

MİKOBAKTERİLERİN TANISINDA, TANIMLANMASINDA VE İLAÇ DİRENCİNİN BELİRLENMESİNDE KULLANILAN MOLEKÜLER YÖNTEMLER

MOLECULAR METHODS USED IN THE DETECTION, IDENTIFICATION AND DETERMINATION OF DRUG RESISTANCE IN STRAINS OF MYCOBACTERIA

Nuran ESEN

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İzmir

Anahtar Sözcükler: Mikobakteriler, *Mycobacterium tuberculosis*, moleküler yöntemler, tanı, ilaç direnci
Key Words: Mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, molecular methods, diagnosis, drug resistance

ÖZET

Günümüzde hala önemli bir halk sağlığı sorunu olan tüberküloz, yılda üç milyon kişinin ölümüne neden olmaktadır. Geleneksel yöntemlerle laboratuvar tanısı zaman alıcı ve zahmetli olan mikobakteri infeksiyonlarında hızlı, duyarlı ve özgül testlere gereksinim duyulmaktadır. Mikobakteriyolojik tanıda moleküler yöntemler; klinik örnekten tanı, tür düzeyinde tanımlama, ilaç direncinin belirlenmesi ve epidemiyolojik araştırmalarda kullanılmaktadır.

SUMMARY

Tuberculosis remains a major public health problem, leading to three million deaths per year. Since the conventional methods for mycobacterial infections are time-consuming and labor intensive, there is a need for rapid, sensitive and specific methods. Molecular methods have been used in mycobacteriology for detection of *Mycobacterium tuberculosis* from clinical specimens, identification, drug resistance and epidemiological studies.

Klinik örnekten tanı

Nükleik asit çoğaltma yöntemleri: Her ne kadar geleneksel yöntemlere göre daha hızlı sonuçlansa da, moleküler testlerin klinik örnekte tüberküloz varlığının saptanmasında altın standart olan direkt bakı ve kültür kombinasyonu ile birlikte uygulanması önerilmektedir. Diğer infeksiyon etkenlerinde olduğu gibi, mikobakterilerde bulunan özgül nükleik asit dizisinin, saptanabilecek düzeye gelinceye kadar çoğaltılması esasına dayanmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemiyle çoğaltılması istenen DNA örneği, replikasyon için gerekli olan primerler, nükleotitler, Taq polimeraz gibi gerekli maddelerle beraber ayrılma (denaturation), birleşme (annealing) ve uzama basamaklarından oluşan döngülerle çoğaltılır. Bir çok laboratuvarında kullanılmakta olan in-house PZR yönteminin duyarlılık ve özgüllükleri, ekstraksiyon ve

amplifiye ürün saptanmasında farklı yöntemlerin kullanılması nedeniyle değişmektedir. Noordhoek ve ark. (1) yedi laboratuvarında aynı örneklerden aynı primerler kullanılarak *M. tuberculosis*'in PZR yöntemiyle arandığı kör çalışmada, duyarlılık ve özgüllüklerin %2-90, yalancı pozitifliklerin ise %3-77 oranında değiştiğini saptamışlardır.

Bu nedenle klinik örnekte *M. tuberculosis* tanısında kullanılan standardize edilmiş olan iki test Amerika Birleşik Devletlerinde, Gıda ve İlaç Yönetimi (FDA) tarafından onaylanmıştır. Bu onaylı testlerden olan PZR tabanlı Roche-Amplicor testinde İnternal kontrol bulunmakta ve AmpErase (UNG) yalancı pozitifliği engellemektedir. Bu testin FDA onayı, son bir yıl içinde tedavi görmeyen, direkt bakısı pozitif olguların solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayrımının yapılabildiği merkezlerde kültür ile birlikte yapılması koşulu ile geçerlidir (2).

