri türleri, tüberküloz, PCR-RFLP.

ABSTRACT: The aim of this study was to detect the *Mycobacterium* species in the sputum samples collected from tuberculosis patients in Elazig province (located in Eastern Anatolia, Turkey), by PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) method. A total of 60 samples from patients (32 male, 28 female) who were diagnosed as tuberculosis by culture positivity at Elazig Tuberculosis Control Dispensary, were included to the study. After DNA extraction and isolation from the

¹ Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Elazığ. (ybulut@firat.edu.tr)

samples, gene region encoding for 65 kDa protein of mycobacteria was amplified with specific primers (first step primers: TB1; 5'-GAG ATC GAC TGG AGG ATC C-3' and TB2; 5'-AGC TGC AGC CCA AAG GTG TT- 3', second step primers: TB1 and TB3; 5'-GTG TTG GAC TCC TCG ACG GT-3') by using seminested PCR method. According to *hsp65* gene region amplification, 51 (85%) samples yielded positive results, while nine (15%) samples could not be identified. Of 51 samples, 44 (86.3%) were identified as *M.tuberculosis* complex, four (7.8%) were *M.scrofulaceum*, two (3.9%) were *M.avium* and one (1.9%) was *M.intracellulare*, in the restriction assay by *HaeIII* of the PCR products. In order to identify the species of *M.tuberculosis* complex, *gyrB* gene region was amplified in those of 44 samples with specific primers (MTUB-f; 5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC-3' and MTUB-r; 5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-3'), and the PCR products were restricted by *RsaI* and *TaqI* enzymes. In this assay, 34 (77.3%), eight (18.2%), one (2.3%) and one (2.3%) of the 44 *M.tuberculosis* complex samples were detected as *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.microti* and *M.africanum*, respectively. Our data indicated that at least seven different *Mycobacterium* species were the causative agents of tuberculosis in our region. As a result, researching for species distributions of mycobacteria in all of the parts of Turkey by molecular methods and clarifying their resistance patterns against antituberculous drugs are needed for the effective control of tuberculosis.

Key words: Mycobacterium spp, tuberculosis, PCR-RFLP.

GİRİŞ

Mycobacteriaceae ailesinde yer alan bakterilerin neden olduğu tüberküloz, halen ölümlü sonuçlanan önemli ve öncelikli hastalıklardan biridir ve halk sağlığı açısından kalıcı bir tehdit olmaya devam etmektedir¹. Aerop, geç ve güç üreyen, aside dirençli, hareketsiz ve sporsuz basiller olan mikobakteriler, standart kültürlerde ortalama üç haftada (4-8 hafta) üretilmektedir.

Standart kültürler, klinik örneklerde sadece *Mycobacteriaceae* üyelerinin varlığı ortaya konmakta, ancak tür düzeyinde tanımlama yapamamaktadır. *Mycobacteriaceae* ailesindeki türlerin tanımlanması, özellikle olguların epidemilerinin anlaşılması, hastalığın kaynağının belirlenmesi ve bu kaynağa göre tedbir alınması bakımından oldukça önemlidir. Tüberkülozun etkili kontrolü için, kültüre alternatif olabilecek, klinik örnekte doğrudan çalışılabilecek, hızlı, özgül ve duyarlı tanı ve aynı zamanda tiplendirme yapabilecek yöntemlere gereksinim vardır. Bu amaçla, PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism) yöntemi yaygın olarak tercih edilmektedir^{2,3}.

Tüm mikobakteri türlerinde bulunan ve 65 kDa'luk ısı şok proteinini kodlayan gen (*hsp65*) bölgesinin analizi, *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve diğer mikobakteri türlerinin ayırımında sıklıkla kullanılmaktadır^{4,5}. Bakteri DNA'sının süper sarmal reaksiyonunu ATP varlığında katalizleyen DNA giraz enziminin bir alt ünitesi olan *gyrB* proteinini kodlayan gen (*gyrB*) bölgesinin belirlenmesi ise, *M.tuberculosis* kompleks türlerinin tanımlanmasında önemlidir⁶.