Onaylı diğer test ise izotermal bir amplifikasyon yöntemi olan TMA (transcription mediated amplification) yöntemidir. Bu yöntemde çoğaltılan hedef nükleik asit ribozomal RNA (rRNA)'dır. Sentezlenen komplementer DNA molekülünden RNA polimeraz enzimi ile yeni RNA kopyaları çıkarıldıktan sonra ürünün varlığı *M. tuberculosis*'e özgül akridinyum ile işaretli prob ile belirlenmektedir (3). Bu test de; Amplikor'da olduğu gibi son bir yıl içinde tedavi almayan olguların solunum yolu örneklerinde ve *M. tuberculosis* ayırımının yapılabildiği merkezlerde, kültür ile birlikte yapılması koşulu ile FDA onaylı olup, Amplicor'dan farklı olarak sadece direkt bakı pozitif örneklerle değil, negatif örneklerle de uygulanabilmektedir (2).

SDA (Strand Displacement Amplification = Zincir ayırma çoğaltması): İzotermal olan bu tepkimelerde restriksiyon enzimi (HincII) ile kesilen kalıp DNA, *Escherichia coli* DNA polimeraz I (Klenow polimeraz)'in kesim noktasından başlayarak bir zinciri ayırıp diğeri üzerinde DNA sentezi yapabilme özelliğine dayanır. IS6110 ve 16SrRNA çoğaltıldığı için cins ve *M. tuberculosis* için tür saptanması yapılabilmektedir (4).

LCR (Ligase chain reaction = Ligaz zincir reaksiyonu) : İnfeksiyon etkeninin ortaya konmasında ısıya dayanıklı DNA ligazın kullanıldığı prob hibridizasyon bazlı nükleik asit çoğaltma yöntemidir. Ligasyon ürünleri ısı ile denatüre edilerek kalıp DNA'dan ayrılırlar, diğer oligonükleotitlerin bağlanmasını sağlamada kalıp rolü üstlenirler. Hedef nükleik aside özgül, kalıp üzerinde komşu olacak şekilde hazırlanmış işaretli problemler ile hibridizasyon gerçekleşir. Isıya dayanıklı DNA ligaz tarafından birbirine bağlanma ve denatürasyon aşamalarından oluşan döngüler ile çoğaltma meydana gelir (3).

Tür düzeyinde tanı

DNA dizi analizi: Mutasyonların saptanmasında altın standart olmasına karşın manuel uygulanmalarında teknik zorluklar vardır. Otomatik DNA sekanslama ise pahalı ve yatırım gerektirmektedir. Amplifikasyon işleminden sonra PZR ürünlerinin saflaştırılması, florokrom işaretli didioksi sekanslama reaksiyonu, sekanslama ürünlerine elektroforez uygulanması ve analiz gibi basamakları gerektirir. Sekans enzimlerinden birisi kullanılarak DNA iplikçığının komplementeri sentezlenirken dNTP eklendiğinde uzama devam eder, ddNTP eklendiğinde ise zincir uzaması durmaktadır. Tepkimeler sonucu ortaya çıkan farklı uzunluktaki DNA parçalarına poliakrilamid jelde elektroforez uygulanır. Radyoaktif madde, kemilüminesans veya florometrik maddelerle işaretleme yapılmaktadır. DNA dizi analizinde, mikobakterilerde tür tayini ve ilaç direncini belirleyen mutasyonlar gibi filogenetik bilgilere ulaşılabilmektedir. Oldukça hızlı ve kesin sonuçlar vermesine karşın pahalı ve zahmetli bir yöntem oldu-

ğundan rutin olarak değil, araştırma amacıyla kullanılmaktadır. Tüm mikobakteri türlerinin sahip olduğu 65 kDa'luk ısı şok proteininin (hsp65) kodladığı gen bölgesi, türe özgül allelik varyasyonlarla mikobakteri türlerinin ayırımında kullanılmaktadır. hsp65 ve 16SrRNA gen bölgelerinin kullanıldığı dizi analizlerinde *M. tuberculosis* kompleks üyelerinin genetik benzerliği nedeniyle ayırım mümkün olmamaktadır (5).

PZR-REA (Restriksiyon enzim analizi) (PRA): Mikobakterilerin kısa sürede tiplendirilmesi amacıyla geliştirilen PRA yöntemi, hsp65'i kodlayan genin, restriksiyon enzimleriyle kesilmesi temeline dayanmaktadır. Elde edilen paternler tür saptama cetveline göre analiz edilir. Hibridizasyon basamakları ve radyoaktivite içermeyen bu yöntem ile kısa sürede sonuç verilir (6, 7).

Nükleik asit hibridizasyon yöntemleri: Hedef DNA dizisi komplementeri olan işaretli prob ile hibridlenmekte ve tanı konmaktadır. Özgüllükleri yüksek fakat duyarlılıkları düşük olan bu yöntemlerde prob olarak kullanılan moleküllerin örneğe yeterince bağlanması için nükleik asitlerin yeterli miktarda bulunması gerektiğinden özellikle kültürde üreyen mikobakterilerin tanı ve tiplendirmesinde kullanılmaktadır. Otomatize ve yarı otomatize kültür sistemlerinin geliştirilmesi ile daha kısa sürede üretilen mikobakteriler, 1980'li yıllardan beri kullanılmakta olan Accuprobe yöntemi ile erken dönemde doğrulanabilmektedir. Bu DNA problemlerinin en büyük dezavantajı; her seferinde sadece bir mikobakteri türünün test edilmesidir. *M. tuberculosis* kompleksi, *M. avium* kompleksi, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* ve *M. gordonae*'den oluşan sınırlı sayıda tür için elde edilen DNA problemleri, klinik laboratuvarlarda sıklıkla izole edilen bu türlerin tanımlanmasında biyokimyasal testlere gereksinimi ortadan kaldırmaktadır (8). Son yıllarda ters hibridizasyon yöntemi olan Line probe Assay (LiPA) ile mikobakterilerin identifikasyonu yapılabilmektedir. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra membran üzerinde yerleştirilmiş olan problemler hibridizasyona sokularak tek çalışma ile; *Mycobacterium* spp., *M. tuberculosis* kompleksi, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. avium* kompleksi, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* ve *M. chelonae*-abscessus kompleksi olarak tanı yapılabilmektedir (9).

İlaç direncinin belirlenmesi

1980'li yıllardan itibaren tüm dünyada tüberküloz olgularının artışı ilaç direnci ile birlikte gözlenmiştir. İlaç dirençlerinin geleneksel yöntemlerle saptanması, izolasyonda olduğu gibi zahmetli ve zaman alıcıdır. Moleküler yöntemlerle, dirençten sorumlu mutasyonların gösterilmesi direnci kanıtlarken, dirençli olduğu saptanan fakat

mutasyonların gösterilemediği olgular, dirençte başka gen bölge mutasyonları veya başka mekanizmalar olabileceğini düşündürmektedir. Rifampine dirençli mutasyonlar; genellikle, rpo 'nın 81 bazçiftlik gen bölgesinde nokta mutasyon, delesyon ve insersiyonların olduğu gözlenmiş ve bu bölge RRDR (rifampisin direncini belirleyen bölge=rifampin resistance determining region) olarak adlandırılmıştır. İzonyazit dirençli kökenlerin %50-60'ında katG tarafından kodlanan bölgede; nokta mutasyonları, delesyon ve insersiyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonların çoğunluğu 315. kodondadır. İzonyazidin mikolik asit sentezi üzerine etkisi inhA lokusu tarafından kodlanmaktadır. Pirazinamide dirençli mutantlar pirazinamidi aktif formu olan pirazinonik aside dönüştüren pirazinamidaz üretmezler. Pirazinamidazı kodlayan pncA mutasyonları dışında pirazinamit ile ilgili mutasyon bulunmamıştır. Etambutole dirençli kökenlerin %70'inde 306. kodonda oluşan ve çoğunluğunun arabinozil transferaz genini kodlayan embB deki mutasyonlar saptanmıştır. Florokinolonların hedef bölgesi gyrA ve gyrB tarafından kodlanan DNA giraz ve bu enzimin supersarmal yapıcı etkisidir. Mikobakterilerin florokinolonlara direnci hızla meydana gelir ve bu bölge FRDR (florokinolon direncini belirleyen bölge = fluoroquinolone resistance determining region) olarak kabul edilmiştir (10).

DNA dizi analizi: İlaç direncine neden olan mutasyon, delesyon ve insersiyonlar PZR bazlı yöntemler ile saptanmakta ve DNA dizi analizi, antimikobakteriyel ilaç duyarlılığında moleküler altın standart olarak kabul edilmektedir (8).