Bu çalışmada, Elazığ yöresindeki tüberküloz olgularının balgam örneklerinde PCR-RFLP yöntemi ile mikobakteri türlerinin dağılımının belirlenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Örnekler: Çalışmaya, Elazığ Verem Savaş Dispanseri'nde tüberküloz tanısı konulmuş, kültür pozitif 60 (32 erkek, 28 kadın) hastadan alınan balgam örnekleri dahil edildi. Örnekler iki eşit miktara bölündü ve bir kısmı direk DNA izolasyonunda kullanıldı. Örneklerin diğer kısmı, mikobakteri varlığının kontrolü amacıyla, N-asetil-L-sistein (NALC)-NaOH yöntemiyle dekontaminasyon işlemine tabi tutuldu. Bu örnekler, aside dirençli boyama (Ziehl-Neelsen karbolfuksin yöntemi) ile mikroskopik inceleme ve kültür [Löwenstein-Jensen besiyerinde (Oxoid, UK), 37°C'de 6-8 hafta inkübasyon] yöntemleri uygulandı. Bu örnekler, makroskopik ve mikroskopik olarak incelenerek bakteri üremeleri kontrol edildi^{7,8}.

DNA İzolasyonu: Direk balgam örneklerinde DNA izolasyonu, ticari bir kit (Wizard Genomic DNA kit, Promega Co, USA) ile gerçekleştirildi. Kısaca, 3000 rpm'de 30 dakika (dk) santrifüj sonrası elde edilen çöküntüye 10 mg/ml lizozim enzimi ve 50 mM, pH: 8.0 EDTA katıldı. Örnekler 37°C'de bir saat bekletildi. Daha sonra tüplere nükleik lizis solüsyonu eklenerek, tüpler 80°C'de 10 dk. tutuldu. Tüplere 3 µl RNaz ilave edilerek, bekleme süresi tekrarlandı. Beklemeyi takiben, örneklerin üzerine protein çöktürme solüsyonu katılarak hızlı bir şekilde karıştırıldı ve buzlu suda 10 dk. bekletildi. Daha sonra örnekler santrifüj edilerek üst sıvı yeni mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve üzerlerine çöktürme için izopropanolol eklenip bir gece oda ısısına kaldırıldı. Bu süre sonunda, %70'lik etil alkol ile yıkama işlemi yapıldı ve elde edilen DNA örnekleri distile su ile sulandırılarak, kullanıncaya kadar -80°C'de saklandı.

Çalışmada klinik örnekler ek olarak, standart pozitif kontrol suşların (*M.abcessus* 19977, *M.szulgai* 35799, *M.gordonea* 14470, *M.tuberculosis* H37RV, *M.avium* 15769, *M.intracellulare* 13950, *M.fortuitum* 6841, *M.kansasii* 12478, *M.scrofulaceum* 19981) DNA'ları da aynı şekilde elde edilip, aynı şartlarda saklandı.

Mikobakteri hsp65 Geninin PCR'ı ve HaeIII RE ile Kesimi: Mikobakterilerin 65 kDa proteinini kodlayan gen bölgesi iki adımlı (seminested) PCR ile çoğaltıldı⁹. Birinci aşama PCR için; önce 10X tampon, 25mM MgCl₂, her biri 100 mM olan dNTP, 20 pmol/µl primer 1 (TB1; 5'-GAG ATC GAC TGG AGG ATC C-3'), 20 pmol/µl primer 2 (TB2; 5'- AGC TGC AGC CCA AAG GTG TT-3'), 23.5 µl dH₂O ve 0.5 µl 1U Taq polimeraz enzimi (Bioron, Germany) içeren karışım hazırlandı. On µl DNA örneklerinden ve 40 µl de PCR karışımından katılan örnekler, bir döngü 94°C'de 2 dk. ön ısıtmayı takiben, 94°C'de 1 dk., 56°C'de 1 dk. ile 72°C'de 2 dk.'dan oluşan toplam 36 döngü ve 72°C'de 10 dk. 1 döngü son uzatma olacak şekilde PCR'a koşuldu. İkinci aşama PCR ise, primer 1 (TB1) ve primer 3 (TB3; 5'-GTG TTG GAC TCC TCG ACG GT-3') kullanılarak hazırlanan karışımından 48 µl ve birinci aşama PCR örneklerinden 2 µl katılarak, yukarıdaki süreklilik ve döngülerde gerçekleştirildi. PCR örneklerine %2'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı ve görüntülendi.