Tek zincir biçim çeşitliliği (Single strand conformation polymorphism=SSCP): Bu yöntemde, PZR ile çoğaltılan ilaç direncinden sorumlu gen bölgesindeki çift zincirli DNA, ısı ile denatüre edilerek tek zincirler elde edilir. Her zincir içerdiği nükleotid dizisine göre kıvrılmalar ile özgül yapı oluşturur. Uygulanan elektroforez sırasında zincirin özgül yapısı jel gözeneklerinden geçiş hızını etkiler. İlaça duyarlı bir kontrol köken ile hastadan elde edilen SSCP karşılaştırıldığında farklılığın saptanması, o gende bir mutasyon olduğunu ortaya çıkarır. Tek zincirli DNA'nın elektroforez jelinde görülebilmesi genellikle radyoaktif bir madde ile işaretleme ile sağlanır. Deneyim gerektirmesi ve uygulama zorlukları nedeniyle günlük kullanıma girememiştir (11, 12).

Heterodupleks analizi: Bu yöntemde ilaç direncine neden olan gen bölgesi, hem hastadan izole edilen basilden hem de ilaca duyarlı olduğu bilinen bir kontrol suşundan PZR ile çoğaltılır. Çoğaltma ürünleri bir tüpte karıştırılıp, önce 95° C'ye kadar ısıtılarak DNA zincirlerinin birbirinden ayrılması, daha sonra oda sıcaklığında dek soğutulmuş zincirlerin yeniden eşleşerek birleşmesi

sağlanır. Farklı bakteriden geldiği halde uygunluk gösteren tek zincirler de bir araya gelerek heterodupleksler oluşur. Eşleşme duyarlı bir suşta tam olurken, dirençli suşlarda heterodupleksler arasında mutasyon noktasında bozukluk olur. Bu durum çift sarmal yapıyı bozar, zincirdeki bükülmeler elektroforez sırasında molekülün mutasyon bulunmayan DNA'dan farklı hızda yürütmesine neden olur. Çift zincirlerin etidyum bromür ile boyanıp ultraviyole transluminatörde hemen gözlenebilir olması rutinde kullanılmaya uygun olmasını sağlamıştır (11-13).

Ters hibridizasyon yöntemi: Rifampisin direncini saptamaya yönelik ticari formu bulunmaktadır. Yöntemde dirençten sorumlu gen bölgesine ait dizileri içeren probalar bir nitrosellüloz membran üzerine aktarılmıştır. Probal üzerinde normal ve mutant gen bölgelerine özgül diziler bulunmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltıldıktan sonra dirençten sorumlu gen bölgelerine ait DNA molekülleri bu probalar ile hibridizasyona sokulur. Dirençli kökenler mutant dizileri taşıyan problemlere, duyarlı kökenlere ise normal dizileri içeren problemlere bağlanarak ilaç direnci saptanabilir (11-13).

Floresans rezonanslı enerji aktarımı (FRET-Fluorescence Resonance Energy Transfer): Polimeraz zincir reaksiyonu sırasında çoğaltılmış DNA molekülüne bağlanan biri 3' diğeri 5' ucu floresans ile işaretli ve çok yakın yerleşimli iki DNA prob arasında enerji aktarımı ile floresansın ortaya çıkması sağlanmaktadır. 3' ucu floresans ile işaretli olan ve DNA molekülüne sıkı bağlanan verici molekül, 5' ucu işaretli olan alıcı moleküle enerji aktarır. Mutasyonların tanımlanması için 5' ucu işaretli problemlerin mutasyonun beklendiği bölgeyi kaplayacak şekilde tasarlanması gerekmektedir. Amplifikasyonun sonunda en yüksek miktarda probun birbirlerine yakın tutunmasıyla en yüksek miktarda floresans üretilmektedir. Daha sonra tüpler yavaş yavaş ısıtılırken floresans izlenir ve erime eğrileri elde edilir. Belirli ısılarda 5'ucu floresans işaretli olan probun bağlandığı bölgeden ayrılmasıyla floresans aniden azalır. Floresansın en fazla azaldığı ısıya erime noktası denir. Probul bağlandığı bölgede mutasyon varlığı, gevşek bağlanmaya ve erime noktasının düşmesine neden olmaktadır. Bu yöntem özellikle ilaç dirençlerini belirleyen mutasyonların ve klinik örneklerdeki mikobakterilerin saptanmasında kullanılmaktadır (14, 15).

Epidemiyolojik araştırmalar

Moleküler yöntemlerin geliştirilmesi ile epidemiyolojik araştırmalar, özellikle salgınlarda kaynağın belirlenmesi, reenfeksiyon-reaktivasyon ayırımının yapılabilmesi, iyatrojenik infeksiyonların ve laboratuvar kontaminasyonlarının tanımlanması mümkün olabilmektedir.

IS6110 REA: Özellikle epidemiyolojik çalışmalarda özgü türlerin yayılmasının belirlenmesinde başvurulan bir yöntemdir. Kromozomal DNA'nın IS6110 tekrar bölgelerinden restriksiyon enzimleriyle kesilerek oluşan değişik uzunluktaki parçaların agaroz jel elektroforezinde yürütüldükten sonra DNA bantlarının membrana aktarılmasıyla hibridizasyon yapılması esasına dayanır. *Mycobacterium tuberculosis* kompleks kökenlerinin kromozomlarında bulunan IS6110'un tekrarlanma özelliği, uluslararası standardize edilmiş DNA parmak izi protokolunun geliştirilmesini sağlayarak klinik kökenlerin genotiplerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır. Yaygın olarak kullanılmakla beraber bu yöntem, IS6110 kopya sayısı beş ve daha az olan *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinin tanımlanmasında yetersiz kalmaktadır (16).

PGRS ile tiplendirme : Üzerinde PGRS (polimorfik GC'den zengin bölge - polimorfik GC rich sequence) taşıyan rekombinant bir plazmit olan pTBN12, *E. coli* DH5a'dan izole edilip çeşitli enzimlerle kesildikten sonra saflaştırılıp prob olarak kullanılmaktadır. Bu prob her genom üzerinde yaklaşık 30 kez tekrarlayan PGRS ile hibridizasyona girmektedir (16, 17).

Spoligotyping (Spacer oligonucleotide typing): Direkt tekrarlayan kromozomal bölgelerin amplifikasyonu hedeflenerek *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinin ayırımında kullanılan PZR bazlı moleküler yöntemlerdendir. Bu bölgelere yönelik PZR sonrası ortalama 36 baz çiftlik amplifiye ürünler 43 set oligonükleotit içeren membran ile hibridize edilmektedir. Farklı epidemiyolojik kökenli izolatlarda bölgeler ve sayılarda değişiklik görülmektedir. Bu yöntem direkt olarak canlı *M. tuberculosis* organiz-

masına uygulanabileceği gibi parafin bloklardan veya arkeolojik örneklerden de çalışılabilmektedir. IS6110 kopya sayıları beşten az olan *M. tuberculosis* kompleks izolatlarının tanımlanmasında spoligotyping, IS6110 profiline dayanan yöntemlerden üstündür. En az 20 kez tekrar kullanılabilen membranlarda 43 örnek birlikte çalışılabilmektedir. Değerlendirilmesi ve uygulaması kolay nispeten ekonomik bir yöntemdir (18).

MIRU-VNTR (Variable number tandem repeats of mycobacterial interspersed repetitive units-Mikobakterilerde tekrarlayan ünitelerin değişken sayıda tekrarları): Son yıllarda geliştirilen PZR bazlı moleküler yöntemde her izolat, genomda dağılmış bulunan 12 bağımsız bölgedeki tekrarlayan ünitelerin kopya sayıları ile tiplendirilmektedir. Elliiki ile 77 nükleotit uzunluğunda olan tekrarlayan ünitelerin sayıları tüm bölgelerin çoğaltılması ile elde edilen ürün büyüklüğü ile belirlenmektedir. Bu yöntem IS6110 kopya sayısının düşük olduğu *M. tuberculosis* kompleks kökenlerinde olduğu gibi sayının yüksek olduğu kökenlerde de grup çeşitliliğini artırmaktadır (19).