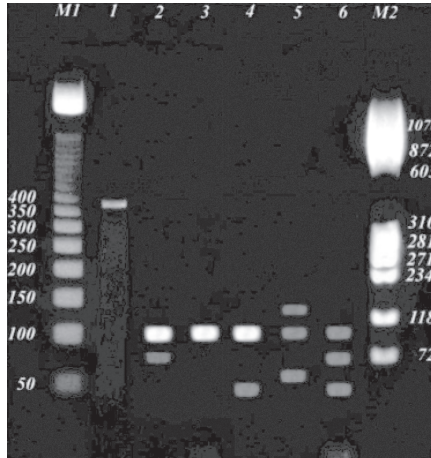
İki aşamalı PCR'dan sonra hsp65 gen bölgesi HaeIII RE enzimi (Fermentas, Germany) ile kesime bırakıldı. Kesim 37°C'de 6-8 saat süre ile gerçekleştirildi. Bu süre sonunda kesim ürünleri %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve ultraviyole ışınları ile incelenerek değerlendirildi.

M.tuberculosis Kompleks Ayırımında *gyrB* Geninin PCR'ı, *RsaI* ve *TaqI* RE ile kesimi: *M.tuberculosis* kompleksi olarak belirlenen DNA örneklerine, *gyrB* geni içerisinde bulunan 1020 baz çift (bç)'lik bölgenin çoğaltılması için tekrar PCR uygulandı^{10,11}. Çoğaltma işlemi balgam DNA'ları ile primer 1 (MTUB-f; 5'-TCG GAC GCG TAT GCG ATA TC-3') ve primer 2 (MTUB-r; 5'-ACA TAC AGT TCG GAC TTG CG-3') kullanılarak gerçekleştirildi. PCR örnekleri %2'lik agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve elde edilen 1020 bç'lik ürünler *RsaI* ve *TaqI* RE enzimleri (Fermentas, Germany) ile kesime bırakıldı. Kesim örneklerine %2'lik agaroz jelde elektroforez uygulandı ve görüntüledi.

BULGULAR

Çalışmaya alınan 60 hastanın tümünün balgam örneklerinde aside dirençli boyanmış basil varlığı ve kültürlerinde mikobakteri üremesi tespit edilmiştir.

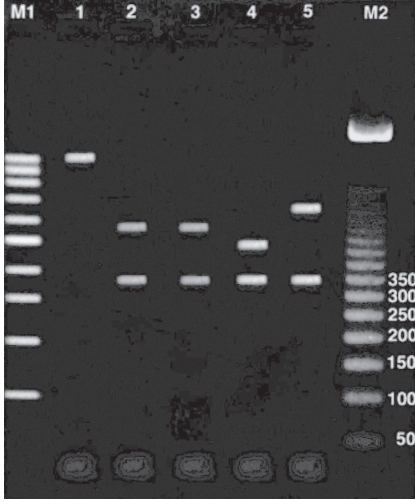
Mikobakteri türlerinin belirlenmesi amacıyla uygulanan *hsp65* gen bölgesinin PCR'ı sonucunda, TB1-TB2 ve TB1-TB3 primerleri ile 368 bç'lik ürün elde edilmiştir (Şekil 1). Balgam örneklerinin 51'inde (%85) bu ürünün varlığı saptanırken, 9 (%15) örnek tanımlanamamıştır. Elde edilen 368 bç'lik PCR ürünlerine *HaeIII* restriksiyon enzimiyle kesim yapıldığında belirlenen kesim motifleri Şekil 1'de görülmektedir. Bu motiflere göre, 51 örneğin 44'ü (%86.3) *M.tuberculosis* kompleksi, 4'ü (%7.8) *M.scrofulaceum*, 2'si (%3.9) *M.avium* ve 1'i (%1.9) *M. intracellulare* olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1. PCR sonucu elde edilen 368 bç'lik *hsp65* gen bölgesi ve bu bölgenin *HaeIII* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.