DNA chip analizi: DNA molekülündeki farklı nükleik asitlerin katı faz üzerinde belirli bir düzende yerleştirilmiş bulunan oligonükleotitlere bağlanması sinyal oluşumuna neden olmaktadır. Maliyeti düşük, kullanımı basit ve değerlendirmesi kolay olan bu yöntem önceleri sadece gen ekspresyonu ve genomik içerik incelemesinde kullanılırken, son yıllarda *M. tuberculosis*'in rifampin direncin ve IS6110 kopya sayılarını belirlemede de kullanılmaya başlanmıştır (20, 21).

KAYNAKLAR

1. Noordhoek G T, Kolk AH, Bjune G, et al. Sensitivity and specificity of PCR for detection of *Mycobacterium tuberculosis*: a blind comparison study among seven laboratories. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 277-84.
2. Woods G. Molecular methods in the detection and identification of mycobacterial infections. *Arch Pathol Lab Med* 1999; 123: 1002-5.
3. Moore DF, Curry JL. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* directly from sputum sediments by ligase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 1028-31.
4. American Thoracic Society Workshop, Medical Section of the American Lung Association. Rapid diagnostic tests for tuberculosis. What is the appropriate use? *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1804-14.
5. Pai S, Esen N, Pan X, Musser JM. Routine rapid *Mycobacterium* species assignment based on species-specific allelic variation in the 65 kilodalton heat shock protein (hsp65). *Arch Pathol Lab Med* 1997; 121: 859-64.
6. 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.
7. Ergin A, Kocagoz T, Us D. Evaluation of 120 mycobacterial strains isolated from clinical specimens to the species level by polymerase chain reaction-restriction enzyme analysis. *Scand J Infect Dis* 2000; 32: 657-62.
8. Metchock BG, Nolte FS, Wallace Jr RJ. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH, eds. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press, 1999: 399-437.
9. Mijs W, De Vreese K, Devos A, et al. Evaluation of a commercial line probe assay for identification of *Mycobacterium* species from liquid and solid culture. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002; 11: 794-802.
10. Ramaswamy S, Musser JM. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber Lung Dis* 1998; 79: 3-29.

11. **Kocagöz T.** *Mycobacterium tuberculosis* için uygulanan fenotipik ve genotipik direnç testleri. 4. *Ulusal Mikobakteri Simpozyumu Kitabı*'nda. **2002**; 115-124.
12. **Fluit C, Visser MR, Schmitz J.** Molecular detection of antimicrobial resistance. *Clin Microb Rev* **2001**;14: 836-71.
13. **Telenti A, Persing DH.** Novel strategies for the detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* **1996**; 147: 73-9
14. **Torres MJ, Criado A, Palomares JC, Aznar J.** Use of real-time PCR and fluorimetry for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 3194-9.
15. **Kocagöz T, Sanbaş Z.** Rapid determination of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* by PCR and fluorescence resonance energy transfer. 2. *Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi (2002, Antalya)* kitabında. **2002**: 16.
16. **Gillespie SH, Dickens A, McHugh TD.** False molecular clusters due to non random association of IS 6110 with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **1994**; 32: 277-84.
17. **Durmaz R.** *Mycobacterium tuberculosis* suşlarının genotiplendirilmesi: IS6110 ve pTBN12-fingerprinting, Durmaz R, ed. *Uygulamalı Moleküler Mikrobiyoloji*'de. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri, **2001**: 181.
18. **Soini H, Pan X, Amin A, Graviss EA, Siddiqui A, Musser JM.** Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* isolates from patients in Houston, Texas, by spoligotyping. *J Clin Microbiol* **2000**; 38: 669-76.
19. **Cowan LS, Mosher L, Diem L, Massey JP, Crawford JT.** Variable-number tandem repeat typing of *Mycobacterium tuberculosis* isolates with low copy numbers of IS6110 by using mycobacterial interspersed repetitive units. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 1592-602.
20. **Kivi M, Liu X, Raychaudhuri S, Altman RB, Small PM.** Determining the genomic locations of repetitive DNA sequences with a whole-genome microarray: IS6110 in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* **2002**; 40: 2192-8.
21. **Mikhailovich V, Lapa S, Gryadunov D, et al.** Identification of rifampin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains by hybridization, PCR, and ligase detection reaction on oligonucleotide microchips. *J Clin Microbiol* **2001**; 39: 2531-40.