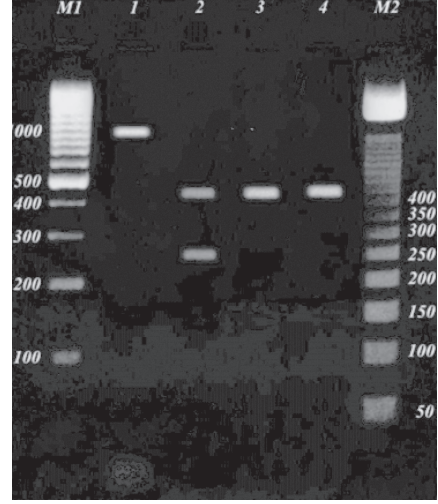
[Hat 1; 368 bç'lik PCR ürünü, hat 2; *M.tuberculosis* kompleksi (105/100/70 bç), hat 3; *M.scrofulaceum* (100/90 bç), hat 4; *M.avium* (100/100/40 bç), hat 5; *M.intracellulare* (130/100/60 bç), M1 ve M2; DNA ağırlık standardı] Hat 2, hat 3 ve hat 4'de beklenen sayıdan az bandın görülmesi, bazı kesim ürünlerinin aynı veya yakın büyüklükte olmasından dolayıdır.

M.tuberculosis kompleksi *gyrB* gen bölgesinin *RsaI* RE enzimi ile kesim sonucu *M.bovis* ve *M.microti* birbirinden ayrılırken, *M.tuberculosis* ve *M.africanum* birbirinden ayrt edilememektedir. Bunun için 1020 bç'lik PCR ürünlerine *RsaI* RE enzimine ek olarak *TaqI* RE enzimi ile de kesim yapılmıştır (Şekil 2 ve 3). Buna göre, 44 *M.tuberculosis* kompleks suşunun 34'ü (%77.3) *M.tuberculosis*, 8'i (%18.2) *M.bovis*, 1'i (%2.3) *M.microti* ve 1'i (%2.3) *M.africanum* olarak tespit edilmiştir.



Şekil 2. PCR ile *gyrB* gen bölgesinden elde edilen 1020 bç'lik ürünün *RsaI* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.

[Hat 1; kesimi yapılmamış *gyrB* geni (1020 bç), hat 2-3; *M.tuberculosis* veya *M.africanum* (560/360 bç), hat 4; *M.bovis* (480/360 bç), hat 5; *M.microti* (660/360 bç), M1; 100 bç'lik DNA ağırlık standardı, M2; 50 bç'lik DNA ağırlık standardı]



Şekil 3. PCR ile çoğaltılan 1020 bç'lik *gyrB* gen bölgesi ve bu bölgenin *TaqI* enzimi ile kesim ürünlerinin agaroz jelde görüntüsü.

[Hat 1; *gyrB* geni (1020 bç), hat 2; *M.tuberculosis* (440/250 bç), hat 3-4; *M.africanum* (440 bç), M1; 100 bç'lik DNA ağırlık standardı, M2; 50 bç'lik DNA ağırlık standardı]

TARTIŞMA

Tüberküloz tanı yöntemlerinin amacı, klinik örneklerde mikobakteri varlığının gösterilmesi ve hastalık etkeni olan türün izole edilerek tanımlanmasıdır. Mikobakteri türlerinin tespiti genellikle biyokimyasal testlerle yapılmaktadır, ancak bu yöntem için uygun bakteri kültürüne ve uzun bir zamana gerek vardır. Bu nedenle mikobakteri türlerinin tanımlanmasında, hızlı, doğru, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek yöntemlere gereksinim duyulmaktadır. Son yıllarda moleküler yöntemlerin ön plana çıkması sonucu, PCR-RFLP metodu ile türlere özgü polimorfizmler belirlenerek örneklerden direk olarak mikobakterilerin tür tayini hızlı bir şekilde yapılabilmektedir^{2,4,11-16}.

Tüm mikobakteri türlerinde bulunan *hsp65* gen dizisinin analizi ile *Mycobacterium tuberculosis* kompleks ve diğer mikobakteri türlerinin ayırt edilmesi mümkündür⁴. Bu gen bölgesinde, *HaeIII* RE enzimi için pek çok (türlerine göre 6-7 adet) tanıma bölgesi olmasına rağmen, tanıma bölgelerinin bir çoğu 10-20 nükleotid uzunluğundadır. Kesilen bu kısa parçalar elektroforezden sonra jelde görülemeyebilirler ve bu nedenle türler arasındaki karşılaştırmalar büyük parçalara göre yapılmaktadır⁹. Çavuşoğlu ve arkadaşlarının¹³ çalışmasında, DNA probe ve *hsp65* gen dizi analizi yöntemleri ile 10 mikobakteri türünün beşi *M.tuberculosis* kompleks, üçü *M.chelonae* ve birer suş da *M.gordonae* ve *M.intracellulare* olarak tanımlanmıştır. Hernandez ve arkadaşlarının¹⁴, 180 mikobakteri suşunun 65 kDa gen bölgesini *BstEII* ve *HaeIII* RE enzimleri ile keserek yaptıkları çalışmada, 16'sı *M.tuberculosis* kompleksi, 10'u *M.avium*, sekizi *M.scrofulaceum* ve üçü *M.intracellulare* olmak üzere 22 farklı tür tanımlanmıştır. Telenti ve arkadaşları³ ile Hidaka ve arkadaşları⁹ da, aynı gen bölgesini kullanarak PCR-RFLP yöntemiyle *M.tuberculosis* kompleksi, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.marinum*, *M.gastri*, *M.fortuitum*, *M.scrofulaceum* ve *M.chelonae* türlerini tanımlayabildiklerini bildirmişlerdir. Aynı kriterleri temel alarak gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada, ARB ve konvansiyonel kültür yöntemleri ile pozitif olan tüberkülozlu hastaların balgam örneklerine direkt olarak uygulanan PCR-RFLP yöntemiyle, örneklerin %85'inde (51/60) tür tanımı yapılabilmektedir. Örneklerde en sık saptanan etkenin *M.tuberculosis* kompleksi olduğu, bunu *M.scrofulaceum*, *M.avium* ve *M.intracellulare* türlerinin izlediği belirlenmiştir (yaklaşık oranlar sırasıyla; %86, %8, %4 ve %2).

M.tuberculosis kompleks içinde yer alan türlerinin tanımlanmasında, *gyrB* gen bölgesinin dizi analizinin yapılması önem taşımaktadır^{6,10,11}. Zanden ve arkadaşlarının¹⁵ çalışmasında, 314 *M.tuberculosis* kompleks suşunun %96.5'i *M.tuberculosis* ve %2.8'i *M.bovis* olarak tanımlanırken, Parsons ve arkadaşları¹⁶ 605 *M.tuberculosis* kompleksi ile yaptıkları çalışmada bu oranları sırasıyla %96 ve %3 olarak bildirmektedirler. Niemann ve arkadaşları¹² ise, PCR-RFLP yöntemiyle MTUB-f ve MTUB-r primerlerini kullanarak *gyrB* gen bölgesini çoğaltmışlar; bu bölgeyi *RsaI* ve *TaqI* RE enzimleri ile keserek *M.tuberculosis*, *M.bovis*, ve *M.africanum* türlerini ayırt edebilmişlerdir. Bizim çalışmamızda da, PCR-RFLP yöntemi ile *M.tuberculosis* kompleks suşlarının büyük oranının *M.tuberculosis* olduğu, bunu *M.bovis*, *M.microti* ve *M.africanum*'un izlediği belirlenmiştir (yaklaşık oranlar sırasıyla; %77, %18, %2 ve %2).

Çalışmamızda örneklerin toplandığı Elazığ Verem Savaş Dispanseri, yalnızca Elazığ ve ilçelerine hizmet vermekle kalmayıp, Bingöl, Tunceli ve Muş gibi yakın illerden gelen tüberküloz olgularının tanı ve takibinde de önemli bir görev üstlenmektedir. Bu nedenle elde ettiğimiz verilerin, bir bakıma bölgesel düzeyde mikobakteri türlerinin profilini ortaya koyduğu düşünülebilir. Çalışmamızın sonuçları, bölgemizde tüberküloz etkeni olarak en az yedi farklı mikobakteri türünün varlığını göstermekte ve düşük sosyoekonomik koşullara

rağmen ülkemizin Doğu ve Güneydoğu Anadolu bölgelerinde epidemiyolojik verilerin toplanması ve tüberküloza karşı etkili önlemlerin alınması için moleküler yöntemlerle tür tanımlamasının yapılması gerekliliğini vurgulamaktadır.

TEŞEKKÜR

Çalışmada pozitif kontroller olarak kullanılan mikobakteri türlerinin sağlanmasındaki yardımları için Dr.Gönül Aslan'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, et al. Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis* 2004; 4: 584-92.
2. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, et al. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 907-14.
3. 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: 175-8.
4. Shinnick TM. The 65-kilodalton antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1987; 169: 1080-8.
5. Nagabhushanam V, Praszquier J, Cheers C. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium avium* 65 kDa heat shock protein (Hsp65). *Immunol Cell Biol* 2001; 79: 454.
6. Jain P, Nagaraja V. An orphan *gyrB* in the *Mycobacterium smegmatis* genome uncovered by comparative genomics. *J Gen* 2002; 81: 105-10.
7. Özkütük N. Klinik materyalin hastadan alınması ve laboratuvara götürülmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 11-14 Haziran 2003, Samsun. Sempozyum ve Kurs Kitabı, s: 278-84.
8. Sarıgüzel N. Direk mikroskopi teknikleri ve değerlendirilmesi. 21. Yüzyılda Tüberküloz Sempozyumu ve II. Tüberküloz Laboratuvar Tanı Yöntemleri Kursu. 11-14 Haziran 2003, Samsun. Sempozyum ve Kurs Kitabı, s: 291-9.
9. Hidaka E, Honda T, Ueno I, et al. Sensitive identification of *Mycobacterial* species using PCR-RFLP on bronchial washings. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; 161: 930-4.
10. Niemann S, Harmsen D, Rüsç-Gerdes S, et al. Differentiation of clinical *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by *gyrB* DNA sequence polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 3231-4.
11. Kasai H, Ezaki T, Harayama S. Differentiation of phylogenetically related slowly growing *Mycobacteria* by their *gyrB* sequences. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 301-8.
12. Niemann S, Richter E, Rüsç-Gerdes S. Differentiation among members of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by molecular and biochemical features: evidence for two pyrazinamide-susceptible subtypes of *Mycobacterium bovis*. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 152-7.
13. Çavuşoğlu C, Bilgiç A. Klinik örneklerden izole mikobakterilerin DNA dizi analizi ve line probe assay ile tanımlanması. 4. Ulusal Mikobakteri Sempozyumu, 31 Ekim- 2 Kasım 2002, Abant. Sempozyum Kitabı, s: 190.
14. Hernandez SM, Morlock GP, Butler WR, et al. Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis using fluorescence capillary electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1999; 37: 3688-92.
15. van der Zanden AG, Kremer K, Schouls LM, et al. Improvement of differentiation and interpretability of spoligotyping for *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by introduction of new spacer oligonucleotides. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4628-39.
16. Parsons LM, Brosch R, Cole ST, et al. Rapid and simple approach for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates by PCR-based genomic deletion analysis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 2339-45.